



FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

EL EFECTO DEL ESTRÉS
OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN
DE LA OXIDASA ALTERNA DE
Ustilago maydis

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

ERICK SIERRA CAMPOS

DIRECTOR: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Facultad de Medicina



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

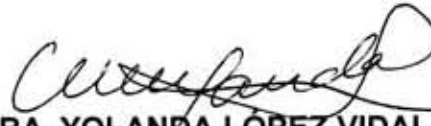
PDCB/grad/084Jur/2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 238a del 25 de marzo de 2009, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ERICK SIERRA CAMPOS**, con número de cuenta **50500822-6**, con la tesis titulada **"EL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN DE LA OXIDASA ALTERNA DE USTILAGO MAYDIS"**, dirigida por el Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.

Presidente: Dr. Antonio Peña Díaz
Secretario: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Vocal: Dr. Rafael Moreno Sánchez
Vocal: Dr. José Edgardo Escamilla Marvan
Vocal: Dra. Irma Romero Álvarez

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, a 14 de octubre de 2009.


DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA


DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.
Coordinación de PDCB

MMF/YLV/evb

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcab.unam.mx> E-mail: pdcab@servidor.unam.mx

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Federico Martínez M	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado por el CONACYT (59855) y por DGAPA, UNAM (IN219107-3). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por el CONACYT con No. de registro 175144 y una beca complemento de la DGEP, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por abrirme las puertas y contribuir a mi formación académica.

Al CONACYT y a la DGEP, UNAM por el apoyo económico recibido durante mi estancia doctoral.

Yo expreso mi gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera participaron en esta investigación.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Pablo Pardo V por la gran oportunidad de permitirme desarrollar este proyecto y formar parte de su excelente equipo de trabajo. Muchas gracias por su gran asesoría científica y apoyo en todo momento.

A los miembros de mi jurado: Dr. Rafael Moreno, Dra. Irma Romero, Dr. Antonio Peña y al Dr. José Edgardo Escamilla, quienes con sus acertados comentarios y sugerencias enriquecieron el contenido y la presentación final de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Isabel Velázquez L por su gran ayuda en la mayor parte del proyecto. Gracias por ser una excelente amiga y compañera de trabajo.

Agradezco a Deyamira Matus M por su excelente ayuda en los experimentos, principalmente con la determinación del glutatión.

Como olvidar a la chica rebelde, de ideas revolucionarias y afable personalidad. Gracias Alexa por todos los momentos coquetos.

Estoy muy agradecido con el Dr. Federico Martínez y el Dr. Diego González por las buenas sugerencias y discusiones realizadas durante el desarrollo de este proyecto.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Patricia del Arenal y al Dr. Juan Luís Rendón por permitirme trabajar en su laboratorio y oficina en un ambiente de cordialidad. Como olvidar las galletitas del medio día.

Agradezco al Dr. Federico Martínez y su gran grupo de trabajo por permitirme tener acceso a su material. Especialmente a Tere, Rebe, Jessica, Lupita y Oscar quienes me hicieron disfrutar de excelentes momentos durante mi estancia en el departamento de Bioquímica.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos: Patricia, Genaro, Alberto, Héctor, y demás camaradas que conocí durante los buenos cursos de cinética y estrés oxidativo.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a todas las personas del departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, por sus cordiales saludos y su ayuda en la parte administrativa.

Finalmente, de manera muy personal quiero agradecer a mi familia y grandes amigos:

A mi esposa Móni por alentarme en todo momento. Tú eres lo más lindo de mi vida.

A mis padres María Eugenia y Salomón por mostrarme el camino de la disciplina, el cariño y el respeto hacia el trabajo y darme la oportunidad de conocer nuevos horizontes.

A mis hermanos Sandra y Jerry por los bonitos momentos que me hacen olvidar los libros por un buen rato. Con mucho cariño para mi sobrina Catherine, por sus travesuras y juegos en el patio.

A mis amigos, Martita, Vero, Januaria, Jaime, Atahualpa, Carlos,.....por sus llamadas, e-mails y mensajes de texto que me hacen recordar los buenos tiempos en Morelia.

A todos los cuates de las canchas de Ingeniería, UNAM. Por los buenos partidos de basquetbol de cada fin de semana. Fueron una excelente terapia contra el estrés.

**EL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN DE LA
OXIDASA ALTERNA DE *Ustilago maydis***

	Página
ÍNDICE	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	10
I. Las especies reactivas	10
a. El radical superóxido	11
b. El peróxido de hidrógeno	12
c. El radical hidroxilo	13
d. El óxido nítrico y sus derivados	13
II. Los sistemas celulares para la detoxificación de especies reactivas	16
III. La mitocondria	17
IV. Los inhibidores clásicos de los complejos respiratorios	18
V. La producción de ROS en la mitocondria	19
VI. El sistema antioxidante mitocondrial	21
VII. Los componentes alternos	22
VIII. Características estructurales y catalíticas de la oxidasa alterna	24
IX. Las AOX de hongos	27
X. Diferencias regulatorias entre las AOX de plantas y hongos	29
XI. Importancia de la AOX como un componente del sistema antioxidante	30
XII. <i>Ustilago maydis</i> como modelo de estudio	31
a. El ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	31
XIII. El sistema antioxidante de <i>U. maydis</i>	34
XIV. La oxidasa alterna de <i>U. maydis</i>	35

HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
I. Reactivos	40
II. Cultivos celulares	40
III. Sensibilidad al estrés nitrosante	40
IV. Evaluación morfológica con calcofluor	41
V. Preparación mitocondrial	41
VI. Determinación de proteína por el método de Biuret	41
VII. Medición del potencial de membrana	41
VIII. Determinación de la respiración mitocondrial	42
IX. Detección del peróxido de hidrógeno mitocondrial	42
X. Ensayo de glutatión total	42
XI. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida e inmunodetección	43
XII. Western blot para nitrotirosinas y nitrocisteínas	43
XIII. Determinación de la peroxidación de lípidos	44
RESULTADOS	45
1. El octil galato inhibe el crecimiento y estimula el cambio morfológico	46
2. Integridad de las mitocondrias aisladas de <i>U. maydis</i>	51
3. Inducción de la expresión de la AOX por antimicina A	55
4. Estimulación de la respiración alterna por AMP y piruvato	56
5. Relación entre la actividad de la AOX y la producción mitocondrial de ROS	59
6. Efecto del estrés nitrosante sobre la respiración celular de <i>U. maydis</i>	65
7. Sensibilidad de los componentes respiratorios al estrés nitrosante	70
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIÓN	81

PERSPECTIVAS 82

REFERENCIAS 83

APÉNDICE 102

1. Functional properties of the *U. maydis* AOX under oxidative stress conditions
2. Induction of morphological changes in *U. maydis* cells by octyl gallate
3. The relationship between the antioxidant system and the virulence from fungal pathogens
4. Effect of nitrosative stress on *U. maydis*: irreversible inhibition of complex I by intracellular peroxynitrite

RESUMEN

La oxidasa alterna (AOX) está presente en las mitocondrias de plantas, hongos y algunos protistas y animales. Esta enzima transfiere directamente los electrones del ubiquinol hacia el oxígeno sin contribuir en la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial. La AOX participa en las respuestas al estrés, la muerte celular programada y en mantener el balance redox de la célula. *Ustilago maydis* aumenta la expresión de la AOX cuando se expone a diferentes condiciones de estrés. Para investigar la relevancia funcional de la AOX en el estrés oxidativo, las células levaduriformes de *U. maydis* se cultivaron en presencia de antimicina A y de óxido nítrico. Las actividades de las vías de los citocromos y alterna se cuantificaron polarográficamente utilizando sustratos respiratorios e inhibidores específicos para cada vía. Los resultados indican que en las células control (no inducidas), la AOX tiene una baja participación en la respiración celular. Además, en las mitocondrias energizadas con succinato como sustrato respiratorio, la actividad de esta enzima se incrementó por la adición del piruvato ($K_{05} = 2.6$ mM) y de nucleótidos de purina (AMP, $K_A = 600$ μ M). A pesar de tener una función antioxidante, debido a su baja actividad y abundancia, la AOX no evita la producción de ROS cuando la antimicina A se adiciona a las mitocondrias aisladas. Este último resultado está relacionado con el aumento en los niveles de lipoperoxidación y con la disminución en el glutatión total. Asimismo, el aumento de las ROS promueve la inactivación de la AOX mediante la oxidación de la membrana. Cuando las células de *U. maydis* se cultivaron con antimicina A, la cantidad de AOX en la mitocondria aumentó de 2.5 a 3 veces y su sensibilidad al AMP y al piruvato se modificó completamente, sugiriendo que eventos post-traduccionales pueden estar modificando la regulación de la actividad de la AOX bajo condiciones de estrés oxidativo.

También se analizó el efecto del óxido nítrico (NO^{\cdot}) sobre la actividad de la AOX y la vía de los citocromos en mitocondrias aisladas y en células cultivadas con nitritos (donador de NO^{\cdot}). Los resultados muestran que en las mitocondrias aisladas de *U. maydis*, el NO^{\cdot} inhibe reversiblemente la vía de los citocromos y disminuye el potencial de membrana, pero no afecta la actividad de la AOX. Mientras que en las células cultivadas con nitritos se encontró que el NO^{\cdot} induce las actividades de la AOX y de la NADH deshidrogenasa alterna, pero inactiva al complejo I, posiblemente por

modificación química a través de la nitración de tirosinas y S-nitrosilación de cisteínas en algunas subunidades importantes en la catálisis.

Finalmente, en este trabajo se valoró el efecto de diferentes inhibidores de la AOX sobre la viabilidad de *U. maydis*. El nOg indujo el cambio morfológico de levadura a pseudomicelio probablemente a través de la formación de peróxidos de lípidos y del colapso del potencial de membrana mitocondrial. Por tanto, este compuesto tiene múltiples blancos en el hongo.

En *U. maydis*, el estrés oxidativo tiene un fuerte impacto sobre la viabilidad celular e induce una respuesta adaptativa que depende de la intensidad y del tipo de estrés. Un excelente ejemplo son los cambios en la expresión y actividad de la AOX cuando las células se cultivaron en presencia de antimicina y nitritos. Sin embargo, en algunos casos, la expresión de enzimas antioxidantes no es suficiente para mantener la viabilidad de la célula y son necesarios severos cambios morfológicos y metabólicos, como en el caso de las células cultivadas con nOg.

ABSTRACT

The alternative oxidase (AOX) is present in mitochondria of plants, fungi and some yeast. This enzyme transfers electrons directly from ubiquinol to oxygen without help in the transfer of protons through the mitochondrial membrane. The AOX is involved in stress responses, programmed cell death and to maintain the redox balance of the cell. *Ustilago maydis* expresses AOX when cells are exposed to different stress conditions. To investigate the functional relevance of the AOX in oxidative stress, yeast cells of *U. maydis* were grown in the presence of antimycin A and nitric oxide. The activities of cytochromes routes and alternates were quantified polarographically using respiratory substrates and specific inhibitors for each pathway. The results indicate that in control cells (not induced), the AOX is constitutive and has a low participation in cellular respiration. Also in mitochondria energized with succinate as respiratory substrate, the activity of this enzyme is increased by the addition of pyruvate ($K_{05} = 2.6$ mM) and purine nucleotides (AMP, $K_A = 600$ microM). Despite having an antioxidant function, reduced activity and low amount of protein in isolated mitochondria, is not sufficient to prevent the production of ROS when antimycin A was added. The latter result confirmed the increased levels of lipoperoxidation and the decrease in total glutathione. Then the increase of ROS promotes the inactivation of the AOX by oxidation of the membrane. When cells of *U. maydis* were cultured with antimycin A, the amount of AOX in mitochondria increased from 2.5 to 3 times and its sensitivity to AMP and pyruvate were changed completely, suggesting that post-translational events may be changing the regulation of AOX activity under oxidative stress conditions.

It also examined the effect of nitric oxide (NO \cdot) on the activity of the AOX and the cytochrome pathway in isolated mitochondria and cells cultured with nitrite (NO \cdot donor). The results show that in mitochondria isolated from *U. maydis*, NO \cdot reversibly inhibits cytochrome pathway and decreases the membrane potential, but does not affect the activity of AOX. While in cells grown with nitrite was found that the NO \cdot induce the activities of AOX and alternative NADH dehydrogenase, but I probably inactivates the complex by chemical modification via tyrosine nitration and S-nitrosylation of cysteines in some subunits involved in catalysis.

Finally in this thesis we have evaluated the effect of different AOX inhibitors on the viability of *U. maydis*. The nOg induced morphological change of yeast to pseudomycelia probably through the formation of lipid peroxides and the uncoupling of

mitochondrial membrane potential. Therefore, this compound has multiple targets in cellular membranes of this fungus.

In *U. maydis*, oxidative stress has a strong impact on cell viability and induces an adaptive response that depends on the intensity and type of stress. An excellent example is the changes in expression and AOX activity when cells were cultured in the presence of antimycin A and nitrites. However, in some cases, the expression of antioxidant enzymes is not sufficient to maintain cell viability and morphological change is necessary as in the case of cells cultured with nOg.

ABREVIATURAS

AMP	Adenosín monofosfato
AOX	Siglas en inglés de oxidasa alterna
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CCCP	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
COX	Citocromo c oxidasa
DTNB	5,5'-Ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EGTA	Ácido glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N, N',N'-tetracético
FAD ⁺	Flavín adenín dinucleótido
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FMN	Flavín mononucleótido
GSH	Glutatió n reducido
GSSG	Glutatió n oxidado
GSNO	S-Nitrosoglutatió n
HEPES	N-2-Hidro-etil-piperazona-N'-2-ácido etanosulfónico
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dicloro-dihidrofluoresceína diacetato
HClO ₄	Ácido perclórico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
LPO	Siglas en inglés de peróxidos de lípidos
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NO [·]	Óxido nítrico
NOO [·]	Peroxinitrito
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
nOg	n-Octil galato
nPg	n-Propil galato
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
PVDF	Polivinil dieno difluoruro
Q	Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
QH [·]	Semiubiquinona
ROS	Siglas en inglés de especies reactivas de oxígeno

RNS	Siglas en inglés de especies reactivas de nitrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Siglas en inglés de la electroforesis en geles de poliacrilamida com SDS
SNAP	S-Nitroso-Nacetilpenicilamina
SIN-1	1,3-(4-morfolinil)sidnonimina
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
THBP	<i>tert</i> -butil-hidroperóxido
UCP	Siglas en inglés de proteína desacoplante

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas

Los organismos aerobios requieren mantener un ambiente redox intracelular apropiado para disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Debido a su configuración electrónica, el oxígeno molecular (O_2) es propenso a ganar electrones y, por tanto, es un potente oxidante. Sin embargo, consideraciones cinéticas limitan la reactividad del O_2 . Durante los procesos respiratorios, el O_2 se reduce progresivamente por un suplemento controlado de cuatro electrones para producir agua, pero la reducción incompleta del O_2 es posible y provoca la formación de entidades químicas que actúan como potentes oxidantes. A estas moléculas se les conoce como ROS. La reducción del O_2 por uno, dos o tres electrones genera sucesivamente el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), respectivamente (Figura 1). El anión $O_2^{\cdot-}$ puede ser protonado a pH ácido ($pK_a = 4.8$) para formar el radical perhidroxilo ($\cdot HO_2$) o dismutar para producir H_2O_2 . El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, en la presencia de metales de transición como el Fe^{2+} o Cu^+ , H_2O_2 produce el radical $\cdot OH$ a través de la reacción de Fenton o de Haber-Weiss. Además, otro tipo de especies se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno como el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno singulete, 1O_2 . (Figura 1).

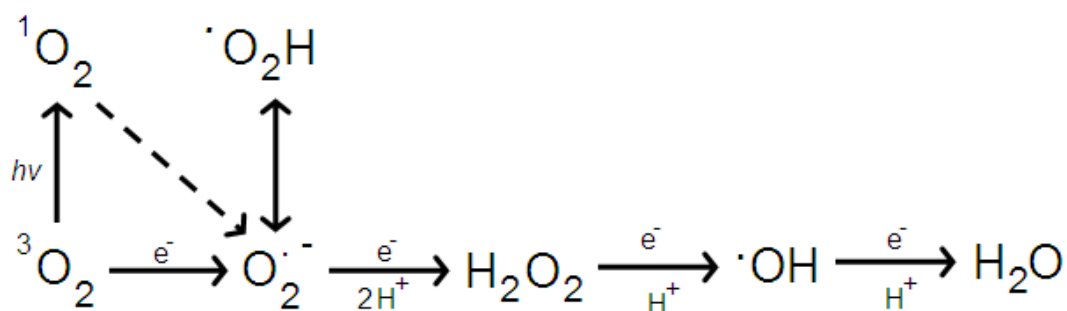


Figura 1. Formación de las diferentes ROS por la reducción secuencial del oxígeno molecular.

Tradicionalmente se considera que los ROS son subproductos indeseables del metabolismo aerobio, que oxidan las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos (Vaughan, 1997). La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas mitocondriales comienza por la sustracción de un átomo de hidrógeno por las ROS, principalmente por el radical $\cdot OH$, y produce aldehídos, alquenes e

hidroxialquenos. Es interesante mencionar que la inhibición de la cadena respiratoria con antimicina A genera hidroxialquenos que reaccionan con las proteínas que contienen ácido lipoico (Sweetlove y cols., 2002). También las proteínas se dañan por otros mecanismos como la oxidación de aminoácidos (Cys, Met, Arg, Lys y Thr) (Berlett y Stadtman, 1997) y la interacción de las ROS con los cofactores metálicos, como los centros hierro-azufre de la aconitasa (Verniquet y cols., 1991; Flint y cols., 1993). A pesar de que las ROS y las RNS son tóxicas, también participan en eventos de señalización y defensa de muchos organismos (Allan y Fluhr, 1997; Egan y cols., 2007; Hancock y cols. 2001). Para ello, las células requieren de al menos dos diferentes mecanismos para regular la concentración intracelular de estas especies, uno para modular la producción de bajos niveles de ROS para eventos de señalización y el otro para la detoxificación del exceso de ROS, especialmente durante las condiciones de estrés. Además, los diferentes tipos de ROS que se producen y el balance entre sus niveles están determinados por la interacción entre los mecanismos de su producción y detoxificación, los cuales varían según las condiciones fisiológicas del organismo y la integración de los diversos estímulos bioquímicos y ambientales.

La concentración de O_2 en las células de mamífero es de 10 μM y se estima que la de O_2^- está en el intervalo de 0.001-0.01 nM y la de H_2O_2 de 1 a 100 nM (Nivière y Fontecave, 1995).

El radical superóxido (O_2^-).

El O_2^- es el radical libre que mejor se conoce de todas las especies derivadas del oxígeno, quizás por ser el primer intermediario en la reducción univalente del O_2 hacia la formación de H_2O . El anión O_2^- puede formar otras especies reactivas como el HO^\bullet , el H_2O_2 y el HO_2^\bullet . La principal característica del anión O_2^- es su capacidad para actuar como una base de Brönsted, por lo cual, en medio acuoso, el equilibrio ácido-base se desvía hacia la formación de HO_2^\bullet (Figura 1). En un ambiente ácido, el anión O_2^- se dismuta a H_2O_2 , mientras que a pH neutro o alcalino, la dismutación del anión O_2^- es catalizada por las superóxido dismutasa (SOD).

In vivo, el O_2^- se produce enzimática y no enzimáticamente. Las fuentes enzimáticas incluyen a las NADPH oxidasas, localizadas en la membrana plasmática de los polimorfonucleares, los macrófagos y las células endoteliales, y a las oxidasas dependientes del citocromo P_{450} . La conversión proteolítica de la xantina

deshidrogenasa hacia xantina oxidasa provee otra fuente enzimática de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 , por lo que se ha propuesto que esta conversión está involucrada en procesos dañinos *in vivo*.

La producción no enzimática de $O_2^{\cdot-}$ ocurre cuando un electrón se transfiere directamente hacia el oxígeno por coenzimas o grupos prostéticos reducidos (flavinas y centros hierro-azufre) o por los xenobióticos previamente reducidos por ciertas enzimas (el agente anticancerígeno adriamicina o el herbicida paraquat). La cadena de transporte de electrones contiene diversos centros redox que pueden perder electrones hacia el oxígeno, constituyendo la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ en muchos sistemas biológicos (Turrens, 2003).

El $O_2^{\cdot-}$ es más selectivo en su reactividad que el HO^{\cdot} y paradójicamente es potencialmente más dañino. Así, el $O_2^{\cdot-}$ puede disminuir la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peróxidasa. En *Escherichia coli* diversas enzimas que contienen un centro hierro-azufre en su sitio activo se inactivan por el $O_2^{\cdot-}$, por ejemplo, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la aconitasa, la fumarasa y la dihidroxiácido deshidratasa (Flint y cols., 1993). Así, el metabolismo energético en el ciclo de Krebs es uno de los principales blancos del $O_2^{\cdot-}$. Otras proteínas que se afectan por el $O_2^{\cdot-}$ son la ribonucleótido reductasa y la calcineurina, esta última involucrada en la transducción de señales.

Además, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con otros radicales que incluyen al óxido nítrico (NO^{\cdot}) en una reacción controlada por la velocidad de difusión de ambos radicales, produciendo el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es un oxidante muy fuerte (Beckman y Koppenol, 1996).

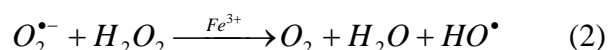
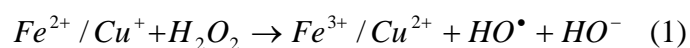
El peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El H_2O_2 se produce principalmente por la dismutación del anión $O_2^{\cdot-}$ por las SOD. Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, es la especie reactiva de oxígeno que más se ha estudiado, debido a su capacidad para difundir a través de las membranas con relativa facilidad y por su participación en la iniciación de la citotoxicidad de los radicales libres. Asimismo, es un oxidante de importancia biológica, debido a su capacidad para generar el radical HO^{\cdot} a través de su interacción con los metales de transición y con el HOCl por acción de la mieloperoxidasa.

Por otro lado, el H₂O₂ se ha implicado recientemente como un mensajero intracelular que afecta diversos procesos celulares, que incluyen la fosforilación, la transcripción y la apoptosis (Goo, 1999).

El radical hidroxilo (HO•).

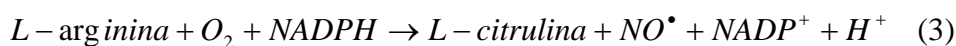
El HO• se considera el oxidante más potente en los sistemas biológicos e interactúa con muchos compuestos orgánicos (principalmente lípidos) a velocidades limitadas por la difusión. La producción de este radical en la célula puede ocurrir por diversas rutas, aunque las dos principales son la reacción del H₂O₂ con los iones metálicos (Fe²⁺ o Cu⁺), frecuentemente unidos a diferentes proteínas y otras moléculas, vía la reacción de Fenton (reacción 1) y por la interacción del anión O₂⁻ con el H₂O₂ a través de la reacción de Haber-Weiss (reacción 2).



Además, el Fe (II) se puede liberar de algunas proteínas tales como la ferritina y diferentes deshidrogenasas a través de la oxidación de sus centros [4Fe-4S]. Este mecanismo es específico para las células y por tanto se conoce como la reacción de Haber-Weiss *in vivo* (Fridovich, 1999). El HO• produce alteraciones en la estructura de las proteínas, como la albúmina y la colágena, provocando que sean más susceptibles a la degradación proteolítica.

El óxido nítrico (NO•) y sus derivados.

El NO• es un radical libre que se produce como un contaminante ambiental por las actividades industriales y a través de algunas actividades biológicas, principalmente por la desnitrificación bacteriana. En los mamíferos, el NO• se sintetiza enzimáticamente a partir de la L-arginina por las óxido nítrico sintasas (NOS) (reacción 3) (Bredt, 1999).



El NO[•] tiene diversas funciones fisiológicas que incluyen la transducción de señales, la regulación enzimática y como parte de la respuesta inmune. Además, el NO[•] funciona como un mensajero intercelular debido a su capacidad para difundir a través de las membranas biológicas y puede, por tanto, transmitir las señales a otras células. El NO[•], a concentraciones fisiológicas (10-100 nM), es poco reactivo y muchas de sus funciones fisiológicas son mediadas a través de su unión al Fe (II) en el grupo hemo de la guanilato ciclasa formando el aducto nitrosil-hierro (Fe-NO) (Ignarro, 1996).

El NO[•] participa en algunas respuestas fisiológicas en las plantas, que incluyen: la respuesta a patógenos, la muerte celular programada, el crecimiento, la germinación, la producción de fitoalexinas y la emisión de etileno (Crawford y Guo, 2005). En contraste al gran conocimiento que se tiene de los mecanismos de producción de NO[•] en los mamíferos, la fuente del NO[•] en las plantas está actualmente en controversia (Wojtaszek, 2000; Yamasaki y cols., 2000). Aunque hay reportes que sugieren que las plantas contienen una NOS semejante a la de mamíferos, ningún gen o proteína de la NOS se ha aislado de las plantas (Wojtaszek, 2000; Yamasaki y cols., 2000). Además, la única enzima constitutiva de plantas que produce NO[•] es la nitrito reductasa. Las mitocondrias de plantas producen NO[•] a partir de nitritos (Tischner y cols., 2004; Planchet y cols., 2005). Sin embargo, se necesitan condiciones anaerobias para detectar cantidades apreciables de NO[•]. Además, los inhibidores de la cadena respiratoria inhiben la síntesis de NO[•].

Las consecuencias biológicas de la producción de NO[•] en los sistemas celulares se controlan por una serie de reacciones entre el NO[•] y el O₂, las ROS, los metales de transición y los grupos tioles (Stamler y cols., 2001). Tales reacciones producen varias RNS, como los complejos nitrosil-metal, los S-nitrosotioles, los trióxidos de dinitrógeno (N₂O₃) y el peroxinitrito (ONOO⁻). Al igual que las ROS, las RNS dañan y matan a la célula por diversos mecanismos como la inactivación de la cadena respiratoria (Brown, 1999) y de otras enzimas (Beltrán y cols., 2000), la modificación irreversible y degradación del DNA (Burney y cols., 1999), de las proteínas (Tien y cols., 1999) y de los lípidos de las membranas (Goss y cols., 1999).

En los sistemas biológicos el NO[•] reacciona con el O₂, el O₂⁻ y con los metales de transición. La reacción del NO[•] con el O₂ genera compuestos NO_x que incluyen el dióxido de nitrógeno (NO₂), el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y el tetraóxido de

dinitrógeno (N_2O_4), los cuales pueden reaccionar con las aminas y los tioles de las proteínas o se hidrolizan para formar nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-).

La reacción del NO^\cdot con el O_2^- produce el $ONOO^-$, un potente oxidante que ocasiona daño celular a través de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, de liberar los iones cobre de la ceruloplasmina, de nitrosilar los residuos de tirosina de diferentes proteínas, o que puede descomponerse para producir otras especies más dañinas (HO^\cdot y NO_2^\cdot). El $ONOO^-$ inhibe diversas enzimas, entre las que se incluyen el complejo I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, la aconitasa y la ribonucleótido reductasa (Stewart y Heales, 2003). Por tanto, la toxicidad del NO^\cdot está parcialmente mediada por el $ONOO^-$.

La pérdida de un electrón del NO^\cdot produce el catión nitrosonio (NO^+), el cual puede nitrar los centros que contienen azufre, oxígeno, nitrógeno y carbonos aromáticos. Así, la nitración de los grupos sulfhidrilo (S-nitración) de las enzimas resulta en modificaciones químicas reversibles que pueden afectar su actividad. Por tanto, este proceso de S-nitración/desnitración en las proteínas es un importante mecanismo en la transducción de señales.

La ganancia de un electrón por parte del NO^\cdot genera el anión nitroxilo (NO^-). En los sistemas biológicos, el NO^- se produce directamente de la reacción de la NOS, por la descomposición de los nitrosotioles (RSNO) y de la reducción del NO^\cdot por el ubiquinol, la hemoglobina y el Fe (II) del centro hemo del citocromo c. Además, el anión NO^- puede convertirse en NO^\cdot al ser oxidado por el oxígeno, la metahemoglobina, las flavinas y las SOD-CuZn. El NO^- también forma complejos fierro-nitroxilo con las proteínas que contienen grupos hemo o fierro, lo cual altera su estructura y su función.

Además, el NO^\cdot afecta varios procesos de la transducción de energía en la mitocondria, debido a que inhibe el consumo de oxígeno a través de la inhibición de la citocromo c oxidasa (COX) en las células de mamífero y planta (Shiva y cols., 2001; Millar y Day, 1996), lo que resulta en una disminución del potencial de membrana, del cociente ATP/ADP y de la síntesis de ATP (Brookes y cols., 2002).

No todas las ROS son radicales. Por ejemplo, el O_2 es un di-radical que tiene dos electrones no apareados, el O_2^- y el OH^\cdot son también radicales, pero el H_2O_2 no es un radical (Tabla 1). En analogía con el estrés oxidativo, el término estrés nitrosante se utiliza para definir una formación excesiva y desregulada de óxido nítrico y de otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Hausladen y Stamler, 1999).

Tabla 1. Radicales libres de oxígeno y nitrógeno

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

<i>Radicales</i>	<i>No radicales</i>
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Ácido hipobromoso, HOBr
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Ozono, O_3
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Oxígeno singulete,

Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

Óxido nítrico, NO^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrógeno, NO_2	Catión nitrosilo, NO^+
	Anión nitroxilo, NO^-
	Tetróxido de dinitrógeno, N_2O_4
	Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
	Catión nitrilo, NO_2^+
	Peroxinitritos de alquilo, $ROONO$

Los sistemas antioxidantes

Para protegerse de las ROS y RNS, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos no enzimáticos y enzimáticos que eliminan estos compuestos. Entre las principales enzimas antioxidantes de los organismos aerobios se encuentran las superóxido dismutasas, las glutatión peroxidadas, las tioredoxina peroxidadas, las catalasas, las glutatión S-transferasas, las tiol peroxidadas, las flavohemoglobinas, la citocromo c peroxidasa y las peroxiredoxinas (Figura 2). Otras moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la trehalosa, el manitol, las melaninas y otros metabolitos completan la maquinaria de destoxificación que previene la acumulación de especies reactivas y repara las moléculas dañadas. Aunque estos antioxidantes efectivamente neutralizan los oxidantes, su eficiencia es mucho mayor si trabajan juntos, lo cual puede proveer una ventaja evolutiva. Además, cada conjunto de antioxidantes realiza una

función particular en cada uno de los diferentes compartimientos de la célula o en distintas condiciones.

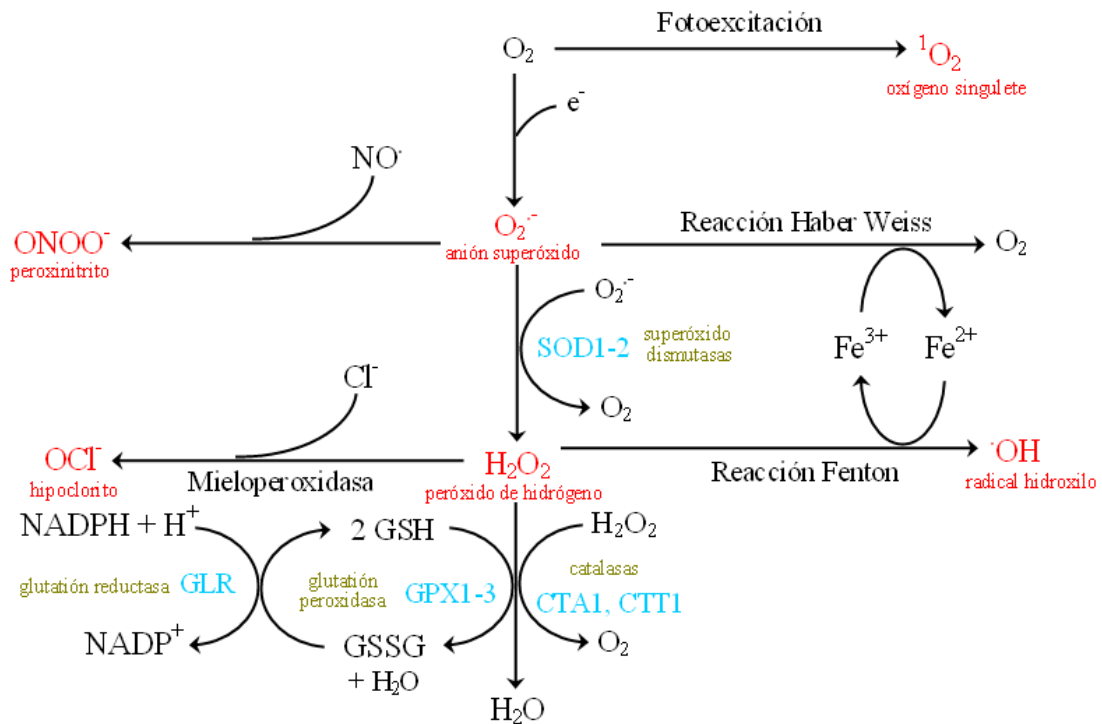


Figura 2. Especies reactivas generadas por las células. Las RNS y ROS se muestran en rojo, las principales enzimas antioxidantes en verde y los genes que codifican para estas enzimas en levadura en azul. La mieloperoxidasa es una enzima de neutrófilos que participa en la defensa contra microorganismos. Modificada de Temple y cols., 2005.

La mitocondria

Las mitocondrias generan energía en la forma de un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu H^+$), que se utiliza para la síntesis de ATP, el transporte de iones y el metabolismo (Skulachev, 1994). La generación del $\Delta\mu H^+$ ocurre a través de una serie de reacciones de oxido-reducción en los complejos de la cadena respiratoria que se localizan en la membrana interna mitocondrial.

La cadena de transporte de electrones y el sistema de fosforilación están constituidos por más de 80 componentes proteicos que forman cinco complejos: el complejo I (NADH deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa), el complejo IV (citocromo c

oxidasa), el complejo V (F₁F₀-ATP sintasa) y de componentes móviles, la ubiquinona y el citocromo c.

La oxidación de moléculas, como los carbohidratos, los lípidos y las proteínas en el metabolismo celular, producen la transferencia de electrones al NAD⁺ y FAD. Estos cofactores reducidos (NADH y FADH₂) posteriormente donan sus electrones a los complejos I y II, respectivamente.

El NADH transfiere los electrones al complejo I para producir ubiquinol, el cual transfiere sus electrones al complejo III para reducir al citocromo c, que posteriormente pasa sus electrones al complejo IV para la reducción completa del O₂ (Figura 3). Cada uno de estos complejos bombea protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal acoplado al flujo de electrones, para generar un ΔμH⁺ de -180 a -220 mV y un gradiente de pH de 0.4 a 0.6 unidades a través de la membrana interna. Por último, el gradiente se utiliza para la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico en el complejo V o el transporte de proteínas, lo cual permite mantener activas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a la β-oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, este organelo es la principal fuente intracelular de ROS y es muy vulnerable al daño oxidativo por radicales libres (Ott y cols., 2007). Además de su función en la síntesis de ATP, las mitocondrias participan en la señalización celular (Logan y Knight, 2003) y en la muerte celular programada (Youle y Karbowski, 2005).

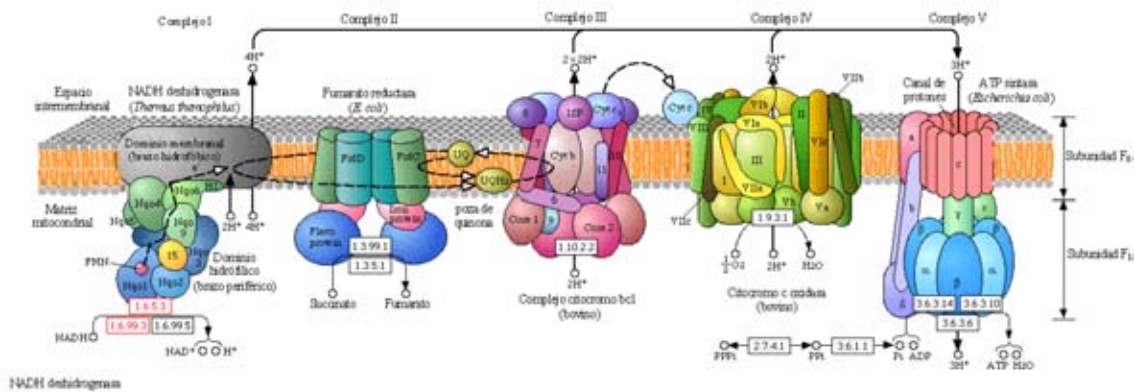


Figura 3. Cadena respiratoria clásica de mamíferos. La cadena de transporte de electrones está compuesta por cuatro complejos (I-IV) y la F₁F₀-ATPasa (complejo V), la ubiquinona y el citocromo c. Tomado de <http://www.genome.d.jp/kegg/pathway.html>

Los inhibidores de los complejos mitocondriales

Los inhibidores respiratorios han permitido conocer la secuencia de acarreadores redox en la cadena respiratoria y su participación en la producción de ROS. Existen diferentes compuestos que afectan de manera específica la actividad de cada complejo. El complejo I se inhibe por más de 60 diferentes compuestos (Degli-Esposti, 1998), los cuales se agrupan en tres clases (A, B y C) con base en sus efectos sobre la cinética de la enzima, teniendo como prototipos a la piericidina A, a la rotenona y a la capsaicina, respectivamente. El complejo II se inhibe por el malonato, el ácido 3-nitropropiónico y por oxaloacetato. Para el complejo III existen dos grupos de inhibidores, los cuales se clasifican en inhibidores del sitio Q_N y Q_P (Brand y Trumpower, 1994). El mixotiazol, la estigmatelina y la mucidina son inhibidores de la oxidación del QH_2 en el sitio Q_P , y la antimicina, el diurón y el N-óxido de 2n-heptil-4-hidroxiquinolina son inhibidores de la reducción de la Q en el sitio Q_N . En el caso del complejo IV, los inhibidores son el cianuro, la azida y el monóxido de carbono, los cuales bloquean su interacción con el oxígeno. Por último, el complejo V se inhibe con oligomicina, el cual se une a la subunidad OSCP del componente F_0 .

La producción de ROS en la mitocondria

Teóricamente, el oxígeno puede sufrir la reducción monovalente para generar el anión superóxido en todos los componentes de la cadena respiratoria, pero la formación de radicales superóxido no ocurre a nivel de la citocromo c oxidasa. No obstante, del 1 al 2 % del oxígeno reducido por la mitocondria se convierte en $O_2^{\cdot-}$. Esta producción puede ocurrir a nivel del complejo I (Figura 5) (Turres y Boveris, 1980), o en el complejo III (Cadenas y cols., 1977; Turrens, 2003). Además, el componente de deshidrogenasa del complejo II produce $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de un aceptor de electrones (Zhang y cols., 1998). La mayoría de los estudios realizados sobre la generación de ROS en la mitocondria de mamífero han utilizado inhibidores de la cadena respiratoria como una herramienta para optimizar la producción de ROS y poder identificar los potenciales sitios de producción. Estos estudios sugieren que la inhibición del complejo I con rotenona y del complejo III de la cadena con antimicina A, inducen una alta producción de ROS (Turres, 1997; Murphy y cols., 1999; Lenaz, 2001). Enfoques similares se han utilizado para el estudio de las ROS en mitocondrias de plantas y hongos (Pastore y cols., 2007; Affourtit y cols., 2000). Sin embargo, no existe información con respecto a los sitios de producción de ROS en ausencia de los

inhibidores para ningún organismo (Sipos y cols., 2003). Además de la cadena respiratoria, una cantidad significativa de ROS puede ser producida por la α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs (Starkov y cols., 2002; Tretter y Adam.Vizi, 2004) y por la monoamino oxidasa localizada en la membrana externa mitocondrial (Figura 5) [Andreyev y cols., 2005]. También se sabe que las flavinas reducidas (Massey, 1994) y las flavoproteínas (Bunik y Sievers, 2002) pueden generar $O_2^{\cdot-}$ en solución acuosa. La lactato deshidrogenasa (Chan y Bieski, 1974) y la gliceraldehído 3P deshidrogenasa (Chan y Bielski, 1980) producen $O_2^{\cdot-}$, pero su participación en la producción total de ROS es baja. Recientemente se reportó que los componentes alternos son posibles fuentes de ROS. La NADH deshidrogenasa externa mitocondrial de *Trypanosoma brucei* y la oxidasa alterna contribuyen a la producción de ROS (Fang y Beattie, 2002; Bhate y Ramasarma, 2009).

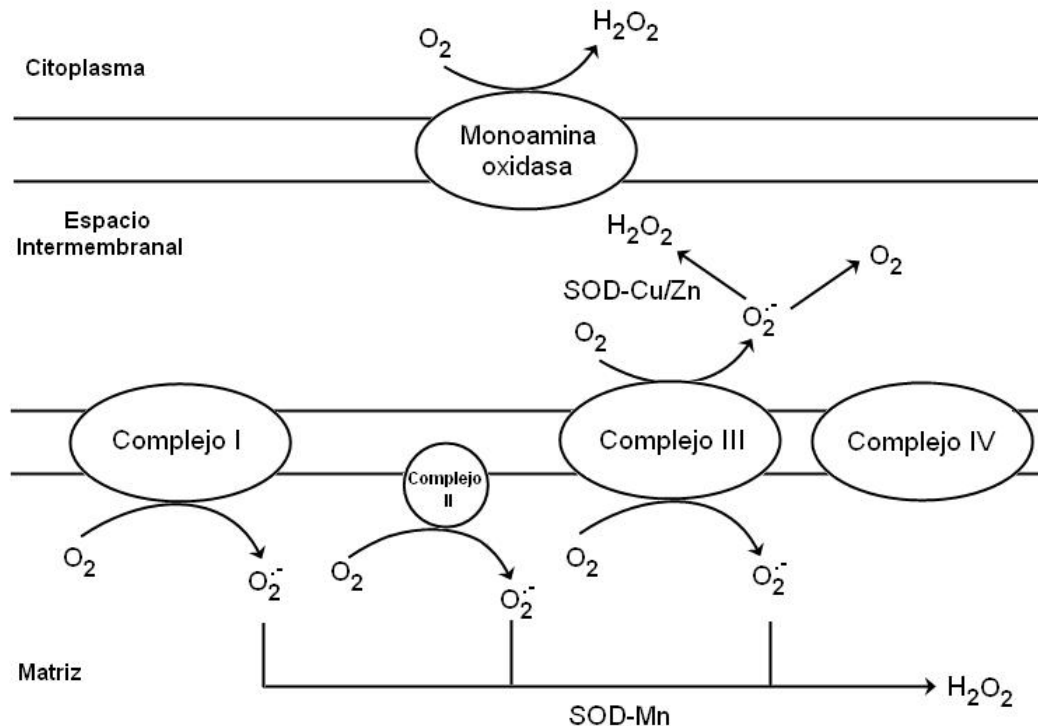


Figura 4. Sitios de formación de superóxido en la cadena respiratoria. Varios complejos respiratorios pierden electrones hacia el oxígeno. Este anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede reducir al citocromo c en el espacio intermembranal o puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno tanto en el lado de la matriz como en el espacio intermembranal. Esquema modificado de Turrens, 2003.

Cambios en el estado redox de la coenzima Q también estimulan la producción de ROS (Kowaltowski y cols., 1995). Aunque el desacoplamiento de la cadena

respiratoria mitocondrial de la fosforilación del ADP suele disminuir la producción de ROS, se puede incrementar la producción a otras condiciones.

La respiración mitocondrial es la principal fuente de ROS y se considera que el 2% del oxígeno consumido por la mitocondria se convierte en el anión O_2^- (St-Pierre y cols., 2002). La concentración *in vivo* de O_2^- mitocondrial está en el intervalo de 3-30 μM (Turrens, 2003). Sin embargo, la producción de O_2^- depende de que el estado redox de los acarreadores sea alto y de que se genere un alto potencial de membrana en la mitocondria. Las enzimas mitocondriales que participan en la producción de ROS incluyen los complejos I, II y III de la cadena respiratoria (Zhang y cols., 1998; Cadenas y Davies, 2000; Sun y Trompower, 2003). Otras enzimas que producen ROS son la catalasa 2, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Orrenius y cols., 2007), la piruvato deshidrogenasa (Miwa y Brand, 2005), la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Mracek y cols., 2009), la dihidroorotato deshidrogenasa, la monoamina oxidasa A y B (Bortolato y cols., 2008; Vindis y cols., 2001) y la citocromo b5 reductasa (Lin y Beal, 2006).

El sistema antioxidante mitocondrial

Debido a que la producción de ROS es continua y ocurre en condiciones fisiológicas, la mitocondria tiene un sistema antioxidante muy eficiente, compuesto de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para la destoxicación de las ROS (Andreyev y cols., 2005). Los componentes no enzimáticos incluyen moléculas lipofílicas e hidrofílicas como el citocromo c, el α -tocoferol, el ascorbato, el ubiquinol y el glutatión. Entre los componentes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa de manganeso (Fridovich, 1997), la catalasa (en algunas especies) (Radi y cols., 1991), la glutatión peroxidasa y la hidropéroxido fosfolípidos GSH peroxidasa (Pushpa-Rekha y cols., 1995). También se encuentran las enzimas que participan en la reducción de las formas oxidadas de las moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como la glutatión reductasa, la tiorredoxina reductasa y la peroxirredoxina (Maher, 2006). La regeneración del GSH por la GSH reductasa y de la tiorredoxina 2 por la tiorredoxina reductasa depende de NADPH. A su vez, el $NADP^+$ se regenera por la actividad de varias enzimas, como la isocitrato deshidrogenasa, la NADH cinasa y la $NADP^+$ transhidrogenasa (Jo y cols., 2001; McGuinness y Butler, 1985; Chance y cols., 1979). El NADH utilizado en la regeneración del $NADP^+$ se obtiene del ciclo de Krebs. Por

tanto, existe una estrecha relación entre la respiración, el estado redox de los nucleótidos de adenina, el contenido de GSH y las enzimas antioxidantes para mantener la funcionalidad mitocondrial.

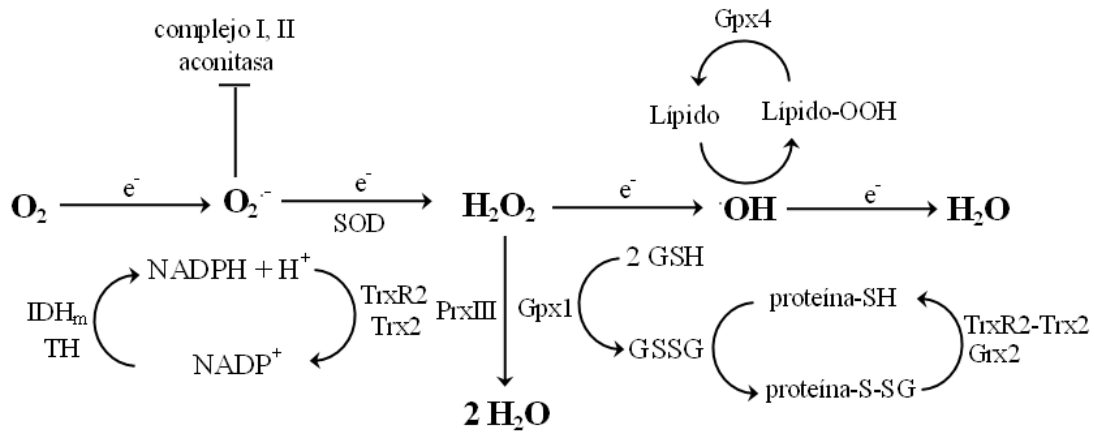


Figura 5. Formación, efectos e inactivación de las ROS en la mitocondria. GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; SOD, superóxido dismutasa; IDH_m, isocitrato deshidrogenasa; Gpx, glutatión peroxidasa; Trx, tioredoxina; TrxR, tioredoxina reductasa; TH, transhidrogenasa.

Por otro lado, las vías que disipan el gradiente electroquímico de protones, como las proteínas desacoplantes (UCP), que se encuentran en el tejido adiposo pardo y en las plantas, y la oxidasa alterna disminuyen la producción de ROS mitocondrial (Négre-Salvayre y cols., 1997; Popov y cols., 1997). Esto puede explicarse por el hecho de que al desacoplarse la fosforilación oxidativa se incrementa la velocidad de la respiración mitocondrial, disminuyendo el tiempo de vida del radical $UQ^{\cdot -}$ en la cadena respiratoria y, por tanto, la probabilidad de producción del $O_2^{\cdot -}$ por la donación de electrones de la $UQ^{\cdot -}$ hacia el O_2 (Popov y cols., 1997).

Los componentes alternos de la cadena respiratoria

En los mamíferos, la única NADH-ubiquinona oxidoreductasa es el complejo I (Walker, 1992). En contraste con los mamíferos, las plantas, los hongos y las bacterias contienen otras NADH-ubiquinona oxidoreductasas distintas al complejo I (Kerscher, 2000). Las NADH-ubiquinona oxidoreductasas alternas catalizan la misma reacción

que el complejo I, pero no contribuyen a la generación de un gradiente de protones transmembranal y son insensibles a rotenona (Figura 6). En algunos microorganismos, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis*, el complejo I está ausente (Balcavage y Mattoon, 1968; Schatz y Racker, 1966) y tres NADH-ubiquinona oxidorreductasas alternas transfieren los electrones del NADH a la ubiquinona (Joseph-Horne y cols., 2001; Kerscher, 2000). Una de ellas está orientada hacia la matriz, mientras que las otras se orientan hacia el citosol y compensan la ausencia de la lanzadera de malato y aspartato en estos microorganismos (De Vries y cols., 1992). Diferente al complejo I, las NADH-ubiquinona oxidorreductasas alternas son proteínas de 53 a 58 kDa y están desprovistas de grupos fierro-azufre (De Vries y cols., 1992). Una de las funciones de estas NADH deshidrogenasas es mantener los equivalentes reducidos en niveles fisiológicos y evitan la producción de ROS por el complejo I (Davidson y Schiestl, 2001).

Las proteínas desacoplantes (UCP) se localizan en la membrana interna mitocondrial (Figura 6) y son parte de una gran familia de transportadores mitocondriales (Ricquier y Bouillaud, 2000). Las UCPs catalizan el transporte de protones a través de la membrana interna, desacoplando la oxidación de los sustratos de la fosforilación del ADP. Sin embargo, estas proteínas deben estar altamente reguladas para prevenir la pérdida innecesaria de energía (Esteves y Brand, 2005). La principal función de las UCPs es atenuar la producción de ROS por la cadena respiratoria y proteger contra el estrés oxidativo (Brand y Esteves, 2005).

Aparte de la cadena respiratoria sensible al cianuro y a la antimicina A, se han reportado otros tipos de vías respiratorias mitocondriales en las células eucarióticas. En plantas, hongos y protistas, la respiración es resistente a la antimicina A debido a la presencia de una ubiquinol oxidasa alterna (AOX) sensible a alquil galatos, localizada en la membrana interna mitocondrial, hacia el lado de la matriz, y codificada por un miembro de la familia de genes de la AOX en el genoma nuclear (Siedow y Umbach, 2000). Tanto la AOX constitutiva como la inducible evitan que los electrones del ubiquinol entren a la cadena de los citocromos y los transfieren directamente al oxígeno (Figura 6).

La respiración alterna tiene diferentes funciones: 1) permite la oxidación de los equivalentes reductores para mantener la actividad de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos cuando la vía de los citocromos está limitada; 2) evita la

generación de ROS a través de la oxidación del ubiquinol; 3) produce calor (Siedow y Umbach, 2000; Joseph-Horne y cols., 2001).

Recientemente se mostró que si la AOX está presente en los hongos, también se encuentra el complejo I (Joseph-Horne y cols., 2001; Veiga y cols., 2003). De esta manera, se asegura que cuando los electrones del NADH viajan al oxígeno molecular, se acople a la translocación de protones al menos en un sitio. Además, la respiración resistente a cianuro se estimula por nucleótidos de purina, por ejemplo, ATP en plantas, AMP y GMP en levaduras y hongos (Joseph-Horne y cols., 2001; Veiga y cols., 2003). Para estos organismos, este fenómeno puede constituir un medio para variar la eficiencia de la fosforilación oxidativa como una función del estado energético de la célula.

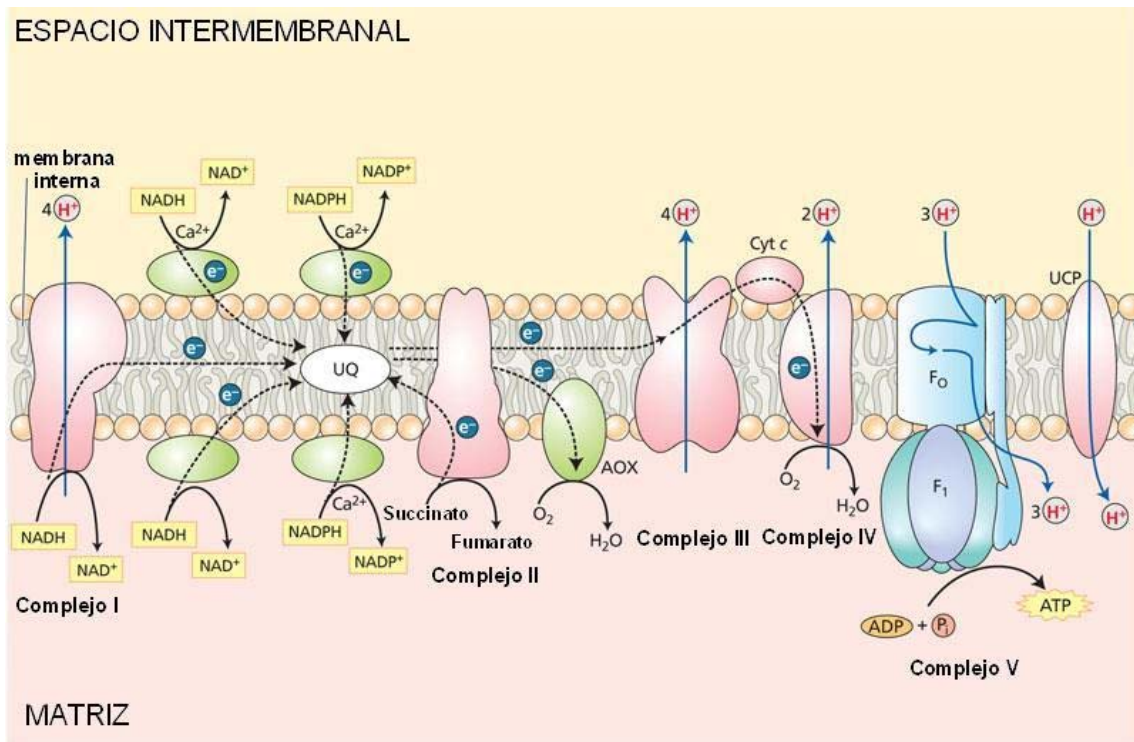


Figura 6. La cadena respiratoria mitocondrial de las plantas. Los componentes alternos se muestran en verde. Tomado de <http://www.sinauer.com>

Características estructurales y catalíticas de la oxidasa alterna

Todas las oxidasas alternas tienen dos regiones hidrofóbicas conservadas y de dos a tres motivos EXXH de unión a hierro (Siedow, 1995; Andersson y Nordlund, 1999). Este motivo es característico de las proteínas carboxilato di-fierro tipo R2.

Aunque la enzima es difícil de purificar hasta la homogeneidad en una forma estable y activa (Berthold y Siedow, 1993; Bonner y cols., 1986; Elthon y McIntosh, 1987; Zhang y cols., 1996), se han propuesto algunos modelos sobre su estructura tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos. Siedow y cols., (1995) propusieron que la AOX de plantas es una proteína integral de membrana, homodimérica, con dos hélices transmembranales conectadas por una α hélice en el espacio intermembranal y con un centro di-fierro no hemo coordinado por residuos de glutamato e histidina localizado en la región hidrofílica del carboxilo terminal. Por tanto, las AOX se consideraron proteínas integrales de membrana con los extremos amino y carboxilo terminal localizados en la matriz mitocondrial. Subsecuentemente, en 1999, Andersson y Nordlund reportaron que este modelo no concordaba con la estructura de otras proteínas di-fierro (Δ^9 -desaturasa). Por tanto, el nuevo modelo no considera a la AOX como una proteína transmembranal, sino como una proteína de membrana monotópica, asociada con la membrana interna del lado de la matriz mitocondrial (Andersson y Nordlund, 1999; Siedow y Umbach, 2000). El modelo consiste de cinco α hélices con dos motivos EXXH altamente conservados en las hélices II y V. Una de las regiones hidrofóbicas conservadas está localizada entre las hélices I y II, y la otra está localizada entre las hélices II y III (Figura 7). La longitud y el arreglo de las hélices en este nuevo modelo se ajustan a la familia de proteínas di-fierro tipo R2 (Anderson y Nordlund, 1999). Además, tal orientación está respaldada por experimentos de mutagénesis sitio dirigida (Albury y cols., 2002).

Mucha de la información sobre la identificación de los aminoácidos que estabilizan los átomos de hierro se obtuvo del uso de sistemas de expresión heterólogos (*Escherichia coli* y *Schizosaccharomyces pombe*) [Kumar y Soll, 1992; Albury y cols., 1996]. Los estudios de mutagénesis dirigida utilizando estos sistemas mostraron que los residuos de glutamato e histidina indicados en la figura 8 actúan como los ligandos de unión a hierro, aunque cierta controversia queda con respecto a cuál de los residuos de glutamato en la hélice IV participa, si es el Glu₂₆₉ o el Glu₂₇₀, debido a que la mutación de ambos inactiva a la proteína (Albury y cols., 1998; Ajayi y cols., 2002). Además, otros residuos se han identificado con respecto a la actividad de la AOX (Albury y cols., 2002; Ajayi y cols., 2002). De particular interés fue descubrir que muchas de las secuencias de AOX poseen sólo cuatro residuos de tirosina altamente conservados, denominadas Tyr₂₅₃, Tyr₂₆₆, Try₂₇₅ y Try₂₉₉. Albury y cols., (2002) y Nakamura y cols., (2005) encontraron que la Try₂₇₅ es esencial para la catálisis, por lo que se sugirió que

este residuo es importante para la formación del radical durante el ciclo catalítico (Affourtit y cols., 2002). Berthold y cols., (2000) sugirieron que la localización de Try₂₇₅, río arriba del Glu₂₆₉, le permite formar un puente de hidrógeno con el Glu₁₇₈ en la hélice I. Sin embargo, recientemente se observó que la Try₂₇₅ no está conservada en algunas AOX, por lo que, el donador de electrones podría ser el Trp₂₀₆, el cual se localiza en el C-terminal de la segunda hélice; ésto fue confirmado por mutagénesis dirigida (Moore y Albury, 2008). Con respecto a la función de los otros residuos, las Tyr₂₆₆ y Try₂₉₉ están altamente conservadas en todos los organismos y su mutación resulta en una enzima inhibida (Nakamura y cols., 2005).

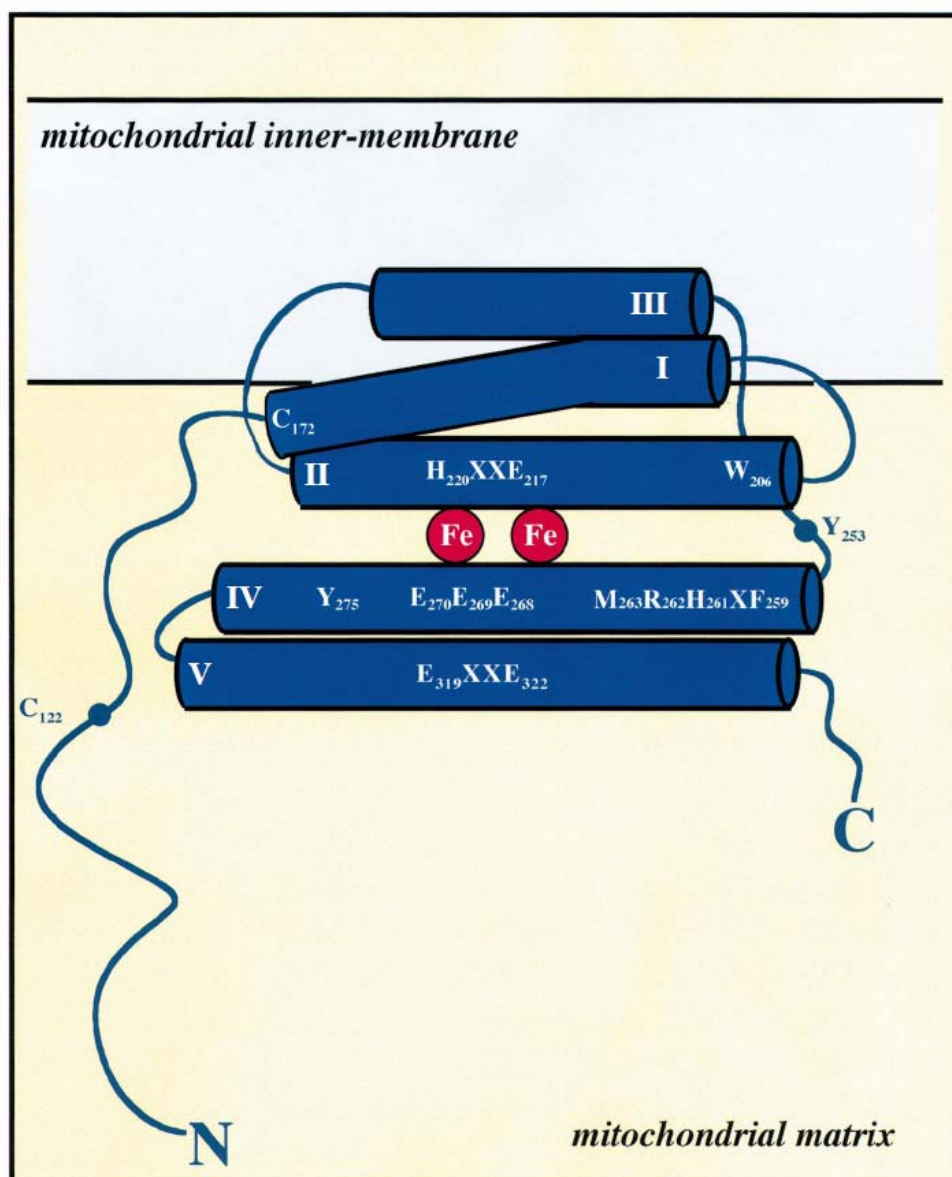


Figura 7. Representación de la estructura de la oxidasa alterna. La región de hélices alberga al centro hierro binuclear (esferas rojas) y está basado en la estructura

propuesta por Andersson y Nordlund, 1999. Los residuos de aminoácidos marcados corresponden a la numeración de la secuencia de *Sauromatum guttatum*. Figura tomada de Albury y cols., 2002.

Además del sitio catalítico para la reducción del oxígeno en agua, la AOX contiene un sitio de unión para el ubiquinol. Aunque estas estructuras no han sido completamente elucidadas, Berthold y cols., (2000) identificaron diversas características en el sitio de unión de la quinona. Su modelo se basa en la semejanza en la estructura y en la catálisis entre la AOX y las proteínas di-fierro tipo R2 (Berthold y Stenmark, 2003). Sin embargo, El grupo de Moore, a través de una búsqueda bioinformática, propuso que el sitio de unión del ubiquinol en la AOX se localiza en una porción hidrofóbica entre las hélices II y IV. Entre los residuos que se identificaron en esta sección de la proteína, la pareja His₂₆₁/Arg₂₆₂ forman parte del posible motivo de unión a la hidroquinona (Fisher y Rich, 2000); otros residuos importantes para la unión de la ubiquinona son Try₂₅₃, Gln₂₄₂, Asn₂₄₇, y Ser₂₅₆. Los estudios de mutagénesis dirigida en esta región de la AOX de *S. guttatum* expresada en *S. pombe* indican que las mutaciones de Try₂₅₃, Gln₂₄₂, Ser₂₅₆ y Arg₂₆₂ resultan en una inhibición considerable en la actividad de la AOX, lo que sugiere que estos residuos son importantes para la catálisis (Moore y Albury, 2008).

Las AOX de hongos

La respiración resistente al cianuro de las levaduras y de los hongos no recibió mucha atención en la literatura como en el caso de las plantas, posiblemente debido a su ausencia en *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se ha utilizado como un modelo de levadura por mucho tiempo. Sin embargo, se han descrito vías alternas diferentes a la AOX en otras levaduras. En *Kluyveromyces lactis* (Ferrero y cols., 1981) y en *Schwanniomyces Castellii* (Claisse y cols., 1991) se reportó una respiración inhibida por azida, pero insensible a SHAM y a cianuro. En *Candida parapsilosis* se encontró una segunda cadena respiratoria, insensible a la antimicina A, pero que se inhibe con amital, SHAM, mixotiazol y cianuro. Esta cadena funciona en paralelo con la cadena de los citocromos clásica y diverge antes del complejo III, pero converge a nivel del complejo IV (Guérin y Camougrand, 1994).

El primer reporte de la presencia de una AOX en levaduras fue en 1966 en *Rhodotorula glutinis* (Matsunaka y cols. 1966). En 1972, Nyns y Hamaide-Deplus reportaron la presencia de esta oxidasa en *Yarrowia lipolytica*. En paralelo, el grupo de Medentsev y Akimenko llevaron a cabo una extensa investigación de la AOX en este mismo hongo, pero muchos de sus estudios, realizados entre 1976 y 1999, fueron publicados en ruso y sólo fue posible tener acceso al resumen a través de la red. Mientras tanto, los reportes de la AOX es limitada, como en el caso de *Candida utilis* (Downie y Garland, 1973) y *Candida albicans* (Kot y cols., 1976). Durante los 1990s, los estudios de la AOX en levaduras aumentaron en frecuencia, principalmente en *Hansenula anomala*, por el grupo de Minagawa (1990a, 1990b y 1991). En el 2000, Veiga y cols., reportaron que las células de *Pichia membranifaciens* ayunadas y crecidas en condiciones aerobias inducen una AOX. El desarrollo de fungicidas relacionados con la estrobilurina, que inhiben el centro Q₀ del citocromo b, incrementaron el interés en la respiración alterna. Los estudios con fitopatógenos sugieren que la AOX se expresa cuando la vía de los citocromos se inhibe con antimicina o cianuro (Sakajo y cols., 1993; Mizutani y cols., 1995; Yukioka y cols., 1998). Sin embargo, otros trabajos sugieren que la AOX es constitutiva durante las diferentes etapas del crecimiento de *G. graminis*, *Septoria tritici* y *B. cinerea* (Joseph-Horne y cols., 1998; Tamura y cols., 1999). Además, se ha observado que la activación transcripcional de la AOX en *M. grisea* es constitutiva, pero la traducción y la activación postraduccional ocurren en respuesta a inhibidores de los citocromos o a un aumento de los niveles de H₂O₂ (Yukioka y cols., 1998).

Otros factores importantes que afectan la transcripción y el estado funcional de la AOX en *B. cinerea*, son las condiciones de cultivo y la etapa de su desarrollo. La respiración en las esporas de este patógeno es completamente sensible a los inhibidores clásicos del complejo III, como azoxystrobina y antimicina A. Sin embargo, a las 48 horas de la germinación de la spora en medio líquido, la respiración cambia y ahora es completamente sensible a inhibidores de la AOX (propil galato y SHAM). Estos resultados sugieren que la AOX es esencial para la sobrevivencia de *B. cinerea* durante la fase estacionaria, cuando la formación de ROS en la mitocondria aumenta de manera significativa.

Una pregunta importante sobre la presencia de los componentes alternos en los hongos patógenos es ¿por qué existe tal diversidad en un proceso bioenergético

altamente conservado? Una posibilidad es que estos componentes alternos estén involucrados en los procesos de sobrevivencia celular durante la patogénesis.

Los patógenos están expuestos a las ROS producidas durante la respuesta de defensa antifúngica de los hospederos, y para sobrevivir inducen una respuesta antioxidante que incluye a la AOX (Helmerhorst y cols. 2001). Este es el caso de *Aspergillus fumigatus*, el cual requiere a la AOX para mantener su patogenicidad y contrarrestar el ataque de los macrófagos. Se han reportado resultados similares para *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (Aknter, S y cols., 2003; Helmerhorst y cols., 2005) Por tanto, se ha considerado a la AOX como un posible blanco para los fungicidas. Sin embargo, los inhibidores de la AOX no se han utilizado en plantas o animales debido a la pobre distribución hacia los patógenos, a la inactivación de los inhibidores por el metabolismo del hospedero (humanos y plantas) y porque en el caso de las plantas, éstas poseen múltiples oxidases alternas (Wood y Hollomon, 2003). Además, la inducción de la AOX por los fungicidas en medios de cultivo no se observa cuando el hongo está en las plantas (Olaya y cols., 1998; Ziogas y cols., 1997). Esta discrepancia entre las respuestas del patógeno durante las fases saprofítica y patogénica posiblemente se deba a que el hospedero suprime la inducción de la respiración alterna. De acuerdo con este modelo, los antioxidantes constitutivos de la planta, como la flavona, entran a las células del hongo y provocan la disminución de los niveles de ROS requeridos para la inducción de la AOX (Mizutani y cols., 1996; Tamura y cols., 1999).

Diferencias regulatorias entre las AOX de plantas y hongos

En las plantas es común que las AOX estén codificadas por familias de multigenes, cuyos miembros se regulan diferencialmente en una forma dependiente del desarrollo y del tejido. Se han identificado tres genes de AOX en la soya (Finnegan y cols., 1997) y dos genes en tabaco y arroz (Whelan y cols., 1995; Ito y cols., 1997). Sin embargo, en microorganismos, la presencia de familias de multigenes para la AOX es controversial. Se ha reportado que *U. maydis* (Juárez y cols., 2004) y en *H. anomala* (Sakajo y cols., 1999) tienen un solo gen para la AOX, pero en *Candida albicans*, hay una familia de dos miembros (Huh y Kang, 2001).

Además del control transcripcional, las modificaciones covalentes reversibles y el control alostérico están también involucrados en la regulación de la actividad de la AOX en plantas. La AOX existe en la membrana interna como un homodímero en

donde los dos monómeros pueden estar covalentemente unidos (forma oxidada, menos activa) o no covalentemente unidos (forma reducida, más activa), indicando que la actividad de la AOX es sensible al estado redox en las plantas (Umbach y Siedow, 1993). Cuando el enlace disulfuro se reduce, la AOX de planta puede adicionalmente estimularse por α -ceto ácidos, como el piruvato, a través de la formación de un enlace tiohemiacetal (Umbach y Siedow, 1996). El residuo de cisteína que se asocia con la formación del enlace disulfuro es el mismo que participa en la reacción con el α -ceto ácido (Rhoads y cols., 1998).

Las características regulatorias de la AOX de los microorganismos son diferentes de las de las de plantas. Los nucleótidos de purina, como el AMP, ADP, GMP e IMP, estimulan la AOX de *Moniliella tomentosa* (Vanderleyden y cols., 1980a), *Neurospora crassa* (Vanderleyden y cols., 1980b), *Paramecium tetraurelia* (Doussiere y Vignais, 1984) y *Hansenula anomala* (Sakajo, y cols., 1997), mientras que la AOX de las mitocondrias de las plantas no se estimula por los nucleótidos de purina.

En contraste con las AOX de plantas, la AOX de los hongos tiene una estructura monomérica, sin el sistema de disulfuro, y su actividad es independiente de los α -cetoácidos (Umbach y Siedow, 2000). Estas diferencias en las propiedades regulatorias entre los dos tipos de AOX sugieren que pueden tener diferentes funciones fisiológicas.

Diferente a la estimulación, la inhibición de la AOX no depende del tipo de organismo. El SHAM es el inhibidor más comúnmente utilizado en células completas y posiblemente actúa compitiendo con el ubiquinol (Siedow y Umbach, 2000). Hoefnagel y cols., (1995) realizaron una búsqueda de posibles inhibidores de la AOX y encontraron que diversos compuestos inhiben a la enzima. Entre éstos se encuentran el 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona, el disulfiram, el 5-n-decil-6-hidroxi-4,7-dioxobenzotiazol, la valinomicina, los alquil galatos y diferentes derivados del ácido hidroxámico, como el ácido m-yodo-benzohidroxámico, el ácido benzohidroxámico y la cloroquina (Hoefnagel y cols., 1995). De hecho, Affourtit y cols., (2000) reportaron que la maesaquinona es un inhibidor de la AOX y de otras enzimas respiratorias que utilizan ubiquinona como sustrato.

La importancia de la AOX como un componente del sistema antioxidante

Los organismos que viven en ambientes aeróbicos utilizan mecanismos de defensa antioxidante para proteger sus componentes celulares del daño oxidativo (Yakes y Van Houten, 1997). La mitocondria es la principal fuente de ROS en la célula por lo que diversas enzimas contribuyen en la mitocondria para prevenir la acumulación de ROS, tanto en la matriz como en el espacio intermembranal (Figura 5).

Estudios recientes sugieren que la AOX puede desempeñar una función importante en limitar la producción de ROS en plantas y hongos, por lo que puede ser considerada como una defensa de la mitocondria contra el estrés oxidativo (Purvis y Shewfelt, 1993; Wagner y Moore, 1997). Esta sugerencia concuerda con las observaciones de que situaciones de estrés oxidativo (tratamiento con antimicina A) inducen la actividad de la AOX (Purvis y Shewfelt, 1993; Wanger y Wagner, 1997). Asimismo, el tratamiento con H₂O₂ induce la expresión de la AOX (Wagner, 1995), lo cual indica que esta enzima tiene un función crítica en la regulación del estado redox celular.

Ustilago maydis como modelo de estudio

El hongo biotrófico *Ustilago maydis* es un basidiomiceto que causa el carbón del maíz o huitlacoche. Huitlacoche es el nombre que los aztecas le dieron a las agallas o tumores del hongo en la planta, y se ha utilizado como un ingrediente tradicional en la gastronomía mexicana. *U. maydis* ha sido un modelo en los estudios de fitopatogenicidad (Valverde y cols., 1995), dimorfismo, eventos de recombinación homóloga e interacciones planta-patógeno (Banuett, 2002; Bölker, 2001).

Este basidiomiceto pertenece a los hongos tizones, un importante grupo de patógenos de plantas que causan considerables pérdidas y daños económicos (Agrios, 1997). Por tanto, *U. maydis* es considerado una amenaza potencial a la economía de países desarrollados (Madden y Wheelis, 2003).

El ciclo de vida de U. maydis

El ciclo de vida de *U. maydis* comienza con el desarrollo de células haploides no patógenas, las cuales presentan un crecimiento levaduriforme y se reproducen por gemación. La fusión de las células haploides genéticamente compatibles genera una estructura infecciosa conocida como dicarion, la cual presenta crecimiento micelial. Esta estructura infecciosa es capaz de colonizar la planta de maíz y generar tumores

lentos de esporas diploides o teliosporas melanizadas en las partes aéreas de la planta, principalmente en la mazorca (Banuett, 2002; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998). Aunque *U. maydis* no es un patógeno obligado del maíz, requiere a su hospedero para completar su ciclo de vida.

La infección del maíz ocurre por penetración directa del dicarion, al formar una estructura tipo apresorio, y también a través de las aperturas de los estomas o por heridas en la planta (Banuett y Herskowitz, 1996). Los tumores se desarrollan en grupos sobre las células meristemáticas, las cuales tienen un proceso de proliferación y elongación celular (Snetselaar y Mims, 1994).

El ciclo de vida de *U. maydis* se caracteriza por un cambio dimórfico entre la forma celular haploide semejante a levadura, conocida como esporidia, y un dicarion infeccioso filamentoso (Banuett, 1995). Aunque *U. maydis* se considera un hongo dimórfico, exhibe 3 formas en su ciclo de vida: A) la unicelular, con células uninucleadas y haploides (la esporidia), las cuales son saprofíticas y pueden crecer en materia inerte, B) una forma filamentosa dicariótica, la cual es parasítica y patogénica, por lo que necesita al hospedero para crecer, y C) una forma de resistencia diploide, la teliospora, que se forma dentro de los tumores. Estas transiciones morfológicas están gobernadas por dos locus de apareamiento: el *a* y el *b*. La fusión de células haploides compatibles genera una forma dicariótica, normalmente sobre las hojas del hospedero. La formación del dicarion y su crecimiento filamentoso está regido por los loci *a* y *b*. El loci *a* contiene los alelos *a*₁ y *a*₂, los cuales codifican para un sistema de receptor/feromona que permite el apareamiento de cepas haploides compatibles (Bölker y cols., 1992). El crecimiento filamentoso del dicarion depende del locus *b*, el cual codifica para las proteínas *bE* y *bW*, las cuales forman dímeros que funcionan como factores de transcripción que regulan el crecimiento filamentoso y la patogenicidad (Basse y Steinber, 2004).

Los filamentos dicarióticos proliferan en los tejidos de la planta, creciendo inter e intracelularmente, induciendo la formación de los tumores pero sin mucho daño a las células hospederas. Puesto que los filamentos dicarióticos no se pueden propagar en cultivos, pero crecen bien en los tejidos de la planta, se ha sugerido que hay señales de la planta que promueven su crecimiento o el mantenimiento del estado dicariótico del patógeno. Los tumores proveen el ambiente idóneo donde las hifas se diferencian, culminando en la formación de células redondas donde ocurre la cariogamia, y en las cuales se produce una pared celular especializada, para dar lugar a la forma diploide de

la espora. Los tumores, al madurar, se rompen y liberan a las teliosporas que se esparcen en el campo por el viento. Éstas pueden dormir en el suelo por años y sirven como una forma de resistencia contra los cambios climáticos. La teliospora no es capaz de crecer vegetativamente y deben sufrir un proceso de meiosis para producir la progenie haploide, completando de esta manera el ciclo de vida (Figura 8).

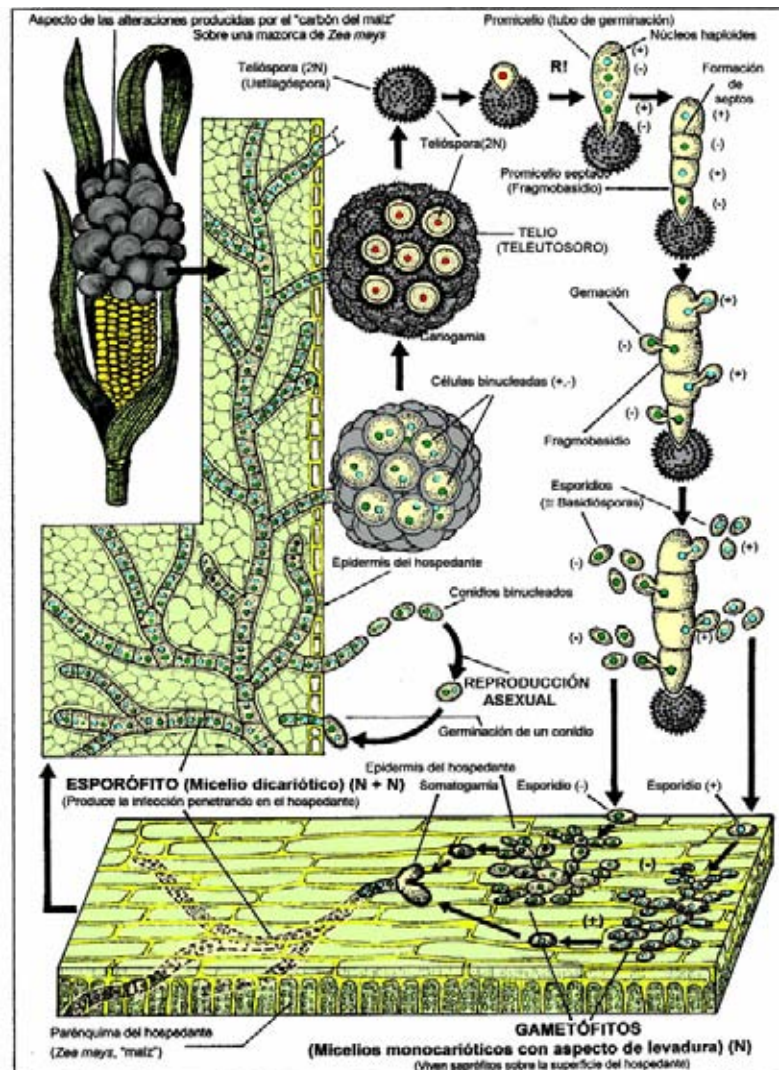


Figura 8. Ciclo de vida del hongo *U. maydis*. Tomado de la página del departamento de biología de organismos y sistemas, Universidad de Oviedo, España. <http://www.uniovi.es/BOS/Asignaturas/Botanica/9.html>.

En los eucariotes, la energía requerida para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la respuesta al estrés, proviene de la hidrólisis del ATP, el cual se produce principalmente en la fosforilación oxidativa mitocondrial. El suplemento de energía también es importante para que los patógenos produzcan la enfermedad en el

ambiente oxidante del hospedero. Sin embargo, los hongos patógenos son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a la producción de ROS y RNS durante la respuesta de defensa del hospedero. Por tanto, el patógeno debe responder con enzimas o moléculas antioxidantes que neutralicen las especies reactivas como primera línea de defensa y enzimas que reparen o remuevan las moléculas dañadas como segunda línea. Así, los sistemas antioxidantes son esenciales para la virulencia de los hongos (Hamilton y Holdom, 1999).

La mitocondria del hongo fitopatógeno *U. maydis* contiene los componentes clásicos de la cadena de transporte de electrones (Complejo I-IV) y dos elementos alternos: una AOX resistente a cianuro y una NADH deshidrogenasa alterna externa (Figura 9) [Juárez et al., 2004], los cuales son codificados por sus respectivos genes nucleares.

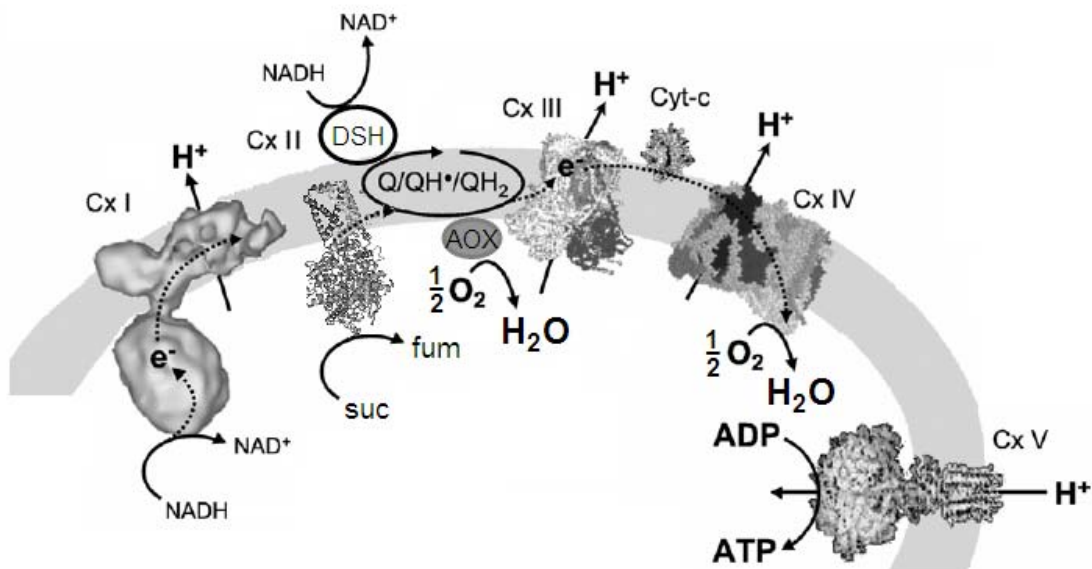


Figura 9. Representación esquemática de la cadena respiratoria de *U. maydis*. Cx 1-IV, complejos respiratorios clásicos; Cx V, F₁F₀-ATP sintasa; DSH, deshidrogenasa alterna; AOX, oxidasa alterna.

El sistema antioxidante de U. maydis

Las células desarrollaron diferentes estrategias de defensa contra las ROS y las RNS. En *U. maydis* no existen estudios sobre las enzimas antioxidantes que participan en la generación y detoxificación de las especies reactivas o sobre su localización dentro de la célula. En un intento por conocer los sistemas antioxidantes que participan en este hongo, se realizó un análisis bioinformático de los marcos de lectura abiertos que tienen similitud con los genes de las proteínas antioxidantes de diversos hongos

patógenos, utilizando la información disponible en la base del genoma (http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/index.html). La localización subcelular de las proteínas se realizó con el programa TargetP (Emanuelsoon y cols., 2000). Con los datos obtenidos se construyó el siguiente esquema hipotético (Figura 10).

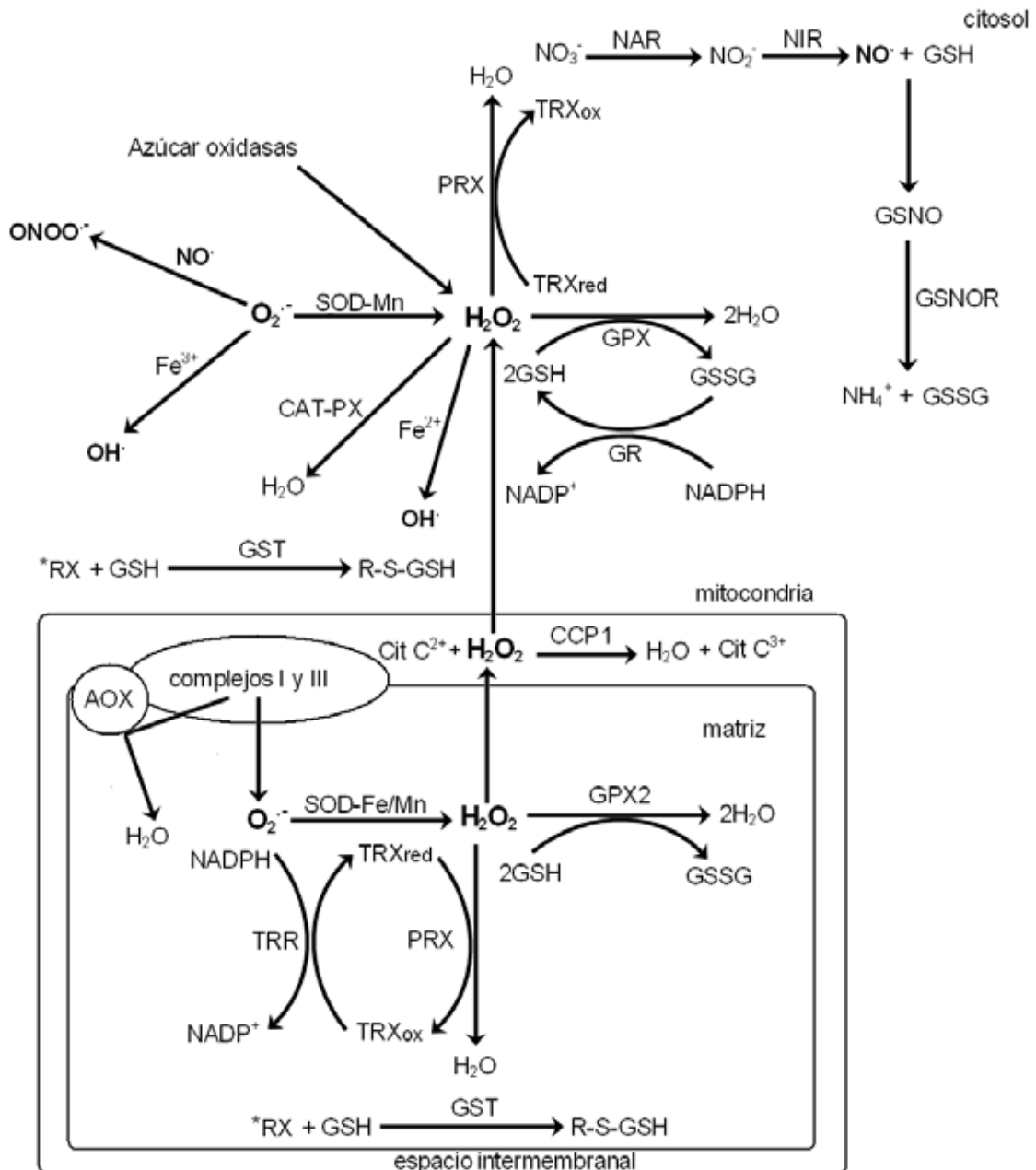


Figura 10. Modelo hipotético para los sistemas de detoxificación de las ROS y las RNS en *U. maydis*. Las azúcar oxidasas y los complejos respiratorios son las fuentes de ROS, mientras que las enzimas de reducción de los nitratos son posibles fuentes de NO^{\cdot} en este hongo. Además, los radicales hidroxilo se forman por el hierro libre mediante la reacción de Fenton. R puede ser un grupo alifático, aromático o heterocíclico; X representa los grupos sulfato, nitratos y halogenuros. Ver abreviaturas para detalles de las ROS y RNS.

La oxidasa alterna de U. maydis

En 1970, Sherald y Sisler reportaron la presencia de una vía alterna resistente al inhibidor antimicina A en esporas de *U. maydis*, la cual fue posteriormente estudiada por Georgopoulos y Sisler (1970). Además, esta enzima alterna tiene una afinidad por el oxígeno de 11 a 14 μM , mucho más baja que de la citocromo c oxidasa, de 1.2 a 1.4 μM (Sherald y Sisler, 1972). La AOX de este hongo se induce por cloranfenicol (Ziogas y Georgopoulos, 1980). Sin embargo, la sensibilidad del componente inducible de la respiración resistente a cianuro difiere tanto en su sensibilidad a los inhibidores derivados del ácido hidroxámico, como en su afinidad por el oxígeno, que depende de la concentración de AMP (Ziogas y Georgopoulos, 1980). Posteriormente, la AOX de *U. maydis* se identificó como una proteína mitocondrial de 33 kDa por Juárez et al., (2004), utilizando un anticuerpo policlonal obtenido contra la AOX de *Clamydomonas reihartii*. Este peso molecular es similar al reportado para otras AOX de plantas y hongos, las cuales están entre 32 a 38 kDa (Moore y Albury, 2008). Estudios recientes sobre la regulación de la AOX en levaduras de *U. maydis* sugieren que esta enzima es estimulada por AMP pero no por piruvato (Juarez y cols., 2004). Otra interesante observación es que la AOX se induce por diversos factores, como el choque térmico, el estrés oxidativo exógeno y la disponibilidad de nutrientes (Juárez y cols., 2006). Por tanto, se sugiere que la AOX forma parte del sistema antioxidante y de la plasticidad metabólica de este hongo.

A nivel estructural, las estructuras primarias de las AOX de algunas especies de plantas y hongos han sido importantes para la comprensión de la relación estructura-función, para la determinación de los posibles sitios de unión de los sustratos y la regulación de estas enzimas. Al nivel de su organización molecular, las oxidasas alternas de plantas y hongos son diferentes (Joseph-Horne, 2001; Siedow y Umbach, 2000), debido a que sus estructuras primarias principalmente difieren en su amino terminal en esta parte de la proteína se localizan los residuos importantes de la regulación post-traducciona. En contraste, la parte carboxilo terminal presenta un buen grado de identidad y de similitud (Figura 11), debido a que en esta sección se localiza el sitio activo de la enzima.

El análisis del alineamiento de la región C-terminal de la AOX de *U. maydis* contra la secuencia de *S. guttatum* mostró una identidad del 44% y un 62% de similitud.

Por otro lado, un análisis comparativo entre la AOX de *U. maydis* con la de *C. neoformans* mostró que en las regiones C-terminal de estas proteínas son un 53% idénticas y presentan un 71% de similitud, lo cual correlaciona con un alto nivel de conservación de esta región en las oxidasas de plantas y hongos. El alto grado de conservación de esta región en *U. maydis* se debe a la presencia del sitio catalítico en esta parte de la proteína. Además, en este hongo la AOX presenta una región adicional de alrededor de 70 aminoácidos entre las regiones N-terminal y C-terminal, cuya estructura terciaria se desconoce (Figura 11).

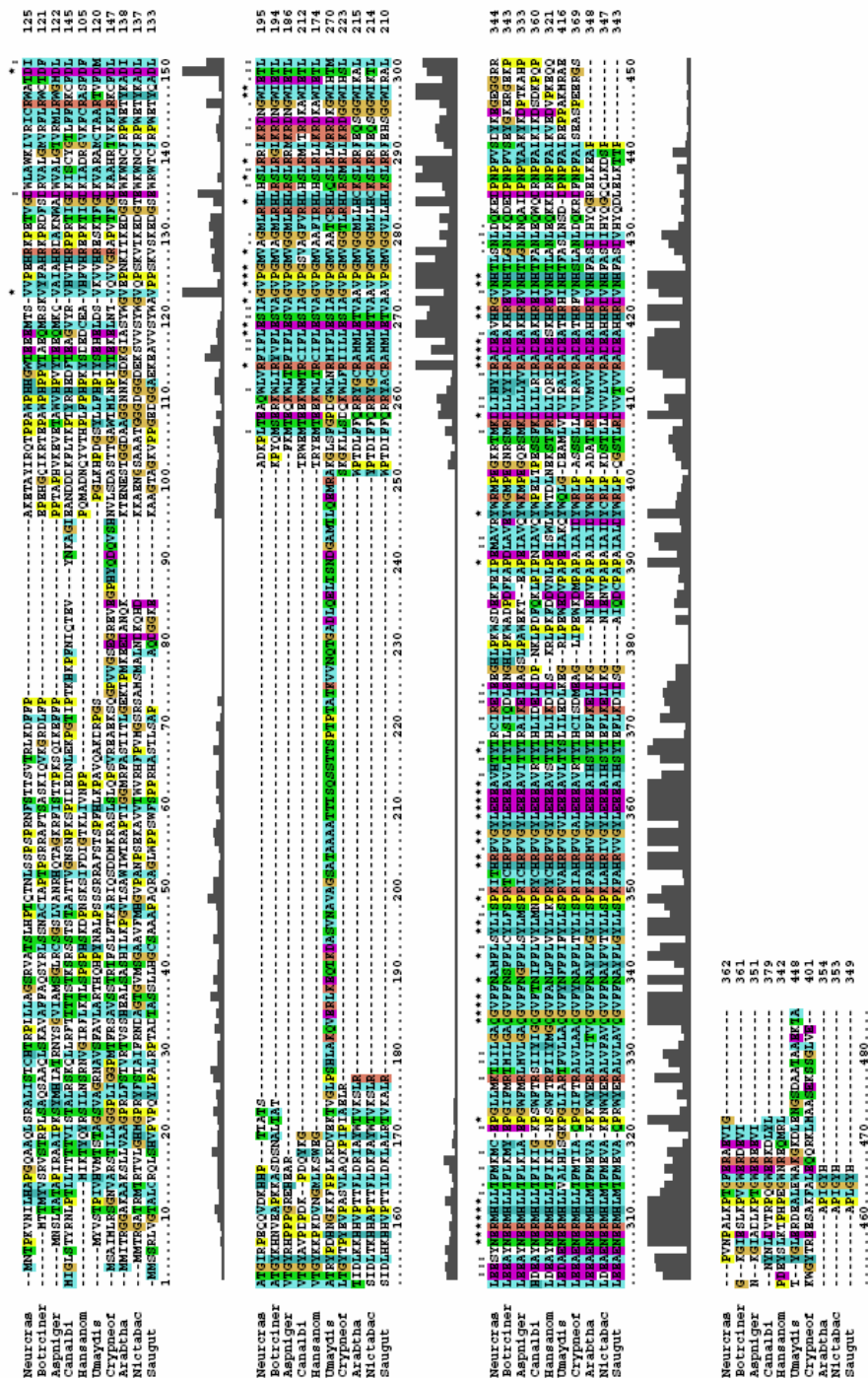


Figura 11. Alineamiento de diferentes secuencias de AOX. Para el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Neurcras, *Neurospora crassa* (Q01355-1); Botrciner, *Botrytis cinerea* (Q8NJ59-1); Aspninger, *Aspergillus niger* (O74180-1); Canalbi, *Candida albicans* (O93853-1); Hansanom, *Hansenula anomala* (Q00912-1); Umaydis, *Ustilago maydis* (UM02774.1); Crypneof, *Cryptococcus neoformans* (Q8NKE2-1); Arabtha, *Arabidopsis thaliana* (NP_188876); Nictabac, *Nicotiana tabacum* (Q41224-1); Saugut, *Sauromatum guttatum* (P22185-1), se utilizó el programa ClustalW.

En la figura 12 se muestran los residuos importantes para la unión de los átomos de hierro y los que se han propuesto en la unión de la ubiquinona. La AOX de *U. maydis* contiene dos motivos EXXH en los residuos 277-280 y 383-386 y dos regiones hidrofóbicas que le permiten su interacción monotópica con la membrana (Chaudhuri, 1998). Además, se identificó a la pareja His₃₂₂/Arg₃₂₃ y a las tirosinas 336 y 314, que corresponden a la Tyr₂₇₅ y Tyr₂₅₃ de *S. guttatum* y que son importantes para la unión de la quinona, y al Trp₂₆₆, el cual parece ser el donador de electrones durante el ciclo catalítico de la enzima. Los residuos Ala₁₀₉ y Asn₂₃₂ corresponden a las cisteínas regulatorias Cys₁₂₂ y Cys₁₇₂ de la secuencia de *Sauromatum guttatum* (Figura 11).

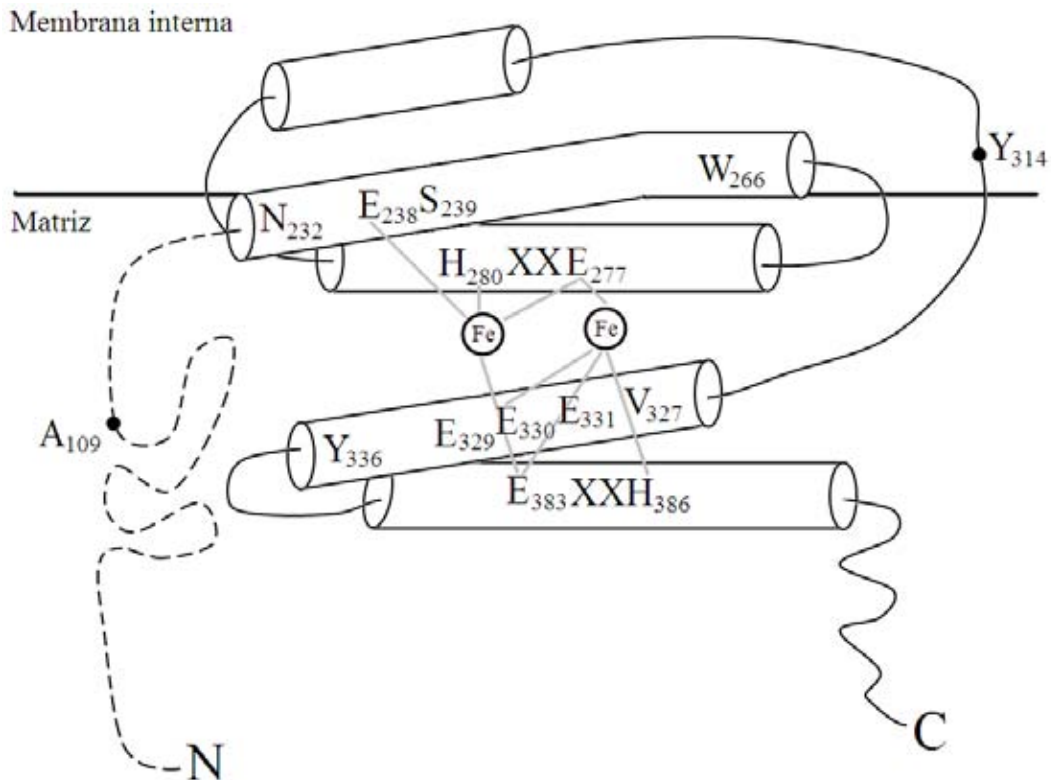


Figura 12. Esquema de la estructura del sitio catalítico de la AOX de *U. maydis* basado en el modelo propuesto por Andersson y Nordlund (1999), revisado por Berthold y Stenmark (2003) y modificado por Moore y Albury (2008). Los cilindros representan el grupo de cuatro α hélices y las regiones ancladas a la membrana. Tres α hélices

contienen los residuos que unen los átomos de hierro. Los residuos se numeraron de acuerdo con el modelo de Nordlund, 1999. Las líneas punteadas indican las regiones que no han sido modeladas hasta el momento. La figura se modificó de Affourtit y cols., 2002.

Es evidente que faltan muchos estudios para comprender la respiración mitocondrial en las especies patógenas de plantas y humanos. Por tanto, es probable que la composición de la cadena respiratoria de los hongos dependa de las especies y de las condiciones ambientales, de desarrollo y metabólicas. Para analizar con más detalle la función de la AOX de *U. maydis* en la destoxificación de las ROS, se analizó el efecto del estrés oxidativo inducido con antimicina A y óxido nítrico sobre la actividad de la AOX en mitocondrias aisladas y el efecto del inhibidor nOg sobre la viabilidad y morfología de las levaduras de *U. maydis*.

HIPÓTESIS

Si el óxido nítrico inhibe a los componentes clásicos de la cadena respiratoria de *U. maydis*, entonces debe inducir la actividad de la AOX para evitar la sobreproducción de ROS y la disfunción mitocondrial.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la regulación de la oxidasa alterna de *U. maydis* bajo condiciones de estrés oxidativo.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del octil galato sobre el crecimiento de las levaduras de *U. maydis*.
2. Determinar la actividad de la AOX en células cultivadas en presencia de antimicina A.
3. Analizar el efecto de la regulación postraducciona de la AOX en la producción de ROS mitocondrial
4. Evaluar el efecto del óxido nítrico sobre la actividad de la respiración mitocondrial
5. Determinar la relación entre el daño oxidativo mitocondrial y la inactivación de la AOX.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Las sustancias químicas que se utilizaron fueron de grado reactivo y de alta pureza y se obtuvieron de Sigma Chemical (México) a menos que se indique lo contrario. El S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y el hidrocloreuro de 1,3-(4-morfolinil) sidnonimina (SNI-1) se obtuvieron de Calbiochem (Merck-México S.A); la dihidrorrodamina 123 de Molecular Probes (Eugene, OR.), el anticuerpo monoclonal contra S-nitrocisteína de A. G. Scientific, Inc, y el anticuerpo monoclonal contra nitrotirosina de R&D Systems, Inc.

Cultivos celulares

Las células FB₂ de *Ustilago maydis* se cultivaron en un medio de YPD a pH 4.5, con 1% glucosa, 0.25% bactopectona y 1% de extracto de levadura. Los cultivos se mantuvieron a 28° C con agitación constante de 250 rpm. A las 24 h de cultivo, las células se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm y se lavaron dos veces con agua destilada.

Para determinar el efecto de los compuestos polifenólicos sobre la morfología celular de *U. maydis*, las células se cultivaron en presencia de 30 µM de cada compuesto, y la morfología de las células se observó en el microscopio óptico y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon TE300.

Para la inducción de la respiración a través de la AOX, las células en la fase estacionaria, que son altamente sensibles a cianuro (85-90%), se cultivaron en presencia de antimicina A a una concentración final de 7 µM. A las 24 h de cultivo, las células se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm y se lavaron dos veces con agua destilada.

Sensibilidad al estrés nitrosante

Para ensayar el efecto del estrés nitrosante, las células de levadura en la fase estacionaria se cultivaron en presencia del sistema de nitritos y ascorbato en una relación de 8:1 (Beligni y Lamattina, 1999; Kröcke y Kolb-Bachfen, 1996), por 24 horas, a 250 rpm y 28 ° C. Como control positivo se utilizó al donador de óxido nítrico SNAP.

Evaluación morfológica con calcofluor

La evaluación de la tinción de la pared celular se realizó incubando 1×10^7 células de *U. maydis* con 1 mg de calcofluor. Las células se incubaron 5 min a 30 ° C con agitación y se lavaron dos veces con agua estéril. Las células se observaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia con iluminación en el ultravioleta utilizando diferentes combinaciones de filtros de emisión y excitación. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Nikon modelo TE300.

Preparación mitocondrial

Para obtener de las mitocondrias, las células se resuspendieron en el medio de aislamiento con 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 250 mM sacarosa, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM β -mercapto-etanol, 1 mM PMSF y 0.1% (p/v) BSA a una relación final de 5 ml/g de peso húmedo. Las células se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio (450 μ m), con tres ciclos de 25 segundos de ruptura con intervalos de 35 segundos en un bead beater a 4° C. Los homogeneizados se centrifugaron a 3000 x g por 10 minutos a 4° C para remover las células rotas y el sedimento celular. El sobrenadante se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos y el sedimento con la fracción mitocondrial se lavó con el medio de aislamiento una vez más, y las mitocondrias se resuspendieron a una concentración final de 5 mg de proteína por ml. Las mitocondrias se mantuvieron en hielo y se utilizaron frescas dentro de las siguientes 3 horas.

Determinación de proteína por el método de Biuret

La muestra problema y los estándares de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg de albúmina se aforaron a 200 μ l con H₂O. Se agregaron dos mililitros de una mezcla de tartrato de sodio, sulfato de cobre y yoduro de potasio a cada muestra y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, para generar los complejos de cobre-proteína. La absorbencia de la muestras se leyó a 540 nm y se comparó contra la curva estándar para conocer la concentración de proteína.

Medición del potencial de membrana

El potencial de membrana mitocondrial se monitoreó a través de los cambios en la absorbencia de la safranina O utilizando las longitudes de onda de 511-533 nm, de acuerdo con el método de Akerman y Wikström (1976). Los resultados se muestran como los cambios relativos en el $\Delta\psi$ debido a que el sistema no fue calibrado. El ensayo se realizó en un medio de 125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 0.5

mM EGTA, 8 μ M safranina O y 1.0 mg/ml de proteína mitocondrial. La temperatura del ensayo fue de 30° C y la reacción se inició por la adición de 7 mM succinato o 0.5 mM de NADH a 2.0 ml de medio.

Determinación de la respiración mitocondrial

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente utilizando un electrodo de tipo Clark ajustado a una cámara de 1.5 ml. El ensayo se realizó utilizando 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial en una solución saturada de oxígeno con 125 mM de sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.0, 2.5 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , 0.5 mM EGTA, 0.1% (p/v) BSA. Todos los experimentos se realizaron a 28° C. Los estados respiratorios 3 y 4 se determinaron como lo describió Estabrook (1967), utilizando 7 mM succinato o una mezcla de 6 mM de piruvato y malato como sustratos respiratorios. El ADP se utilizó a una concentración final de 0.85 mM. La velocidad de la respiración antes de la adición del ADP (estado 4) y durante la fosforilación (estado 3) se utilizaron para calcular el cociente respiratoria (estado 3/estado 4).

Detección del peróxido de hidrogeno mitocondrial

La producción de H_2O_2 mitocondrial se determinó con la sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) [Black y Brandt, 1974]. La fluorescencia de la DCF se monitoreó con un espectrofluorómetro a 30° C. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 488 y 520 nm, respectivamente. La mezcla de reacción fue 125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 2.5 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , 0.5 mM EGTA, 2 μ M $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 5 U de peroxidasa de rabano (Sigma) y 1.0 mg/ml de proteína mitocondrial. La reacción se inició con la adición de succinato 7 mM o la mezcla de 6 mM de piruvato y malato.

Ensayo del glutatión total

Las mitocondrias frescas se mezclaron con 2 M HClO_4 y se centrifugaron a 12000 x g por 10 minutos. El sobrenadante, que contiene los componentes solubles GSH, GSSG y los disulfuro solubles en ácido, se transfirió a un nuevo tubo y se utilizó para el ensayo del glutatión.

El contenido de glutatión total (glutatión reducido y oxidado) en los sobrenadantes mitocondriales se determinó mediante la reducción del DTNB

(Akerboom y Sies, 1981). La mezcla de reacción contenía 100 mM de fosfato de potasio, pH 7.0, 5 μ M GSH reducido, 200 μ g de proteína, 75 μ M DTNB, 240 μ M NADPH. La reacción se inició con la adición de 20 μ l glutatión reductasa (5 mg/ml, Roche Applied Science). La formación de TNB se siguió por absorbencia a 412 nm. Para la calibración, el procedimiento se repitió utilizando 10 μ M GSSG en lugar de la muestra.

Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida e inmunodetección (Western blotting)

Se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Las muestras de las fracciones mitocondriales (10 μ g de proteína) se mezclaron con un volumen igual de amortiguador desnaturalizante y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF con un voltaje constante de 25 V en una cámara semihúmeda (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS-T. Después se incubaron 2 horas con los anticuerpos monoclonales contra la AOX de *Sauromatum guttatum* (proporcionado por el Dr T. E Elthon de la Universidad de Nebraska-Lincoln, NB, USA). El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000. Las membranas se lavaron ocho veces por 10 minutos con 20 ml de PBS-T. Posteriormente se incubaron en agitación durante 2 horas con el anticuerpo secundario (anti-ratón) acoplado a peroxidasa, diluido 1:20,000 en PBS-Tween con 5% de leche. Las membranas nuevamente se lavaron con PBS-T y las bandas se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL-plus (Amersham), y se detectaron por autorradiografía en placas fotográficas (Kodak, Biomax-Light Film). Los pesos moleculares de las dos proteínas reconocidas por el anticuerpo se calcularon por un análisis de regresión no lineal utilizando el programa CurveExpert 1.3.

Western blot para nitrotirosinas y nitro cisteínas

Las muestras de cada preparación mitocondrial (20 μ g) se mezclaron con un volumen igual de amortiguador desnaturalizante y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubó toda la noche a 4° C con un anticuerpo monoclonal contra 3-nitrotirosina (R&D Systems, Inc, MAB3248) a una dilución de 1:1000 o con un anticuerpo monoclonal contra nitrocisteínas (A.G Scientific, Inc, N1078) a una dilución 1:2000. Las membranas nuevamente se lavaron con PBS-T y las bandas se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL-plus

(Amersham), y se detectaron por autorradiografía en placas fotográficas (Kodak, Biomax-Light Film).

Determinación de la peroxidación de lípidos

La peroxidación de los lípidos se determinó con el ensayo cuantitativo para peróxidos de lípidos (LPO) de Calbiochem (Cat. No. 437639). Las muestras mitocondriales se incubaron con los distintos tratamientos por diferentes tiempos (1, 2, 5 y 10 min). Posteriormente se lavaron 2 veces con un amortiguador 50 mM de fosfatos pH 7.0. Los hidroperóxidos de lípidos se extrajeron con una mezcla de solventes y se cuantificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cromógeno se siguió por su absorbencia a 500 nm ($\epsilon = 16667 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). En paralelo se llevó a cabo la preparación de la curva de titulación con 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 μl del estándar de hidroperóxidos de lípidos.

RESULTADOS

En la respiración de las células de *U. maydis* que crecen a 28 ° C participan la vía de los citocromos y la vía alterna (Juárez y cols., 2006). Sin embargo, la velocidad de respiración de estas células en presencia de inhibidores mostró que la vía principal es la de los citocromos y que la AOX posiblemente participa en regular otras funciones celulares como la producción de ROS (Figura 1). Es interesante mencionar que el inhibidor específico de la AOX ligeramente estimuló la respiración (Figura 13A), y este efecto se atribuye a la redistribución de los electrones de la vía alterna hacia la ruta de los citocromos. En contraste, la adición de KCN no tuvo el mismo efecto sobre la velocidad de respiración de la AOX (Figura 13B). Este resultado sugiere que la actividad de la vía alterna sólo corresponde a la mitad de la vía de los citocromos, aunque no necesariamente este valor representa la máxima capacidad de la AOX. Además la adición de ambos inhibidores a las células promueve la formación de oxígeno, que posiblemente resulta de la descomposición del H₂O₂ por algún sistema antioxidante.

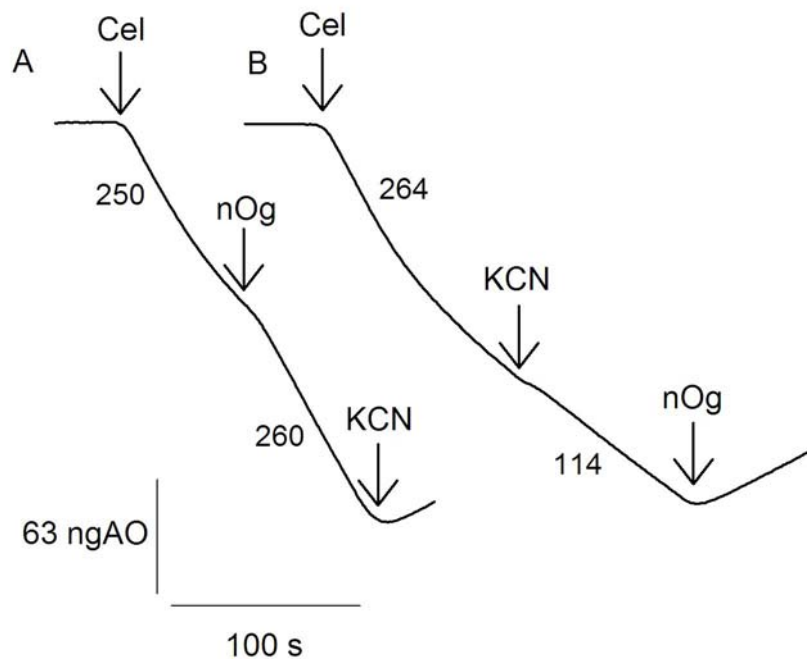


Figura 13. Consumo de oxígeno por las células de *U. maydis* cultivadas a 28° C. Las células se lavaron dos veces con agua destilada para remover el medio de cultivo. Las mediciones de la respiración se llevaron a cabo en 10 mM de Mes pH 6.0. Donde se indica con las flechas se adicionó, 0.2 AU₆₀₀ de células, 25 µM de nOg y 1 mM de KCN. La densidad celular se determinó como la absorbencia a 600 nm (AU₆₀₀).

Es interesante mencionar que la AOX forma parte de la primera línea de defensa antioxidante mitocondrial y su función está directamente relacionada con la regulación de la producción de ROS a través de dos mecanismos: 1) La AOX mantiene el estado redox de la quinona en la forma oxidada y 2) La AOX mantiene una baja concentración de oxígeno debido a que lo reduce en agua y evita que este se acumule en la mitocondria y pueda aceptar los electrones de los complejos respiratorios (Sándor y cols., 2003).

Para confirmar que la AOX regula la formación de ROS, las células de *U. maydis* se cultivaron en presencia de 25 μM de nOg por 24 horas en matraces de 250 ml. Para nuestra sorpresa, la cantidad de biomasa de este cultivo correspondió a solo la cuarta parte de la biomasa de las células cultivadas en el mismo medio sin nOg. Por tanto, se decidió hacer más experimentos para comprender mejor el efecto de este compuesto sobre la morfología y la viabilidad de la célula.

1. *Octil galato inhibe el crecimiento y estimula el cambio morfológico de U. maydis*

U. maydis es un hongo dimórfico, capaz de producir diferentes formas morfológicas en respuesta a diferentes estímulos ambientales y su capacidad para transformarse de levadura a micelio es un factor de patogenicidad (Martínez-Espinoza y cols. 1997). En condiciones de estrés nutricional, el pH ácido induce la transición dimórfica (Ruiz-Herrera y cols. 1995). Sin embargo, no hay estudios sobre la participación de la mitocondria durante este proceso.

El nOg pertenece al grupo de los alquil galatos, los cuales son compuestos fenólicos que inhiben específicamente a las AOX en mitocondrias aisladas y en organismos completos (Shimoji y Yamasaki, 2005; Juárez y cols. 2004). Algunos compuestos polifenólicos son producidos o liberados por las plantas durante la infección fúngica (Kobayashi A y cols., 1994). Asimismo, las AOX de los hongos patógenos participan en la protección contra el estrés oxidativo y están implicadas con su virulencia (Akhter y cols. 2003). Puesto que estos compuestos son tóxicos para los hongos y afectan su patogenicidad, pueden ser utilizados como agentes antifúngicos.

La finalidad de la primera parte de este trabajo fue comprender la participación de la AOX en la plasticidad de *U. maydis*, y se estudió el efecto de diferentes compuestos polifenólicos que inhiben a la AOX en mitocondria aislada (propil galato, NDGA y octil galato, Figura 14) sobre la viabilidad y la morfología de la fase levaduriforme y saprofítica de este hongo.

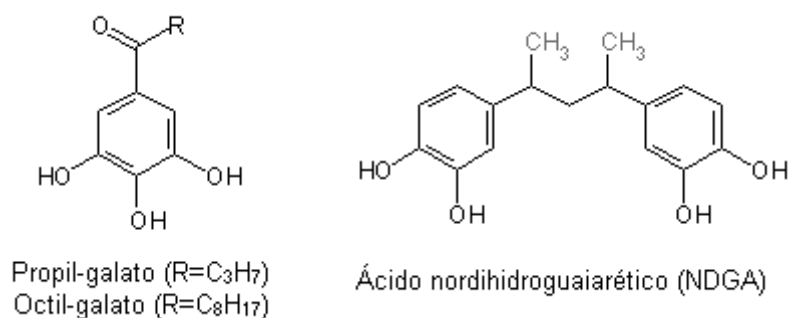


Figura 14. Estructura química de los compuestos polifenólicos utilizados en este estudio.

La Figura 15 muestra el efecto inhibitorio de los diferentes compuestos polifenólicos sobre el crecimiento celular. Las células de *U. maydis* en medio de YPD se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de propil galato (nPg), ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y octil galato (nOg). El crecimiento se cuantificó en términos de peso seco en gramos. A la concentración máxima de 100 μ M de cada compuesto, tanto el nPg y el NDGA disminuyen en un 35 % el rendimiento celular (Figura 15). En contraste, las células cultivadas en presencia de nOg mostraron una dramática disminución en el peso seco, el cual corresponde al 15 % del valor obtenido en ausencia del compuesto (Figura 15). Es interesante mencionar que otras líneas celulares se han cultivado en presencia de estos compuestos y generalmente se produce la inhibición de la AOX y un incremento en la actividad de la vía clásica de los citocromos (Tanton y cols., 2003). Estos resultados sugieren que los efectos de cada compuesto sobre el crecimiento de las células de *U. maydis* no dependen sólo de la inhibición sobre la AOX y que estos compuestos tienen otros blancos celulares aún no identificados.

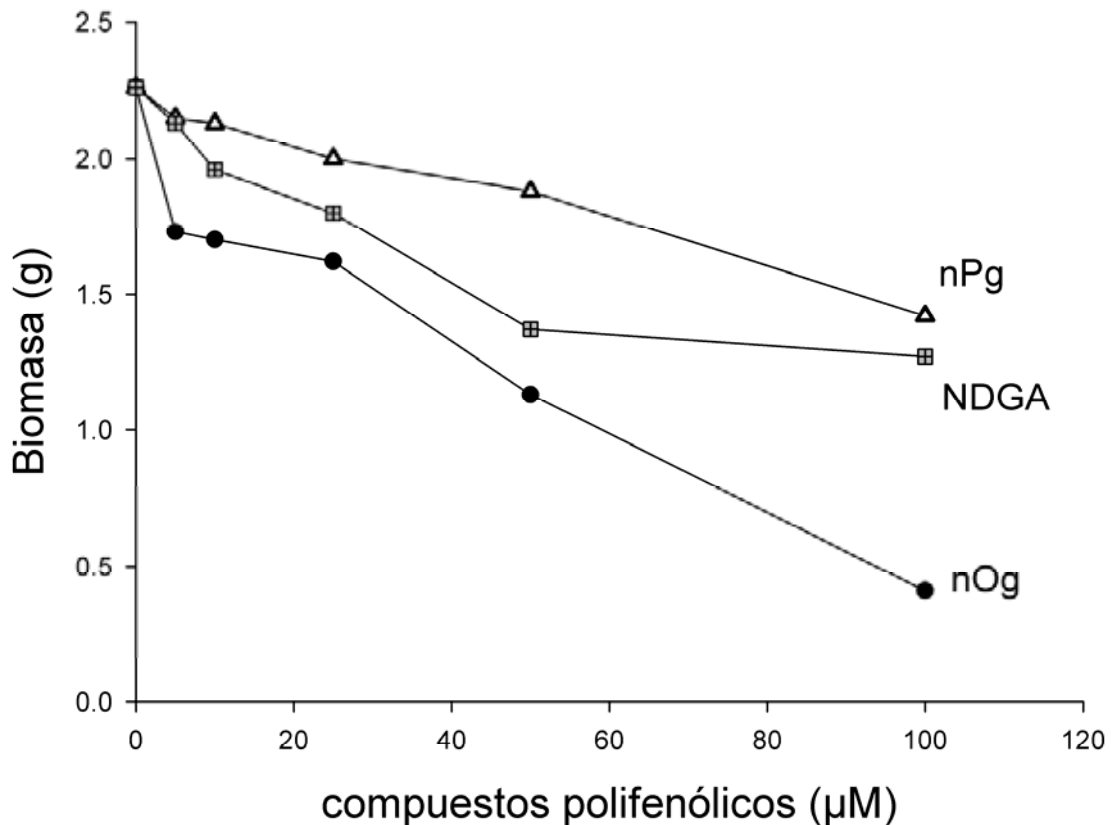


Figura 15. Efecto del propil galato (nPg), octil galato (nOg) y el NDGA sobre el rendimiento de la biomasa de las células de *U. maydis*.

Aunque hubo una disminución en la biomasa, las células de *U. maydis* cultivadas en presencia de nPg y NDGA mostraron la morfología típica de las células control, las cuales crecen por gemación en medio líquido de YPD a 28° C (Figura 16a). Sin embargo, cuando las células de *U. maydis* se expusieron a concentraciones de octil galato entre 30 y 40 µM, se indujo un cambio morfológico de levadura a micelio (Figura 16b). Entre los mecanismos antifúngicos del nOg destaca su capacidad para generar estrés oxidativo (Fujita y Kubo, 2002). Ya que el glutatión participa en las defensa contra las ROS y en la transición dimórfica de algunas levaduras (Thomas y cols., 1991; Jürgensen y cols., 2001), Se utilizó al glutatión total para medir el grado de estrés en las células tratadas con los compuestos polifenólicos. Además, se tomó como control positivo al L-Butionín-S,R-sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la síntesis del glutatión (Griffith y Meister, 1979). La concentración de GSH total de estas células es muy parecida a la reportada para otras levaduras (Madeo y cols., 1999) y plantas (Okuda y Yokotsuka, 1999). En el caso de las células tratadas con nPg y NDGA se observó una ligera disminución. Sin embargo, las células tratadas con el nOg no

presentaron cambios significativos con respecto al control (Tabla 2). Estos resultados muestran que el metabolismo del glutatión no está relacionado con la transición dimórfica inducida por el nOg.

Tabla 2. Concentración de glutatión total (GSH+GSSG) de las células tratadas con los diferentes compuestos polifenólicos.

Compuesto polifenólico	Glutatión total (μ moles/g peso seco)
Control	1.8 ± 0.24
30 μ M n-propil galato	1.3 ± 0.13
30 μ M n-octil galato	1.7 ± 0.44
30 μ M NDGA	1.4 ± 0.24
200 μ M BSO	1.1 ± 0.10

Otra posibilidad es que el nOg promueva el dimorfismo de las células alterando la fluidez de las membranas celulares mediante su propiedad surfactante. Este efecto se observó en recientes estudios, por ejemplo, cuando las células de *U. maydis* se cultivan en presencia de triacilgliceroles se induce el cambio dimórfico (Klose y cols. 2004). Además, se ha reportado que el peróxido de hidrógeno producido por las glioxal oxidasas de este hongo son importantes en el dimorfismo celular (Leuthner y cols., 2005). Por tanto, es posible que el nOg induzca el dimorfismo a través de su interacción con las membranas. Para ensayar esta posibilidad se utilizó al trolox (Calbiochem), un análogo del α -tocoferol soluble en agua que se utiliza para reducir el daño oxidativo de las membranas.

Las células tratadas con trolox y nOg por 24 horas a 28° C crecieron como levaduras, un poco más alargadas que las células control (Figura 16c). Este resultado sugiere que el nOg interactúa con la membrana y promueve la peroxidación lipídica que promueve el dimorfismo de este hongo.

Para demostrar que el octil galato estimula el cambio dimórfico de levadura a pseudomicelio y no solamente la agregación de las células que podrían confundir la interpretación de los resultados morfológicos, se utilizó la técnica del blanco de calcoflúor. Este fluorocromo tiene la característica de unirse a los polisacáridos de la pared celular de los hongos, especialmente en los septos. En la figura 17a se muestra un fenotipo típico de las levaduras del hongo, las cuales acumulan el calcoflúor en estructuras parecidas a vesículas, mientras que las células tratadas con octil galato acumularon el colorante principalmente en las regiones de los septos de los pseudomicelios (Figura 17b).

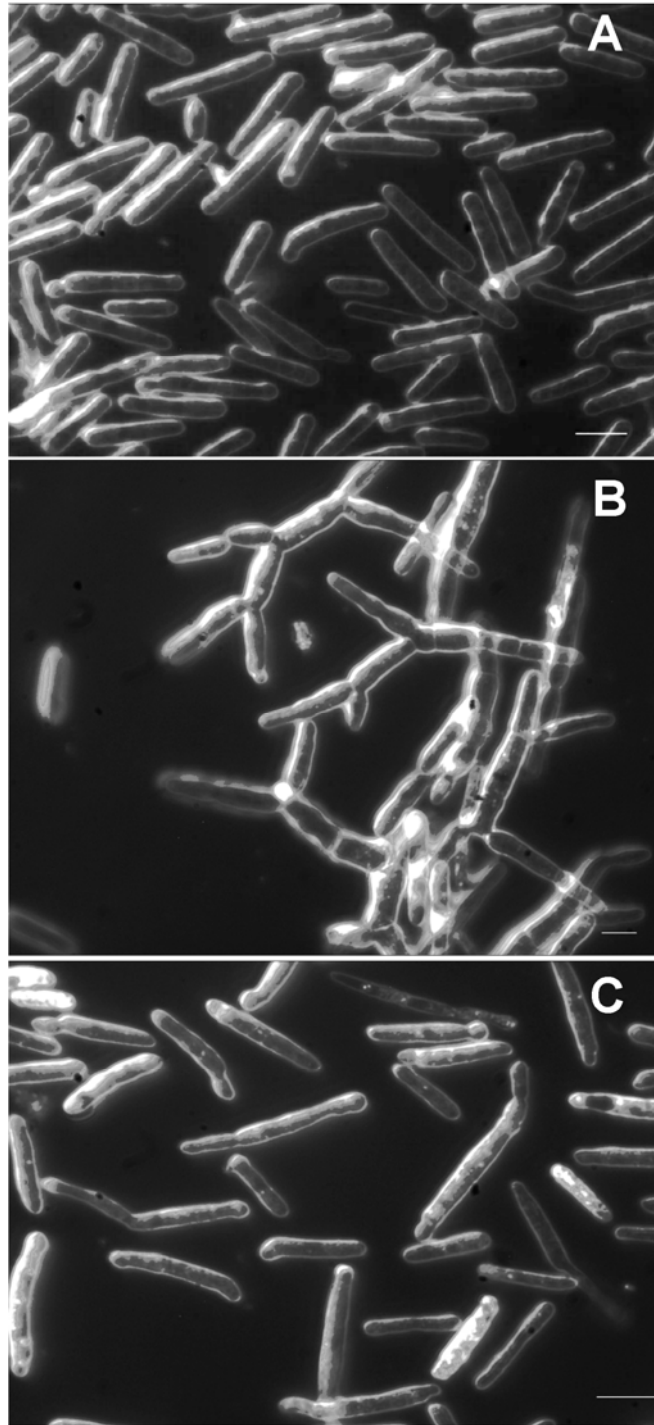


Figura 16. Cambios morfológicos de las células de *U. maydis* inducidos por el octil galato y revertidos por el trolox. A) células control (no tratadas); B) células cultivadas con 40 μM de octil galato; C) células cultivadas con 40 μM de octil galato y 200 μM de trolox. Las imágenes fueron tomadas a las 20 horas después de añadir los compuestos. Escala de la barra, 10 μm .

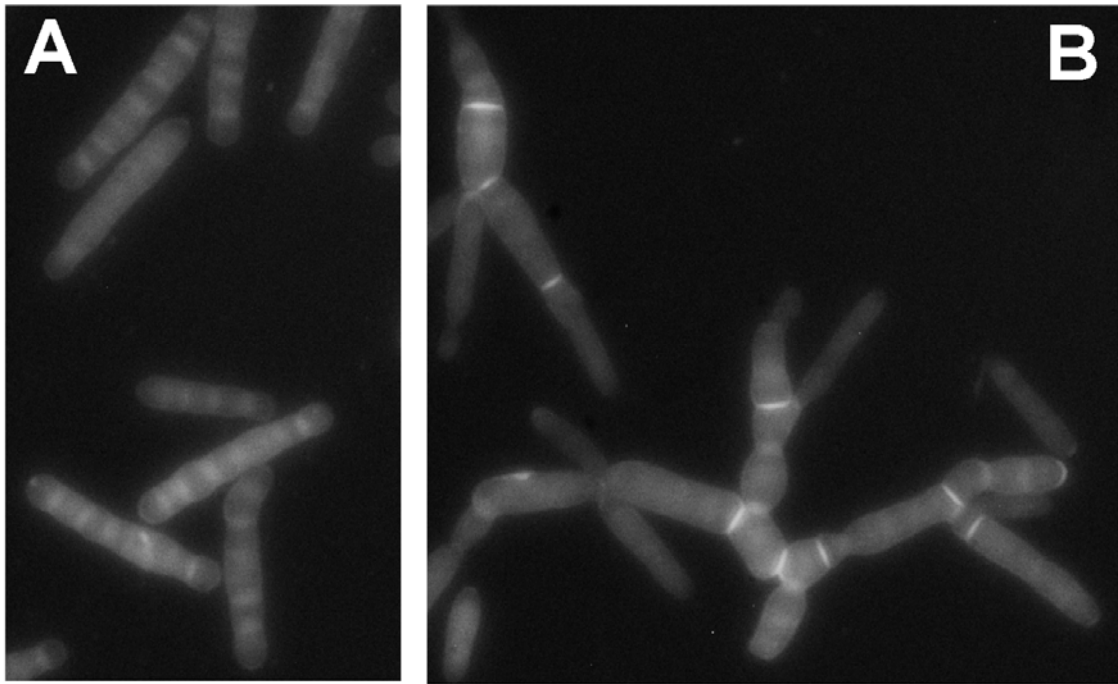


Figura 17. Células de *U. maydis* teñidas con calcoflúor. Los cambios morfológicos se observaron 24 h después de la adición del octil galato. A) células control; B) células cultivadas con 30 μ M de octil galato.

Debido a la complejidad de los efectos del inhibidor nOg sobre la viabilidad y la morfología en células completas, se decidió trabajar con mitocondrias aisladas para el estudio del efecto del estrés oxidativo y nitrosante sobre la actividad de la AOX en las levaduras de *U. maydis*.

2. Integridad de las mitocondrias aisladas de *U. maydis*

Las mitocondrias se analizaron por microscopía electrónica para determinar su grado de pureza. La figura 18 muestra que la preparación mitocondrial contiene una cantidad importante de membranas, las cuales son de origen mitocondrial de acuerdo con los resultados obtenidos por espectroscopía de masas de al menos 30 diferentes bandas de geles desnaturalizantes. A pesar de que una fracción importante se daña por el método de ruptura celular con perlas de vidrio, en la preparación se observó un 80 % de mitocondrias intactas. Sin embargo, por razones que desconocemos, las mitocondrias son muy frágiles y si se someten a un paso adicional de purificación en gradiente de percoll o sacarosa, el porcentaje de mitocondrias intactas disminuye hasta un 15 %, comparado con la fracción cruda, por lo que, se decidió trabajar con la fracción cruda en un tiempo relativamente corto, no mayor de tres horas después de su aislamiento, para asegurar la reproducibilidad de los resultados.



Figura 18. Micrografía electrónica de las mitocondrias aisladas de células FB₂ en la fase levaduriforme, utilizando el método de las perlas de vidrio para romper a las células.

En este trabajo estudiamos por primera vez la integridad de la cadena mitocondrial utilizando mitocondrias aisladas. No hay consumo de oxígeno basal en ausencia de los sustratos respiratorios, lo cual muestra que la preparación no tiene sustratos endógenos (estado 1). Como se esperaba, las mitocondrias de *U. maydis* oxidaron eficientemente todos los sustratos respiratorios (piruvato/malato, succinato, NADH y glicerol-3P) (estado 2) y el ADP estimuló el consumo de oxígeno (estado 3). Una vez que todo el ADP se transformó en ATP, el consumo de oxígeno disminuyó (estado 4). A partir del cociente entre los valores de consumo de oxígeno del estado 3 y el 4 se obtuvo el valor del control respiratorio, que indica el grado de funcionalidad de las mitocondrias. En nuestras preparaciones mitocondriales se obtuvo un control respiratorio de 1.5 con succinato y de 2.0 con piruvato/malato (Figura 19).

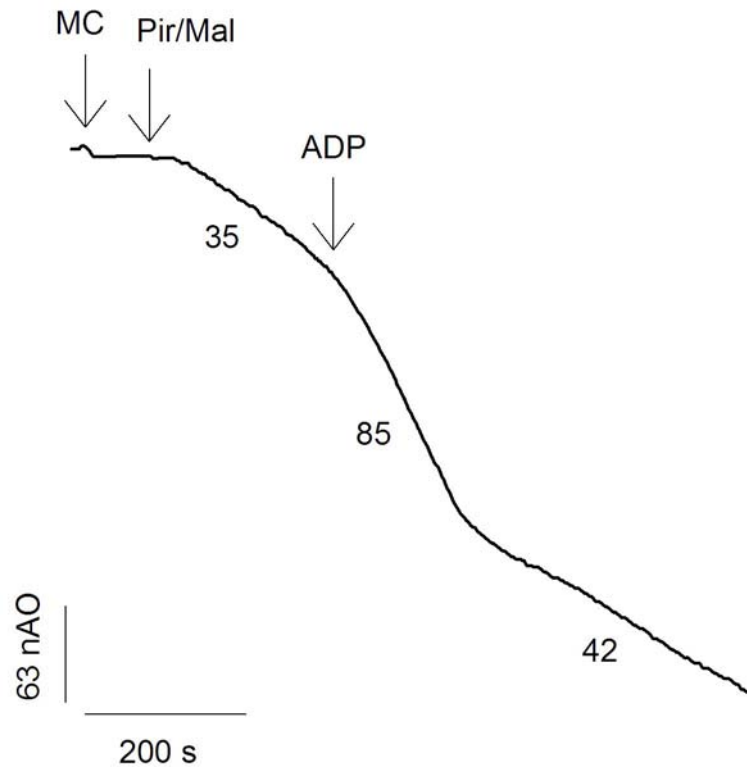


Figura 19. Trazo respiratorio de las mitocondrias aisladas de células de *U. maydis*. Donde se indica se adicionó 1 mg/ml de proteína mitocondrial, una mezcla de 6 mM de piruvato y malato y 250 μM de ADP para inducir la fosforilación oxidativa.

Las concentraciones de los inhibidores se disminuyeron a 5 μM para el nOg y 0.5 mM para el KCN para evitar efectos inespecíficos sobre otros blancos mitocondriales diferentes de las oxidasas terminales. Como se esperaba, la respiración en las mitocondrias aisladas fue insensible a la adición del nOg y se inhibió por la adición subsecuente de KCN (Figura 20A). Sin embargo, cuando se invirtió el orden de adición, el KCN inhibió el 60 % de la respiración y el nOg completamente inhibió la respiración residual (Figura 20B). Estos resultados concuerda con que las dos rutas respiratorias coexisten en las células de *U. maydis*, pero la AOX no parece competir con la vía de los citocromos por los electrones y sólo mantiene la respiración cuando la vía clásica está inhibida.

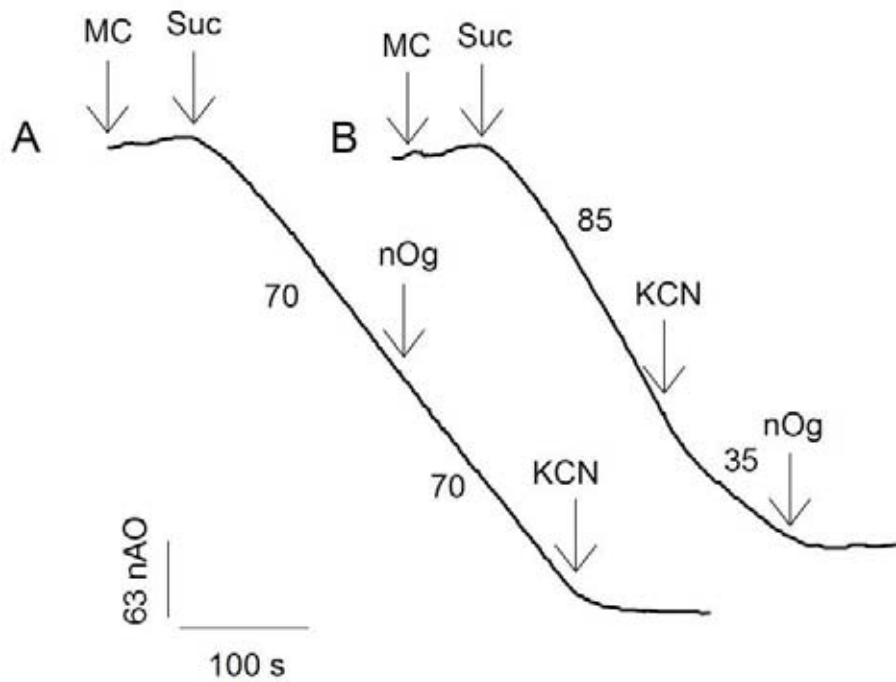


Figura 20. Efecto de los inhibidores nOg y KCN sobre la respiración total en mitocondrias aisladas. En los tiempos indicados por las flechas se adicionó 1 mg/ml de proteína mitocondrial, 7 mM de succinato (Suc), 5 μ M de octil galato (nOg), 0.5 mM de KCN.

Tanto el succinato como la mezcla de piruvato-malato inducen la generación de un potencial de membrana. Este potencial se abate ligeramente por la adición de nOg (Figura 21), lo cual sugiere que este compuesto polifenólico afecta las membranas debido a que la inhibición de la AOX no participa en la generación del potencial de membrana. La adición de 1 μ M de CCCP, un desacoplante de la fosforilación oxidativa, sólo tuvo un ligero efecto y se necesitaron de concentraciones más altas para abatir completamente el potencial de membrana. Sin embargo, el potencial es muy sensible a los inhibidores de la vía de los citocromos, como la antimicina A y el cianuro (Figura 21). A partir de estos datos, se utilizó al succinato como el sustrato respiratorio debido a la excelente actividad de la succinato deshidrogenasa y a la antimicina A como inhibidor de la vía de los citocromos.

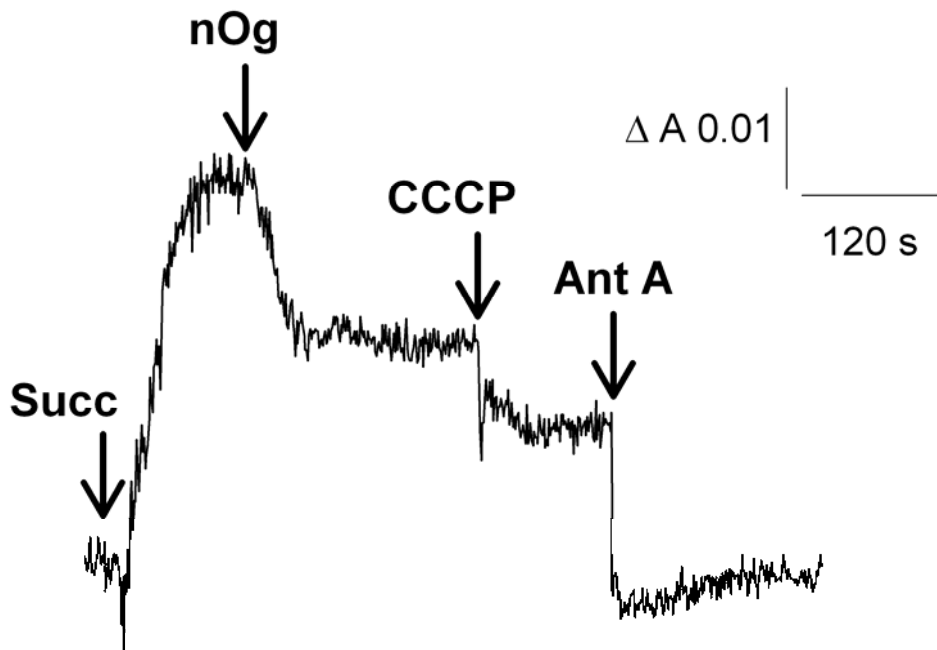


Figura 21. Efecto del octil galato sobre el potencial de membrana mitocondrial. El potencial se midió con safranina O. En los tiempos indicados por las flechas se adicionó 7 mM de succinato (Succ), 5 μ M de octil galato (nOg), 1 μ M de CCCP y 3 μ M de antimicina A (Ant A).

3. Inducción de la expresión de la AOX por antimicina A

La existencia de una AOX constitutiva es una característica común en los hongos (Affourtit et al., 2000; Umbach and Siedow, 2000). Sin embargo, cuando ciertos hongos fitopatógenos se exponen a fungicidas comerciales, expresan diferentes genes de la AOX, que confieren resistencia a estos compuestos (Wood and Hollomon, 2003). Además, en respuesta a cambios en las condiciones ambientales o a las demandas energéticas de las células, por ejemplo, en presencia de los inhibidores de la vía de los citocromos, como la antimicina A o el cianuro, se induce la expresión de la AOX en diversas especies (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Helmerhorst et al., 2002; Lambowitz et al., 1989; Minaga and Yoshimoto, 1987). En este trabajo se utilizó a la antimicina A para incrementar la capacidad de la AOX en la células levaduriformes de *U. maydis*. A través del análisis de inmunodetección utilizando el anticuerpo monoclonal contra la AOX de *Sauromatum guttatum*, se detectaron dos bandas con una masa molecular de alrededor de 42.5 y 28.5 kDa, tanto en las mitocondrias de las células control como en las células cultivadas con antimicina A (Figura 22). Mediante la cuantificación densitométrica se encontró un incremento de 2.5 a 3 veces en la

concentración de la AOX en las mitocondrias obtenidas de las células cultivadas en presencia de antimicina A, en comparación con las mitocondrias control. Por tanto, como en otros hongos, la alteración en la concentración de la AOX en la membrana interna mitocondrial parece desempeñar un papel clave en la regulación de la actividad de la AOX en *U. maydis* bajo condiciones de estrés oxidativo.

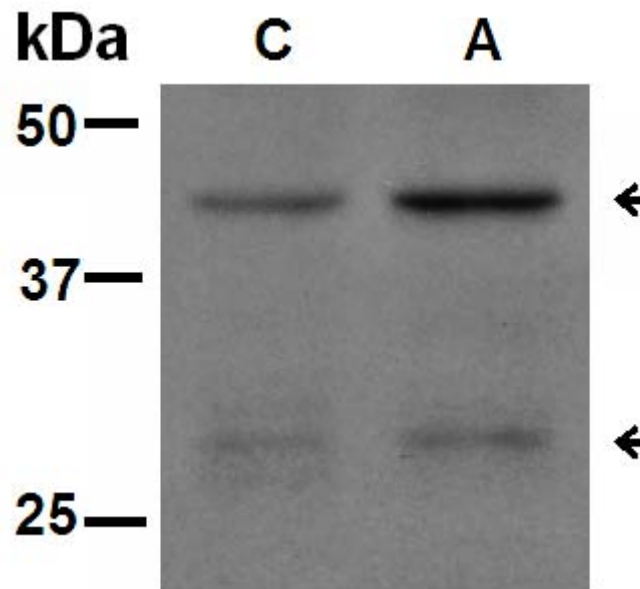


Figura 22. Inmunodetección de la AOX. Carril C: mitocondrias de células cultivadas en ausencia de antimicina A (células control); Carril A: mitocondrias de células cultivadas en presencia de antimicina A. Los marcadores de peso molecular en kDa son indicados a la izquierda de la figura. Las flechas muestran las bandas que reaccionaron con el anticuerpo monoclonal de *Sauromatum guttatum*.

4. Estimulación de la respiración alterna por AMP y piruvato

Previamente se reportó que la respiración resistente a cianuro en las células permeabilizadas con digitonina puede ser inhibida por altas concentraciones de ácido salicilhidroxámico y alquil galatos (Juárez et al., 2004 y 2006), sugiriendo que estos inhibidores pueden ser utilizados para estimar la actividad de la AOX en las células de *U. maydis*. Como se esperaba, esta inhibición también se observó en las mitocondrias aisladas. La adición de antimicina A inhibe el 85% de la respiración total en las mitocondrias energizadas con succinato, y la adición del octil galato inhibe el resto de la actividad respiratoria (Figura 23A). La velocidad de consumo del oxígeno a través de la AOX después de la adición de la antimicina A fue dos a tres veces mayor en presencia de 1 mM de AMP o 2 mM de piruvato que en su ausencia (Figura 23A y B,

respectivamente). Llama la atención que en nuestras condiciones de ensayo, el piruvato estimula la respiración alterna. Por tanto, se exploró el efecto de estos dos activadores sobre la AOX en mitocondrias que se aislaron a partir de células cultivadas con antimicina A. Lo más interesante de los resultados fue el cambio en la conducta de la AOX. Con succinato como sustrato, las mitocondrias control mostraron una baja actividad de AOX, que se estimuló con AMP o piruvato (Figura 23A y B). En cambio, las mitocondrias de las células cultivadas en presencia de antimicina A mostraron un gran incremento en la capacidad de la AOX (comparar la Figura 23A con 23C), la cual no se estimuló con AMP (Figura 23C), pero sí con piruvato (Figura 23D). A fin de comparar los efectos observados con antimicina A se empleó peróxido de hidrógeno y cloranfenicol. Las mitocondrias aisladas de las células sometidas a estos tratamientos presentaron el mismo patrón de activación de la AOX por AMP y piruvato, como en el caso de la antimicina A. Estos resultados sugieren que en condiciones de estrés oxidativo, disminuye la concentración de ATP y aumenta la actividad de las enzimas que producen piruvato dependientes de ADP. Entonces para evitar la acumulación de piruvato, las enzimas que lo utilizan deben aumentar la concentración de ubiquinol y la actividad de la AOX en la respiración. Además el piruvato tiene actividad antioxidante contra el H_2O_2 y el $ONOO^-$ que protege la mitocondria durante el estrés oxidativo (Wang y cols., 2007).

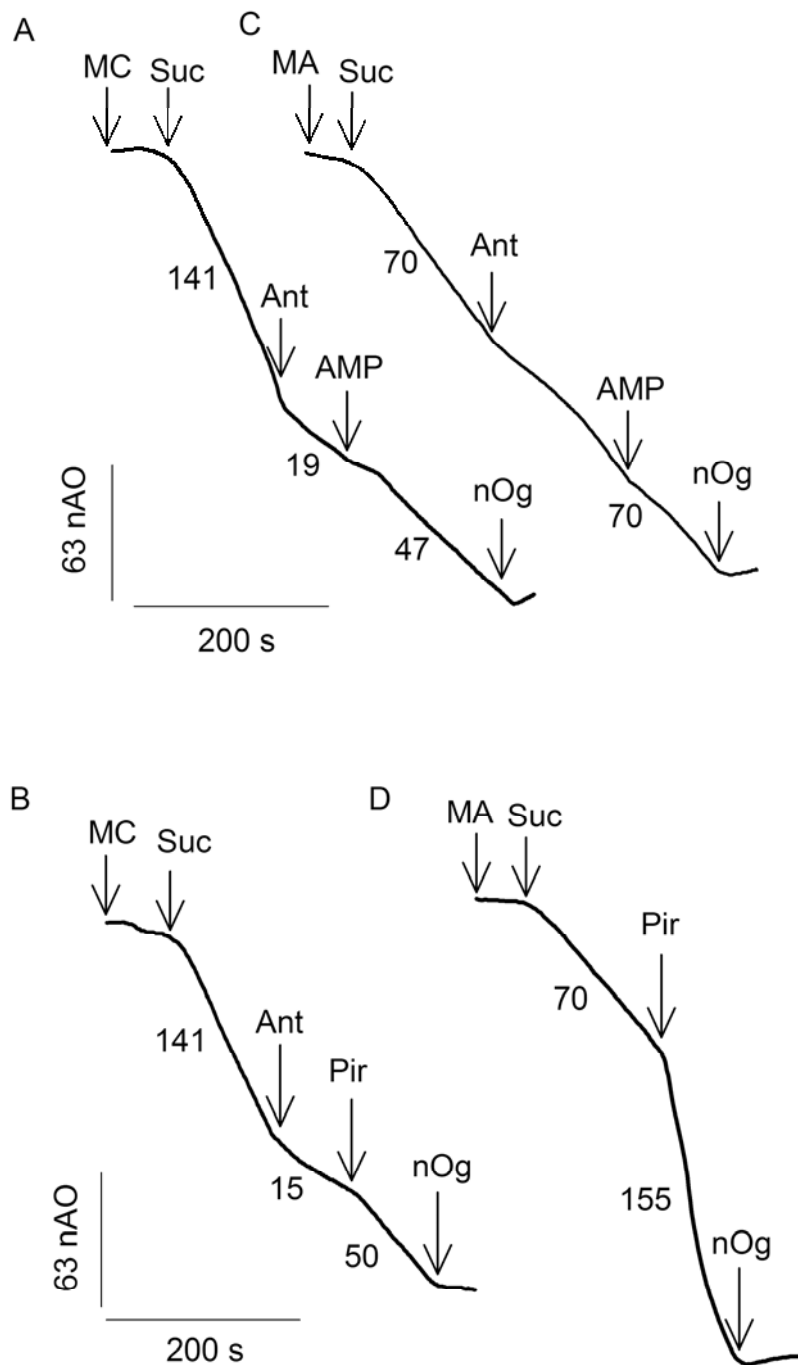


Figura 23. Registros de oximetría de las mitocondrias aisladas de células cultivadas en ausencia (MC) o presencia de antimicina A (MA). En A y B se muestran los trazos de consumo de oxígeno de las mitocondrias control aisladas de células sin antimicina A. Donde se indica, se realizaron las siguientes adiciones: 0.5 mg/ml proteína mitocondrial, 7 mM succinato (Suc), 2 μ M antimicina A (Ant), 1 mM AMP, 2 mM piruvato (pir), 5 μ M n-octil gallato (nOg). Los números a la izquierda de los trazos son las velocidades de consumo de oxígeno en nano átomo-gramos de oxígeno (nAO) por miligramo de proteína por minuto. Los trazos C y D, se obtuvieron con mitocondrias aisladas de células cultivadas con antimicina A. Solo se muestran resultados representativos.

5. La relación entre la actividad de la AOX y la producción mitocondrial de ROS

Existen muchos métodos para ensayar el estrés oxidativo intracelular, como la cuantificación del GSH, de la lipoperoxidación, de los aldehídos reactivos, de los carbonilos proteicos y de la ruptura de las cadenas de DNA (Tyson y Frazier, 1994). Aunque estos métodos son muy útiles para determinar los efectos de los ROS en las células, no identifican a las especies reactivas que inducen el daño. El reciente concepto de que las ROS y las RNS participan en los diferentes procesos celulares ha permitido el desarrollo de indicadores que detectan a las especies que participan en cada proceso.

El diacetato de la diclorodihidrofluoresceína ($H_2DCF-DA$) se utiliza como un detector fluorescente para el peróxido de hidrógeno (Burrow y Valet, 1987). Los grupos acetilo del $H_2DCF-DA$ se rompen por las esterasas intracelulares para producir H_2DCF . La oxidación de la H_2DCF produce la diclorofluoresceína que es altamente fluorescente (DCF). Aunque el $H_2DCF-DA$ fue inicialmente desarrollado para la cuantificación del H_2O_2 , este compuesto es oxidado por el $O_2^{\cdot-}$, el $\cdot OH$, ROOH y el $NO\cdot$ (LeBel y cols., 1992; Royall y Ischiropoulos, 1993). Estas propiedades del $H_2DCF-DA$ lo hace un detector general del estrés oxidativo celular.

Para estudiar la participación de la AOX en la producción de ROS en las mitocondrias de *U. maydis* se utilizó al $H_2DCF-DA$, que difunde a través de las membranas y permite mantener la integridad del organelo. La adición de succinato aumentó la oxidación de la sonda, y el nOg provocó un mayor aumento en la formación de ROS (Figura 24). Este resultado muestra que la inhibición de la AOX favorece la producción de ROS en mitocondrias aisladas. Además, como control positivo se adicionó al H_2O_2 , que provocó un rápido aumento en la oxidación de la sonda.

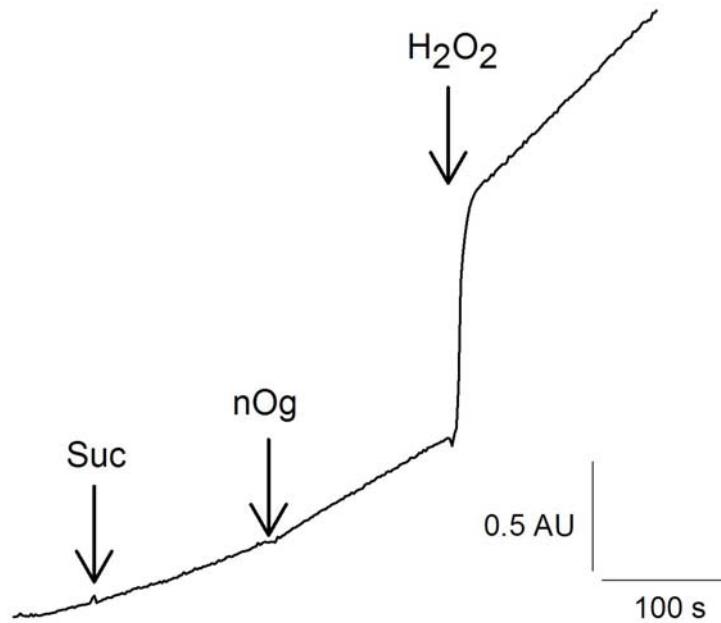


Figura 24. Detección de ROS en mitocondrias cargadas con la sonda H₂DCF-DA. Las flechas indican el orden de adición: 6 mM de succinato (Suc), 5 μM de octil-galato (nOg) y 0.2 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como control positivo.

Entre las funciones de la AOX en la mitocondria está la de actuar como una válvula de sobreflujo en la transferencia de electrones, previniendo la formación de ROS durante la inhibición de la vía de los citocromos. Para estudiar esta relación, se estimó el efecto del KCN, nOg o ambos sobre la formación de ROS. Se observó que la adición de 5.5 μM de nOg incrementó la velocidad de producción del H₂O₂, mientras que 0.4 mM de cianuro tuvo poco efecto sobre la generación de ROS (Figura 25, trazo +KCN). En cambio, la adición de cianuro y nOg indujeron un gran incremento en la producción de H₂O₂, mayor que el observado con sólo KCN o nOg (Figura 24A, trazo KCN+nOg). Para demostrar que los cambios en la fluorescencia de H₂DCF-DA estaban relacionados con la producción de H₂O₂, se adicionaron 50 U/ml de catalasa en el medio de incubación. La presencia de esta enzima antioxidante redujo la producción de ROS inducida por la adición de antimicina A (Figura 25B). Estos resultados muestran que a pesar de la presencia de la AOX, la producción de ROS fue bastante significativa en ausencia de nOg y que otros mecanismos también deben participar en la regulación de la producción de ROS.

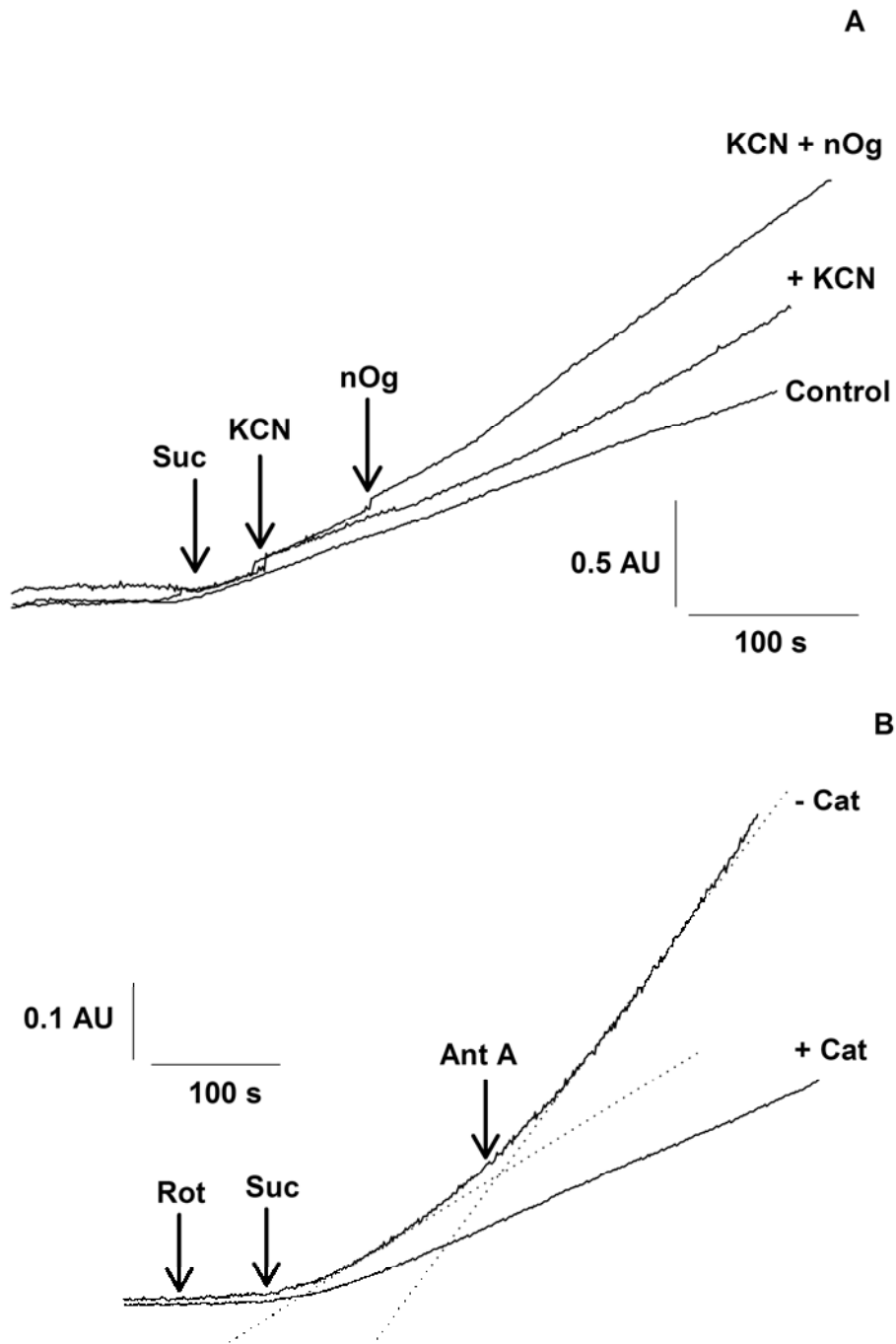


Figura 25. Efecto de la antimicina A, cianuro y octil galato sobre la producción de ROS en las mitocondrias de *U. maydis*. Las mitocondrias (1 mg/ml) se cargaron con la sonda H₂DCF-DA para la detección del H₂O₂. Donde se indica se realizaron las siguientes adiciones: 7 mM succinato (Suc), 0.5 mM KCN, 5 μ M octil galato (nOg), 1 μ M rotenona (Rot) and 3 μ M antimicin A (Ant A). Las líneas punteadas indican la tendencia de los trazos cuando alcanzaron una velocidad constante.

Debido a la proximidad de la AOX con los principales sitios de producción de ROS (complejo I y complejo III), posiblemente a través de una interacción proteína-proteína (Navet et al., 2004), se puede especular que la AOX está constantemente expuesta a altos niveles de ROS, resultando en una pérdida irreversible de su función durante el estrés (Winger et al., 2005). En las mitocondrias control, la actividad de la AOX se pierde en unos pocos segundos después de la adición de la antimicina A. Además, la inactivación de la AOX correlaciona con un incremento en la producción de ROS (ver Figura 25). Estos resultados sugerían una relación entre el estado redox mitocondrial y la actividad de la AOX, como en el caso de las plantas (Mizuno et al., 2005; Gelhaye et al., 2004) y otros hongos (Hwang et al., 2003).

Los grupos sulfhidrilo son componentes de la defensa celular contra el estrés oxidativo y mantienen la homeostasis redox de la célula (Grant, 2001). Además, el nivel del glutatión reducido es importante para mantener la integridad mitocondrial, pero no es el único factor. También los lípidos de la membrana mitocondrial interna son esenciales para la funcionalidad mitocondrial. La cardiolipina es un fosfolípido específico de las mitocondrias y es sensible al estrés oxidativo (Soussi y cols., 1990). Los complejos respiratorios (I-IV) y el translocador de nucleótidos de adenina se unen a la cardiolipina y requieren de una composición específica de la membrana mitocondrial para desarrollar su actividad. Se escogieron como marcadores de estrés oxidativo los cambios en los peróxidos de lípidos y al glutatión total en la mitocondria aislada. Como se observa en la Figura 26, hay un incremento en la producción de peróxidos de lípidos en la mitocondria, lo cual correlacionó con la disminución de la poza de glutatión después de la adición de antimicina A. Así, la inhibición del complejo III por la antimicina A resulta en una mayor producción de ROS y de otras moléculas producto de la lipoperoxidación de las membranas, las cuales inducen cambios en el estado redox que pueden alterar la actividad de la AOX.

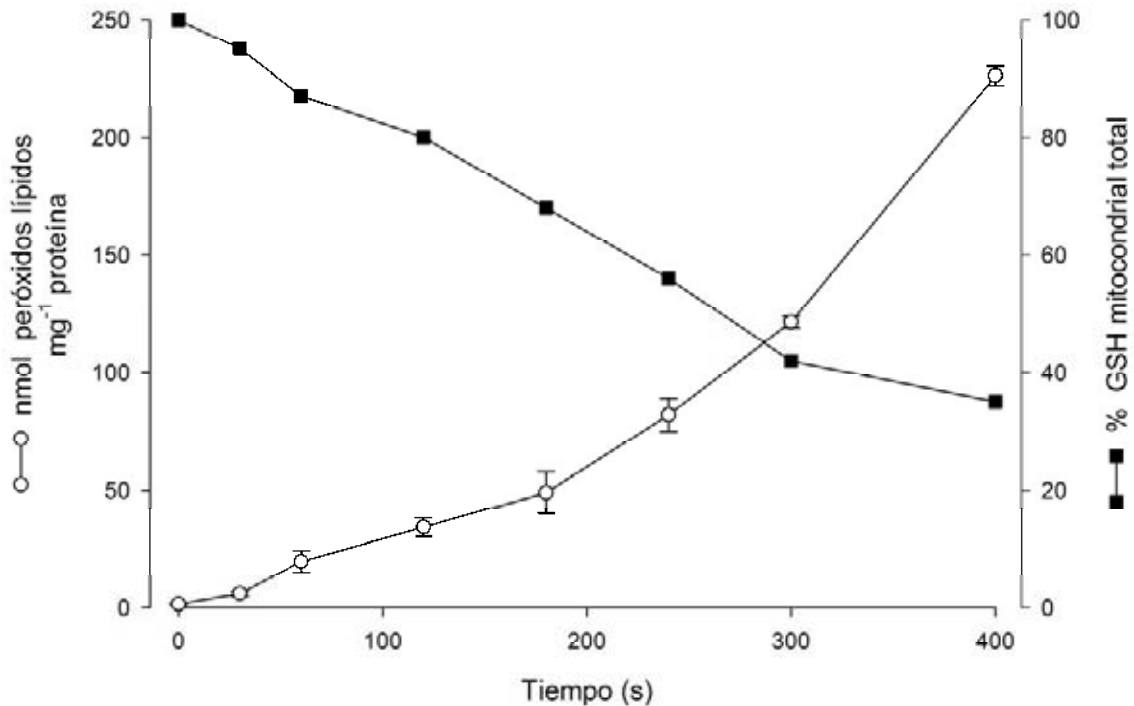


Figura 26. Efecto de la antimicina A sobre la producción de peróxidos de lípidos y el contenido de glutatión total en mitocondrias aisladas. Cada punto representa los promedios \pm el error estándar de al menos tres diferentes preparaciones mitocondriales. Los datos se graficaron directamente para los peróxidos de lípidos o como cambios en el porcentaje de los niveles de glutatión total (donde el valor máximo en las mitocondrias control se consideró el 100 %).

Con base en estos resultados, se ensayó el efecto de dos antioxidantes que pueden difundir dentro de la matriz mitocondrial, el glutatión reducido y la N-acetil cisteína, y una enzima impermeable a la membrana (catalasa) sobre la actividad de la AOX. El glutatión a bajas concentraciones (0.5 mM) disminuye la susceptibilidad de la AOX contra el daño oxidativo, mientras que la catalasa y la N-acetil cisteína fueron igualmente efectivos en la protección de la AOX contra la inactivación (Figura 27). Estos resultados sugieren que el H_2O_2 es un intermediario en el proceso de inactivación de la AOX. Sin embargo, existen varias posibilidades dentro del mecanismo, ya que el H_2O_2 puede interactuar con metales de transición como el hierro y el cobre de las proteínas mitocondriales y producir al radical hidroxilo, un potente oxidante que podría modificar la estructura de la AOX; también el H_2O_2 puede favorecer la pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales a través de la lipoperoxidación. Para estudiar estas posibilidades se utilizó al oxidante tert-butil hidroperóxido (TBHP), el cual se ha utilizado ampliamente en el estudio del estrés oxidativo en mitocondria

debido a que cambia la homeostasis de calcio (Nicotera et al., 1988), incrementa la lipoperoxidación de lípidos (Rubin and Farber, 1984) y disminuye el potencial de membrana mitocondrial (Kmonickova et al., 2001).

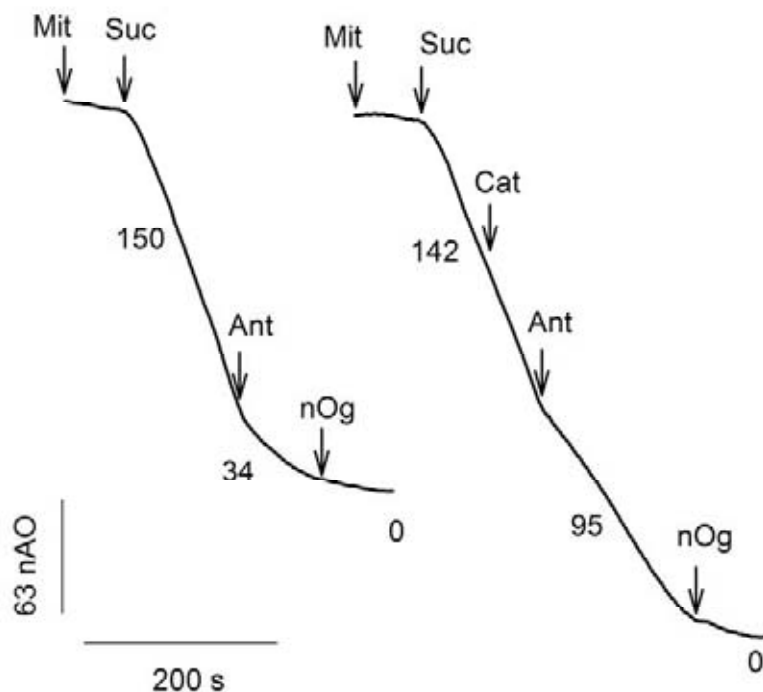


Figura 27. Efecto de la antimicina A sobre la actividad de la AOX en mitocondrias tratadas con catalasa. Donde se indica se realizaron las siguientes adiciones: 0.5 mg/ml proteína mitocondrial, 7 mM succinato (Suc), 50 U/ml catalasa (CAT), 2 μ M antimicina A (Ant) y 5 μ M n-octil galato (nOg). Los números sobre la izquierda de los trazos indican el consumo de oxígeno en nano átomo-gramo de oxígeno (nAO) por miligramo de proteína por minuto. Sólo se muestran trazos representativos.

La figura 28 muestra que la respiración total con succinato no se modificó al añadir TBHP, pero se inhibió completamente con la antimicina A. Para mostrar la presencia de la AOX en la preparación mitocondrial, se adicionó 1 mM de AMP para estimular su actividad. Como se observa en la parte inferior del trazo A, el AMP estimuló ligeramente a la AOX y esta se inhibió completamente con el nOg (Figura 25A). Para investigar la posibilidad de que el AMP protegiera a la AOX de la inhibición por TBHP, se adicionó 1 mM de AMP después de la antimicina A y se observó una inhibición lenta y completa de la AOX debida al TBHP (Figura 28B). Estos resultados sugieren que el TBHP es un potente inhibidor irreversible de la AOX y que la respiración a través de la ruta de los citocromos no se afecta por el TBHP.

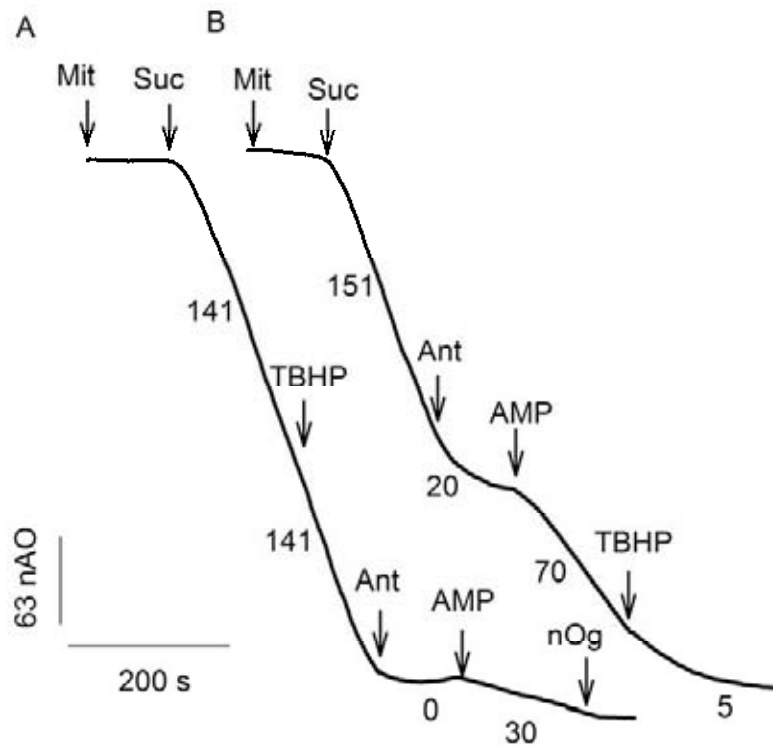


Figura 28. Efecto del *tert*-butil hidroperóxido (TBHP) sobre la actividad de la AOX en mitocondrias aisladas. Donde se indica se realizaron las siguientes adiciones: 0.5 mg/ml proteína mitocondrial, 7 mM succinato (Suc), 10 μ M TBHP, 2 μ M antimicina A (Ant), 1 mM AMP y 5 μ M n-octil galato (nOg). Los números sobre la izquierda de los trazos indican el consumo de oxígeno en nano átomo-gramo de oxígeno(nAO) por miligramo de proteína por minuto. Sólo se muestran trazos representativos.

El estrés oxidativo produce una inhibición de la cadena respiratoria y del ciclo de Krebs a través de diversos mecanismos. Se consideran al radical OH^\bullet y al O_2^\bullet como las especies mas importantes en el mecanismo de inactivación de las enzimas de la cadena respiratoria (Zhang y cols., 1990). Sin embargo, el NO^\bullet se une e inhibe el complejo IV y el ONOO^- participa en la inhibición de los complejo I, II y V (Radi y cols., 1994). Por tanto, resultaba interesante conocer los efectos de estas moléculas sobre la funcionalidad mitocondrial de *U. maydis*.

6. Efecto del estrés nitrosante sobre la respiración de las células de *U. maydis*

En hongos hay muy poca información sobre el efecto de las RNS, pero se sugiere que el peroxinitrito tiene un efecto fungicida sobre los organismos patógenos (Vázquez-Torres et al., 1996) y es más dañino que el óxido nítrico para los

microorganismos (Brunelli et al., 1995). Además, los hongos que infectan plantas y humanos están continuamente expuestos a las RNS (Klessing et al., 2000). En respuesta al ambiente oxidante, los patógenos deben evitar el estallido oxidativo a través de la síntesis de proteínas antioxidantes que les permitan mantener su viabilidad (Misall et al., 2006).

Para el ensayo del efecto de las RNS sobre la respiración mitocondrial en *U. maydis*, inicialmente se utilizó al SNAP (donador de NO[•]) y al SIN-1 (donador de ONOO⁻). Desafortunadamente, este tipo de ensayos sólo nos permitieron obtener resultados preliminares debido a las propiedades del donador y a que la velocidad de liberación de cada especie varía de acuerdo con las condiciones experimentales. En el caso del SNAP, 1 mM del compuesto sólo generó 130 nM de NO[•] x min⁻¹, medido con el método de oxihemoglobina en el medio de oximetría. Asimismo, la adición de 1 mM de SNAP a la cámara del oxímetro no modificó la velocidad de respiración de las mitocondrias de *U. maydis* energizadas con 6 mM de piruvato y de malato, posiblemente debido a que el poco NO[•] generado no pudo interactuar con la citocromo c oxidasa debido a la alta concentración de O₂ del medio de reacción (de aproximadamente 240 µM). Sin embargo, la adición de 0.5 mM de ascorbato al medio inhibió un 70 % la respiración mitocondrial. Para determinar el efecto del ascorbato sobre la liberación de NO[•] por el SNAP, nuevamente se utilizó el método de la oxihemoglobina para cuantificar la producción de NO[•], la cual aumentó de 0.130 a 8.40 µM de NO[•] x min⁻¹, con la misma concentración de SNAP. Para el caso del SIN-1, los resultados no fueron satisfactorios, pues la liberación del ONOO⁻ fue muy lenta y las actividades respiratorias fueron muy semejantes a las de las mitocondrias control en ausencia del donador. Debido a que se necesitaban de altas concentraciones de los donadores para detectar un efecto y dado su alto costo, se decidió buscar un método más sencillo. De los diferentes métodos químicos de generar RNS, en este trabajo se empleó el sistema reportado por Yamasaki y cols., 2001, en el cual se utilizan nitritos de sodio y ascorbato.

En las mitocondrias energizadas con succinato, el consumo de oxígeno se inhibió parcialmente por la adición de 1 mM de ascorbato y de 10 mM de nitritos de sodio, los cuales producen alrededor de 54 µM de NO[•] x min⁻¹. La respiración residual se bloqueó por la adición del inhibidor de la AOX, el n-octil galato (Figura 29A). Para demostrar que el NO[•] sólo afecta a los componentes de la vía de los citocromos y que la AOX es resistente a este radical, se incubaron a las mitocondrias con 5 µM de nOg

antes de energizarlas con el succinato; la posterior adición del ascorbato y los nitritos inhibió la respiración por la vía clásica (Figura 29B). Para comprobar los datos anteriores, las mitocondrias se trataron con 0.5 mM de KCN antes de energizarse con succinato; la posterior adición de ascorbato y de nitritos no afectó la respiración de la AOX y ésta sólo se inhibió por la adición de nOg (Figura 29C). Sin embargo la preincubación de las mitocondrias con los inhibidores nOg y KCN modificó las actividades respiratorias de cada uno de las oxidasas terminales. Por tanto, la actividad de la ruta alterna no es sensible al NO', mientras que la vía de los citocromos se inhibió completa y progresivamente por la presencia del NO'. Estos datos correlacionan con los reportados para mitocondria de mamífero y plantas (Millar y Day, 1996; Brown, 1999).

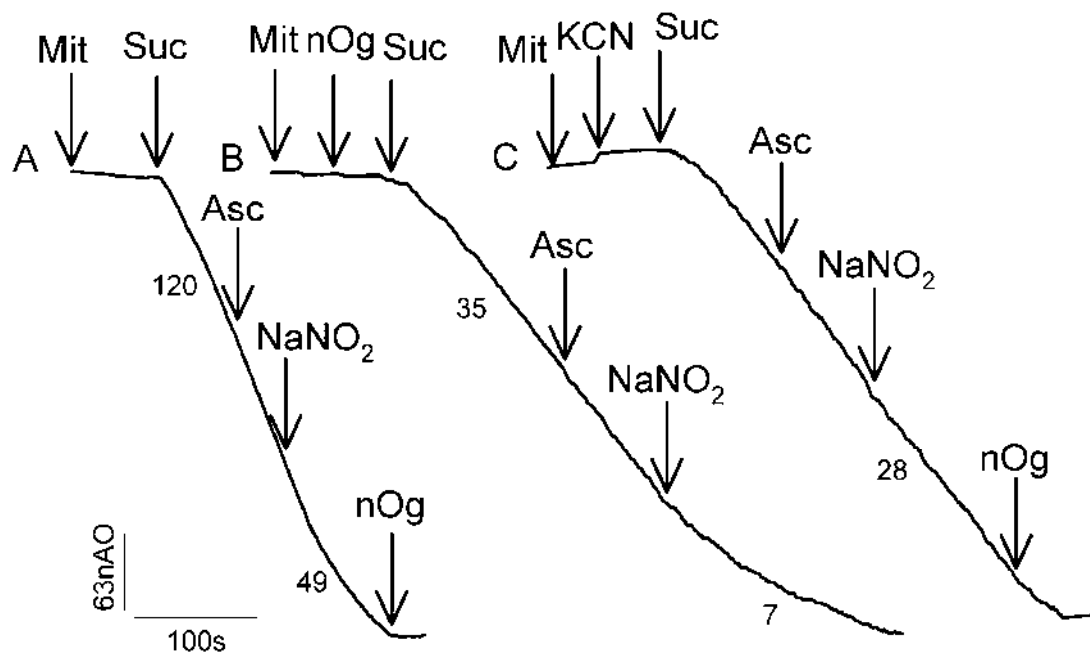


Figura 29. Efecto del óxido nítrico sobre la respiración de la vía de los citocromos y la oxidasa alterna. Los trazos son representativos de cinco ensayos independientes. Consumo de oxígeno en mitocondrias control (trazo A), en mitocondrias incubadas con nOg (trazo B) y en mitocondrias incubadas con KCN (trazo C). Donde se indica se adicionó 1 mg/ml de proteína mitocondrial (Mit), 7 mM de succinato (Suc), 5 μ M de nOg y 0.5 μ M de KCN.

Para confirmar que el NO' afecta la funcionalidad de la mitocondria, se midió el potencial de membrana. La Figura 30 muestra que la adición de piruvato y de malato a

las mitocondrias aisladas promueve la generación de NADH, el cual transfiere sus electrones a nivel del complejo I y promueve la formación de un potencial de membrana, el cual se abatió completamente con la adición de ascorbato/nitritos (trazo a) o por 5 μM del desacoplante FCCP (trazo b). Esto sugiere que el NO^\bullet inhibe la cadena respiratoria, posiblemente a nivel de la citocromo c oxidasa, debido a que la adición de oxihemoglobina, la cual atrapa al NO^\bullet , permite la recuperación parcial del potencial e indica que la inhibición de la cadena respiratoria es reversible.

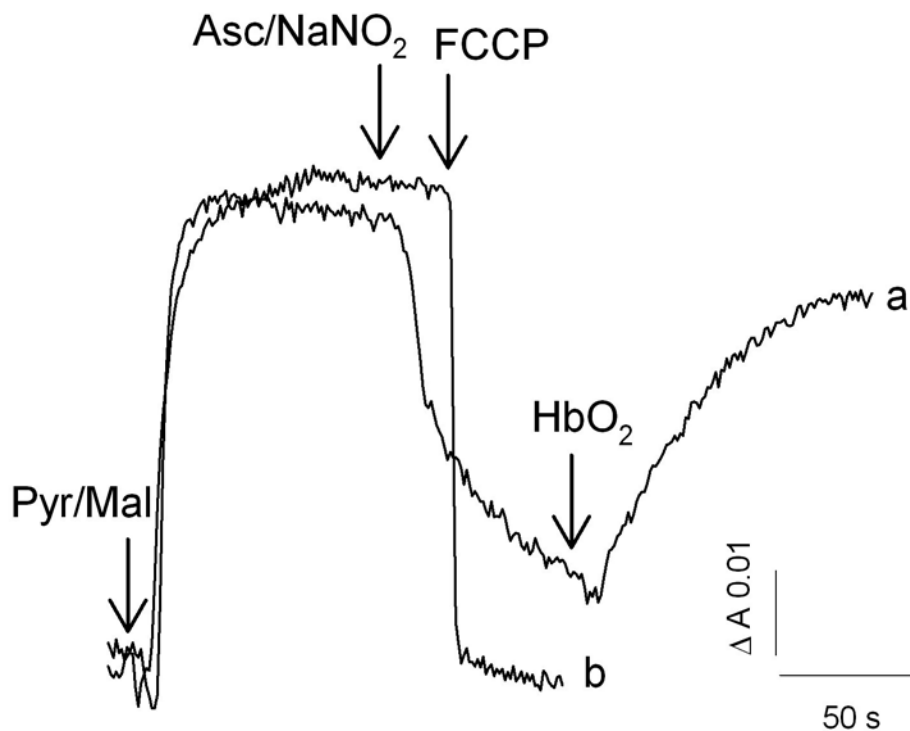


Figura 30. Efecto del óxido nítrico sobre el potencial de membrana mitocondrial. La proteína mitocondrial se adicionó sobre el medio respiratorio que contiene 8 μM de safranina O. En el trazo A, el óxido nítrico abate el potencial de membrana generado por la adición de piruvato y malato. La adición de oxihemoglobina permite la recuperación del potencial al remover el óxido nítrico. En el trazo B se observa el efecto del desacoplante FCCP sobre el potencial. Las flechas indican el orden de adición: 6 mM piruvato (Pyr), 6 mM malato (mal), 10 mM nitrito de sodio (NaNO_2), 2 mM ascorbato (Asc), 4 μM oxihemoglobina (HbO_2) y 5 μM FCCP.

Para estudiar el efecto de estos compuestos a nivel de célula, las levaduras FB_2 de *U. maydis* se cultivaron hasta la fase estacionaria en medio de YPD (pH 5), con diferentes concentraciones de nitritos de sodio (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 mM) en presencia o ausencia de 1 mM de ascorbato. La viabilidad celular se determinó por la reducción

de las sales de tetrazolio (MTT) y por el rendimiento celular. A concentraciones de 0.5 a 2.0 mM de nitritos de sodio no se detectó cambios significativos en ninguno de los parámetros de viabilidad, pero a las concentraciones de 5.0 y 10 mM se observó una disminución de la viabilidad de la célula que corresponde a un tercio del control. Se decidió trabajar con la concentración de 5.0 mM de nitritos de sodio debido a que el estrés nitrosante generado en estas condiciones fue similar al observado con 10 mM. Después del tratamiento por 24 horas, las células se cosecharon y se resuspendieron en un medio de 10 mM de MES, pH 6.0, y se valoró la respiración de las células en ausencia y en presencia de nitritos. En la figura 31 se observa que la antimicina A no tuvo un efecto sobre la respiración de las células control (sin tratamiento) y que los electrones rápidamente se desviaron hacia la AOX (Figura 31A). En el caso de las células cultivadas en presencia de nitritos, se observó que la adición de la antimicina produjo una disminución transitoria de la respiración, la cual posteriormente se recuperó a sus valores iniciales (figura 31B). Una observación interesante es que las células cultivadas con nitritos sólo alcanzaron la mitad de la velocidad respiratoria que las células control, lo cual sugiere que el estrés nitrosante, además de inhibir a la citocromo c oxidasa, afecta a otros componentes de la cadena respiratoria o del ciclo de Krebs. Además, la actividad de la respiración alterna durante la protección contra el estrés nitrosante debe provocar una disminución en la producción del ATP, lo cual se refleja en el lento crecimiento de las células cultivadas en presencia de nitritos.

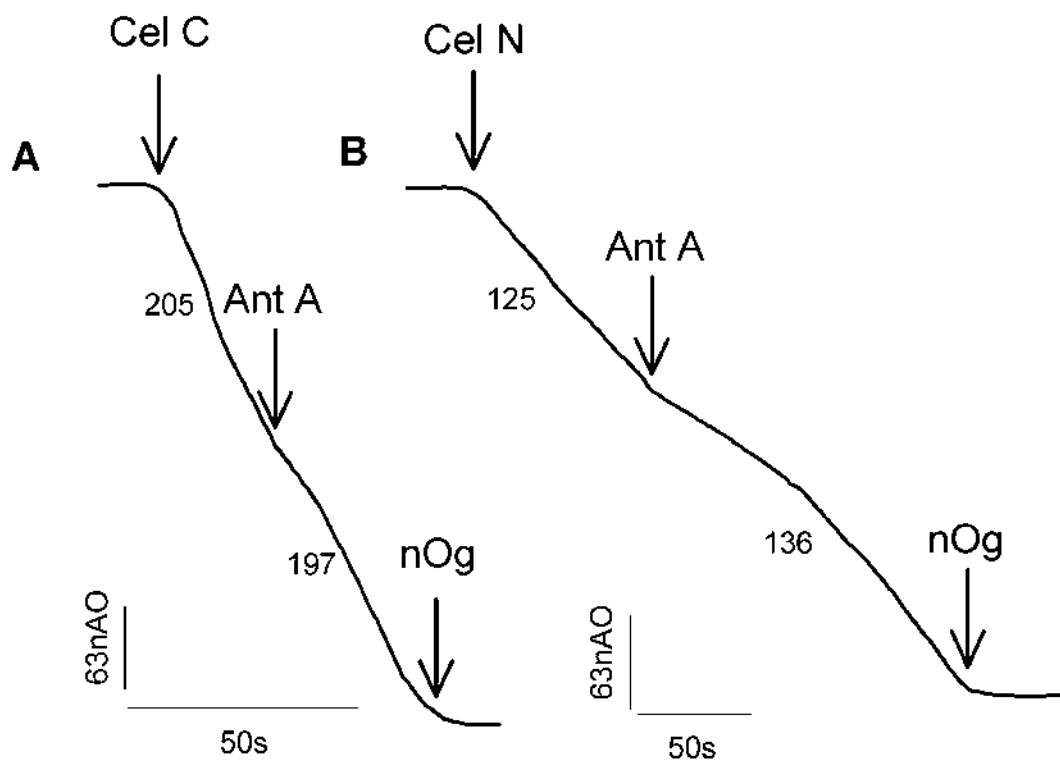


Figura 31. Consumo de oxígeno por las células de *U. maydis* cultivadas en medio de YPD sin o con 4 mM de nitrito de sodio. Las células se resuspendieron en 10 mM de MES (pH = 6.0) a una UA_{600} de 1.5. Las adiciones fueron 3 μ M de antimicina (Ant A) y 5 μ M de nOg.

7. Sensibilidad de los componentes respiratorios al estrés nitrosante

En la tabla 3 se muestran las actividades de cada complejo en las mitocondrias aisladas de células cultivadas en presencia y ausencia de nitritos. La adición de 6 mM de glutamato y de malato aumenta el consumo de oxígeno de ambas mitocondrias y esta respiración se inhibe con 1 μ M de rotenona. Sin embargo, la actividad del complejo I en las mitocondrias de las células cultivadas con nitritos sólo corresponde a la mitad de la actividad de las mitocondrias control. La adición de 1 mM de NADH induce el consumo de oxígeno por la entrada de electrones a través de la NADH deshidrogenasa externa. La actividad de esta enzima en las mitocondrias de las células cultivadas con nitritos se incremento en un 15 % con respecto al control. Este aumento en la deshidrogenasa posiblemente resulte de la inactivación parcial de complejo I en estas mitocondrias. La adición de 25 μ M de flavona inhibe parcialmente la respiración, un 50 % en las mitocondrias control y un 40 % en las mitocondrias con nitritos. La posterior adición de 3 μ M de antimicina A bloqueó en un 80 % la respiración en ambas

mitocondrias. Sin embargo, la actividad de la AOX sólo se incremento por la adición de 1 mM de piruvato en las mitocondrias de las células cultivadas en presencia de nitritos. La actividad de la AOX en ambas mitocondrias se bloquea con 5 μ M de nOg. Asimismo, la actividad de la succinato deshidrogenasa es de 125 ± 7 nAO $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para ambas preparaciones mitocondriales. Estos resultados sugieren que el complejo I es susceptible al estrés nitrosante.

Tabla 3. Efecto del óxido nítrico sobre la actividad de los complejos y los componentes alternos de la cadena respiratoria.

Adiciones	Control (nAO $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	Nitritos (nAO $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
Glutamate/Malate	121 ± 13	60 ± 5
+ Rotenone	0	0
+ NADH	272 ± 14	332 ± 20
+ Flavone	151 ± 8	242 ± 15
+Antimycin A	38 ± 2	45 ± 7
+ Pyruvate	38 ± 2	60 ± 4
+ nOg	0	0

Los datos son el promedio de tres experimentos independientes (\pm S.E.M.).

Existen diferentes mecanismos para la inhibición del complejo I por las RNS, como la nitración de las tirosinas para producir 3-nitrotirosina y la S-nitrosilación de las cisteínas (Viner y cols., 1999). Para distinguir entre estas dos posibilidades, las modificaciones de las proteínas por RNS se identificaron con anticuerpos específicos para 3-nitrotirosinas y nitrosocisteínas.

El anticuerpo contra las 3-nitrotirosinas, se detectó tres bandas con una masa molecular de alrededor de 75, 51 y 30 kDa en las mitocondrias control y en las mitocondrias de células cultivadas con nitritos (Figura 32A). Sin embargo, en el caso de las mitocondrias de células con nitritos se observó un aumento significativo en la cantidad de proteína modificada de 75 kDa, mientras que las bandas más pequeñas no presentan cambios significativos en la intensidad de la banda. Este dato sugiere que el aumento en la modificación de la banda de 75 kDa no se debe a la agregación de las otras bandas y posiblemente esta proteína, sensible al estrés nitrosante, forme parte del complejo I. Esta posibilidad adquiere relevancia debido a que el western blot contra las nitrosocisteínas mostró que multiples proteínas sufren la nitración de sus cisteínas en ambas preparaciones mitocondriales (Figura 32B). En este experimento se encontraron tres bandas principales, de las cuales sólo la de 30 kDa se observa en ambos ensayos. En contraste con la nitración de tirosinas, el grado de nitrosilación de las cisteínas se

modificó ligeramente en presencia de nitritos, y la banda que presentó el principal aumento fue la de mayor peso molecular, 115 kDa. Este resultado sugiere que se producen suficientes RNS *in vivo* que permiten la modificación de las proteínas. Pese a que no se cuantificó la formación de peroxinitrito en estos ensayos, es posible que ésta sea la especie reactiva que inactiva al complejo I, debido a que se sabe que la descomposición del NO en la mitocondria principalmente ocurre a través de su interacción con el anión superóxido. Estos resultados muestran que en las células de *U. maydis* se producen RNS que modifican las proteínas mitocondriales. Sin embargo, la relevancia fisiológica de tales modificaciones queda por ser definida.

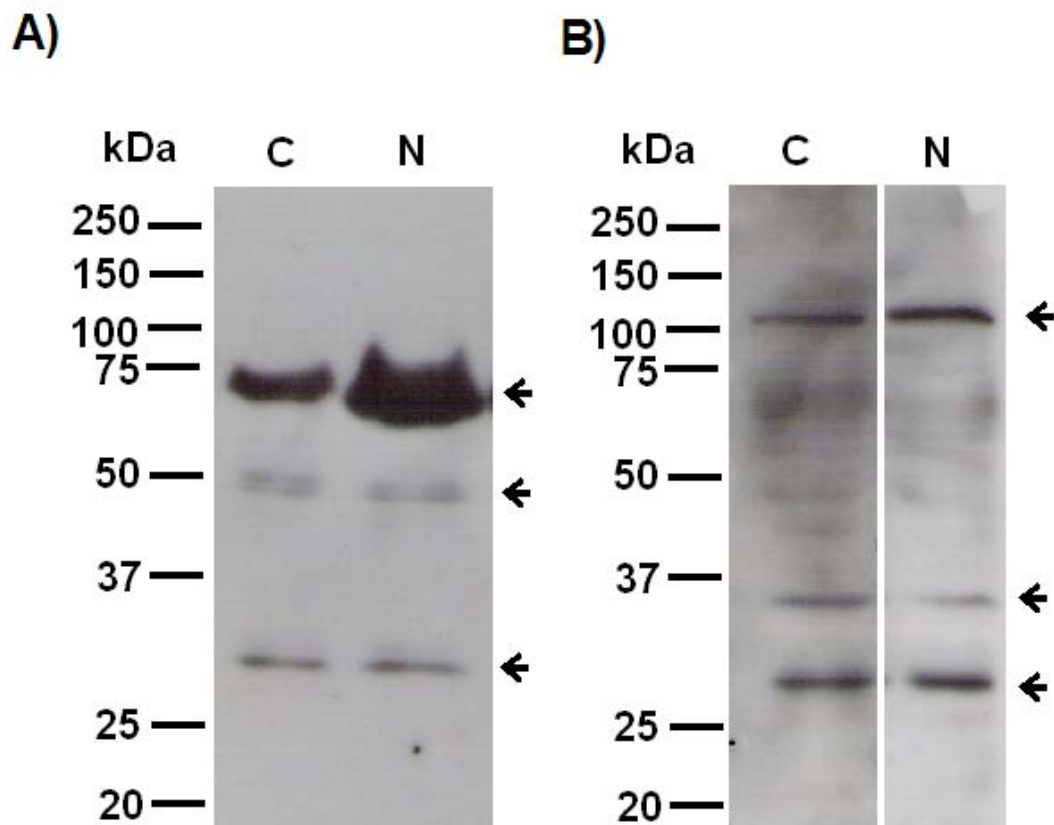


Figura 32. Análisis de inmunoblot de mitocondrias aisladas de células cultivadas en ausencia o presencia de nitritos. A) se utilizó un anticuerpo monoclonal contra anti-nitrotirosinas. B) se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-nitrocisteínas. Carril C, mitocondrias de células control. Carril N, mitocondrias de células en presencia de nitritos.

DISCUSIÓN

Los organismos aerobios continuamente están expuestos a las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo oxidativo. Las ROS deben ser eliminadas para evitar que éstas dañen los diferentes componentes celulares que resultan en la muerte celular (Raha y Robinson, 2002). Para prevenir el estrés oxidativo, los organismos han desarrollado un complejo sistema antioxidante.

En las células eucarióticas, las mitocondrias son la principal fuente endógena de ROS y son susceptibles al daño oxidativo. Debido a su localización, las AOX son enzimas importantes en la defensa mitocondrial contra el estrés oxidativo debido a que controlan la producción del anión superóxido durante la respiración (Camacho y cols., 2004). La AOX es una ubiquinol:oxígeno oxidoreductasa que actúa en paralelo con el sistema *bcl* y IV transfiere los electrones de la poza de ubiquinona hacia el oxígeno, el cual se reduce completamente en agua. Sin embargo, los electrones a través de la AOX no están acoplados a la síntesis de ATP debido a que se saltan dos sitios de bombeo de protones (complejos III y IV) y la energía libre se pierde como calor.

Recientemente se caracterizó la cadena respiratoria de *U. maydis* (Juárez y cols., 2004), la cual posee una AOX cuya función es importante en condiciones de estrés (Juárez y cols., 2006). El presente estudio se realizó para conocer más detalles de la regulación de la AOX de *U. maydis*. Se conoce relativamente poco sobre la respuesta de defensa antioxidante de este hongo. Sin embargo, desde una perspectiva antioxidante general, la AOX ocupa un lugar muy importante en el estado energético y redox de la mitocondria en condiciones de estrés. Así, ambas funciones son potencialmente importantes para la patogénesis de los hongos.

Los inhibidores de la cadena respiratoria se utilizan frecuentemente para inducir la producción de ROS mitocondrial y determinar su efecto sobre la funcionalidad mitocondrial y/o la actividad de las enzimas antioxidantes. En esta tesis se utilizaron dos enfoques para valorar la función de la AOX en la mitocondria de *U. maydis* bajo condiciones de estrés oxidativo. El primer enfoque consistió en cultivar las células con inhibidores específicos de la AOX, ampliamente utilizados en plantas, hongos y protistas (Siedow y Umbach., 2000; Juárez y cols., 2004; Fang y Beattie, 2003). Sin embargo, los experimentos preliminares mostraron que el ácido salicilhidroxámico (SHAM), a una concentración de 250 μ M, inhibe completamente el crecimiento de las células de *U. maydis*. Este dato podría ser interpretado de manera errónea, puesto que la

adición de estos inhibidor no deben afectar el crecimiento de las células debido a que la AOX tiene una baja participación en la síntesis de ATP cuando la vía de los citocromos está activa (Juárez y cols., 2006). Además, el SHAM es un derivado del ácido hidroxámico que inhibe el crecimiento de otros hongos y bacterias a través de interferir con la captura del hierro, y es un inhibidor de otras enzimas, por ejemplo, las peroxidasas y las ureasas (Davies y Edwards, 1989; Hassan y cols., 1997). Asimismo, el SHAM tiene actividad de esterasa y transforma la DCFH-DA en DCFH (Hsiao y Bornman, 1993). Este dato sugiere que la combinación de SHAM con DCFH-DA no es un método confiable para determinar la participación de la AOX en la formación de ROS. Por tanto se utilizó al nOg en lugar del SHAM para inhibir la AOX de *U. maydis*. Los resultados muestran que este inhibidor afectó el crecimiento de *U. maydis* (Figura 15), su morfología celular (Figura 16) e indujo la síntesis de melanina. Este dato es muy interesante debido a que no existen reportes en la literatura sobre la inducción del dimorfismo en *U. maydis* por agentes antioxidantes, aunque hay reportes sobre la participación de la respiración alterna en el crecimiento celular y en la diferenciación de plantas y hongos (Cruz-Hernández y Gómez-Lim, 1995; Huh y Kang, 2001).

Se decidió realizar una caracterización adicional de los efectos del nOg. Para tener un punto de comparación se utilizaron compuestos estructural y funcionalmente semejantes al nOg (Figura 14). Se conoce que estos compuestos polifenólicos son eficientes antioxidantes debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura (Morris y cols., 1947) y que todos inhiben completamente la actividad de la AOX en mitocondrias aisladas en un intervalo de concentraciones de 2 a 10 μM , posiblemente por interactuar con el radical ubisemiquinona durante el ciclo catalítico de la enzima (Shimoji y Yamasaki, 2005). Además, entre los mecanismos antifúngicos del nOg destaca su capacidad para generar estrés oxidativo (Fujita y Kubo, 2002). Estos datos sugieren que la propiedad prooxidante del nOg provoca el dimorfismo de estas células.

Para comprobar esta hipótesis, se empleó la cuantificación del glutatión total para medir el grado de estrés en las células tratadas con los diferentes compuestos polifenólicos. En el caso de las células tratadas con nPg y NDGA se observó una ligera disminución en el contenido de glutatión total. Sin embargo, las células tratadas con el nOg no presentaron cambios significativos con respecto al control (Tabla 2). Además, el nPg y el NDGA sólo afectan en un 35 % el rendimiento celular y ninguno modificó la morfología de la célula. Estos resultados indican que no hay una relación entre los niveles de glutatión y el dimorfismo.

Es interesante mencionar que el nOg, en comparación con el nPg y el NDGA, se incorpora muy rápidamente en las membranas debido a su capacidad para actuar como un surfactante, y esto puede alterar la viabilidad de la célula (Hsu y cols., 2007; Fujita y Kubo, 2002a). Por lo tanto, la otra posibilidad es que el nOg altere la fluidez de las membranas celulares mediante su propiedad surfactante, lo cual promueve los cambios morfológicos de las células.

Para ensayar esta posibilidad, las células se cultivaron con el antioxidante comercial trolox y con el nOg por 24 horas a 28° C. Después del tratamiento, las células crecieron como levaduras (Figura 16c). Este resultado mostró que el daño oxidativo a la membrana ocasionado por el nOg promueve el dimorfismo de este hongo. Recientemente se ha encontrado que cuando las células de *U. maydis* se cultivan en presencia de triacilgliceroles se induce el cambio dimórfico (Klose y cols. 2004). Además, el peróxido de hidrógeno producido por las glioxal oxidasas de este hongo son importantes en el dimorfismo celular (Leuthner y cols., 2005).

Una vez establecidas las condiciones de aislamiento de las mitocondrias, se realizó una caracterización más detallada de la actividad y regulación de la AOX. En las mitocondrias control, la actividad de esta enzima fue baja en comparación con la actividad de la citocromo c oxidasa. Sin embargo, las AOX de hongos y protistas aumentan su actividad en presencia nucleótidos de purina a través de un mecanismo desconocido (Doussiere y Vignais, 1984; Sakajo y cols., 1997; Umbach y Siedow, 2000). En este trabajo se observó que la actividad de la AOX se activó tres veces en presencia de AMP (Figura 23), lo cual correlaciona con las observaciones previas realizadas con células permeabilizadas (Juárez y cols., 2004). Recientemente, se sugirió que los nucleósido 5'-monofosfatos interactúan con un sitio en la enzima. Además, estos autores demostraron que el ATP inhibe a la AOX por competir con el AMP en el posible sitio de regulación (Woyda-Ploszczyca y cols., 2009).

Por otro lado, la AOX de *U. maydis* también se activó con el piruvato en las mitocondrias aisladas en presencia de antimicina y energizadas con succinato (Figura 23). Este resultado sugiere que la AOX de este hongo tiene un comportamiento semejante al de las AOX de plantas, las cuales son dímeros y el mecanismo de activación del piruvato involucra dos pasos, el primero consiste en la reducción del puente disulfuro entre los dos residuos de cisteína, y posteriormente la modificación de una de las cisteínas por el piruvato mediante la formación de un enlace tiohemiacetal (Umbach y Siedow, 1996). Sin embargo, la AOX de *U. maydis* no posee la cisteína

regulatoria y funciona como un monómero (Figura 12), lo cual sugiere que el efecto del piruvato no es por interacción directa con la enzima, sino a través de la oxidación del piruvato, lo cual aumenta la disponibilidad del ubiquinol hacia la AOX. Esto concuerda con la idea general de que la actividad de la AOX depende de la concentración de ubiquinol en las mitocondrias (Millenaar y cols., 1998; Hiser y cols., 1996). Además, se ha reportado que la activación aparente de la AOX de hongos por piruvato se debe principalmente a la estimulación de la succinato deshidrogenasa (Umbach y Siedow, 2000). Sin embargo, en nuestras condiciones de ensayo (estado 4 mitocondrial y presencia de antimicina), los cambios de la poza de quinona (Q/QH₂) no parecen ser un factor de control debido a que la concentración de ubiquinol debe ser saturante para la AOX. Aunque no se puede descartar que el piruvato tenga un efecto sobre la constante catalítica de la enzima.

Existen reportes en la literatura que sugieren la inducción de la AOX en respuesta a una variedad de condiciones de estrés, como la alteración de la síntesis de las proteínas mitocondriales (Zhang et al., 1996), la inhibición de la vía de los citocromos (Vanlerberghe and McIntosh, 1997) y la exposición al anión superóxido (Minagawa et al., 2002). Una característica común de estas condiciones de estrés es la sobreproducción de ROS en la célula, las cuales pueden representar la señal inicial para la sobre-expresión del gen *Aox*.

Para determinar si la AOX de *U. maydis* se induce en condiciones de estrés, las levaduras se cultivaron en presencia de antimicina A y la expresión de la AOX se valoró por inmunodetección. A diferencia de los resultados previos en los cuales la AOX de *U. maydis* se asociaba con una banda de 26 a 30 kDa utilizando anticuerpos contra la AOX de *C. reinhardtii* (Juárez et al., 2004, 2006), en este trabajo se identificaron dos bandas, de 42 y 27 kDa, con un anticuerpo monoclonal contra la AOX de *S. guttatum*. La proteína de 42 kDa correlaciona con el peso molecular esperado de 45 kDa obtenido a partir del gen de la AOX en *U. maydis* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilagomaydis/Home.html>, número de acceso UM02774.1), después de remover el péptido señal mitocondrial (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitprot.html>). El mayor peso molecular de la AOX de *U. maydis* se debe a que posee un segmento adicional de aproximadamente 70 aminoácidos. Si consideramos el peso promedio de cada aminoácido de 110 Da, esta secuencia corresponden a 7.7 kDa. Además, es probable que la banda de 27 kDa provenga de la proteína de 42 kDa como resultado de un proceso proteolítico.

Por otro lado, es muy interesante que la regulación post-traducciona l de la AOX cambi3 en las c3lulas cultivadas con antimicina A. Por ejemplo, la adici3n de AMP activ3 la AOX en las mitocondrias control, pero no tuvo efecto sobre la AOX en las mitocondrias de las c3lulas cultivadas con antimicina A. Asimismo, se observ3 una gran estimulaci3n de la respiraci3n por piruvato en las mitocondrias aisladas de las c3lulas cultivadas con antimicina A (Figura 23). De hecho, en condiciones de estr3s, la concentraci3n de piruvato se acumula como resultado de un da1o en la fosforilaci3n oxidativa y la actividad de la AOX juega un papel importante en la adaptaci3n del metabolismo celular (Juszczuk y Rychter, 2002). Adem3s, se ha reportado que en *Saccharomyces cerevisiae* las pozas de nucle3tidos de purina disminuyen durante el estr3s inducido con antimicina (Ditzelm3ller y cols., 1983).

La AOX es un sistema que disipa energ3a y act3a directamente en la disminuci3n de los ROS que se producen en la cadena respiratoria. En las mitocondrias aisladas de *U. maydis*, los complejos I y III participan en la producci3n de ROS (Figura 25) y la inhibici3n de la AOX correlaciona con un aumento en la formaci3n de H₂O₂ (Figura 21A). Sin embargo, debido a su localizaci3n, la AOX est3 continuamente expuesta al an3n O₂⁻ y al H₂O₂, lo cual provoca su inactivaci3n en las mitocondrias aisladas. Adem3s, la AOX contiene hierro en su sitio activo y puede participar en la formaci3n de ROS (Bhate y Ramasarma, 2009).

El glutati3n (GSH) est3 presente en altas concentraciones en las c3lulas de levadura. En estos organismos, el GSH participa en diversas funciones celulares, por ejemplo, mantiene la integridad mitocondrial, destoxifica metabolitos reactivos como el formaldeh3do, protege contra el estr3s oxidativo y participa en la transici3n de levadura a micelio (Penninckx, 2002; P3csi y cols., 2004). La mitocondria es m3s sensible a las perturbaciones redox que otros compartimientos subcelulares (Bartoli y cols., 2004; Schwarzl3nder y cols., 2009).

Una de las principales consecuencias del estr3s oxidativo es la peroxidaci3n de los l3pidos (Forsmark-Andr3e y Ernster, 1994). Los 3cidos grasos poliinsaturados (PUFA) son particularmente susceptibles al ataque por los radicales [•]OH, y 3stos promueven una reacci3n en cadena. Las mitocondrias contienen alrededor de un 20% (p/p) de l3pidos y la mayor3a son fosfol3pidos con un alto porcentaje de PUFA (Daum, 1985). As3, la peroxidaci3n modifica la estructura de los l3pidos y provoca la inhibici3n de la respiraci3n que depende de la actividad de enzimas y transportadores asociados a la membrana. Por tanto, los cambios en el estado redox mitocondrial pueden estar

relacionados con la inactivación irreversible de la AOX, probablemente a través de la disminución de la poza de glutatión y del daño oxidativo de las membranas mitocondriales.

Un análisis más detallado muestra que el mecanismo responsable de la inactivación de la enzima está relacionado con los mecanismos de detoxificación de los ROS. La figura 26 confirma que la inactivación de la AOX favorece la producción de peróxidos de lípidos en la mitocondria aislada. De forma semejante, se observó una disminución tanto de la actividad de la AOX como de la poza de GSH después de la adición de antimicina A (Figura 26). La adición de la catalasa y la N-acetil cisteína antes de la antimicina A protege la actividad de la AOX en las mitocondrias (Figura 24). Estos resultados sugieren que el H_2O_2 o alguno de sus derivados están involucrados en el proceso de inactivación de la AOX debido a una baja capacidad antioxidante. Asimismo, este resultado se explica si consideramos que en la mitocondria, los principales sistemas de detoxificación del H_2O_2 de estas mitocondrias son la citocromo c peroxidasa y los sistemas del glutatión y de la tiorredoxina (Figura 10). Estos sistemas dependen del aporte continuo de NADPH para su regeneración. Debido a que la reducción del GSH en este hongo posiblemente ocurre en el lado citosólico, la relación GSH:GSSG cae rápidamente. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que la adición de 0.5 mM de GSH protege transitoriamente a la AOX. Es interesante mencionar que las células de *U. maydis* son muy sensibles al H_2O_2 extracelular y una concentración de 400 μ M inhibe completamente su crecimiento. Esto indica que estas células constan de un sistema muy limitado para la eliminación del H_2O_2 . Las células de *U. maydis* que presentan un alta capacidad de AOX, muestran una disminución en las actividades de la catalasa y de la glutatión reductasa (Juárez y cols., 2006).

Una vez que la AOX se ha inactivado por completo, los antioxidantes no favorecen la reactivación de la proteína, pero sí detienen su inactivación, lo cual sugiere que algún producto de los ROS está interactuando con la proteína. Para clarificar un poco más el mecanismo, se determinó el efecto del tert-butil hidroperóxido (TBHP) sobre la actividad de la AOX. Cuando la vía de los citocromos se inhibió con antimicina A, la adición de TBHP inhibe la respiración dada por la AOX. En contraste, la vía de los citocromos no se afectó por TBHP (Figura 25). Estos resultados concuerdan con reportes previos de mitocondrias de planta (Winger et al., 2005, 2007). Recientemente, Jarmuszkiewicz y cols. (2008) muestran que cuando las mitocondrias de *Acanthamoeba*

castellani se incuban con H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} , hay aumento en la lipoperoxidación mitocondrial, e inhibición de la AOX.

Las plantas y los animales generan $NO\cdot$ como parte de su respuesta contra patógenos (Wendehenne y cols., 2001). Además, la respuesta de defensa de algunas plantas involucra la liberación de cianuro (Poulton, 1990). Los patógenos poseen diferentes estrategias que permiten su sobrevivencia dentro de sus hospederos. Un ejemplo de ello es la presencia de la AOX en hongos y protistas patógenos (Suzuki y cols., 2004; Joseph y Hollomon, 2000). En el hongo *Cryptococcus neoformans*, el gen de la AOX se induce por cambios de temperatura y contribuye a la virulencia de este organismo (Akhter y cols., 2003). Algunos hongos patógenos de planta también expresan una AOX cuando son tratados con antifúngicos comerciales (Joseph y Hollomon, 2000).

Además, la exposición de las levaduras de *H. capsulatum* a niveles fisiológicos de óxido nítrico (generado por $5\ \mu M$ de GSNO), causan la rápida inactivación de la respiración sensible a cianuro pero poco efecto sobre la respiración por la AOX. La pérdida sustancial de la viabilidad ocurre después de cultivar a las células de *H. capsulatum* en la presencia de un donador de NO y de un inhibidor de la AOX, lo que sugiere que la AOX es necesaria para la sobrevivencia del organismo durante el estrés nitrosante.

La relación obligada entre *U. maydis* y su hospedero el maíz sugiere que este hongo ha desarrollado mecanismos muy especializados para adaptarse al ambiente de su hospedero y por otro lado, se sabe que el $NO\cdot$ desempeña diversas funciones en la planta del maíz (Tossi y cols., 2009). En este trabajo se analizó el efecto del $NO\cdot$ sobre la funcionalidad mitocondrial.

El $NO\cdot$ inhibe a la citocromo c oxidasa en la mitocondrias aisladas energizadas con succinato, pero no afectó la actividad de la AOX (Figura 29). Además, afecta el potencial de membrana (Figura 30). Estos resultados concuerdan con resultados previos en mamíferos y plantas (Cleeter y cols., 1994; Millar y Day, 1996; Wulff y cols., 2009).

El $NO\cdot$ induce la transcripción de la AOX1a y la actividad de la vía alterna en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*. Además, la inhibición de la AOX favorece la muerte celular inducida por el $NO\cdot$ (Huang y cols., 2002). El $NO\cdot$ participa en la inducción de la AOX en *Nicotiana tabacum* tratadas con ozono (Ederli y cols., 2006).

Los datos en la figura 31 y en la tabla 3 indican que la actividad de la AOX se incrementa en las células cultivadas en presencia de nitritos. Además, en este estudio se

observó que la exposición prolongada de las células con NO^\cdot provoca la inhibición del complejo I. Se ha reportado que la inhibición de este complejo es reversible y resulta de la nitrosilación de los grupos tioles de algunos de sus componentes (Borutaité y cols., 2000). Los niveles de NO^\cdot en la mitocondria se regulan principalmente a través de su interacción con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y en un menor grado por la reacción con el ubiquinol y con la citocromo c oxidasa (Poderoso y cols., 1999). La interacción del NO^\cdot con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ produce un potente oxidante, el peroxinitrito (ONOO^-) (Kissner y cols., 1997). A concentraciones de 20-30 nM, el ONOO^- modifica lípidos y proteínas a través de reacciones de oxidación y nitración que dañan las funciones mitocondriales (Valdez y cols., 2000). El ONOO^- inhibe al complejo I y al III mediante estos mecanismos (Clementi y cols., 1998; Riobo y cols., 2001). Además, el ONOO^- reacciona con el CO_2 y produce ONOOCO_2^- (Bonini y cols., 1999), el cual también participan en las reacciones de oxidación y nitración de los componentes mitocondriales.

En la figura 32 se muestra que en las mitocondrias de *U. maydis* se produce ONOO^- y que éste modifica algunas proteínas de las mitocondrias. Aunque no se identificaron los péptidos que se modifican químicamente por las RNS, es probable que algunos formen parte del complejo I (Tabla 3). Es interesante que las células control también presentan un cierto grado de estrés nitrosante, lo cual sugiere que *U. maydis* produce NO^\cdot en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en la síntesis de este radical en los hongos. Entre los posibles candidatos se encuentra la nitrato reductasa (Figura 10; Yamasaki y Sakihama, 2000). Además, se ha reportado que la mitocondria es un posible sitio de producción de NO^\cdot (Kozlov y cols., 1999; Castello y cols., 2006). Recientemente se reportó que los componentes alternos de la cadena respiratoria de las plantas regulan la concentración de NO^\cdot (Wulff y cols., 2009). Todos estos datos muestran la importancia que tienen los radicales libres en la funcionalidad mitocondrial y destacan la participación de la AOX en la adaptación metabólica de *U. maydis* a las condiciones de estrés.

CONCLUSIONES

- De manera semejante a otros hongos, *U. maydis* también posee una oxidasa alterna constitutiva en sus mitocondrias que mantiene la viabilidad celular en condiciones de estrés oxidativo.
- El nOg induce el cambio morfológico de levadura a micelio principalmente por el daño a las membranas celulares y a la inhibición de la AOX.
- La inhibición del complejo III con antimicina A modifican la actividad y la cantidad de la AOX, lo cual sugiere que la AOX tiene una función antioxidante que depende del estado redox mitocondrial.
- La regulación post-traducciona de la AOX en este hongo es compleja, debido a que su sensibilidad hacia el AMP y el piruvato se modifica en condiciones de estrés.
- La AOX se inhibe con *tert*-butil hidroperóxido, lo cual sugiere que el daño oxidativo de la membrana interna puede ser el mecanismo de inactivación de esta proteína.
- La exposición de las células al estrés nitrosante provoca una disminución en la respiración total debido a la inhibición de los complejos I y IV. Además, la AOX es insensible al óxido nítrico y permite mantener el flujo de electrones y generar un potencial vía el complejo I para la síntesis de ATP.

PERSPECTIVAS

Este estudio mostró la importancia de la AOX en la respuesta adaptativa de las células de *U. maydis* al estrés oxidativo. Sin embargo, *in vivo* las mitocondrias no se encuentran aisladas y su funcionalidad depende de su interacción con otros componentes celulares, por ejemplo, el núcleo, el citoesqueleto, el retículo endoplásmico. De igual manera, la oxidasa alterna es sólo un componente del sistema antioxidante, pero su actividad depende de su interacción con otros sistemas. En condiciones normales, el balance redox está diseñado para que se produzca una baja concentración de ROS que no excedan la capacidad del sistema antioxidante de las mitocondrias. Esto es muy importante, ya que las ROS actúan como segundos mensajeros en la inducción de genes del sistema antioxidante. Por tanto, es necesario realizar un estudio global de proteómica para identificar los genes que cambian su expresión bajo condiciones de estrés oxidativo.

Por otro lado, se necesita realizar una caracterización detallada de otros componentes alternos que participan en el control de la producción de ROS en las mitocondrias de *U. maydis*. La NADH deshidrogenasa alterna externa y una posible proteína desacoplante en las mitocondrias de este hongo son dos candidatos importante durante el estrés.

Aunque los componentes alternos unidos a la membrana desempeñan un alto nivel de control en la producción de las ROS, algunas enzimas del ciclo de Krebs también pueden participar en el balance redox, por ejemplo, la aconitasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa.

El aporte más interesante de este trabajo fue mostrar que las células de *U. maydis* sintetizan RNS, las cuales afectan la funcionalidad de la mitocondria. Por medio del programa BLAST se logró identificar al gen de la nitrito reductasa en el genoma de *U. maydis*, el cual se expresa en nuestras condiciones de ensayo, ya que se detectó en la fracción cruda mitocondrial por espectroscopía de masas. Una caracterización enzimática nos permitirá conocer su participación en la síntesis de NO[•].

Por último, el hallazgo de que el nOg induce el dimorfismo de las células de *U. maydis* puede ayudar al estudio de las interacciones planta-patógeno. Se ha reportado que las plantas producen compuestos antioxidantes muy parecidos a los galatos que posiblemente funcionan como señales para el hongo durante su ciclo celular.

REFERENCIAS

- Affourtit, C., Heaney, S. P., Moore, A. L. 2000. Mitochondrial electron transfer in the wheat pathogenic fungus *Septoria tritici*: on the role of alternative respiratory enzymes in fungicide resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1459; 291-298.
- Affourtit, C., Whitehouse, D. G., Moore, A. L. 2000. Maesaquinone: a novel inhibitor of plant mitochondrial respiratory enzymes that react with ubiquinone. *IUBMB Life* 49: 533-537.
- Affourtit, C., Krab, K., Moore, A.L., 2001. Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504, 58-69.
- Affourtit, C., Albury, M. S., Crichton, P. G., Moore, A. L. 2002. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* 510: 121-126.
- Agrios, G. N. 1997. *Plant pathology*. 4 th ed. San Diego, California: Academic Press. 635 p.
- Ajayi, W., Chaudhuri, M., Hill, G. C. 2002. Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J. Biol. Chem.* 277; 8187-8193.
- Akerboom, T. P.M., Helmut, S., 1981. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology* 77, 373- 382.
- Akerman, K. E. O. y Wikström, K. F. 1976. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68: 191-197.
- Akhter, S., McDade, H. C., Gorch, J. M., Heinrich, G., Cox, G. M., Perfect, J. R. 2003. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 71: 5794-5802.
- Albury, M. A., Dudley, P., Watts, F. Z., Moore, A. L. 1996. Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration. *J. Biol. Chem.* 271; 17062-17066.
- Albury, M. A., Affourtit, C., Moore, A. L. 1998. A highly conserved glutamate residue (E270) is essential for plant alternative oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 30301-30306.
- Albury, M. A., Affourtit, C., Crichton, P. G., Moore, A. L. 2002. The structure of the plant alternative oxidase: site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. *J. Biol. Chem.* 277; 1190-1194.
- Allan, A. C., Fluhr, R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The plant cell.* 9; 1559-1572.

- Andersson, M. E., Nordlund, P. 1999. A revised model of the active site of alternative oxidase. FEBS Lett. 449; 17-22.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Starkov, A. A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochem. (Mosc). 70; 200-214.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J. H., Fernandes de Melo, D. 2006. AOX-a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? TRENDS in Plant Sci. 11; 281-287.
- Balcavage, W. X., Matton, J. R. 1968. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria prepared by a mechanical method. Biochim. Biophys. Acta. 153: 521-530.
- Bandy, B., Davidson, A.J., 1990. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? Free Radical Biol. Med. 8, 523-607.
- Banuett, F., Herskowitz, I. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122; 2965-2976.
- Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annu. Rev. Genet. 29: 179-208.
- Banuett, F., Herskowitz, I. 2002. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons Turing in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Fungal Genet. Biol. 37; 149-170.
- Bartoli, C. G., Gómez, F., Martínez, D. E., Guiamet, J. J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Exp. Bot. 55: 1663-1669.
- Basse, C., Steinberg, G. 2004. *Ustilago maydis*, a model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. Mol. Plant Pathol. 5; 83-92.
- Beckman, J. S. y Koppenol, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am. J. Physiol. 271: C1424-C1437.
- Beligni, M. V. y Lamattina, L. 1999. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. Nitric oxide 3: 199-208.
- Beltrán, B., Orsi, A., Clementi, E., Moncada, S. 2000. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. Br. J. Pharmacol. 129: 953-960.
- Berlett, B. S. y Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging disease and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272: 20313-20316.
- Berthold, D. A., Siedow, J. N. 1993. Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). Plant Physiol. 101; 113-119.

- Berthold, D. A., Andersson, M. E., Nordlund, P. 2000. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1460; 241-254.
- Berthold, D. A., Stenmark, P. 2003. Membrane-bound di-iron carboxylate proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54; 497-517.
- Beyer, R. E. 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem. Cell Biol.* 70; 390-403.
- Bhate, R. H., Ramasarma, T. 2009. Evidence for H₂O₂ as the product of reduction of oxygen by alternative oxidase in mitochondria from potato tubers. *Arch. Biochem. Biophys.* 486: 165-169.
- Black, M.J., Brandt, R.B., 1974. Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 58, 246-254.
- Bonner, W. D., Clarke, S. D., Rich, P. R. 1986. Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria. *Plant Physiol.* 80; 838-842.
- Borutaité, V., Budriunaite, A., Brown, G. C. 2000. Reversal of nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiol induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459: 405-410.
- Boveris, A., Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Boveris, A., Cadenas, E., Stoppani, A. O. 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156; 435-444.
- Bölker, M., Urban, M., Kahmann, R. 1992. The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68; 441-450.
- Bortolato, M., Chen, K., Shih, J. C. 2008. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 1527-1533.
- Bölker, M. 2001. *Ustilago maydis*-a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147; 1395-1401
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M., Augusto, O. 1999. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274: 10802-10806.
- Bowsher, C. G., Tobin, A. K. 2001. Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. *J. Exp. Bot.* 52: 513-527.
- Brand, M. D., Esteves, T. C. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2: 85-93.

- Bredt, D. S. 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31: 577-596.
- Brookes, P. S., Shiva, S., Patel, R. P., Darley-USmar, V. M. 2002. Measurement of mitochondrial respiratory thresholds and the control of respiration by nitric oxide. *Methods Enzymol.* 359: 305-319.
- Brown, G. C., 1999. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 351-369.
- Bunik, V. I., Sievers, C. 2002. Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur. J. Biochem.* 269; 5004-5015.
- Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 424: 37-49.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., Stoppani, A. O. M. 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180; 248-257.
- Cadenas, E., Boveris, A. 1980. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem. J.* 188; 31-37.
- Cadenas, E., Davies, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Res.* 33: 747-756.
- Camacho, A., Moreno-Sanchez, R., Bernal-Lugo, I. 2004. Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls. *FEBS Lett.* 570: 52-56.
- Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z., Poyton, R. O. 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signalling in eukaryotes. *Cell Metab.* 3: 277-287.
- Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 77-109.
- Chan, P. C., Bieski, B. H. 1974. Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotides. II. Lactate dehydrogenase-catalyzed of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by superoxide radicals generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 249; 1317-1319.
- Chan, P. C., Bielski, B. H. 1980. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by perhydroxyl radicals. *J. Biol. Chem.* 255; 874-876.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527-605.

Chaudhuri, M., Ajayi, W., Hill, G. C. 1998. Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95: 53-68.

Claisse, M. L., Boze, H., Dubreucq, E., Segueilha, L., Moulin, G., Galzy, P., 1991. Characterization of alternative respiratory pathways in the yeast *Schwanniomyces castelli* by the study of mutants deficient in cytochrome a + a₃ and/o b. *Acta Biochim. Pol.* 38: 365-392.

Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., Schapira, A. H. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345: 50-54.

Clementi, E., Brown, G. C., Feelisch, M., Moncada, S. 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 7631-7636.

Crawford, N. M., Guo, F.Q. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10: 195-200.

Costa, N.J., Dahm, C.C., Hurrell, F., Taylor, E.R., Murphy, M.P., 2003. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid. Redox Signaling.* 5, 291-305.

Cruz-Hernández, A., Gómez-Lim, M. A. 1995. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* 197: 569-576.

Daum, G. 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 822: 1-42.

Davidson, J. F., Schiestl, R. H. 2001. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 8483-8489.

Davies, B., Edwards, S. W. 1989. Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochem. J.* 258: 801-806.

Day, D.A., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., 1994. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol.* 106, 1421-1427.

De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L. A., Marres, C. A. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 203; 587-592.

Degli-Esposti, M., 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1364; 222-235.

Ditzelmüller, G., Wöhrer, W., Kubicek, C. P., Röhr, M. 1983. Nucleotide pools of growing, synchronized and stressed cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 135: 63-67.

- Doussiere, J., Vignais, P. V., 1984. AMP-dependence of the cyanide-insensitive pathways in the respiratory chain of *Paramecium tetraurelia*. *Biochem. J.* 220; 787-780.
- Downie, J. A., Garland, P. B., 1973. An antimycin A and cyanide resistant variant of *Candida utilis* arising during copper limited growth. *Biochem. J.* 134: 1051-1061.
- Dry, I. B., Moore, A. L., Day, D. A., Wiskich, J. T. 1989. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Arch. Biochem. Biophys.* 273; 148-157.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N., Pasqualini, S. 2006. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone treated tobacco plants. *Plant Physiol.* 142: 595-608.
- Egan, M. J., Wang, Z-Y., Jones, M. A., Smirnoff, N., Talbot, N. J. 2007. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104; 11772-11777.
- Esteves, T. C., Brand, M. D. 2005. The reactions catalyzed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim. Biophys. Acta* 1709; 35-44
- Elthon, T. E., McIntosh, L. 1987. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84; 8399-8403.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89, 1311-1317.
- Emanuelson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization based on their N- terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. *Meth. Enzymol.* 10, 41-47.
- Fang, J., Beattie, D. S. 2002. Rotenone insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 123: 135-142.
- Fang, J., Beattie, D. S. 2003. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 294-302.
- Ferrero, I., Viola, A. M., Goffeau, A., 1981. Induction by glucose of an antimycin insensitive, azide sensitive respiration in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 47: 11-24.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., Emptage, M. H. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268: 22369-22376.

- Finnegan, P. M., Whelan, J., Millar, A. H., Zhang, Q., Smith, M. K., Wiskich, J. T., Day, D. A. 1997. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol.* 114; 455-466.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.
- Fridovich, I. 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. NY Acad. Sci.* 893: 13-18.
- Fisher, N. Rich, P. R. 2000. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* 296; 1153-1162.
- Forsmark-Andrée, P., Ernster, L. 1994. Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation. *Mol. Aspects Med.* 15: s73-81.
- Fujita, K., Kubo, I. 2002. Antifungal activity of octyl gallate. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 193-201.
- Fujita, K., Kubo, I. 2002a. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1035-1042.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dzegremel, P., Meyer, Y., Jacquot, J. P. 2004. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101; 14545-14550.
- Georgopoulos, S. G., Sisler, H. D., 1970. Gene mutation eliminating antimycin A tolerant electron transport in *Ustilago maydis*. *J. Bacteriol.* 103: 745-750.
- Golderer, G., Werner, E. R., Leitner, S., Gröbner, P., Werner-Felmayer, G., 2001. Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes Dev.* 15: 1299-1309.
- Goo Rhee, S. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31: 53-59.
- Goss, S. P., Singh, R. J., Hogg, N., Kalyanaraman, B., 1999. Reactions of NO, NO₂ and peroxynitrite in membranes: physiological implications. *Free Radic. Res.* 31: 597-606.
- Guérin, M. G., Camougrand, N. M., 1994. Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1184: 111-117.
- Hakkaart, G. A., Dassa, E. P., Jacobs, H. T., Rustin, P. 2006. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Rep.* 7; 341-345.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford Univ.

Hamilton, A. J., Holdom, M. D., 1999. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol.* 37: 375-389.

Hancock, J. T., Desikan, R., Neill, S. J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29; 345-350.

Hansford, R. G., Hogue, B. A., Mildaziene, V. 1997. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29; 89-95.

Hassan, S. S. M., El-Bahnasawy, R. M., Rizk, N. M. 1997. Potentiometric determination of salicylhydroxamic acid (urinary struvite stone inhibitor) base don the inhibition of urease activity. *Analytica Chimica Acta.* 351: 91-96.

Hausladen, A., Stamler, J. S. 1999. Nitrosative stress. *Methods Enzymol.* 300: 389-395.

Helmerhorst, E.J., Murphy, M.P., Troxler, R.F., Oppenheim, F.G., 2002. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1556, 73-80.

Hinkle, P. C., Butow, R. A., Racker, E., Chance, B. 1967. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 242; 5169-5173.

Hiser, C., Kapranov, P., McIntosh, L. 1996. Genetic modification of respiratory capacity in potato. *Plant Physiol.* 110: 277-286.

Hoefnagel, M.H.N., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1995. Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 394-400.

Hsiao, K., Bornman, C. H. 1993. Salicylhydroxamic acid mimics esterase-like action. *J. Exp. Bot.* 44; 1847-1849.

Huang, X., von Rad, U., Durner, J. 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 215: 914-923.

Huh, W. K., Kang, S. O. 2001. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 356; 595-604.

Hwang, C. S., Baek, Y. U., Yim, H. S., Kang, S. O. 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20; 929-941.

- Ignarro, L. J. 1996. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl.* 55: S2-S5.
- Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hirai, A. 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene* 203; 121-129.
- Jarmuszkiewicz, W., Antos-Krzeminska, N., Drachal-Chrul, D., Matkovic, K., Nobik, W., Pienkowska, J., Swida, A., Woyda-Ploszczyca, A., Budzinska, M., 2008. Basic energetic parameters of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria and their resistance to oxidative stress. *Acta Biochim. Pol.* 55: 349-355.
- Jarmuzkiewicz, W., Wagner, A.M., Wagner, M.J., Hryniewiecka, L., 1997. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 411, 110-114.
- Jo, S. H., Son, M. K., Koh, H. J., Lee, S. M., Song, I. M., Huh, T. L. 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺ dependent isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 276: 16168-16176.
- Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P.M., Hollomon, D., Sessions, R.B., 2000. New sequence data enable modeling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett.* 481, 141-146.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., Wood, P. M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 1504; 179-195.
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F., Pardo, J.P., 2004. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 244-251.
- Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R. E., Pardo, J. P., 2006. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J.* 273, 4603-4615.
- Juszczuk, I. M., Rychter, A. M. 2001. Regulation of alternative oxidase activity. *Postepy Biochem.* 47: 318-327.
- Kerscher, S. J. 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1459; 274-283.
- Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., Koppenol, W. H. 1997. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high pressure stopped-flow technique and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 1285-1292.
- Klose, J., Moniz de Sá, M., Kronstad, J. W., 2004. Lipid induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 52: 823-835.

Kmonícková, E., Drahota, Z., Kameníková, L., Cervinková, Z., Masek, K., Farghali, H. 2001. Modulatory effect of cyclosporine A on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23; 43-54.

Kröncke, K. D., Kold-Bachofen, V. 1996. Detection of nitric oxide interaction with zinc finger proteins. *FEBS Lett.* 269: 426-434.

Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., Starkov, A. A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416; 15-18.

Kot, E. J., Olson, V. L., Rolewic, L. J., McClary, D. O., 1976. An alternative respiratory pathway in *Caldida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 42: 33-48.

Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. 1996. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 378; 150-152.

Kowaltowski, A. J., Castillo, R. F., Vercesi, A. E. 1995. Ca^{2+} induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox rate. *Am. J. Physiol.* 269 C141-C147.

Kozlov, A. V., Staniek, K., Nohl, H. 1999. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 454: 127-130.

Krab, K. 1995. Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative in plant respiration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 387-396.

Ksenzenko, M., Konstantinov, A. A., Khomutov, G. B., Tikhonov, A. N., Ruuge, E. K. 1983. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett.* 155; 19-24.

Kumar, A. M., Soll, D. 1992. *Arabidopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89; 10842-10846.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambowitz, A.M., Sabourin, J.R., Bertrand, H., Nickels, R., McIntosh, L., 1989. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1362-1364.

Leary, S.C., Moyes, C.D., 2000. The effects of bioenergetic stress and redox balance on the expression of genes critical to mitochondrial function. In: Storey K.B., Storey, J. editors. *Cell and molecular responses to stress*. Amsterdam: Elsevier. p. 209-229.

Lenaz, G. 2001. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanism and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52; 159-164.

- Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Müller, P., Kahmann, R., Bölker, M., Schreier, P. H. 2005. A H₂O₂ producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* 272: 639-650.
- Lin, M. T., Beal, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80: 780-787.
- Logan, D. C., Knight, M. R. 2003. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol.* 133: 21-24.
- Logan, D. C. 2006. The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57; 1225-1243.
- Maher, P. 2006. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. *Antioxid. Redox Signal.* 8: 1941-1970.
- Martínez-Espinoza, A. D., León, C., Elizarraraz, G., Ruiz-Herrera, J. Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 87: 259-265.
- Massey, V. 1994. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269; 22459-22462.
- Matsunaka, S., Morita, S., Conti, S. F., 1966. Respiratory system of *Rhodotorula glutinis*. Inhibitor tolerance and cytochrome components. *Plant Physiol.* 41: 1364-1369.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8271-8276.
- Maxwell, D.P., Nickels, R., McIntosh, L., 2002. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.* 29, 269-279.
- McGuinness, E. T., Butler, J. R. 1985. NAD⁺ kinase a review. *Int. J. Biochem.* 17: 1-11.
- Medentsev, A. G., Akimenko, V. K., 1999. Development and activation of cyanide resistant respiration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow)* 64: 945-951.
- Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Akimenko, V.K., 2004. Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates. *FEMS Yeast Res.* 5, 231-236.
- Michéa-Hamzehpour, M., Turian, G., 1987. GMP-stimulation of the cyanide-insensitive mitochondrial respiration in heat-shocked conidia of *Neurospora crassa*. *Experientia* 43, 439-440.

- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., Day, D.A., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 329, 259-262.
- Millar, A. H., Day, D. A. 1996. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 398: 155-158.
- Millenaar, F. F., Benschop, J. J., Wagner, A. M., Lambers, H. 1998. The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant. Physiol.* 118: 599-607.
- Minagawa, N., Yoshimoto, A., 1987. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J. Biochem.* 101, 1141-1146.
- Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T., Yoshimoto, A. 1990. Essential role of ferrous anion in cyanide resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 267: 114-116.
- Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T., Yoshimoto, A. 1990. Essential role of ferrous iron in cyanide resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 267: 114-116.
- Minagawa, N., Koga, S., Nakano, M., Sakajo, S., Yoshimoto, A., 1992. possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 302, 217-219.
- Minagawa, N., Kariya, H., Kumaraswami, N. S., Kamimura, I., Sakajo, S., Yoshimoto, A. 2002. Zinc is involved in the expression of a nuclear-encoded alternative oxidase gene in the yeast *Hansenula anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2645-2650.
- Mizuno, M., Tada, Y., Uchii, K., Kawakami, S., Mayama, S. 2005. Catalase and alternative oxidase cooperatively regulated programmed cell death induced by beta-glucan elicitor in potato suspension cultures. *Planta* 220; 849-853.
- Mizutani, A., Miki, N., Yukioka, H., tamura, H., Masuko, M. 1996. A possible mechanism of control of rice blast disease by a novel alkoxyiminoacetamide fungicide SSF126. *Phytopathology* 86: 295-300.
- Miwa, S., Brand, M. D. 2005. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1709: 214-219.
- Mizutani A., Yukioka, H., Tamura, H., Miki, N., Masuko, M., Takeda, R., 1995. Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyiminoacetamide fungicide. *Phytopathology* 86: 306-311.
- Moller I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52; 561-591.
- Moore, A.L., Siedow, J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of the plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059, 121-140.

- Moore, A. L., Albury, M. S. 2008. Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites. *Biochem. Soc. Trans.* 36; 1022-1026.
- Morris, S. G., Kraekel, L. A., Hammer, D., Myers, J. S., Riemenschneider, R. W. 1947. Antioxidant properties of the fatty alcohol esters of gallic acid. *J. A. Oil Chem. Soc.* 24: 309-311.
- Mráček, T., Pecinová, A., Vrbacký, M., Drahota, Z., Houstek, J. 2009. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 481: 30-36.
- Murphy, A. N., Fiskum, G., Beal, M. F. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 231-245.
- Müller, U., 1997. The nitric oxide system in insects. *Prog. Neurobiol.* 51: 363-381.
- Nakamura, K., Sakamoto, K., Kido, Y., Fujimoto, Y., Suzuki, T., Suzuki, M., Yabu, Y., Ohta, N., Tsuda, A., Onuma, M., Kita, K. 2005. Mutational analysis of the *Trypanosoma vivax* alternative oxidase: the E(X)₆Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334; 593-600.
- Navet, R., Jarmuszkiewicz, W., Douette, P., Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E., 2004. Mitochondrial respiratory chain complex patterns from *Acanthamoeba castellanii* and *Lycopersicon esculentum*: comparative analysis by BN-PAGE and evidence of protein-protein interaction between alternative oxidase and complex III. *J. Bioenerg. Biomemb.* 36, 471-479.
- Négre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L., Casteilla, L. A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 11 (1997) 809-815.
- Nicotera, P., McConkey, D., Svensson, S. A., Bellomo, G., Orrenius, S. 1988. Correlation between cytosolic Ca²⁺ concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol.* 52; 55-63.
- Nivière, N., Fontecave, M. 1995. Biological sources of reduced oxygen species. Analysis of free radicals in biology systems. Favier, A. E., Cadet, J., Kalyaraman, B., Fontecave, M., Pierre, J. L. (eds) Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland pp. 11.
- Nulton-Persson, A.M., Szweda, L.I., 2003. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276, 23357-23361.
- Nyns, E. J., Hamaide-Deplus, M. C., 1972. Cyanide insensitive respiration of *Candida lipolytica*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 80: 978-980.
- Ohnishi, T., Sled, V. D., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D. S., Vinogradov, A. D. 1998. Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory. *Biochim. Biophys. Acta* 1365; 301-308.

- Okun, J. G., Lümmen, P., Brandt, U. 1999. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* 274; 2625-2630.
- Olaya, G., Zheng, D., Köller, W., 1998. Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pestic Sci.* 54: 230-236.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913-922.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Forzo, N. D., Flagella, Z. 2007. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. *J. Exp. Bot.* 58; 195-210.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M., Kaiser, W. M. 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondria electron transport. *Plant J.* 41: 732-743.
- Penninckx, M. J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2: 295-305.
- Pócsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49: 1-76.
- Popov, V.N. Simonian, R.A., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 415, 87-90.
- Poulton, J. E. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94: 401-405.
- Poyton, R.O., McEwen, J.E., 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 563-607.
- Purvis, A. C., Shewfelt, R. L. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant* 88; 712-718.
- Raamsdomk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H.V., van Dam, K., Oliver, S.G., 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology* 19, 45-50.
- Raha, S., Robinson, B. H. 2002. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25; 502-508.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crap, J. D., Freeman, B. A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261 (1991) 14081-14024.
- Richard, P., Teusink, B., Hemker, M.B., van Dam, K., Westerhoff, H.V., 1996. Sustained oscillations in free-energy state and hexose phosphate in yeast. *Yeast* 12, 731-740.

- Ricquier, D., Bouillaud, F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, stUCP AND AtUCP. *Biochem. J.* 345; 161-179.
- Riobó, N. A., Clementi, E., Melani, M., Boveris, A., Cadenas, E., Moncada, S., Poderoso, J. J. 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem. J.* 359: 139-145.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Sweet, C. R., Lennon, A. M., Rauch, G.S., Siedow, J. N. 1998. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* 273; 30750-30756.
- Rubin, R., Farber, J. L. 1984. Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 228; 450-459.
- Ruiz-Herrera, J., Martínez-Espinoza, A. D. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *Int. Microbiol.* 37; 365-367.
- Sakajo, S., Minagawa, N., Yoshimoto, A. 1997. Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61; 396-399.
- Sakajo, S., Minagawa, N., Yoshimoto, A. 1999. Structure and regulatory expression of the single copy alternative oxidase gene from the yeast *Pichia anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63; 1889-1894.
- Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283; 1488-1493.
- Sipos, I., Tretter, L., Adam-Vizi, V. 2003. Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 84; 112-118.
- Schatz, G., Racker, E. 1966. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VII. Oxidative phosphorylation in the diphosphopyridine nucleotide-cytochrome b segment of the respiratory chain: assay and properties in submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 241; 1429-1438.
- Schultz, B. E., Chan, S. I. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30; 23-65.
- Schwarzländer, M., Fricker, M. D., Sweetlove, L. J. 2009. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787: 468-475.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L., Moore, A. L. 1995. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.* 362; 10-14.

- Sherald, J. L., Sisler, H. D., 1970. Antimycin A resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. *Plant Physiol.* 46: 180-182.
- Sheral, J. L., Sisler, H. H., 1972. Selective inhibition of antimycin A insensitive respiration in *Ustilago maydis* and *Ceratocystis ulmi*. *Plant Cell Physiol.* 13: 1039-1052.
- Shimoji, H., Yamasaki, H. 2005. Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. *Biologia Plantarum* 49: 117-119.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L. 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation and regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1459; 432-439.
- Stamler, J. S., Singel, D. J., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Stamler, J. S., Lamas, S., Fang, F. C. 2001. Nitrosylation, the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* 106: 675-683.
- Starkov, A. A., Polster, B. M., Fiskum, G. 2002. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J. Neurochem.* 83; 220-223.
- Stenmark, P., Nordlund, P. 2003. A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Lett.* 552; 189-192.
- Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Minagawa, N., Ohta, N., Kita, K. 2004. Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 1044-1052.
- Sweetlove, L. J., Foyer, C. H. 2004. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In D. A. Day, A. H. Millar, J. Whelan, eds, *Plant mitochondria: From genome to function*, Vol. 1, *Advances in Photosynthesis and respiration*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp 307-320.
- Talbot, D. A., Brand, M. D. 2005. Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1709; 150-156.
- Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K., Masuko, M., 1999. Effect of the methoxyminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pestic Sci.* 55: 681-686.
- Takaya, N., 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 506-510.
- Tien, M., Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B., Stadtman, E. R., 1999. Peroxynitrite mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7809-7814.

- Tischner, R., Planchet, E., Kaiser, W. M. 2004. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. FEBS Lett. 576: 151-155.
- Tretter, L., Adam-Vizi, V. 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J. Neurosci. 24; 7771-7778.
- Tossi, V., Cassia, R., Lamattina, L. 2009. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. J. Plant Physiol. 166: 1336-1341.
- Turrens, J. F., Boveris, A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J. 191; 421-427.
- Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552: 335-344.
- Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosc. Rep. 17 (1997) 3-8.
- Umbach, A- L., Siedow, J. N. 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. Plant Physiol. 103; 845-854.
- Umbach, A. L., Siedow, J. N. 1996. The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that alpha-keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal. J. Biol. Chem. 271, 25019-25026.
- Umbach, A.L, Wiskick, J. T., Siedow, J.N., 1994. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. FEBS Lett. 348, 181-184.
- Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2000. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 378, 234-245.
- Valdez, L. B., Alvarez, S., Arnaiz, S. L., Schöpfer, F., Carreras, M. C., Poderoso., J. J., Boveris, A. 2000. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix. Free Radic. Biol. Med. 29: 349-356.
- Valverde, M. E., Paredes-López, O., Pataky, J. K., Guevara-Lara, F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source biology, composition, and production. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35; 191-229.
- Van den Bergen, C. W., Wagner, A. M., Moore, A. L. 1994. The relationship between flux and the poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways. Eur. J. Biochem. 226; 1071-1078.

- Vanderleyden, J., Meyers, M., Verachtert, H. 1980a. Identification of the quinone species in cyanide-sensitive and cyanide-insensitive mitochondria of *Moniliella tomentosa*. *Biochem. J.* 192; 881-885.
- Vanderleyden, J. Peeters, C., Verachtert, H., Bertrand, H. 1980b. Stimulation of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* by nucleotide phosphates. *Biochem. J.* 188; 141-144.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703-734.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., Yip, J.Y.H., 1998. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* 10, 1551-1560.
- Vaughan, M. 1997. Oxidative modification of macromolecules minireview series. *J. Biol. Chem.* 272: 18513.
- Veiga, A., Arrabaca, J. D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Côrte-Real, M., Loureiro-Dias, M. C. 2003. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 3; 141-148.
- Veiga, A., Arrabaca, J. D., Loureiro-Dias, M. C., 2003. Cyanide resistant respiration is frequent, but confined to yeast incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 190: 93-97.
- Verniquet, F., Gaillard, J., Neuburger, M., Douce, R. 1991. Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 276: 345-353.
- Wagner, A. M., Moore, A. L. 1997. Structure and Function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci. Rep.* 17; 319-333.
- Wagner, A. M. 1995. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia* hybrid cells. *FEBS Lett.* 368; 339-342.
- Walker, J. E. 1992. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.* 25; 253-324.
- Watabe, S., Hiroi, T., Yamamoto, Y., Fujioka, Y., Hasegawa, H., Yago, N., Takashashi, S. Y. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxidase reductase in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 249 (1997) 52-60.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., Durner, J. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 177-183.
- Whelan, J., Smith, M. K., Meijer, M., Yu, J. W., Badger, M. R., Price, G. D., Day, D. A. 1995. *Plant Physiol.* 107; 1469-1470.

- Winger, A.M., Millar, A.H., Day, D.A., 2005. Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *Biochem. J.* 387, 865-870.
- Winger, A.M., Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., Millar, H., 2007. 4-Hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 37436-37447.
- Wojtaszek, P. 2000. Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Pytochemistry* 54: 1-4.
- Wood, P. M., Hollomon, D., 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q(o) site of complex III. *Pest Manag. Sci.* 59, 499-511.
- Woyda-Ploszczyca, A. M., Sluse, F. E., Jarmuszkiewicz, W. 2009. Regulation of *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase activity by mutual exclusion of purine nucleotides; ATP's inhibitory effect. *Biochim, Biophys. Acta.* 1787: 264-271.
- Wulff, A., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Salgado, I. 2009. Nitrite reduction and superoxide dependent nitric oxide degradation by Arabidopsis mitochondria: Influence of external NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase in control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* 21: 132-139.
- Yamasaki, H. Sakihama, Y., 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468: 89-92.
- Youle, R. J., Karbowski, M. 2005. Mitochondria fission in apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 657-663.
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74; 139-162.
- Zhang, L., Yu, L., Yu, C. A. 1998. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273; 33972-33976.
- Zhang, Q., Mischis, L., Wiskich, J.T., 1996. Respiratory responses of pea and wheat seedlings to chloramphenicol treatment. *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 583-592.
- Ziogas, B.N., Georgopoulos, S. G., 1980. Chloramphenicol induction of a second cyanide and azide insensitive mitochondrial pathway in *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta* 592: 223-234.

APÉNDICE

Artículos generados para su publicación durante el Doctorado.

1. Functional properties of the *U. maydis* AOX under oxidative stress conditions
2. Induction of morphological changes in *U. maydis* cells by octyl gallate
3. The relationship between the antioxidant system and the virulence from fungal pathogens
4. Effect of nitrosative stress on *U. maydis*: irreversible inhibition of complex I by intracellular peroxynitrite

Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate

E. Sierra-Campos,¹ M. A. Valdez-Solana,² D. Matuz-Mares,¹ I. Velázquez¹ and J. P. Pardo¹

Correspondence

J. P. Pardo

pardov@bq.unam.mx

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Coyoacán 04510, México D. F., Mexico

²Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Casco de Santo Tomas, Mexico

The effects of octyl gallate on *Ustilago maydis* yeast cells were analysed in relation to its capacity to oxidize compounds (pro-oxidant actions). All phenolic compounds tested inhibited the alternative oxidase (AOX). However, only octyl gallate induced a morphological change in yeast cells and collapsed the mitochondrial membrane potential. In contrast to octyl gallate, propyl gallate and nordihydroguaiaretic acid caused only a negligible cell change and the membrane potential was not affected. Our findings show that structurally related phenolic compounds do not necessarily exert similar actions on target cells. Preincubation of *U. maydis* cells with trolox inhibited the change to pseudohyphal growth produced by octyl gallate. These results suggest that in addition to the inhibitory action of octyl gallate on the AOX, this compound induces a switch from yeast to a mycelium, probably through the formation of lipid peroxides.

Received 23 May 2008

Revised 27 October 2008

Accepted 5 November 2008

INTRODUCTION

Gallic acid, a natural plant triphenol that constitutes tannin, and some esters of gallate, especially propyl, octyl and lauryl gallate, are widely used as scavenging reactive oxygen species (ROS). The antioxidant effect of polyphenolic compounds is closely related to their hydrogen donor activity (Serrano *et al.*, 1998), and this is the case for gallate esters, which inhibit lipid peroxidation by donating hydrogen to peroxy and alkoxy radical intermediates. However, gallic acid compounds show various cytotoxic and antiproliferative effects on tissues and cells. Alkyl gallates, including octyl gallate, induce apoptosis with DNA fragmentation in hepatocytes (Inoue *et al.*, 1994; Nakagawa *et al.*, 1997) and some tumour cells (Serrano *et al.*, 1998); they also show trypanocidal effects (Koide *et al.*, 1998), and free radicals of propyl gallate inhibit the activity of some redox enzymes (Brzhevskaja *et al.*, 1966). These cytotoxic effects of gallate compounds are assumed to be due to the pro-oxidant action, not to their antioxidant capacity. Alkyl gallates also have antifungal activities against *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (Kubo, 1999; Fujita & Kubo, 2002b; Hirasawa & Takada, 2004). In addition, propyl gallate inhibits the growth of microorganisms by inhibiting respiration and nucleic acid synthesis (Boyd & Beveridge, 1979). Similarly, nordihydro-

droguaiaretic acid (NDGA) strongly inhibits succinate cytochrome *c* reductase by depleting the thiol groups (Shi & Pardini, 1995). Therefore, these natural compounds could serve as useful alternatives or additives to conventional antifungals (Kim *et al.*, 2006).

Corn smut disease is caused by the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. The disease results in stunted maize plant growth and reduced yield, leading to severe economic losses (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). *U. maydis* is a dimorphic micro-organism, capable of producing different morphological forms (yeast or mycelium) in response to environmental stimulus. The change in morphology in *U. maydis* results from the activation of two conserved signalling pathways: a mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling cascade and a cyclic AMP-dependent pathway (D'Souza & Heitman, 2001). Both pathways are thought to transduce environmental signals, such as nutrient availability, presence of lipids, air exposure, acidic pH, and pheromones from cells of opposite mating type, during the transition from budding to filamentous growth (Bölker *et al.*, 1995; Klose *et al.*, 2004; Martínez-Espinoza *et al.*, 2004).

It has been shown that *U. maydis* is able to express a rotenone-insensitive NADH dehydrogenase and an alternative oxidase (AOX), which may play an important role in the yield of ATP synthesis (Juárez *et al.*, 2004) due to their non-proton motive character. It is also likely that the composition of the fungal electron transport chain depends on the metabolic state of the cell, and on developmental

Abbreviations: AOX, alternative oxidase; DCFDA, dichlorofluorescein diacetate; DHR123, dihydrorhodamine 123; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; ROS, reactive oxygen species.

and environmental conditions (Juárez *et al.*, 2006). Thus the alternative respiratory enzymes might confer resistance against certain fungicides.

In this work we explore the underlying mechanism of the antifungal effects of octyl gallate in the phytopathogen *U. maydis*.

METHODS

Materials. Dihydrorhodamine 123 (DHR123) and DCFDA (dichlorofluorescein diacetate) were from Molecular Probes. Strain FB₂ was obtained from the American Type Cell Collection (Manassas, VA, USA). All other reagents were from Sigma.

Culture conditions. Growth of wild-type *U. maydis* strain FB₂ was as described previously (Juárez *et al.*, 2004). Briefly, cells were grown in YPD medium (1 % yeast extract, 0.25 % bacto-peptone, 1 % glucose, pH 4.7) at 28 °C with shaking at 220 r.p.m. After 24 h of culture, cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water.

Morphological evaluation. Morphology was monitored by light microscopy. The cells were grown in YPD for 24 h in the presence of 30 µM each polyphenolic compound. Cells were photographed using a Nikon model TE300 digital camera.

Cell-wall staining. For cell-wall staining, 1 mg fluorescent brightener 28 ml⁻¹ (Sigma) was added to 1 ml cell culture (approx. 1 × 10⁷ cells). The cell suspension was incubated for 5 min at 30 °C with agitation and washed twice in sterile distilled water. Cells were viewed under a fluorescence microscope with UV illumination by using different filter combinations (emission and excitation filters). Images were captured with a Nikon model TE300 digital camera.

Preparation of mitochondria. To prepare intact mitochondria, cells were suspended in isolation buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.0, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 %, w/v, BSA), at a final ratio of 5 ml (g wet wt)⁻¹. The cells were disrupted with glass beads (450 µm) using 3 cycles of 25 s stroke at 35 s intervals in a bead beater at 0–4 °C. From this point, all steps were carried out at 4 °C. The broken cells were centrifuged for 10 min at 3000 g to remove the unbroken cells and cell debris. The supernatant was centrifuged at 12 000 g for 10 min, and the pellets containing mitochondria were washed once in isolation buffer and resuspended to a final protein concentration of 5 mg ml⁻¹. Mitochondria were maintained on ice and used within 3 h. Protein concentration in mitochondrial preparations was estimated by the Biuret method using BSA as standard. The integrity of the isolated mitochondria was determined by measuring the membrane potential and the respiratory control ratio.

Measurement of mitochondrial membrane potential. The mitochondrial membrane potential was monitored by measuring the changes in absorbance of safranin O (Akerman & Wikström, 1976) at the wavelength pair 533/511 nm. Since the system was not calibrated, the results show the relative changes in Δψ, but not their absolute values. The incubation medium contained 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 2.5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 8 µM safranin O and 1.0 mg mitochondrial protein ml⁻¹. The temperature was 30 °C, and the reaction was started by addition of 7 mM succinate or 0.5 mM NADH to 2.0 ml of the medium.

Mitochondrial respiration. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode fitted to a 1.5 ml

water-jacket closed chamber. Isolated mitochondria (0.5 mg ml⁻¹) were suspended in a medium consisting of 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 2.5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 0.1 % (w/v) BSA and 1 µM rotenone. All experiments were performed at 30 °C in air-saturated buffer.

Detection of ROS. The fluorescence of DHR123 and DCFDA were used to detect mitochondrial and cytosolic ROS levels, respectively. Briefly, 2 × 10⁶ cells were incubated at 28 °C for 30 min in the dark in the presence of 2.5 µM DCFDA or for 10 min in the presence of 10 µM DHR123 (dissolved in ethanol). The cells were rinsed twice with 50 mM MOPS (pH 7.0) and the fluorescence intensity was measured.

Glutathione assay. Total glutathione content, the sum of reduced and oxidized glutathione, was estimated by converting oxidized glutathione (GSSG) into glutathione with glutathione reductase, and then glutathione was quantified spectrophotometrically by monitoring the reduction of DTNB (Akerboom & Sies, 1981).

Measurement of lipid peroxidation. Lipid peroxidation was determined with the Calbiochem LPO assay kit. The coloured complex formed reached its maximum absorbance at 500 nm.

Protein determination. The protein content was determined by using the Biuret method using BSA as standard.

Data analysis. Experiments reported in this study were performed a minimum of three times. Results are expressed as means ± SEM or by a representative experiment. Data were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Important advances have been made in the understanding of energy metabolism and the function of AOX under physiological conditions in *U. maydis* yeast cells (Juárez *et al.*, 2006). Despite this, *U. maydis* is a dimorphic micro-organism, capable of producing different morphological forms in response to several environmental stimuli, and the ability to switch from a yeast-like form to a mycelium form correlates with pathogenesis (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997). Stress conditions such as low pH (pH 3) along with nitrogen starvation induce the dimorphic transition (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

Alkyl gallates are phenolic compounds that inhibit the AOX in systems ranging from isolated mitochondria (Shimoji & Yamasaki, 2005) to whole organisms (Juárez *et al.*, 2004). The AOX plays a role in protecting fungal cells against oxidative stress, and recently it has been implicated in promoting cryptococcal virulence (Akhter *et al.*, 2003). This aspect is important because many plants synthesize antioxidant polyphenolic compounds and inhibitors of fungal growth in response to fungal infections. In addition, mitochondria, major players in cell redox homeostasis and signalling, may also have a role in the morphological change.

To understand the importance of the AOX in *U. maydis*, yeast cells were cultivated in the presence of octyl gallate. Growing cells under this condition generally results in inhibition of AOX and an increase in the activity of the

cytochrome *c* oxidase pathway (Tanton *et al.*, 2003), but in *U. maydis* the respiratory activity through the cytochrome *c* oxidase decreased (data not shown). From a theoretical point of view, if the only target of octyl gallate is the AOX, it should not affect the growth of yeast cells, because this enzyme does not participate in the synthesis of ATP (Juárez *et al.*, 2006). In addition, octyl gallate elicited a concentration-dependent increase in the rate of state 4 oxygen consumption (approx. 30%), probably due to an uncoupling effect (data not shown). Therefore, we determined how different polyphenolic compounds (propyl gallate, octyl gallate and NDGA; Fig. 1) affected cellular respiration and growth.

Octyl gallate inhibits growth and stimulates the morphological change to pseudohyphal growth on rich medium

The inhibition of growth by polyphenolic compounds in *U. maydis* yeast cells is shown in Fig. 2. When exponentially growing cells in YPD medium were exposed to different concentrations of propyl gallate, octyl gallate and NDGA, the growth, measured in terms of biomass yield, was slightly reduced with propyl gallate and NDGA. However, when yeast cells were cultivated in the presence of octyl gallate, there was a dramatic decrease in biomass. Surprisingly, exposure of yeast cells to 40 μM octyl gallate induced a morphological change to pseudomycelium, and at higher concentrations of octyl gallate (60 μM), cells started to produce the melanin-like pigment (data not shown). In all cases, the pH of the medium increased, after 24 h growth, from 4.7 to 5.5 (octyl gallate) or 6.0 (propyl gallate and NDGA).

Mitochondrial dysfunction may mediate the switch to pseudohyphal growth by phenolic compounds

It is widely assumed that alkyl gallates are specific inhibitors of the AOX (Siedow & Grivin, 1980). Similar to the alkyl gallates, NDGA also has antifungal properties (Jensen *et al.*, 1992). So, it is likely that NDGA will display an inhibitory action on *U. maydis* AOX due to its structural similarity to alkyl gallates. In the presence of 3 μM

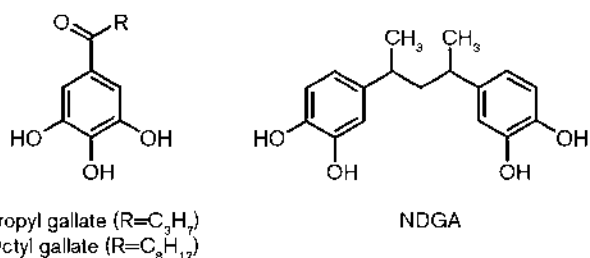


Fig. 1. Structures of the polyphenolic compounds used in this study.

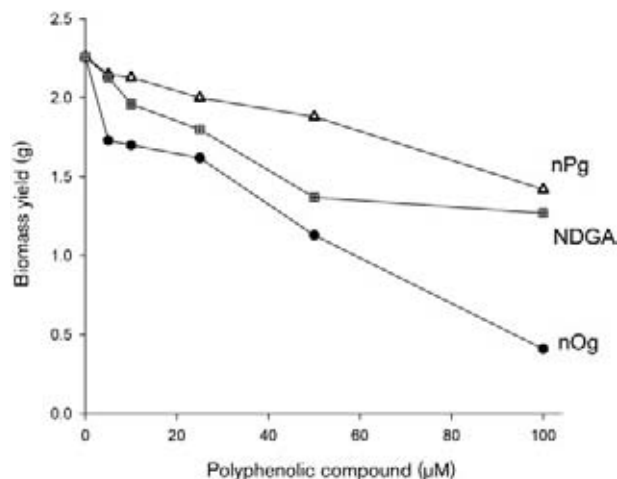


Fig. 2. Biomass yield of *U. maydis* yeast cells grown in the presence of phenolic compounds: propyl gallate (nPg), octyl gallate (nOg) and NDGA.

antimycin A, both propyl and octyl gallates completely inhibited mitochondrial respiration at 5 μM , whereas full inhibition of respiration was attained at 10 μM NDGA (Fig. 3). The effects of phenolic compounds on glutamate+malate-supported respiration were similar to those observed for succinate oxidation (data not shown). These results are in agreement with some studies showing that polyphenolic compounds and gallate esters have similar characteristics, exhibiting the same inhibitory activity against the AOX and comparable antioxidant properties (Shimoji & Yamasaki, 2005).

Unfortunately, very little information exists on the mechanism by which phenolic compounds inhibit the

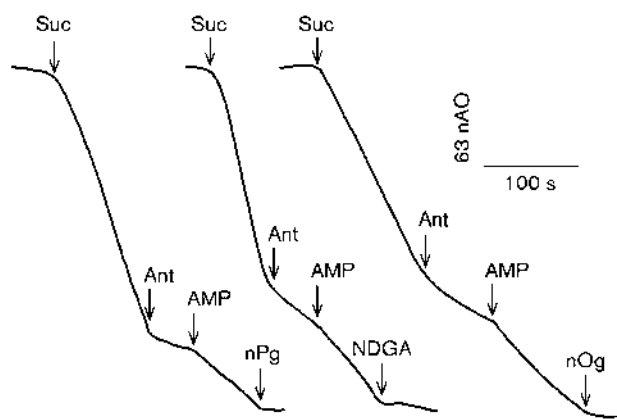


Fig. 3. Oxygen uptake by isolated *U. maydis* mitochondria. The additions to yeast mitochondria were 7 mM succinate (Suc), 3 μM antimycin A (Ant), 1 mM AMP, 5 μM propyl gallate (nPg), 5 μM octyl gallate (nOg) and 15 μM NDGA. nAO, nano-atom-grams of oxygen.

AOX, although sequestering of iron ions from the enzyme active site or competition between the inhibitor and ubiquinone for the active site have been proposed. It is worth mentioning that other mechanisms and protein targets should be taken into consideration, since it has been shown that propyl gallate inhibits oxygen consumption in isolated rat hepatocytes (Nakagawa & Tayama, 1995).

Since the mitochondrial membrane potential plays an important role in mitochondrial functions, we examined the effect of phenolic compounds on this potential. In the absence of succinate there was no membrane potential. At 5 μM , propyl gallate and NDGA had no effects on the membrane potential generated by succinate (data not shown), but octyl gallate collapsed the potential (Fig. 4). Further addition of CCCP induced a small dissipation, whereas antimycin A produced a full collapse of the membrane potential due to inhibition of the respiratory chain (Fig. 4). From a bioenergetic point of view, it is important to realize that electron flow through the AOX is not coupled to proton pumping and hence the effect of octyl gallate is probably associated with an increase in membrane permeability or inhibition of the cytochrome pathway. We suggest that at low concentrations, the effect of octyl gallate is due to its uncoupling properties. These multiple actions are similar to certain dinitrophenols which exhibit both inhibition of respiration and uncoupling activity (Miyoshi *et al.*, 1990).

Generation of oxidative stress is believed to be involved in the antifungal effects of octyl gallate (Fujita & Kubo, 2002b). When cells in YPD medium were exposed to different concentrations of octyl gallate, the growth yield

was significantly reduced (Fig. 2). In addition, concentrations of octyl gallate around 40 μM also induced a morphological change (Fig. 5b). Next, we looked at *U. maydis* by fluorescence microscopy using calcofluor, a dye that has been used in this organism to visualize cell-wall regions (Klose *et al.*, 2004). A common phenotype was observed when cells were grown in YPD as budding yeasts (Fig. 6a). In contrast, cells grown in YPD medium supplemented with 30 μM octyl gallate underwent the switch to pseudomycelium, with visible septa and branched hyphae (Fig. 6b).

To determine whether octyl gallate confers oxidative stress on *U. maydis* cells, we tested its effect on cellular ROS production in yeast cells. It has been reported in several systems that propyl gallate, octyl gallate and NDGA increase the production of ROS (Yoshino *et al.*, 2002; Shi

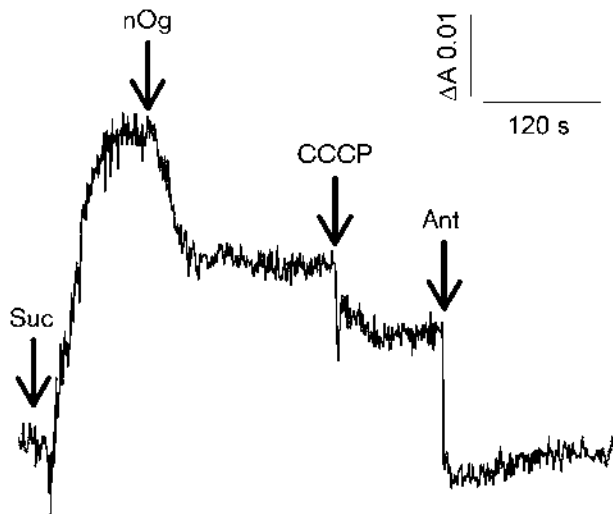


Fig. 4. Effect of octyl gallate on mitochondrial membrane potential. Membrane potential was measured with safranin O. At the times indicated by an arrow, 7 mM succinate (Suc), 5 μM octyl gallate (nOg), 1 μM CCCP and 3 μM antimycin A (Ant) were added.

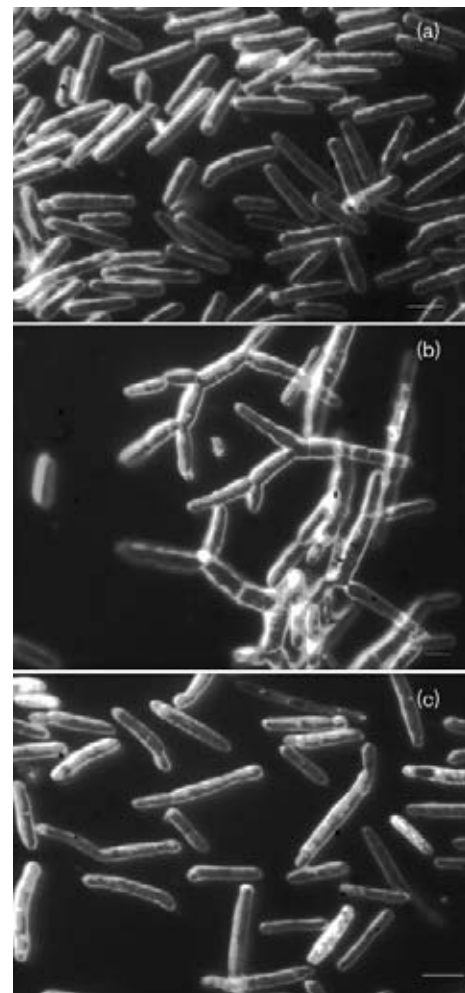


Fig. 5. Morphological response of *U. maydis* to octyl gallate and trolox. (a) Control cells (no treatment); (b) cells treated with octyl gallate (40 μM); (c) cells treated with octyl gallate (40 μM) and trolox (200 μM). The images were taken 20 h after the addition of the compounds. Scale bar, 10 μm .

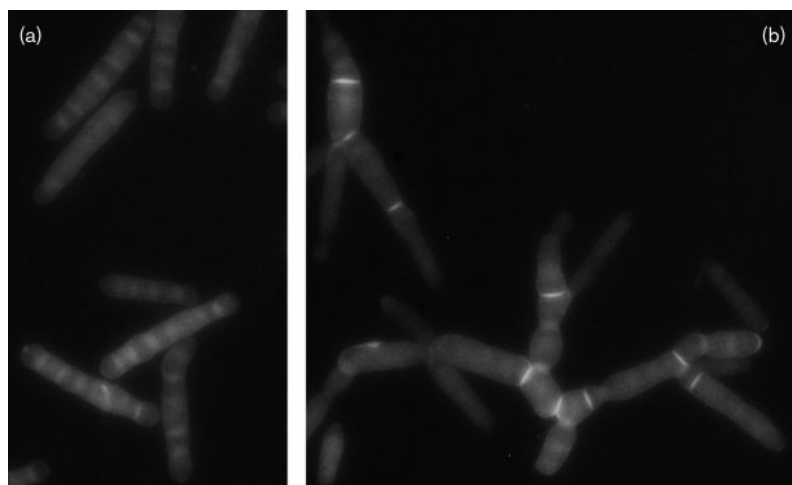


Fig. 6. *U. maydis* yeast cells stained with calcofluor. Cells were observed for morphological changes after 24 h of growth in liquid medium (YPD). Fluorescent brightener 28 (1 mg ml^{-1}) was mixed with 1 ml cell culture (approx. 1×10^7 cells), incubated for 5 min at 30°C with agitation, and washed twice in sterile distilled water. Cells were viewed under a fluorescence microscope with UV illumination and the photographs were taken with a Nikon model TE300 digital camera. (a) Control cells; (b) cells treated with $30 \mu\text{M}$ octyl gallate.

& Pardini, 1995). However, under our experimental conditions there was no evidence of such an increase when yeast cells were loaded with either DHR123 or DCFHDA (data not shown).

Oxidative stress as a factor in the morphological change in *U. maydis*

In an attempt to understand the mechanisms underlying such diverse actions, we examined the chemistry of the interactions between octyl gallate and cellular components. Previously, it was reported that octyl and nonyl gallates induced membrane injury and ROS generation in *S. cerevisiae* (Fujita & Kubo, 2002a). In this case, α -tocopherol did not eliminate the production of ROS or the lethality of these compounds. Since this organism does not have an AOX, these effects should occur by different mechanisms.

Several reports have suggested that glutathione is involved in the yeast to hyphae transition in *C. albicans* (Thomas *et al.*, 1991) and *Aureobasidium pullulans* (Jürgensen *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae*, glutathione and its oxidized disulfide form, GSSG, participate in essential physiological functions, such as synthesis of DNA and proteins, transport and detoxification of xenobiotics and endogenous toxic metabolites, as well as in cell defence against ROS (Penninckx & Elskens, 1993). Thomas *et al.* (1991) supported the idea that alterations in glutathione metabolism play a key role in the differentiation process.

There were no significant changes in total glutathione following treatment of *U. maydis* cells with octyl gallate (Fig. 7), but the addition of $10 \mu\text{M}$ propyl gallate or NDGA to yeast cells caused a slight depletion of cellular glutathione. In addition, when the glutathione content of the cells was reduced to 60% of the control values by treatment with buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis, there was no induction of the morphological change. Thus, dimorphic changes are not due to a decrease in glutathione content.

Evidence of oxidative processes was obtained using the lipid peroxides assay, which revealed a 10-fold increase in the peroxide content after treatment with $40 \mu\text{M}$ octyl gallate (Fig. 8). Pretreatment of cells with lipophilic antioxidant (trolox), a scavenger of lipid peroxides, protected cells from the octyl gallate-mediated morphological change. In addition, at $30 \mu\text{M}$ octyl gallate, the presence of $200 \mu\text{M}$ trolox inhibited the switch to pseudomycelium, but growth was still slowed down (Fig. 5c). These results indicate that octyl gallate has various biological activities. In this case, it was assumed that the cytotoxicity of octyl gallate was due to oxidative membrane damage, probably because of its pro-oxidant action. This is in agreement with previous observations

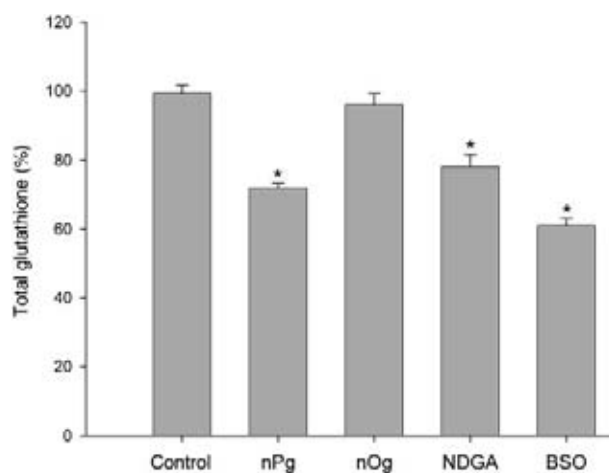


Fig. 7. Effect of polyphenolic compounds propyl gallate (nPg), octyl gallate (nOg) and NDGA on total glutathione levels. *U. maydis* yeast cells were pretreated with $10 \mu\text{M}$ each compound or $200 \mu\text{M}$ buthionine sulfoximine (BSO, positive control) for 3 h. Controls were prepared from cells treated only with ethanol (vehicle) for the same length of time.

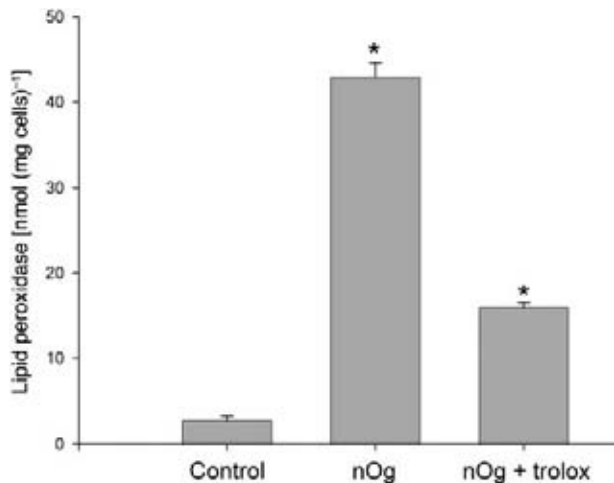


Fig. 8. Lipid peroxidation. The production of lipid peroxides was quantified using the Calbiochem LPO Assay kit. Cells were incubated in the presence of 30 μ M octyl gallate (nOg) with or without 200 μ M trolox.

reporting the fungicidal activity of alkyl gallates on *S. cerevisiae* (Fujita & Kubo, 2002a).

DISCUSSION

Phenolic compounds have multiple biological activities, including antibacterial, antiviral and antifungal actions, which may result, at least in part, from their pro-oxidation capacity and their ability to interact with lipid bilayers. In this sense, phenolics can act as antioxidants under oxidative stress conditions, but if they are applied to cells under normal growth conditions, the active phenolic compounds can interfere with the cellular redox homeostasis, resulting in oxidative stress and growth inhibition. This is the case for *S. cerevisiae*, in which the antifungal activities of phenolics (e.g. catechin and epigallocatechin gallate) are associated with the production of cellular oxidative stress (Maeta *et al.*, 2007). Furthermore, it is possible that many of the proposed biological effects of phenolic compounds depend on the cellular environment. For example, octyl gallate has been suggested to be both an antioxidant (Nakayama *et al.*, 1993) and a pro-oxidant (Roy *et al.*, 2000), depending on its concentration and cellular conditions. So, it was interesting that among the phenolic compounds tested only octyl gallate induced a morphological change in *U. maydis*. Since the mechanism behind this effect is not known, we focused on the ability of octyl gallate to generate oxidative stress.

While all compounds inhibited AOX activity in cells (data not shown) and isolated mitochondria, only octyl gallate disrupted the membrane potential in isolated mitochondria, probably because of its ability to act as surfactant. Inhibition of cell growth might be the result, in part, of

mitochondrial dysfunction in these cells. Interestingly, there was no evidence of an increase in the production of ROS when *U. maydis* yeast cells were exposed to octyl gallate, as measured by the fluorescence of DHR123 or DCFHDA; nor did octyl gallate affect the total glutathione level, whereas propyl gallate and NDGA decreased it.

To get a better understanding of the mechanism underlying this process, we looked for the effects of octyl gallate on cellular signalling and/or toxicity due to its interaction with cellular membranes and the formation of lipid peroxides. We assumed that when yeast cells are exposed to high concentrations of octyl gallate, this compound will partition into the various cell membranes, producing an increase in lipid peroxidation. In this regard, we investigated the effect of trolox on the morphological change induced by octyl gallate. The majority of yeast cells exposed to octyl gallate exhibited the switch from budding to pseudohyphal growth, whereas in yeast cells exposed to octyl gallate plus trolox this change was partially inhibited, suggesting that the production of lipid peroxides might be involved in this process. This result is not surprising because trolox, a water-soluble α -tocopherol analogue with a carboxylic group replacing the lipophilic tail, is frequently used as an antioxidant to inhibit lipid peroxidation in cellular membranes. In accordance with this, it has been established that the oxidative stress produced by octyl gallate kills *S. cerevisiae* via direct or indirect inhibition of plasma membrane H^+ ATPase (Fujita & Kubo, 2002b). Interestingly, free fatty acids have similar characteristics to gallate esters and exhibit the same tendency to induce the morphological transition (Klose *et al.*, 2004). Alkyl gallates and free fatty acids are thought to behave as detergents, disturbing the stable structure of lipid membrane bilayers, including the plasma membrane.

Little is known about the defence response of *U. maydis*. However, from a general perspective, different types of defence responses should be important for *U. maydis*, because its ability to deal with different ambient conditions appears to play a critical role in growth and virulence. It has been suggested that polyphenolic compounds may exert their effects through interactions with specific proteins of the cell signalling pathways (Williams *et al.*, 2004). In *U. maydis*, cAMP signalling is critical for cell morphology and filamentous growth (Kahmann *et al.*, 2000). In addition, several studies have shown that lipids induce the dimorphic transition on *U. maydis*. Klose *et al.* (2004) suggested that growth in the presence of lipids promotes a filamentous phenotype that resembles the infection cell type found in plants. In addition, the ability of the fungus to respond to lipids depends on both the cAMP and the Ras/MAPK signalling pathways which are known to regulate mating, filamentous growth and pathogenesis in *U. maydis*. Therefore, the identification of the signal transduction pathway modulated by octyl gallate will contribute to the characterization of how this polyphenolic compound exerts its morphological effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 59855) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN219107-3), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). E.S.-C. received a scholarship from CONACyT and a complementary scholarship from DGEP, UNAM. We gratefully thank Dr W. Hansberg at the Instituto de Fisiología Celular (UNAM) for helpful discussions. We also thank Josefina Bolado for correcting the English style of the manuscript.

REFERENCES

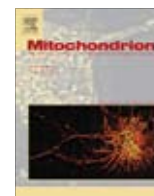
- Akerboom, T. P. & Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**, 373–382.
- Akerman, K. E. O. & Wikström, M. K. F. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**, 191–197.
- Akhter, S., McDade, H. C., Gorch, J. M., Heinrich, G., Cox, G. M. & Perfect, J. R. (2003). Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **71**, 5794–5802.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmier, C. & Kahmann, R. (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320–325.
- Boyd, I. & Beveridge, E. G. (1979). Relationship between the antibacterial activity towards *Escherichia coli* NCTC 5933 and the physico-chemical properties of some esters of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid). *Microbios* **24**, 173–184.
- Brzewska, O. N., Kayushin, L. P. & Nedelina, O. S. (1966). On the existence of free radicals in the enzymatic hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP). *Biofizika* **11**, 213–216.
- D'Souza, C. A. & Heitman, J. (2001). Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 349–364.
- Fujita, K. & Kubo, I. (2002a). Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **92**, 1035–1042.
- Fujita, K. & Kubo, I. (2002b). Antifungal activity of octyl gallate. *Int J Food Microbiol* **79**, 193–201.
- Hirasawa, M. & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **53**, 225–229.
- Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogiwara, Y. & Yabu, Y. (1994). Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 898–904.
- Jensen, E. C., Ogg, C. & Nickerson, K. W. (1992). Lipoxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2505–2508.
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F. & Pardo, J. P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 244–251.
- Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R. E. & Pardo, J. P. (2006). The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J* **273**, 4603–4615.
- Jürgensen, C. W., Jacobsen, N. R., Emri, T., Eriksen, S. H. & Pocsí, I. (2001). Glutathione metabolism and dimorphism in *Aureobasidium pullulans*. *J Basic Microbiol* **41**, 131–137.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. & Kämper, J. (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, pp. 347–371. Edited by J. W. Kronstad. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kim, J. H., Campbell, B. C., Mahoney, N., Chan, K. L. & May, G. S. (2006). Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolic that inhibit mitochondrial function. *J Appl Microbiol* **101**, 181–189.
- Klose, J., Moniz, M. & Kronstad, J. W. (2004). Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **52**, 823–835.
- Koide, T., Nose, M., Yabu, Y. & Ohta, N. (1998). Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. *Planta Med* **64**, 27–30.
- Kubo, I. (1999). Molecular design of antioxidant and antimicrobial agents. *Chemtech* **29**, 37–42.
- Maeta, K., Nomura, W., Takatsume, Y., Izawa, S. & Inoue, Y. (2007). Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative stress responsive transcription factors in yeast. *Appl Environ Microbiol* **73**, 572–580.
- Martínez-Espinoza, A. D., León, C., Elizarraraz, G. & Ruiz-Herrera, J. (1997). Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* **87**, 259–265.
- Martínez-Espinoza, A. D., García-Pedrajas, M. & Gold, S. E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1–20.
- Martínez-Espinoza, A. D., Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. G. & Gold, S. E. (2004). MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol* **49**, 274–281.
- Miyoshi, H., Tsujishita, H., Tokutake, N. & Fujita, T. (1990). Quantitative analysis of uncoupling activity of substituted phenols with a physicochemical substituent and molecular parameters. *Biochim Biophys Acta* **1016**, 99–106.
- Nakagawa, Y. & Tayama, S. (1995). Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes. *Arch Toxicol* **69**, 204–208.
- Nakagawa, Y., Moldés, P. & Moore, G. (1997). Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* **72**, 33–37.
- Nakayama, T., Hiramitsu, M., Osawa, T. & Kawakishi, S. (1993). The protective role of gallic acid esters in bacterial cytotoxicity and ROS responses induced by hydrogen peroxide. *Mutat Res* **303**, 29–34.
- Penninckx, M. J. & Elskens, M. T. (1993). Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Adv Microb Physiol* **34**, 239–301.
- Roy, G., Lombardía, M., Palacis, C., Serrano, A., Cespon, C., Ortega, E., Eiras, P., Luján, S., Revilla, Y. & González-Forqué, P. (2000). Mechanistic aspect of induction of apoptosis by lauryl gallate in murine B-cell lymphoma line Wehi 231. *Arch Biochem Biophys* **383**, 206–214.
- Ruiz-Herrera, J., León, C. G., Guevara-Olvera, L. & Cárbaz-Trejo, A. (1995). Yeast–mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis* in liquid culture. *Microbiology* **141**, 695–703.
- Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespon, C. & González-Forqué, P. (1998). Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys* **350**, 49–54.
- Shi, L. & Pardini, R. S. (1995). Effect of NDGA on beef heart mitochondria and EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **90**, 235–254.
- Shimoi, H. & Yamasaki, H. (2005). Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. *Biol Plant* **49**, 117–119.
- Siedow, J. N. & Grivín, M. E. (1980). Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol* **65**, 669–674.
- Tanton, L. L., Nargang, C. E., Kessler, K. E., Li, Q. & Nargang, F. E. (2003). Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **39**, 176–190.

Thomas, D., Klein, K., Manavathu, E., Dimmock, J. R. & Mutus, B. (1991). Glutathione levels during thermal induction of the yeast-to-mycelial transition in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **61**, 331–334.

Williams, R. J., Spencer, J. P. & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* **36**, 838–849.

Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Htay, H. H., Iwata, S., Tsubouchi, R. & Murakami, K. (2002). Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Toxicol In Vitro* **16**, 705–709.

Edited by: J.-R. Xu



Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions

E. Sierra-Campos, I. Velázquez, D. Matuz-Mares, A. Villavicencio-Queijeiro, J.P. Pardo *

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Coyoacán 04510, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2008

Received in revised form 9 December 2008

Accepted 5 January 2009

Available online 17 January 2009

Keywords:

Isolated mitochondria

Alternative oxidase

Lipid peroxidation

Antimycin A

Pyruvate

Ustilago maydis

ABSTRACT

The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis* contains two terminal oxidases, the cytochrome c oxidase (COX) and the alternative oxidase (AOX). To understand the biochemical events that control AOX activity, we studied the regulation and function of AOX under oxidative stress. The activity of this enzyme was increased by both pyruvate ($K_{05} = 2.6$ mM) and purine nucleotides (AMP, $K_{05} = 600$ μ M) in mitochondria using succinate as respiratory substrate. When *U. maydis* cells were grown in the presence of antimycin A, the amount of AOX in mitochondria was markedly increased and its selectivity towards AMP and pyruvate changed, suggesting that post-translational events may play a role in the regulation of AOX activity under stress conditions. Addition of antimycin A to isolated mitochondria induced the inactivation of AOX, the formation of lipid peroxides and the loss of glutathione from mitochondria. The two last processes are probably related with the time dependent inactivation of AOX, in agreement with the inhibition of the enzyme by *tert*-butyl hydroperoxide. Our results suggest that the *in vivo* operation of AOX in *U. maydis* depends on the mitochondrial antioxidant machinery, including the glutathione linked systems.

© 2009 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

The alternative oxidase (AOX) is a mitochondrial inner membrane protein that catalyzes the four-electron reduction of molecular oxygen to water (Siedow and Umbach, 2000). Electron transfer through AOX is not coupled to proton translocation and consequently the free-energy is released as heat. The AOX is resistant to inhibitors of the cytochrome pathway (e.g., cyanide and antimycin A), but is specifically inhibited by several compounds, including salicylhydroxamic acid (SHAM) and *n*-octyl gallate (Moore and Siedow, 1991). Since AOX has the potential to decrease the yield of ATP synthesis, AOX pathway is tightly regulated by two mechanisms. In plants, AOX is activated by α -keto acids (notably pyruvate) and succinate, and it has been shown that a highly conserved cysteine residue in the N-terminal region of the enzyme is important for the activation by α -keto acids (Umbach et al., 1994; Day et al., 1994; Hoefnagel et al., 1995; Affourtit et al., 2001). In contrast, regulation of AOX activity in fungi and protozoa is not subjected to α -keto acids activation (Umbach and Siedow, 2000), but it is stimulated by purine nucleotides, particularly ADP, AMP and GMP (Michéa-Hamzhepour and Turian, 1987; Sakajo et al., 1997). In fact, under some conditions AOX activity is fully

dependent on the presence of purine nucleotides (Jarmuzkiewicz et al., 1997).

Although the role of AOX remains controversial, it is generally accepted that the AOX pathway plays a role in maintaining the carbon flow through the tricarboxylic acid cycle, when the cytochrome pathway is restricted or limited by the availability of adenine nucleotides (Moore and Siedow, 1991). In addition, recent investigations suggest that this enzyme might be involved in the survival of plants and fungi during periods of stress (Wagner, 1995; Vanlerberghe and McIntosh, 1997); this proposal is supported by the observations that inhibition of AOX increases the formation of reactive oxygen species (ROS) (Popov et al., 1997; Maxwell et al., 1999), and that oxidative stress leads to an increase in AOX activity accompanied by an elevation in the amount of AOX protein (Maxwell et al., 2002).

Mitochondria of the phytopathogen fungi *U. maydis* contain a cyanide and antimycin A resistant AOX (Juárez et al., 2004), encoded by a single nuclear gene. The *U. maydis* enzyme is also stimulated by AMP (Juárez et al., 2004). As in other cells, an important function of the AOX pathway is to decrease the steady-state concentration of ROS, at the expense of ATP synthesis. However, we observed an irreversible inactivation of AOX when isolated *U. maydis* mitochondria were incubated in the presence of antimycin A, suggesting that changes in mitochondrial redox capacity affect the AOX activity. Moreover, in this study we show that AOX can be inhibited by *tert*-butyl-hydroperoxyde, suggesting that mem-

* Corresponding author. Tel.: +52 5 56232510; fax: +52 5 56162419.
E-mail addresses: pardov@bq.unam.mx, pardov@servidor.unam.mx, jppardov@gmail.com (J.P. Pardo).

brane damage might play an important role in the mechanism of AOX inactivation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Growth of the strain FB₂ of the wild-type *U. maydis* was as described previously (Juárez et al., 2004). Briefly, cells were grown in YPD medium (1% yeast extract, 0.25% bactopeptone, 1% glucose, pH 4.7) at 28 °C under shaking at 250 rpm. At 24 h of culture, cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water. To induce the AOX mediated respiration, the stationary-phase yeast cells, which were sensitive to KCN by 85–90%, were grown in the presence of antimycin A at a final concentration of 7 µM. Cells were grown at 28 °C under shaking at 250 rpm. At 24 h of culture, cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water.

2.2. Preparation of mitochondria

To prepare intact mitochondria, cells were suspended in isolation buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.0, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1% (w/v) BSA), at a final ratio of 5 ml/g wet weight. The cells were disrupted with glass beads (450 µm) using 3 cycles of 25 s stroke at 35 s intervals in a bead beater at 0–4 °C. From this point all the steps were carried out at 4 °C. The broken cells were centrifuged for 10 min at 3000g to remove the unbroken cells and cell debris. The supernatant was centrifuged at 12,000g for 10 min and the pellets containing mitochondria were washed once in the isolation buffer and resuspended to final protein concentration of 5 mg/ml. Mitochondria were maintained on ice and used within the next 3 h. Protein concentration in mitochondrial preparations was estimated by the Biuret method using BSA as standard. The integrity of the isolated mitochondria was determined by measuring the membrane potential and the respiratory control ratio (RCR).

2.3. Measurement of oxygen consumption

Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode fitted to a 1.5 ml water-jacketed closed chamber. Isolated mitochondria (0.5 mg/ml) were suspended in a medium consisting of 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 2.5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 0.1% (w/v) BSA. All experiments were performed at 30 °C in air-saturated buffer. State 3 and State 4 respiratory rates were determined as described previously (Estabrook, 1967), using either 7 mM succinate or a mixture of 6 mM pyruvate and 6 mM malate as respiratory substrates. ADP was used at a final concentration of 0.85 mM. The respiratory rates before the addition of ADP (State 4) and during phosphorylation (State 3) were used to calculate the RCR (State 3/State 4).

2.4. Detection of hydrogen peroxide

The production of hydrogen peroxide (H₂O₂) by mitochondria was measured with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) [Black and Brandt, 1974]. The fluorescence from DCF was monitored with a spectrofluorometer at 30 °C. The wavelengths for excitation and emission were 488 and 520 nm, respectively. The incubation medium contained 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0), 2.5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 2 µM H₂DCF-DA, 5 U horseradish peroxidase, and 1.0 mg/ml mitochondrial protein. Reaction was initiated by adding 7 mM suc-

inate or a mixture of 6 mM pyruvate and 6 mM malate to 2.0 ml of the medium.

2.5. Glutathione assay

Total glutathione content, the sum of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, was estimated by converting GSSG into GSH with glutathione reductase and then GSH was quantified spectrophotometrically by monitoring the reduction of DTNB (Akerboom and Helmut, 1981).

2.6. Western blotting

Samples of the mitochondrial preparations (10 µg protein) were mixed with an equal volume of denaturing buffer and subjected to SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The proteins were blotted onto a PVDF membrane, and probed with a 1000-fold dilution of a monoclonal antibody raised against *Sauromatum guttatum* AOX (Elthon et al., 1989). Immunoreactive proteins were visualised using a Lumi-nol-based chemiluminescence system from Amersham Bioscience. Molecular weight of the two proteins recognized by the antibody were calculated by non linear regression, using CurveExpert 1.3.

2.7. Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined with the Calbiochem LPO assay kit. The colored complex formed reached its maximum absorbance at 500 nm.

2.8. Protein determination

The protein content was determined by the method of Biuret using bovine serum albumin as standard.

2.9. Data analysis

Experiments reported herein were performed at least three times. Results are expressed as mean ± SE or by a representative experiment. Data in this study were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Respiratory rates and membrane potential in *U. maydis* mitochondria

It was shown previously that cyanide-resistant respiration in digitonin-permeabilized cells can be inhibited by salicyl hydroxamic acid (Juárez et al., 2004). The next step was to investigate the AOX activity at the organelle level. We first studied the properties and the integrity of isolated *U. maydis* mitochondria. There was no oxygen consumption by mitochondria in the absence of respiratory substrates. As expected, succinate was efficiently oxidized by *U. maydis* mitochondria (Fig. 2), and both succinate and pyruvate-malate induced the generation of a membrane potential that can be abolished by CCCP, an uncoupler of oxidative phosphorylation (data not shown). In addition, ADP increased oxygen uptake with a respiratory control of 1.5–2.0 (data not shown).

3.2. Induction of AOX expression by antimycin A

The occurrence of a constitutive AOX is a common feature in fungal organisms (Affourtit et al., 2000; Umbach and Siedow, 2000). However, when certain phytopathogenic fungi are exposed to commercial fungicides, different AOX genes are expressed,

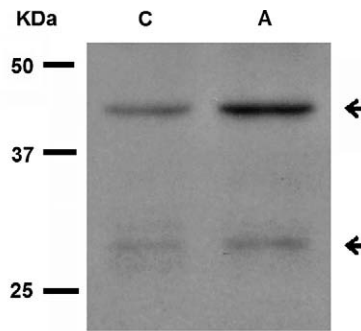


Fig. 1. Immunoblot of AOX protein. Lane C: mitochondria from cells grown in the absence of antimycin A; lane A: mitochondria from cells grown in the presence of antimycin A. The molecular weight (kDa) markers are indicated on the left of the figure. Arrow indicates the cross reactivity with *Sauromatum guttatum* monoclonal antibody.

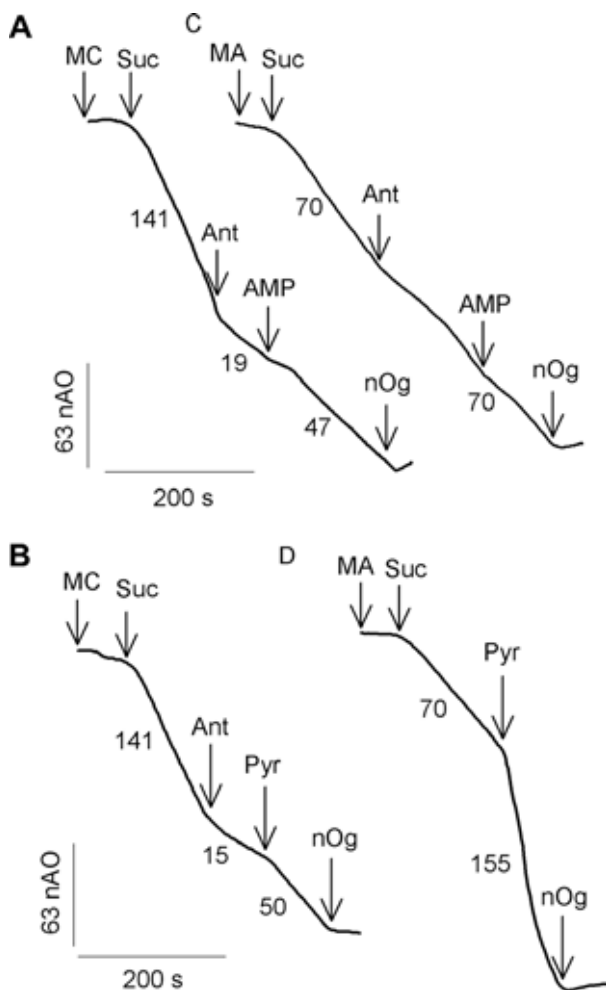


Fig. 2. Oxygen consumption by mitochondria isolated from cells grown in absence or presence of antimycin A (MC and MA, respectively). Where indicated, the following additions were made: 0.5 mg/ml mitochondrial protein, 7 mM succinate (Suc), 2 μ M antimycin A (Ant), 1 mM AMP, 2 mM pyruvate (pyr), 5 μ M *n*-octyl gallate (nOg). Numbers on traces refer to rates of oxygen uptake in nano atomograms of oxygen per milligram protein per minute (nAO). Traces C and D were obtained with mitochondria isolated from cells grown in the presence of antimycin A, and traces A and B show the behavior of mitochondria isolated from cell cultivated in the absence of antimycin A. Representative results are shown.

conferring resistance to fungicides (Wood and Hollomon, 2003). Moreover, in response to changes in the environmental conditions

or cellular energy demands, for example in the presence of antimycin A or cyanide, inhibitors of the cytochrome pathway in the respiratory chain, several fungal species express an AOX (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Helmerhorst et al., 2002; Lambowitz et al., 1989; Minagawa and Yoshimoto, 1987). We employed antimycin A to increase the capacity of AOX in *U. maydis* yeast cells. Immunoblot analysis using a monoclonal antibody against *Sauromatum guttatum* AOX showed two protein bands with molecular masses around 42 and 27 kDa in mitochondria from control cells and cells cultured in the presence of antimycin A (Fig. 1). Interestingly, there was a 2.5- to 3-fold increase in the concentration of AOX in mitochondria when cells were grown in the presence of antimycin A as compared with control cells. Therefore, like in other fungi, alterations in the concentration of AOX in the inner mitochondrial membrane seem to play a key role in the regulation of *U. maydis* AOX activity under oxidative stress.

3.3. Stimulation of alternative respiration by AMP and pyruvate

We previously showed that cyanide-resistant respiration in digitonin-permeabilized cells can be inhibited by salicyl hydroxamic acid and alkyl gallates (Juárez et al., 2004, 2006), suggesting that these inhibitors can be successfully used to estimate AOX capacity in *U. maydis* yeast cells. As expected, this inhibition was also observed in isolated mitochondria. Addition of antimycin A to mitochondria oxidizing succinate inhibited 85% of the total respiration, and nOg inhibited the rest of the respiratory activity (Fig. 2A). The rate of oxygen consumption through the AOX after the addition of antimycin A was two to three times higher in the presence of AMP or pyruvate than in their absence (Fig. 2A and B, respectively). Interestingly, the behavior of the AOX in mitochondria isolated from cells grown in the presence of antimycin A was altered. With succinate as substrate, control mitochondria showed a low AOX activity, which was stimulated by either AMP or pyruvate (Fig. 2A and B). In contrast, mitochondria from cells grown in the presence of antimycin A displayed a three fold increase in AOX capacity (compare Fig. 2A with C), with no stimulation by AMP (Fig. 2C), and a strong response to pyruvate (Fig. 2D). Similar effects were observed when cell were grown in the presence of H_2O_2 or cloramphenicol (data not shown).

The effect of AMP and pyruvate on *U. maydis* AOX activity was further characterized by determining the apparent affinity of AOX mediated respiration for these effectors, using increasing concentrations of the purine nucleotide and the α -keto acid (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, stimulation of AOX by AMP followed Michaelis-Menten kinetics, with a maximal respiratory rate of 120 ± 11 nAO \times min $^{-1}$ \times mg $^{-1}$ protein, and a K_a for AMP of 0.6 ± 0.2 mM. In contrast, the effect of pyruvate on AOX followed a sigmoid kinetics, with an apparent maximal respiratory rate of 125.3 ± 4.6 nAO \times min $^{-1}$ \times mg $^{-1}$ protein, and a $K_{0.5}$ for pyruvate of 2.6 ± 0.4 mM (Fig. 3B).

3.4. The relationship between AOX and ROS in *U. maydis* mitochondria

Many physiological roles for AOX in mitochondria have been proposed. Among these roles, it has been shown that AOX may act as an overflow valve for the electron flow, preventing the formation of ROS during the inhibition of the cytochrome pathway. To study the relationship between AOX and ROS production, nOg was added to mitochondria and H_2O_2 production was followed by measuring the oxidation of H_2DCF -DA. Addition of 5.5 μ M nOg increased the rate of H_2O_2 production, while cyanide (0.4 mM) had a smaller effect on this rate (Fig. 4A, trace +KCN). Indeed, addition of both cyanide and nOg gave a larger increase in H_2O_2 than that observed with nOg or KCN alone (Fig. 4A, trace KCN + nOg).

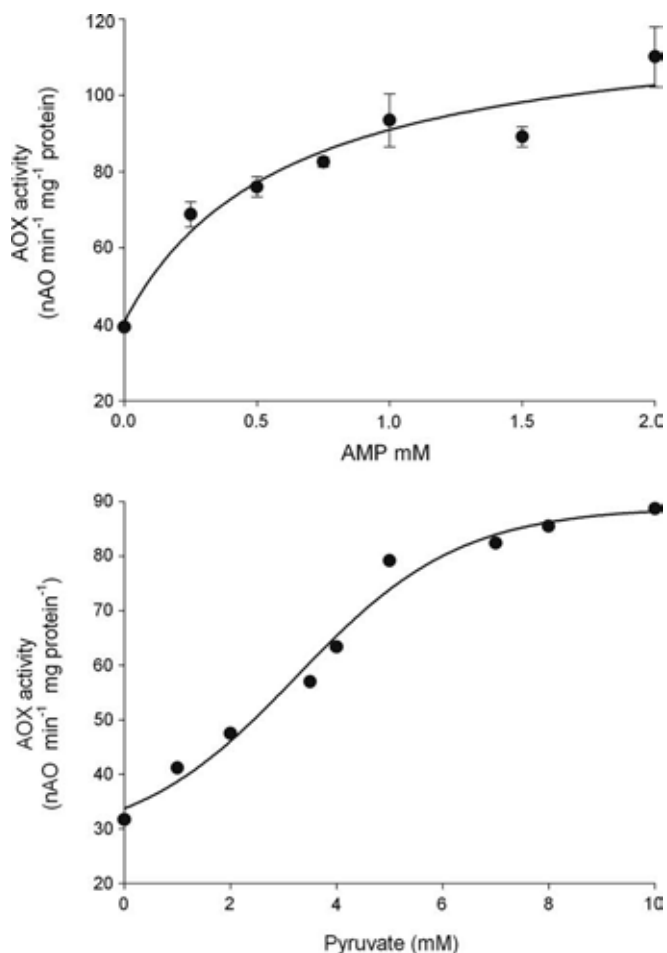


Fig. 3. Concentration dependence of the activation of AOX by AMP and pyruvate in isolated mitochondria. AOX activity was measured in mitochondria after the addition of antimycin A (2 μ M). Results are means \pm SEM of three independent experiments. The values of the activation constants (K_A and $K_{0.5}$) for AMP and pyruvate were obtained by non-linear regression analysis, using either the Michaelis–Menten equation for AMP or the Hill equation for pyruvate.

Due to the proximal location of AOX with the major mitochondrial ROS source (complex III), probably involving protein–protein interactions (Navet et al., 2004), it is tempting to speculate that AOX is constantly exposed to high levels of ROS, resulting in the irreversible loss of its function during stress (Winger et al., 2005). Fig. 5 shows that the activity of AOX was inhibited in few seconds upon the addition of antimycin A (Fig. 5). Furthermore, inactivation of *U. maydis* AOX correlates with an increased in ROS production (see Figs. 4B and 5). To study further the relationship between mitochondrial redox state and AOX activity, we measured the changes in lipid peroxides and total glutathione in isolated mitochondria. As shown in Fig. 6, there was an increase in the production of lipid peroxides in mitochondria, which correlated with the depletion of GSH pool, suggesting that changes in mitochondrial redox state might alter AOX activity. Based on these results, we tested the effect of two antioxidants that can diffuse into the mitochondrial matrix [reduced glutathione (GSH) and N-acetyl cysteine (Nac)] and a membrane impermeant enzyme [catalase (CAT)] on the activity of AOX. GSH at low concentrations (0.5 mM) decreased the susceptibility of mitochondrial AOX against oxidative damage (data not shown), whereas CAT and Nac were equally effective at protecting the AOX against inactivation (Fig. 7).

Fig. 8 shows that *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) is a potent irreversible inhibitor of *U. maydis* AOX activity. Respiration via

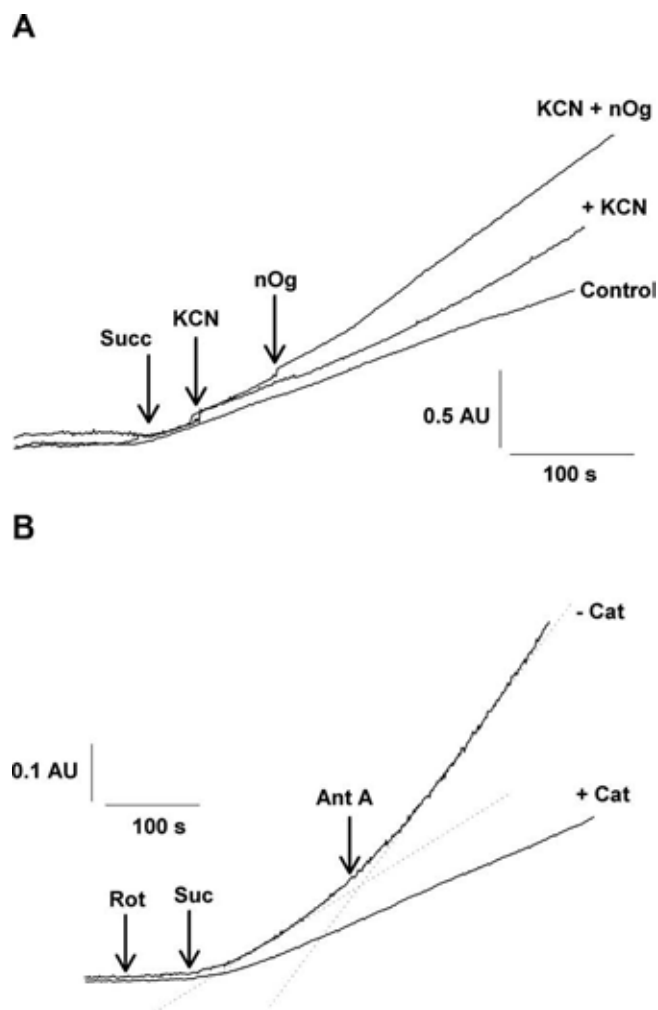


Fig. 4. Effect of antimycin A, KCN and nOg on the production of ROS by isolated *U. maydis* mitochondria. Where indicated, the following additions were made: 7 mM succinate (Suc), 0.5 mM KCN, 5 μ M octyl gallate (nOg), 1 μ M rotenone (Rot) and 3 μ M antimycin A (Ant). Dotted line indicates the tendency of trace.

the cytochrome pathway was not affected by TBHP, and AMP had a small activating effect on the oxygen consumption in the pres-

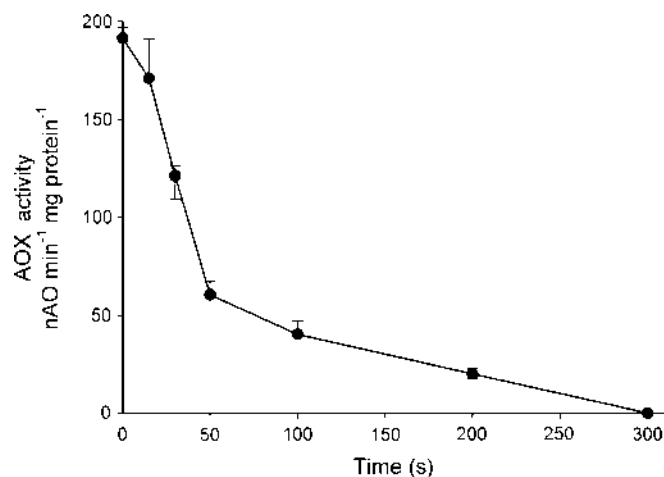


Fig. 5. Time dependent inactivation of AOX in isolated mitochondria upon addition of antimycin A. The experiments were carried out in the same conditions described for Fig. 2. Each time point represents the mean \pm S.E. for three independent mitochondrial preparations.

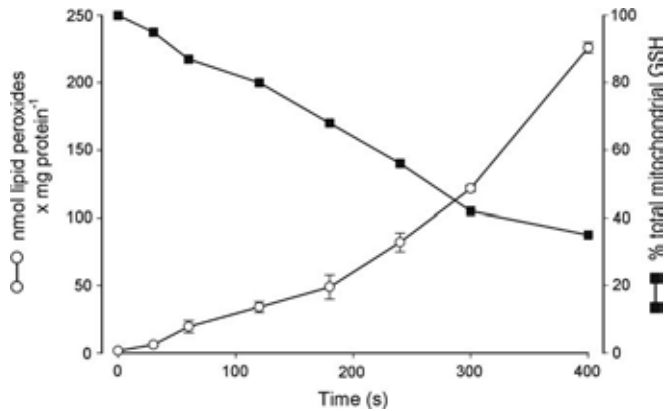


Fig. 6. Effect of antimycin A on lipid peroxides and total glutathione in isolated *U. maydis* mitochondria. Each point represents the mean of at least three mitochondrial preparations \pm SE. Data are plotted either directly (lipid peroxides) or as a percentage change in total glutathione level (where the highest value in control mitochondrial was set as 100%).

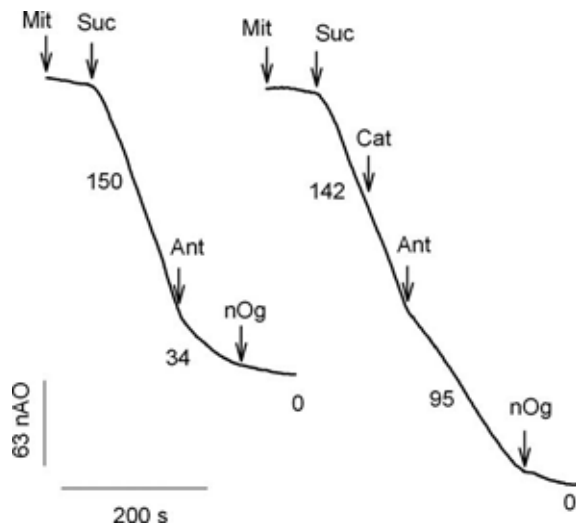


Fig. 7. Effect of antimycin A on AOX activity in mitochondria exposed to catalase. Where indicated, the following additions were made: 0.5 mg/ml mitochondrial protein, 7 mM succinate (Suc), 50 U catalase (CAT), 2 μ M antimycin A (Ant), 5 μ M *n*-octyl gallate (nOg). Numbers on traces refer to rates of oxygen uptake in nano atom-grams of oxygen per milligram protein per minute (nAO). Representative results are shown.

ence of TBHP. This respiration was fully inhibited by *n*-octyl gallate, indicating the participation of AOX (Fig. 8A). Furthermore, the addition of TBHP after activation of the AOX by AMP caused the time dependent inhibition of the enzyme activity (Fig. 8B).

4. Discussion

The integrity and functionality of *U. maydis* mitochondria in our preparation was assessed by the classical method of RCR determination and membrane potential measurements. After a careful consideration of the purification protocol and minor changes in the isolation media (presence of BSA), and decreasing the time of rupture of yeast cells with glass beads, it was possible to obtain mitochondria that generates a membrane potential upon the addition of substrates and that respond to ADP with respiratory controls between 1.5 and 2. Similar RCR values have been reported for other fungal (Affourtit et al., 2000; Lambowitz et al., 1989) and plant (Vanlerberghe et al., 1998; Hoefnagel et al., 1995) mitochondria.

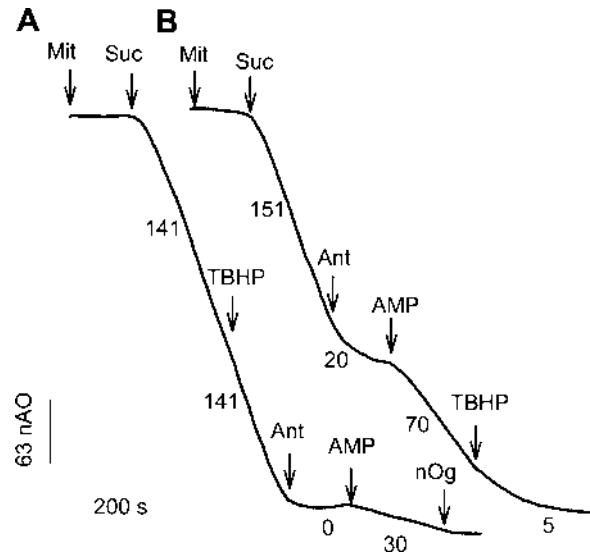


Fig. 8. Effect of TBHP on AOX activity in mitochondria exposed to catalase. Where indicated, the following additions were made: 0.5 mg/ml mitochondrial protein, 7 mM succinate (Suc), 10 μ M *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), 2 μ M antimycin A (Ant), 5 μ M *n*-octyl gallate (nOg). Numbers on traces refer to rates of oxygen uptake in nano atom-grams of oxygen per milligram protein per minute (nAO). Representative results are shown.

There have been many studies reporting the induction of AOX in response to a variety of stress conditions, including alteration of mitochondrial protein synthesis (Zhang et al., 1996), cytochrome pathway inhibition (Vanlerberghe and McIntosh, 1997) and superoxide anion exposure (Minagawa et al., 1992). A common consequence of these stress conditions is the elevation of intracellular ROS levels, which in turn may represent the signal behind the up-regulation of AOX gene expression. Therefore, to determine whether *U. maydis* AOX is induced during the defense response, yeast cells were grown in the presence of antimycin A, and mitochondrial protein was recovered for Western blot analysis. In contrast to our previous results in which the *U. maydis* AOX was associated with a 26–30 kDa band using antibodies raised against the *C. reinhardtii* AOX (Juárez et al., 2004, 2006), we now identified two protein bands with molecular masses of 42 and 27 kDa in the Western blot probed with a monoclonal antibody against *S. gutta-tum* AOX. Although proteolytic activity in mitochondria is the simplest explanation for the 27 kDa band, cross reactivity of this antibody with other proteins cannot be discarded. On the other hand, the molecular mass of 42 kDa obtained in the Western blot agrees with the predicted size of the protein (43.4 kDa) obtained from the *U. maydis* genome (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago_maydis/Home.html, accession number UM02774.1) after removal of the mitochondrial sequence signal (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>). When the cells were grown in media containing antimycin A, a significant increase in the amount of AOX protein was observed (2.5- to 3-fold) (Fig. 1), indicating that the expression of *U. maydis* AOX is also influenced by the stress conditions.

In agreement with previous reports on fungal enzymes (Umbach and Siedow, 2000; Medentsev et al., 2004; Joseph-Horne et al., 2000), the *U. maydis* AOX was activated by AMP. This stimulation was also observed in *U. maydis* permeabilized cell (Juárez et al., 2004). However, in our conditions pyruvate stimulated *U. maydis* AOX respiration (Fig. 2B and D). The simplest explanation for this effect is that in the presence of succinate, pyruvate increases the activity of the Krebs cycle and the concentration of ubiquinol (one of the substrates of AOX) in the inner mitochondrial membrane,

resulting in an apparent “activation” of AOX. Interestingly, the effect of AMP and pyruvate differs in some aspects in mitochondria from cells grown in the presence or absence of antimycin A. For example, addition of AMP activates AOX in control mitochondria, but there was no activation in mitochondria from cell grown in the presence of antimycin A. There was also a stronger stimulation of respiration by pyruvate in mitochondria isolated from cells grown in the presence of antimycin A (Fig. 2D).

The apparent activation constants for AMP (0.6 mM) and pyruvate (2.6 mM) for the *U. maydis* AOX seem to be high compared with the 0.1 mM reported for pyruvate in plant AOX (Millar et al., 1993) and 6–25 μ M for AMP in other fungal species (Medentsev et al., 2004; Vanderleyden et al., 1980). These values may be related with the function and regulation of the enzyme in vivo. In plant mitochondria, the activation of AOX is a two step process, the first one consisting in the reduction of the disulfide bond connecting the two regulatory Cys residues by thioredoxin, followed by the modification of one of the regulatory Cys residues by pyruvate. Since the intracellular concentration of pyruvate in plant cells is in the millimolar range (Farré et al., 2001), the low K_a for pyruvate ensures the rapid reaction between pyruvate and the Cys residue that results in the maximal activity of the enzyme. In contrast, it is more difficult to assign a regulatory function to AMP in fungi, since the low K_a for AMP suggests that this enzyme should be always in the active state at an intracellular concentration of AMP around 200 μ M (Raamsdomk et al., 2001). In the case of *U. maydis*, the values of K_a fall within the range of concentrations reported for pyruvate and AMP. It has been shown that the concentration of AMP in *S. cerevisiae* can vary from 100 to 700 μ M (Richard et al., 1996) while the concentration of pyruvate can reach values as high as 9 mM (Richard et al., 1996). So, it is possible to envisage situations in which the energetic state of the cell leads to the activation of AOX by both AMP and pyruvate, for example, when the cytochrome pathway is inhibited by nitric oxide, cyanide or antimycin A.

In *U. maydis* yeast cells, AOX protects mitochondria against oxidative stress, in agreement with the increase in H_2O_2 production when AOX is inhibited (Fig. 4). Because mitochondrial proteins have been shown to be inhibited by ROS or their by-products (Costa et al., 2003; Bandy and Davidson, 1990; Poyton and McEwen, 1996), a tight regulation of mitochondrial redox state appears to be necessary for the optimal mitochondrial function (Leary and Moyes, 2000; Nulton-Persson and Szwed, 2003). Furthermore, these changes in mitochondrial redox state might be related with the irreversible inactivation of AOX, probably through the decrease in GSH levels and the high rate of lipid peroxidation. This suggestion is supported by the correlation between the time dependent inactivation of AOX activity and the production of lipid peroxides in isolated mitochondria (Figs. 5 and 6). Similarly, a decline in both AOX activity and GSH level was found after antimycin A addition (Fig. 6). The addition of catalase and Nac before antimycin A prevented the loss of AOX activity in isolated mitochondria (Fig. 7), suggesting that H_2O_2 or some of its derivatives are involved in this process. Interestingly, once the AOX was inactivated by antimycin A, these antioxidants were not able to reactivate the enzyme, but stopped its further inactivation (data not shown). To clarify further this aspect, we studied the effect of *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) on *U. maydis* AOX activity. When the cytochrome pathway was inhibited by antimycin A, addition of TBHP strongly suppressed the oxygen consumption driven by the alternative pathway. In contrast, the cytochrome pathway was not affected by TBHP. These results are in agreement with previous reports on plant mitochondria (Winger et al., 2005, 2007). More recently, Jarmuzkiewicz et al. (2008) reported the inactivation of the *Acanthamoeba castellanii* AOX when mitochondria was treated with H_2O_2 in the presence of Fe^{2+} , an oxidative stress resulting from the Fenton

reaction; it is worth to speculate that this sensitivity was also due to lipid peroxidation.

In conclusion, whether stimulation of AOX by AMP and pyruvate occurs as a physiological regulatory process remains to be determined. Our results show a stronger stimulation by pyruvate under stress conditions. It can thus be envisioned that AOX activity increases allowing the effective utilization of pyruvate by the compromised *U. maydis* cells. Moreover, mitochondria are particularly susceptible to the action of ROS and lipid peroxidation, processes that mediate the loss of AOX activity in isolated mitochondria. The progression or reversibility of this process, as well as its relevance in terms of cell survival or death, requires further investigation.

Acknowledgments

The authors thank Dr. T. Elthon from University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, for the monoclonal antibody against *S. guttatum* AOX. We thank M.A. Valdez-Solana for excellent technical assistance. This work was supported by Grants from CONACyT (No. 59855) and DGAPA-UNAM (IN219107-3). Sierra-Campos, E., received a scholarship from CONACyT and complementary scholarship from DGEP, UNAM.

References

- Affourtit, C., Heaney, S.P., Moore, A.L., 2000. Mitochondrial electron transfer in the wheat pathogenic fungus *Septoria tritici*: on the role of alternative respiratory enzymes in fungicide resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 291–298.
- Affourtit, C., Krab, K., Moore, A.L., 2001. Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 58–69.
- Akerboom, T.P.M., Helmut, S., 1981. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Bandy, B., Davidson, A.J., 1990. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radical Biol. Med.* 8, 523–607.
- Black, M.J., Brandt, R.B., 1974. Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 58, 246–254.
- Costa, N.J., Dahm, C.C., Hurrell, F., Taylor, E.R., Murphy, M.P., 2003. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 291–305.
- Day, D.A., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., 1994. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol.* 106, 1421–1427.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89, 1311–1317.
- Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. *Methods Enzymol.* 10, 41–47.
- Farré, E.M., Tiessen, A., Roessner, U., Geigenberg, P., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2001. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol.* 127, 685–700.
- Helmerhorst, E.J., Murphy, M.P., Troxler, R.F., Oppenheim, F.G., 2002. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1556, 73–80.
- Hoefnagel, M.H.N., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1995. Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 394–400.
- Jarmuzkiewicz, W., Antos-Krzeminska, N., Drachal-Chrul, D., Matkovic, K., Nobik, W., Pienkowska, J., Swida, A., Woyda-Ploszczyca, A., Budzinska, M., 2008. Basic energetic parameters of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria and their resistance to oxidative stress.
- Jarmuzkiewicz, W., Wagner, A.M., Wagner, M.J., Hryniewiecka, L., 1997. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 411, 110–114.
- Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P.M., Hollomon, D., Sessions, R.B., 2000. New sequence data enable modeling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett.* 481, 141–146.
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F., Pardo, J.P., 2004. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 244–251.
- Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E., Pardo, J.P., 2006. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J.* 273, 4603–4615.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambowitz, A.M., Sabourin, J.R., Bertrand, H., Nickels, R., McIntosh, L., 1989. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1362–1364.

- Leary, S.C., Moyes, C.D., 2000. The effects of bioenergetic stress and redox balance on the expression of genes critical to mitochondrial function. In: Storey, K.B., Storey, J. (Eds.), *Cell and Molecular Responses to Stress*. Elsevier, Amsterdam, pp. 209–229.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8271–8276.
- Maxwell, D.P., Nickels, R., McIntosh, L., 2002. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.* 29, 269–279.
- Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Akimenko, V.K., 2004. Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates. *FEMS Yeast Res.* 5, 231–236.
- Michéa-Hamzehpour, M., Turian, G., 1987. GMP-stimulation of the cyanide-insensitive mitochondrial respiration in heat-shocked conidia of *Neurospora crassa*. *Experientia* 43, 439–440.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., Day, D.A., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 329, 259–262.
- Minagawa, N., Yoshimoto, A., 1987. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J. Biochem.* 101, 1141–1146.
- Minagawa, N., Koga, S., Nakano, M., Sakajo, S., Yoshimoto, A., 1992. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 302, 217–219.
- Moore, A.L., Siedow, J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of the plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1059, 121–140.
- Navet, R., Jarmuszkievicz, W., Douette, P., Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E., 2004. Mitochondrial respiratory chain complex patterns from *Acanthamoeba castellanii* and *Lycopersicon esculentum*: comparative analysis by BN-PAGE and evidence of protein–protein interaction between alternative oxidase and complex III. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 471–479.
- Nulton-Persson, A.M., Szweda, L.I., 2003. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276, 23357–23361.
- Popov, V.N., Simonian, R.A., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 415, 87–90.
- Poyton, R.O., McEwen, J.E., 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 563–607.
- Raamsdomk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H.V., van Dam, K., Oliver, 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* 19, 45–50.
- Richard, P., Teusink, B., Hemker, M.B., van Dam, K., Westerhoff, H.V., 1996. Sustained oscillations in free-energy state and hexose phosphate in yeast. *Yeast* 12, 731–740.
- Sakajo, S., Minagawa, N., Yoshimoto, A., 1997. Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A treated yeast *Hansenula anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 396–399.
- Siedow, J.N., Umbach, A.L., 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: Structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 432–439.
- Umbach, A.L., Wiskich, J.T., Siedow, J.N., 1994. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett.* 348, 181–184.
- Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2000. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 234–245.
- Vanderleyden, J., Van Den Eynde, E., Verachtert, H., 1980. Nature of the effect of Adenosine 5'-monophosphate on the cyanide-insensitive respiration in mitochondria of *Moniliella tomentosa*. *Biochem. J.* 186, 309–316.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703–734.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., Yip, J.Y.H., 1998. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* 10, 1551–1560.
- Wagner, A.M., 1995. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida*. *FEBS Lett.* 368, 339–342.
- Winger, A.M., Millar, A.H., Day, D.A., 2005. Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *Biochem. J.* 387, 865–870.
- Winger, A.M., Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., Millar, H., 2007. 4-Hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 37436–37447.
- Wood, P.M., Hollomon, D., 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q(o) site of complex III. *Pest Manag. Sci.* 59, 499–511.
- Zhang, Q., Mischis, L., Wiskich, J.T., 1996. Respiratory responses of pea and wheat seedlings to chloramphenicol treatment. *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 583–592.

Title

The relationship between the antioxidant system and the virulence in *Ustilago maydis*, a fungal pathogen.

Authors: Erick Sierra-Campos¹, and Juan Pablo Pardo^{1*}.

* Corresponding author. Tel.:01(55) 56232510; Fax: 01(55) 56162419

E-mail address: pardov@bq.unam.mx.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D. F., México.

Abbreviations: AOX, alternative oxidase; Trx, thioredoxin, Trr, thioredoxin reductase; Prx, thioredoxin peroxidase; GSNO, S-nitrosoglutathione; GSNO_r, GSNO reductase; Grx, glutaredoxin, Grr, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; Gpx, glutathione peroxidase; GST, glutathione S-transferase; PrxR, peroxiredoxin; Nar, nitrate reductase; Nir, nitrite reductase; Ccp, cytochrome c peroxidase; CAT-px, catalase-peroxidase; FeSOD and MnSOD, iron and manganese superoxide dismutase, respectively.

Abstract

Fungal cells deal with a wide variety of toxic environmental conditions during their life span. An important example of stress challenge to which fungi must cope is the high levels of ROS produced by the host during the oxidative burst. *Ustilago maydis* is an important model system for the plant pathogen smut and rust fungi. Genome wide analyses of this pathogen provide an insight into the cellular responses against reactive species in plant-microbe interactions. Little is known about the *U. maydis* antioxidant defense systems or whether constituents of these systems are essential for virulence. This review focuses on the search of sequences involved in oxidative stress response in the *U. maydis* genome. Finally, we compared different defense responses and how these contribute to the virulence of fungal pathogen.

Keywords: antioxidant system, fungal pathogen, virulence, reactive oxygen and nitrogen species.

Resumen

Los hongos durante su ciclo de vida continuamente se encuentran expuestos a condiciones ambientales tóxicas. Un importante ejemplo de estrés es cuando el hongo debe contrarrestar las altas concentraciones de ROS producidas por su hospedero durante el estallido oxidativo. El hongo *Ustilago maydis* es un sistema modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno, debido a que el análisis genómico provee un medio para conocer las respuestas celulares del hongo contra las especies reactivas producidas durante su interacción con la planta. Sin embargo, muy poco se conoce acerca de sus sistemas antioxidantes y su relevancia durante la virulencia. Esta revisión se enfoca en la búsqueda de secuencias en el genoma de *Ustilago maydis* involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. Finalmente, nosotros comparamos diferentes respuestas de defensa y como estas contribuyen a la virulencia de los hongos patógenos.

Introduction

Aerobic organisms are constantly exposed to reactive oxygen species (ROS) generated by normal cellular metabolism. The one-electron reduction of oxygen during respiration leads to the formation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), the main precursor of several ROS such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^{\cdot}), and singlet oxygen (1O_2). Reactions catalyzed by oxidases can also generate H_2O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1989). ROS, and OH^{\cdot} in particular, are highly reactive and cause rapid and deleterious oxidation of proteins, lipids and DNA (Vaughan, 1997). In addition, nitric oxide (NO^{\cdot}) can be oxidized into reactive nitrogen species (RNS), which may show a behavior similar to that of ROS. In particular, the combination of NO^{\cdot} and $O_2^{\cdot-}$ yields a strong biological oxidant, the peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$) (Murphy, 1998). Overproduction of reactive nitrogen species is called nitrosative stress. Both oxidative and nitrosative stresses are common features of a variety of environmental stresses (Jones, 2006), and result from imbalance between ROS and RNS production and detoxification by antioxidant systems, leading to disruption of redox signaling and damage of biomolecules. To protect cells against ROS and RNS, aerobic cells have evolved enzymatic and non-enzymatic mechanisms to overcome these species.

In eukaryotic organisms, the energy required for growth, development, reproduction, and response to external stresses, comes mainly from the hydrolysis of ATP, which is produced to large extent during mitochondrial respiration. A supply of energy is also extremely important for the pathogen's ability to produce disease inside

the host environment. However, pathogenic fungi are especially susceptible to oxidative damage. Because the production of ROS and RNS is increased during the stress imposed by host's defense system, pathogens are forced to respond with specific detoxifying enzymes to neutralize ROS (primary defense) and to repair or remove oxidized molecules (secondary defense). Thus, ROS detoxifying systems can be considered essential for the virulence of the fungi.

Cells contain multiple cytosolic ROS detoxifying enzymes, such as superoxide dismutases, catalases, cytochrome c peroxidases, glutathione peroxidases, glutaredoxins and peroxiredoxins (Collinson and Grant, 2003). In addition, some cellular compartments have mechanisms that protect the cell against the deleterious effects of ROS and RNS produced during the metabolism. It has been shown that filamentous fungi have supplementary mechanisms that decrease ROS production, such as the mitochondrial alternative oxidase. Moreover, SODs localized in the mitochondrial intermembrane space (CuZn SOD) and in the matrix (Mn SOD) form the first line of the antioxidant defense against O_2^- (Ito-kuma et al., 1999). It has not been fully elucidated how the resulting H_2O_2 is scavenged in mitochondria. Therefore, fungi evolved a dynamic network of antioxidant defense mechanisms that prevent the accumulation of ROS, detoxifies ROS, and repairs oxidized molecules. Knowing how pathogenic fungi deal with ROS and RNS is important to understand how infection is established and how fungi can survive within host.

Compared with other fungal pathogens of plants and animals, little is known about the oxidative stress response in *Ustilago maydis*. This organism is a ubiquitous pathogen of maize and a well-established model organism for the study of plant-microbe interactions (Martínez-Espinoza et al., 2002). This basidiomycete fungus does not use aggressive virulence strategies to kill its host. *U. maydis* belongs to the group of biotrophic parasites (the smuts) that depend on living tissue for proliferation and development (Mendgen and Hahn, 2002). Little is known about the genomic features responsible for the pathogenicity of this organism (Kämper et al., 2006; Liu et al., 2000), but it is tempting to speculate that detoxifying systems of ROS and RNS might be essential for the virulence of fungi. For this reason, the enzymes and metabolites involved in the control of these reactive species have been considered virulence factors in other pathogenic fungus. This review describes results of a bioinformatic search of the *U. maydis* defense mechanism in comparison with others fungal pathogen.

The Whitehead Institute/MITT Center for Genome Research (http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/index.html), the NCBI GenBank nr, and the ExpASY dbEST databases were screened for ORFs that have similarity to genes involved in antioxidant systems. For the initial identification of potential candidates, a BLAST search was made based on the enzymes that belong to the antioxidant systems of several pathogen fungi. The subcellular localization of the proteins was predicted using TargetP program (Emanuelsson et al., 2000). The comparative analysis of the available *U. maydis* genome sequence data led to the proposal of the presence of different enzymes involved in the antioxidant pathways.

ROS generation

Mitochondrial respiratory chain

Pathogenic fungi can produce ROS by different mechanisms. However, the principal sources of ROS are the respiratory chain and the NADPH oxidases. Mitochondrial electron transport consumes more than 90% of cellular oxygen and generates superoxide anions as minor by-products (Nohl, 1994). However, mitochondria are highly susceptible to oxidative damage. ROS in mitochondria can damage enzymes and cause mutation in DNA. Several enzymes contribute to the antioxidant defense in mitochondria by preventing the accumulation of endogenous ROS in the matrix and intermembrane space. For example, there is a superoxide dismutase (SOD2) in yeast, which rapidly converts the superoxide radical to H₂O₂ (Moradas-Ferreira et al., 1996). H₂O₂ will diffuse out of mitochondria, preventing its dangerous building up within the matrix and the damage of mitochondrial DNA or proteins containing iron sulfur centers. Because catalase is absent in mitochondria of most eukaryotic cells, glutathione peroxidase and cytochrome c peroxidase, located in the matrix and inter membrane space, respectively, detoxify H₂O₂ to water and oxygen (Skulachev, 1997). Recently, it was proposed that one of the important physiological functions of the alternative respiratory pathway is to keep the ubiquinone pool sufficiently oxidized to prevent the autoxidation of semiubiquinone and subsequent formation of ROS both in plants and fungi (Moore et al., 2002). A similar role in preventing the generation of ROS has been attributed to the uncoupling proteins in plants (Kono et al., 1995). Conversely, decreased mitochondrial activity under conditions of moderate oxidative stress limits further ROS release within the cell. This

limitation of endogenous ROS production could be part of the adaptive response to oxidative stress.

Oxidases

NADPH oxidases catalyze the reaction between NADPH and O₂ to generate O₂⁻ anions, followed by the production of H₂O₂ by dismutation (Torres et al., 2002). In plant animal and fungi, the NADPH oxidases are implicated in development processes (Aguirre et al., 2005). Unlike many other fungi, NADPH oxidases are absent in *U. maydis* (Aguirre et al., 2005).

Although much attention has been given to NADPH oxidases and their possible role in cell signaling (Aguirre et al., 2005), other oxidases have been proposed to generate ROS. Fungi usually contain a wide variety of sugar oxidases, including glucose oxidase, glyoxal oxidase and galactose oxidase.

Fungal extracellular glyoxal oxidases have so far been described only in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (Kerten and Kirk, 1987). There, glyoxal oxidase is an essential component of the lignin degradation pathway, and provides extracellular hydrogen peroxide as a co-substrate for the lignin peroxidase and Mn-dependent peroxidase (Janse et al., 1998). Two substrates for this enzyme, glyoxal and methylglyoxal are found in the extracellular environment of the fungus. The *U. maydis* genome contains three ORFs that share a high degree of similarity to glyoxal oxidases (see table 1). Some of these enzymes are secreted and other is potentially a mitochondrial protein. Interestingly, it was suggested that H₂O₂ produced by glyoxal oxidase 1 is required for filamentous growth and pathogenicity in *U. maydis* (Leuthner et al., 2005). Although the specific functions of glyoxal oxidase 2 and 3 have not been determined, it seems that these two enzymes are not involved in the pathogenicity development.

The copper enzyme galactose oxidase catalyzes the oxidation of D-galactose and other primary alcohols by molecular oxygen to the corresponding aldehydes and H₂O₂ (Berkessel et al., 2005). Galactose oxidase is a 68 KDa monomeric enzyme that contains a single copper and an amino acid derived cofactor. The enzyme is produced by the filamentous fungus as an extracellular enzyme. The *U. maydis* genome contains an ORF that encodes a putative galactose oxidase (Leuthner et al., 2005), with a signal peptide that directs the protein to the peripheral extracellular (see table 1).

Glucose oxidase, a fungal enzyme produced by *Aspergillus* and *Penicillium sp* (Bucke, 1983), is a glycoprotein that catalyzes the oxidation of β -D-glucose by molecular oxygen to δ -gluconolactone, a compound that subsequently hydrolyzes spontaneously to gluconic acid and H_2O_2 (Bentley, 1963). The expression of glucose oxidase in *B. cinerea* and *P. chrysosporium* was induced by low glucose concentrations in the culture medium (Kelly and Reddy, 1986; Liu et al., 1998). A search of the *U. maydis* genome sequence identified four glucose oxidase homologues (see table 1), three possessing a signal sequence for extracellular location and one more that is cytoplasmatic. All of them contribute to the production of H_2O_2 , suggesting their potential importance in fungal metabolism and the infection process (Mayer and Harel, 1979). Intracellular amine oxidase can also generate H_2O_2 , which can diffuse out of cell to complement extracellular H_2O_2 generation.

RNS generation

Nitric oxide ($NO\cdot$) is a free radical produced by biological activities like the bacterial denitrification in soils (Ji and Hollocher, 1988). The main source of the free radical $NO\cdot$ in mammalian cells is the enzymatic oxidation of L-arginine by NO synthases (NOS). Interestingly, NOS are also present in insects, mollusks, bacteria, parasites, and fungi (Muller, 1997; Klesing et al., 2000; Adak et al., 2002; Golderer et al., 2001).

In addition to the route involving the NOS-like enzyme, it has been shown that the production of $NO\cdot$ in plants, fungi, and bacteria occurs as a side-reaction during NO_3^- assimilation via the NADPH dependent reduction of nitrite (NO_2^-) by nitrate reductase (NaR). During NO_3^- assimilation, NaR catalyzes the NADPH dependent reduction of NO_3^- to NO_2^- which is further reduced to ammonium by the enzyme nitrite reductase (NiR) (Takaya, 2002).

The biological consequences of NO formation in cellular systems are governed by a complex and, as yet, not completely elucidated network of competing reactions of the free radical NO with molecular O_2 , ROS, transition metals and thiols (Stamler et al., 2001). Such reactions yield various reactive nitrogen species (RNS), including nitrosyl-metal complexes, S-nitrosothiols, trioxide of dinitrogen (N_2O_3) and peroxyxynitrite ($ONOO\cdot$). Like ROS, RNS may damage and kill cells by mechanisms that include inactivation of respiratory chain (Brown, 1999) and metabolic enzymes (Beltran

et al., 2000), and irreversible oxidative modification and degradation of DNA (Burney et al., 1999), proteins (Tien et al., 1999), and membrane lipids (Goss et al., 1999). Despite the many processes controlled and/or induced by NO in fungi, the molecular mechanisms responsible for the synthesis of this radical remain controversial. Nevertheless, a gene with homology to mammalian NOS enzyme was not found in *U. maydis*, but some genes involved in the formation of NO by dissimilatory nitrate reduction are present in the genome of this fungi (see table 2). Homologues of NaR and NiR were identified, suggesting their possible involvement in NO production. Both proteins are cytosolic and their presence in this organism supports their participation in the process of ammonification. In support of this physiologic role, *U. maydis* possess a nitrate transporter in the plasma membrane and can grow with nitrate as the sole nitrogen source. Addition, we identified the presence of NiR by mass spectroscopy in isolated mitochondria of yeast like *U. maydis* cells, which suggest that possibly this enzyme generate NO or RNS under our experimental conditions (unpublished results).

Antioxidant enzymatic defenses

Major ROS scavenging enzymes of fungi include superoxide dismutases (SOD), glutathione peroxidases (Gpx), thioredoxin peroxidases (Tpx), catalases (CAT), glutathione S-transferases (GST), thiol peroxidases, flavohemoglobin and peroxiredoxins (PrxP). Together with the antioxidants glutathione and thioredoxin, these enzymes provide the cells with highly efficient machinery for detoxifying ROS and RNS.

Alternative oxidase

The alternative oxidase (AOX) is a respiratory chain protein found in all higher plants, fungi, non-fermentative yeasts and trypanosomes (Affourtit et al., 2002). AOX is believed to have two roles, a metabolic one and as antioxidant, and both functions are potentially important for fungal pathogenesis (Joseph-Horne et al., 2001). Significantly, NO is a potent reversible inhibitor of cytochrome c oxidase but not of AOX (Yamasaki et al., 2001). In addition, the maintenance of mitochondrial electron flow as well as the rapid consumption of oxygen by AOX at the inner mitochondrial membrane attenuates

the production of ROS due to mitochondrial electron leak from ubisemiquinone directly to oxygen. *Candida albicans* produces one constitutive AOX and another isoform inducible by cyanide, antimycin A, hydrogen peroxide, paraquat, and hydrogen peroxide (Huh and Kang, 2001). In *C. albicans*, the MnSOD is involved in the expression of AOX (Hwang et al., 2003). A critical test of the role of AOX in fungal pathogenesis was accomplished in the study of *aox1* null mutant of *Cryptococcus neoformans*, which displays increased sensitivity to peroxide stress and decreased virulence in mice (Akhter et al., 2003).

The *U. maydis* genome contains an AOX gene encoding a ~45 kDa protein (see table 3). We have characterized the AOX and found that in contrast with other pathogen fungi, the AOX activity and expression did not change with different stress conditions, suggesting that AOX is regulated at the post-translational level by AMP and pyruvate (Sierra-Campos, et al., paper submitted for publication).

Superoxide dismutases

Superoxide dismutase (SOD) plays a major role in the first line of antioxidant defense by catalyzing the dismutation of $O_2^{\cdot -}$ radicals, to form H_2O_2 and O_2 ; H_2O_2 is subsequently removed by catalase, catalase-peroxidase and GSH or Trx dependent peroxidase. Another function of SOD is to protect dehydratases (dihydroxy acid dehydratase, aconitase, 6-phosphogluconate dehydratase and fumarase) against inactivation by the $O_2^{\cdot -}$ (Benov and Fridovich, 1998). SODs are metallo-proteins classified as iron (Fe-SOD), manganese (Mn-SOD), nickel (Ni-SOD), and copper and zinc (CuZn-SOD) based on the metals in their active sites (Halliwell and Gutteridge, 1989). Of the four SODs, Fe and Mn SODs belong to one family, whereas CuZn-SOD exhibits no sequence similarity with the Fe and Mn SODs (Gralla and Kosman, 1992). There are at least three forms of SOD in eukaryotes: a cytosolic Cu,Zn-SOD, a mitochondrial Mn-SOD, and an extracellular CuZn-SOD (Halliwell and Gutteridge, 1989). With regard to fungi, different types of SOD have been found in various pathogens of plants and animals, including *Botrytis cinerea* (Choi et al., 1997; Ito-kuma et al., 1999). They have a Mn-SOD in the mitochondrial matrix and a CuZn-SOD that it

is thought to reside in cytosol. Recently, CuZn-SOD has also been found in the mitochondrial intermembrane space of some fungi (Neveda et al., 2004), and a cytoplasmatic Fe-SOD (Kono et al., 1995). While the contribution of CuZn-SOD to the virulence of pathogenic fungi has been extensively studied, the role of Mn-SOD is poorly understood (Hamilton and Holdom, 1999). In *C. neoformans* and *C. albicans*, Mn-SOD was involved in oxidative and high temperature stresses, two conditions encountered by pathogenic fungi in the mammalian host (Narasipura et al., 2005). A Fe-SOD is specifically expressed during chlamyospore formation in *Fusarium oxysporum* (Kono et al., 1995). *U. maydis* possess three genes corresponding to distinct SOD isoenzymes. Of these, two are Mn-SOD and the other is a Fe-SOD (see table 4). It is worth to mention that *U. maydis* possesses a Fe-SOD and a Mn-SOD in its mitochondria, and a cytosolic Mn-SOD. The presence of two different mitochondrial SODs might be important in this fungus containing a highly active respiratory chain, which unavoidably leaks O_2^- . Notably this fungus does not have a CuZn-SOD, possibly implying that under its developmental stages, the generation of endogenous H_2O_2 by different oxidases could inactivate this isoform, while that Fe or the Mn-SOD are not inhibited by H_2O_2 . Interestingly, we identified the presence of Fe-SOD by mass spectroscopy in isolated mitochondria of yeast like *U. maydis* cells.

Catalases and peroxidases

Although catalase is a ubiquitous enzyme found in aerobic organisms, it is not an essential enzyme for decomposition of intracellular H_2O_2 to oxygen and water. Three general classes of catalases have been described in the literature: the typical or monofunctional catalases (Schomburg et al., 1994); the catalase-peroxidase with both activities; and the Mn-catalases or pseudocatalases (Kono and Fridovich, 1965). Catalase is important in fungal pathogenicity and for the development of several human and plant pathogens, including *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Blumeria graminis* during host colonization (Wysong et al., 1998; Paris et al., 2003; Xu and Pan, 2000). However, in other phytopathogenic fungi like *Botrytis cinerea* (Schouten et al., 2002), *Cochliobolus heterostrophus* (Robbertse et al., 2003), and *Claviceps purpurea* (Garre et al., 1998), knock out mutants of the catalase have similar virulence as the wild-type strains. Unlike many other pathogenic fungi, *U. maydis* lacks the typical catalase, but possesses the catalase-peroxidase -potentially located in the cytoplasm-, a key enzyme

in many crucial cellular functions, including the disposition of H₂O₂ during sexual development of *Aspergillus nidulans* (Scherer et al., 2002). Another attractive possibility for a role of catalase-peroxidase during development comes from the observation that in *Neurospora crassa* a hyperoxidant state was detected at the start of different morphogenic transitions (Toledo et al., 1995).

Cytochrome c peroxidase (Ccp) is an antioxidant enzyme localized in the mitochondrial intermembrane space, protecting aerobic organisms from the toxic effects of H₂O₂ (Yonetani and Ohnishi, 1996). Ccp detoxifies H₂O₂ by catalyzing its reduction to water using the reducing equivalents from two molecules of ferrocytochrome c. The presence of Ccp in pathogens that lack catalase indicates that this enzyme is the major H₂O₂ detoxificant in mitochondrion. Studies on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* show that the expression of cytochrome c peroxidase gene increases when cells are under nitrosative stress. Therefore, this enzyme probably participates in the detoxification of peroxynitrite as well as H₂O₂ (Kwon et al., 2003). Loss of Ccp function increases the sensitivity of *C. neoformans* to exogenous oxidative stress, but does not diminish the virulence of fungi (Giles et al., 2005). *U. maydis* possesses two distinct genes of Ccp (see table 5), which belong to subfamily II, based on the overall sequence similarity (Zámocky and Dunand, 2006), and are potentially located both in cytoplasm and mitochondria. It can still be assumed that mitochondrial H₂O₂ is detoxified by Ccp in this fungus, while that H₂O₂ produced by other sources is detoxified by cytoplasmatic catalase-peroxidase. Addition, mitochondrial integrity has been show to be important for pathogenicity (Bortfeld et al., 2004).

Glutathione system

Sulfhydryl groups of glutathione (GSH) and thioredoxin (Trx) are important components of the cellular defense mechanisms against oxidative stress and for the maintenance of the redox homeostasis in cells (Grant, 2001).

The tripeptide GSH is a non-proteinous thiol compound abundant in almost all aerobic organisms. It is synthesized in two sequential reactions catalysed by γ -glutamylcysteine synthetase (the GSH1 gene product) and glutathione synthase (GSH2 gene product) in the presence of ATP. The intracellular concentration of glutathione varies within the range 5-10 mM, depending on the cell type and cellular compartment. There are two major GSH pools in cells, the cytoplasmic and the mitochondrial pool;

the later is important in detoxification of H_2O_2 produced by the electron transport chain. Mitochondrial GSH is considered vital for cell survival, because mitochondria in some eukaryotes do not contain catalase, implying that GSH in the mitochondrial matrix is the principal non-enzymatic defense against the potential toxic effects of H_2O_2 on the respiratory chain. GSH has many physiological functions in cells (Meister and Anderson, 1983). GSH acts as a radical scavenger with the redox active sulfhydryl group reacting with oxidants to produce glutathione disulphide (GSSG). Besides this, GSH can serve as an electron donor for a variety of proteins, including Gpx, GSTs and glutaredoxins. The Gpx, a member of the GSH system, reduces H_2O_2 in the presence of two molecules of GSH, forming one molecule of GSSG and water. The GSSG is reduced back to GSH by glutathione reductase, using NADPH as electron donor. The resulting $NADP^+$ is regenerated to NADPH through the reactions catalyzed by the enzymes glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway.

We identified the group of genes involved in the biosynthesis and recycling of glutathione within the *U. maydis* genome (Table 6). In addition, this organism contains various cytoplasmatic GSTs and a GST with a signal peptide for mitochondrial localization, a cytoplasmatic Gpx, and a cytoplasmatic GSH dependent formaldehyde dehydrogenase (GSNO reductase). Interestingly, the high number of GSTs possibly reflects that *U. maydis* is in contact with a large number of mutagens and by-products of oxidative stress. Although the GSH system has not been completely studied in any fungal pathogen to date, the GSH peroxidases have been linked to both virulence and viability of the fungal pathogen *C. neoformans* (Misall et al., 2005). In addition, the GSNO reductase is critical for S-nitrosothiols homeostasis and protects against nitrosative stress (Liu et al., 2001).

Thioredoxin system

U. maydis possesses several proteins belonging to the thioredoxin system, including two cytoplasmatic thioredoxins Trx, a potential mitochondrial thioredoxin reductase Trr and cytoplasmatic thiol Tpx (see table 7), suggesting that this organism possess both a cytosolic and mitochondrial thioredoxin cycle.

Trx are key proteins in many cellular functions, including oxidative stress management (Grant, 2001). Trr is an important component of the thioredoxin oxidative

stress resistance pathway (Missall and Lodge, 2005). In addition to this role, the thioredoxin system of bacteria, yeast, and mammals is involved in DNA synthesis, gene transcription, cell growth, and apoptosis (Arner and Holmgren, 2000). Two different isoforms of Trr have been identified in prokaryotes and eukaryotes, the high molecular weight isoform, which is present in mammals and some parasites, and the low molecular weight isoform, found in most bacteria, plants and fungi (Hirt et al., 2002). The Trr is induced during oxidative and nitrosative stresses and it is necessary for viability in *C. neoformans* (Missall and Lodge, 2005).

Peroxiredoxins are a ubiquitous group of peroxidases that exert their reductive activity via active-site cysteine residues. These enzymes lack prosthetic groups and catalyze the reduction of H_2O_2 , $ONOO^-$, and a wide range of organic hydroperoxides (ROOH) to their corresponding alcohols (Wood et al., 2003). They exist in all organisms and are highly abundant in cells, and proved to be important for resistance to H_2O_2 and for virulence in *C. neoformans* (Missall et al., 2004).

It has been suggested that the thioredoxin and glutathione systems are maintained independently (Trotter and Grant, 2003), though compensation between these two systems has been observed under stress conditions (Inoue et al., 1999).

Defenses against RNS

Considerable evidence indicates that NO^\cdot and its derivatives, such as $ONOO^-$, are important reactive species in signal transduction and defense in animal and plants (Wendehenne et al., 2001). To evade the host oxidative attack, some microorganisms express flavohemoglobin denitrosylase, which converts NO^\cdot to nitrate via a bound nitroxyl (NO^-) intermediate across a broad range of physiological oxygen concentrations. The enzyme is present in many fungi and bacterial species, but it is not found in higher eukaryotes (Liu et al., 2000). However, it might be conserved in plant and mammalian fungal pathogens (de Jesus-berrios et al., 2003). In addition, flavohemoglobin denitrosylase is necessary for NO^\cdot resistance in promoting infection.

In contrast, GSNO reductase is more widespread, conserved from bacteria to humans, and it has been shown to reduce nitrosoglutathione (GSNO) to ammonia and GSSG (Liu et al., 2001). The thiol peroxidase, Tsa1, which is important for both oxidative and nitrosative stress resistance (Missall et al., 2004), contributes significantly to virulence in *C. neoformans*. At least in many fungi, the resistance against the toxic

effects of NO \cdot may be related to the activation of nitrosothiol metabolizing enzymes (Liu et al., 2001). In addition, NO reductase, which catalyzes the reduction of NO to the less toxic compound nitrous oxide (N $_2$ O), plays a major role in protecting organisms from NO (Zumft, 1997).

We did not identify genes encoding flavohemoglobin denitrosylase and NO reductase in the *U. maydis* genome. However, like in other fungi, GSH peroxidase, GSNO reductase and thiol peroxidase are present in *U. maydis* (see Table 6). These enzymes have been shown to be induced in response to nitrosylate stress (Missall et al., 2004).

NADPH production pathway

The cellular pools of the antioxidants Trx and GSH are maintained in their reduced state by a set of enzymes that use NADPH to reduce GSSG or oxidized Trx (e.g. glutathione reductase and thioredoxin reductase; table 5 and 6, respectively). Glucose 6 phosphate dehydrogenase is regarded as the major source of cellular NADPH because it reduces cellular oxidative stress by increasing the GSH concentration (Salvemini et al., 1999). A search of *U. maydis* genome sequence identified two genes, which have high similarity to glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of animal pathogens *C. neoformans* and *A. nidulans*, respectively (see Table 8).

Antioxidant metabolites

In addition to antioxidant enzymes, other factors related to ROS detoxification are important for fungal pathogen virulence. The most common of these antioxidant compounds include melanin, trehalose, mannitol and other metabolites synthesized by fungi in response to different stresses (Aguirre et al., 2006).

Trehalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) plays different biological roles, from energy source to protection against stress, and this sugar is found in organisms as diverse as bacteria, fungi, plants, and invertebrates, but it is absent in mammals (Argüelles, 2000). In yeast and filamentous fungi trehalose is stored in the cytosol, primarily as a reserve carbohydrate, but also to protect against different stress factors (Jamieson, 1998; Fillinger et al., 2001). This disaccharide appears to increase

resistance to heat, dehydration and desiccation, among other stresses, primarily by preventing the denaturation of proteins (Hottinger, 1987). Recent studies on the pathobiology of *C. neoformans* identified the presence of a functional trehalose pathway during infection, pointing to its importance for *C. neoformans* survival in the host (Petzold et al., 2006). ORFs with high similarity to all genes involved in the trehalose synthesis from UDP-glucose and glucose 6-phosphate are present in *U. maydis* (see table 9). In addition, we found the gene coding for trehalase, the enzyme that hydrolyzes trehalose (see table 9). Trehalose hydrolysis is important, perhaps essential, in the life of various organisms, such as during fungal spore germination and the resumption of growth in resting cells (Nwaka and Holzer, 1998).

Melanins are dark brown or black pigments of high molecular weight formed by oxidative polymerization of phenolic compounds. Melanins in the fungal cell-walls are derived from L-tyrosine, γ -glutaminy-3,4-dihydroxybenzene (GDHB), or catechol in the case of Basidiomycota, and from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), in the case of Ascomycota (Bell and Wheeler, 1986). This biosynthetic process occurs by the action of laccases and tyrosinases.

Tyrosinases from mammals, invertebrates, plants, and microorganisms are involved in several biological functions and have considerable heterogeneity (Van Gelder et al., 1997). In fungi, tyrosinases are mainly associated with browning and pigmentation (Soler-Rivas et al., 1999).

Laccases are multicopper enzymes that catalyze the oxidation of phenolic compounds; these enzymes are found in both plants and fungi (Thurston, 1994). In fungi, besides playing a role in delignification, laccases are involved in sporulation, pigment production and plant pathogenesis (Marbach et al., 1985).

Melanins constitute a mechanism of defense and resistance to stress such as UV radiations, free radicals and extreme temperatures, and contribute to the fungal cell-wall resistance against hydrolytic enzymes, avoiding cellular lysis. Fungal pigments are also involved in the formation and stability of spores (Mayer and Harel, 1979), in the defense and virulence mechanisms (Joseph-Horne et al., 2001). Wang and Casadevall (Wang and Casadevall, 1994) studied protection by melanin against ROS and RNS in *C. neoformans*. Melanized cells survived approximately 10-fold better compared to non-melanized cells, and the system was proposed as a model for the role of melanin in virulence and protection of the pathogen against immunologically generated free radicals. In addition, the laccases have been shown to be compensatory, their activity is

only necessary for resistance without the other stress-related enzymes. For example, only in the absence of thiol peroxidase is the laccase 2 induced in response to nitrosative stress, and therefore important for resistance (Missall et al., 2005a).

Desentis-Mendoza, et al. (2006) described the presence of laccase and tyrosinase in *U. maydis*. However, a BLAST search using different plant and fungi sequences of polyphenol oxidases identified only two laccase genes in the *U. maydis* genome (see table 10). A satisfactory explanation might be that tyrosinase activity is a contaminant from plant cells, because the enzymes were purified from galls developed in infected corn plants. *U. maydis* produces two forms of laccase, an intracellular isoform (cytoplasmatic or mitochondrial), and a second one containing a signal sequence for extracellular delivery.

Iron homeostasis in *U. maydis*

Iron is an essential element for almost all living organisms, due to its primary function in many important enzymes mediating one-electron redox reactions (Andrew et al., 2003). However, when present in the free form, they can catalyze hydroxyl radical formation by the Fenton reaction (Halliwell and Gutteridge, 1989). Iron is abundant, but its bioavailability is limited in an aerobic environment because it is mostly present as ferric hydroxides, which have low solubility (Oberegger et al., 2001). When considering pathogen microorganisms, the acquisition of iron is recognized as a fundamental step in the infection process, because this essential nutrient is tightly sequestered by high affinity iron-binding proteins and therefore not readily available in the hosts. Successful pathogens obtain iron by extracting out from heme groups, capturing extracellular iron with secreted siderophores, or utilizing high-affinity systems for iron reduction and transport (Weinberg, 1999). Numerous pathogenic fungi, including *A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *C. albicans*, *U. maydis*, produce siderophores (Hass, 2003; Heymann et al., 2002, Hissen et al., 2004; Budde and Leong, 1989). In addition, *U. maydis* is the only plant pathogenic fungus in which a ferrooxidation/permeation iron uptake system is required for virulence (Eichhorn et al., 2006). Interestingly, *U. maydis* is similar to the human pathogen *C. albicans*, in which two high-affinity iron permeases are present, but only one is essential for pathogenicity in a mouse model for systemic infection (Ramanan and Wang, 2000). In the human

pathogen *A. fumigatus*, the biosynthesis of siderophores is also essential for virulence, whereas the reductive iron assimilation system is not needed (Schrettl et al., 2004).

With this information at hand, we propose here a hypothetical model that integrates our data regarding the involvement of ROS and RNS production and detoxification systems of *U. maydis* (Fig. 1). We show that *U. maydis* antioxidant defense is multifaceted, but limited. Hence, although this organism contains some well studied proteins present in other pathogenic fungi, along with some unique mechanisms and novel physiological roles to combat oxidative stress, *U. maydis* is in a relative disadvantage, lacking a great number of isoforms of these enzymes. The antioxidant systems described above will be relevant for the pathogenic fungi to handle ROS and RNS in a regulated fashion.

Final conclusion

The flexibility and multiplicity of the antioxidant defense mechanisms are particularly important for pathogenic microorganisms living freely in the environment or in association with a host expressing the defense responses, based on the production of reactive oxygen and nitrogen species. The *U. maydis* antioxidant system is multifaceted, but limited, lacking many isoforms found in other organisms. Although we hypothesized that the antioxidant system might contribute to the virulence of this fungus during plant-pathogen interaction, it is known that this biotrophic pathogen causes very little damage to its host until the final phases of infection. However, recently, Molina & Kahmann, 2007; identified and characterized an ortholog of *YAP1* (for Yeast *AP-1* like) from *Saccharomyces cerevisiae* that regulates the oxidative stress response in this organism. Thus, exposure of *U. maydis* cells to H₂O₂ leads to the accumulation of Yap1p in the nucleus and altered transcription of two peroxidase genes (*um01947* and *um10672*), which are considered likely to be involved ROS detoxification. Interestingly, single mutations in either gene showed reduced virulence, comparable to the Yap1 deletion strain. Therefore, further work is required to better understand the RSN and ROS defenses of this fungus.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the CONACyT (59855) and DGAPA-UNAM (IN219107-3). We are grateful to Dr. W. Hansberg (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) and Dr. J. Pedraza-Chaverri (Facultad de Química, UNAM) for helpful comments and suggestions in the preparation of the manuscript. We wish to thank Dr. Isabel Velazquez for their help with critical reading of the manuscript.

References

Adak, S., A. M. Bilwes, K. Panda, D. Hosfield, K. S. Aulak, J. F. mcDonaLD, T. A. Tainer, E. D. Getzoff, B. R Crane & D. J. Stuehr. 2002. A conserved flavin-shielding residue regulates NO synthase electron transfer and nicotinamide coenzyme specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 107-112.

Affourtit, C., M. S. Albury , P. G. Crichton & A. L. Moore. 2002. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* 510: 121-126.

Aguirre, J., M. Ríos-Momberg, D. Hewitt & W. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS Microbiol.* 13: 111-118.

Aguirre, J., W. Hansberg & R. Navarro. 2006. Fungal responses to reactive oxygen species. *Med. Mycol.* 44: 5101-5107.

Akhter, S., H. C. McDade, J. M. Gorch, G. Heinrich, G. M. Cox & J. R. Perfect. 2003. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 71: 5794-5802.

Andrew, S. C., A. K. Robinson & F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 215-237.

Arner, E. S. & A. Holmgren. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6102-6109.

Argüelles, J. C. 2000. Physiological roles of trehalose and yeast: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174: 217-224.

Bell, A. A & M. H. Wheeler. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.

Beltran, B., A. Orsi, E. Clementi & S. Moncada. 2000. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br. J. Pharmacol.* 129: 953-960.

Benov, L. & I. Fridovich. 1998. Growth in iron-enriched medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe SOD. *J. Biol. Chem.* 273: 10313-10316.

Bentley, R. 1963. Glucose oxidase. In: *The enzymes*, 2nd ed., Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K., Eds.; Academic Press: New York, chapter 24, pp 567-586.

Berkessel, A., M. Dousset, S. Bulat & K. Glaubitz. 2005. Combinatorial approaches to functional models for galactose oxidase. *Biol. Chem.* 386: 1035-1041.

Bortfeld, M., K. Auffarth, R. Kahmann & C. W. Basse. 2004. The *Ustilago maydis* $a2$ mating-type locus genes *Iga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein *Mrb1*. *Plant Cell* 16: 2233-2248.

Brown, G. C. 1999. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 351-369.

Bucke, C.L. 1983. Glucose transforming enzymes. In: Fogarty WN (ed) *Microbial enzymes and biotechnology*. Appl. Sci. Publishers, London, pp 111-123.

Budde, A. D. & S. A. Leong. 1989. Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* 108: 125-133.

Burney, S., J. L. Caulfield, J. C. Niles, J. S. Wishnok & S.R. Tannenbaum. 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat, Res.* 424: 37-49.

Collinson, E. J. & C. M. Grant. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 278: 22492-22497.

Choi, G. J., H. J. Lee & K. Y. Cho. 1997. Involvement of catalase and superoxide dismutase in resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicide vinclozolin. *Pesticide Biochem. Physiol.* 59: 1-10.

de Jesus-Berrios, M., L. Liu, J. C. Nussbaum, G. M. Cox, J. S. Stamler & J. Heitman. 2003. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr. Biol.* 13: 1963-1968.

Desentis-Mendoza, R. M., H. Hernández-Sánchez, A. Moreno, E. Rojas del C, Chel- L. Guerrero, J. Tamariz & M. E. Jaramillo-Flores. 2006. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* 7: 1845-1854.

Eichhorn, H., F. Lessing, B. Winterberg, J. Schirawski, J. Kämper, P. Müller & R. Kahmann. 2006. A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 3332-3345.

Emanuelsson, O., H. Henrik Nielsen, S. Brunak & G. von Heijne. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their n-terminal amino acid sequence. *J. mol. Biol.* 300: 1005-1016.

Fillinger, S., M. K. Chaverroche, P. Dijck, R. Vries, G. Ruijter, J. Thevelein & C. d'Enfert. 2001. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 147: 1851-1862.

Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

Garre, V., U. Müller & P. Tudzynski. 1998. Cloning, characterization and target disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 772-783.

Giles, S. S., J. R. Perfect & G. M. Cox. 2005. Cytochrome c peroxidase contribute to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet. Biol. 42: 20-29.

Gralla, E.B. & D.J. Kosman. 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeast and related fungi. Adv. Genet. 30: 251-310.

Grant, C. M. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. Mol. Microbiol. 39: 533-541.

Golderer, G., E. R. Werner, S. Leitner, P. Grobner & G. Werner-Felmayer. 2001. Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. Gen. Dev. 15: 1299-1309.

Goss, S. P., R. J. Singh, N. Hogg & B. kalyanaraman. 1999. Reactions of NO, NO₂ and peroxynitrite in membranes: physiological implications. Free Radic. Res. 31: 597-606.

Haas, H. 2003. Molecular genetics of fungal siderophores biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 316-330.

Halliwell, B. & J. M. C. Gutteridge. 1989. In free Radicals in Biology and Medicine (Halliwell, B and Gutteridge, JMC, eds), 2 nd edn. Clarendon Press, Oxford.

Hamilton, A. J. & M. D. Holdom. 1999. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. Med. Mycol. 37: 375-389.

Heymann, P., M. Gerads, M. Schaller, F. Dromer, G. Winkelmann & J. F. Ernst. 2002. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediated uptake of ferrichrome-type siderophores and required for epithelial invasion. Infect. Immun. 70: 5246-5255.

Hirt, R. P., S. Miller, T. M. Embley & G. H. Coombs. 2002. The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. Trends Parasitol. 18: 302-308.

Hissen, A. H., J. M. Chow, L. J. Pinto & M. M. Moore. 2004. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect. Immun.* 72: 1402-1408.

Hottinger, T., T. Boller & A. Wiemken. 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* 220: 113-115.

Huh W-K. & S-O Kang. 2001. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 356: 595-604.

Hwang, C-S., Y-U. Baek, H-S. Yim & S-O Kang. 2003. Protective role of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20: 929-941.

Inoue, Y. & A. Kimura. 1995. Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 177-227.

Inoue, Y., T. Matsuda, K. Sugiyama, S. Izawa & A. Kimura. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274: 27002-27009.

Ito-kuwa, S., K. Nakamura, S. Aoki, T. Osafune, V. Vidotto & K. Pienthaweechai. 1999. Oxidative stress sensitivity and superoxide dismutase of a wild-type parent strain and a respiratory mutant of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 37: 307-314.

Jacobson, E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 708-717.

Jamieson, D. J. 1998. Oxidative stress response of the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 1511-1527.

Janse, B. J. H., J. Gaskell, M. Akhtar & D. Cullen. 1998. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3536-3538.

Ji, X. B. & T. C. Hollocher. 1988. Reduction of nitrite to nitric oxide by enteric bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 106-108.

Jones, D. P. 2006. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 163: 38-53

Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon & P. M. Wood. 2001. Fungal respiration : A fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504 : 179-195.

Kämper, J., R. Kahmann, M. Bölker, L. Ma, T. Brefort, B. J. Saville, et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101.

Kelly, R. L. & C. A. Reddy. 1986. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phaenerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 166: 269-274.

Kersten, P. J. & T. K. Kirk. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular hydrogen peroxide production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.

Klesing, D. F., J. Durner, R. Noad, D. A. Navarre, D. Wendehenne, D. Kumar, J. M. Zhou, J. Shah, S. Zhang & P. Kachroo. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8849-8855.

Kono, Y. & I. Fridovich. 1965. Isolation and characterization of the cyanide-resistant and azide-resistant catalase of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 90: 352-356.

Kono, Y., H. Yamamoto, M. Takeuchi & H. Komada. 1995. Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1268:35-40.

Kowaltowski, A. J., A. D. T. Costa & A. E. Vercesi. 1998. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.* 425: 213-216.

Kwon, M., S. Chong, S. Han & K. Kim. 2003. Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1623: 1-5.

Leuthner, B., C. Aichinger, E. Oehmen, E. Koopmann, O. Müller, P. Müller, R. Kahmann, M. Bölker & P. H. Schreier. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* 272: 639-650.

Liu, L., M. Zeng, A. Hausladen, J. Heitman & J. S. Stamler. 2000. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4672-4676.

Liu, L., A. Hausladen, M. Zeng, L. Que, J. Heitman & J.S. Stamler. 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490-494.

Liu, S., S. Oeljeklaus, B. Gerhardt & B. Tudzynski. 1998. Purification and characterization of glucose oxidase of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53: 123-132.

Marbach, I., E. Harel & A. M. Mayer. 1985. Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 24: 2559-2561.

Martínez-Espinoza, A., M. D. García-Pedrajas & S. Gold. (2002). The ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35: 1-20.

Mayer, A. M. & E. Harel. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.* 31: 193-215.

Mayer, A.M., R.C. Staples & N. L. Gil-ad. 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58: 33-41.

Meister, A. & M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.

Mendgen, K. & M. Hahn. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends plant Sci.* 7: 352-356.

Misall, T. A. & J. K. Lodge. 2005. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 4: 487-489.

Missall, T. A., J. F. Cherry-Harris & J. K. Logde. 2005. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology* 151: 2573-2581.

Missall, T. A., M. E. Pusateri & J. K. Lodge. 2004. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 51: 1447-1458.

Missall, T. A., J. M. Moran, J. A. Corbett & J. K. Lodge. 2005a. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant, Tsa1. *Eukaryotic Cell* 4: 202-208.

Molina L. & R. Kahmann. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19: 2293-2309.

Moradas-Ferreira, P., V. Costa, P. Piper & W. Mager. 1996. The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.* 19: 651-658.

Moore, A. L., M. S. Albury, P. G. Crichton & C. Affourtit. 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *TRENDS in plant Sci.* 7: 478-481.

Muller, U. 1997. The nitric oxide system in insects. *Prog. Neurobiol.* 51: 363-381.

Murphy, M.P. 1998. Peroxynitrite: A biologically significant oxidant. *Gen. Pharmac.* 31: 179-186.

Narasipura, S. D., V. Chaturvedi & S. Chaturvedi. 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol. Microbiol.* 55: 1782-1800.

Nedeva, T. S., V. Y. Petrova, D. R. Zamfirova, E. V. Stephanova & A. V. Kujumdzieva. 2004. Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria –a general phenomenon. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 19-25.

Nohl, H. 1994. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann. Biol. Clin.* 52: 199-204.

Nugent, K. G., K. Choffe & B. J. Saville. 2004. Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genetics and Biology* 41: 349-360.

Nwaka, S. & H. Holzer. 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58: 197-237.

Oberegger, H., M. Schoeser, I. Zadra, B. Abt & H. Haas. 2001. SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 41: 1077-1089.

Paris, S., D. Wyszog, J. P. Debeauvais, et al. 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 71: 3551-3562.

Petzold, E. W., U. Himmelreich, E. Mylonakis, T. Rude, D. Toffaletti, G. M. Cox, J. L. Miller & J. R. Perfect. 2006. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 74: 5877-5887.

Ramanan, N. & Y. Wang. 2000. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288: 1062-1064.

Robbertse, B., O. C. Yoder, A. Nguyen, C. L. Schoch & G. B. Turgeon. 2003. Deletion of all *Cochliobolus heterostrophus* monofunctional catalase encoding genes reveals a role for one in sensitivity to oxidative stress but none with a role in virulence. *Mol. Plant-Microbe interact.* 16: 1013-1021.

Sandalova, T., L. Zhong, Y. Lindquist, A. Holmgren & G. Schneider. 2001. Three dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9533-9538.

Salvemini, F., A. Franze, A. Iervolino, S. Filosa, S. Salzano & M. V. Ursini, 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose 6 phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.* 274: 2750-2757.

Scherer, M., H. Wei, R. Liese & R. Fischer. 2002. *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryotic Cell* 1: 725-735.

Schomburg, D., M. Salzmann & D. Stephan. 1994. In *Enzyme Handbook*. Vol. 7. Eds.: Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.

Schouten, H., K. B. Tenberge, J. Vermeer, J. Stewart, L. Wagemakers, B. Williamson & J. A. L. Van kan. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3: 227-238.

Schrettl, M., E. Bignell, C. Kragl, C. Joechl, T. Rogers, H. N. Arst, K. Haynes & H. Haas. 2004. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* 200: 1213-1219.

Skulachev, V. P. 1997. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci. Rep.* 17: 347-366.

Soler-Rivas, C., S. Jolivet, N. Arpin, J. M. Oliver & H. J. Wihers. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiol. Rev. 23: 591-614.

Stamler, J. S., S. Lamas & F. C. Fang. 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. Cell 106: 675-683.

Takaya, N. 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. J. Biosci. Bioeng. 94: 506-510.

Tien, M., B. S. Berlett, R. L. Levine, P. B. Chock & E. R. Stadtman. 1999. Peroxynitrite mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7809-7814.

Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26.

Toledo, I. P., P. Rangel & W. Hansberg. 1995. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch. Biochem. Biophys. 319: 519-524.

Torres, M. A., J. L. Dangl & J. D. Jones. 2002. Arabidopsis gp91 phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 517-522.

Trotter, E. & C. M. Grant 2003. Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. EMBO Rep. 4: 184-188.

Toyoda, K., N. C. Collins, A. Takahashi & K. Shirasu. 2002. Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. Rev. Trans. Res. 11: 567-582.

Van Gelder, C. W. G., W.H. Flurkey, and H. J. Wichers. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochem.* 45: 1309-1323.

Vaughan, M. 1997. Oxidative modification of macromolecules. *J. Biol. Chem.* 272: 18513

Wang, Y. & A. Casadevall. 1994. Susceptibility of melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen derived oxidants. *Infect. Immun.* 62: 3004-3007.

Weinberg, E. D. 1999. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 231-238.

Wendehenne D, A. Pugin, D.F. Klessig & J. Durner. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 177-183.

Wood, Z. A., E. Schroder, J. Robin-Harris & L. B. Poole. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 32-40.

Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins & R. D. Diamond. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* 66: 1953-1961.

Xu, X. Q. & S. Q. Pan. 2000. An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Mol. Microbiol.* 35: 407-414.

Yamasaki, H., h. Shimoji, Y. Ohshiro & Y. Sakihama. 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5: 261-270.

Yonetani, T. & T. Ohnishi. 1996. CcP, a mitochondrial enzyme of yeast. *J. Biol. Chem.* 271: 2983-2984.

Zámocky, M. & C. Dunand. 2006. Divergent evolutionary lines of fungal cytochrome c peroxidases belonging to the superfamily of bacterial, fungal and plant heme peroxidases. *FEBS Lett.* 580: 6655-6664.

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Res.* 61: 533-616.

Table 1. Genes involved in ROS production in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequencess	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM00913.1	Glyoxal oxidase	625aa/with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_571566/1e ⁻¹⁴²	<i>Secreted</i> <i>0.837</i> <i>Extracellular</i>
UM01149.1	Glyoxal oxidase	652aa/ with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_567162/1e ⁻¹³⁴	<i>Secreted</i> <i>0.744</i> <i>Endoplasmic reticulum</i>
UM02411.1	Glyoxal oxidase	862aa/ with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_571566/1e ⁻¹⁰⁷	<i>Nuclear</i> <i>0.62</i>
UM02809.1	Galactose oxidase	630aa/ with no introns	<i>Hypomyces rosellus</i> /A38084/1e ⁻⁹⁹	<i>Secreted</i> <i>0.953</i> <i>Extracellular</i>
UM03551.1	Glucose oxidase	634aa/ with no introns	<i>Botryotinia fuckeliana</i> /CAD88590.1/3e ⁻⁸²	<i>Secreted</i> <i>0.976</i> <i>Extracellular</i>
UM04957.1	Glucose oxidase	603aa/1 intron	<i>Coccidiodes immitis</i> /XP_001239189/ 1e ⁻⁹⁴	<i>Secreted</i> <i>0.934</i> <i>Extracellular</i>
UM03615.1	Glucose oxidase	693aa/ with no introns	<i>Botryotinia fuckeliana</i> CAD88590.1/7e ⁻⁷²	<i>Secreted</i> <i>0.836</i> <i>Extracellular</i>
UM01711.1	Glucose oxidase	612aa/ with no introns	<i>Coccidiodes immitis</i> /XP_001239189/ 2e ⁻⁹⁵	<i>Cytosolic</i> <i>0.940</i>
UM05423.1	Amine oxidase	536 aa/ with no introns	<i>Crassostrea gigas</i> /CAD89351/2e ⁻⁶⁴	<i>Cytosolic</i> <i>0.699</i>

Extracellular, including cell wall.

Table 2. Genes involved in RNS production in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM03849.1	Nitrate transporter	607 aa/1 introns	<i>Hebeloma cylindrosporum</i> /CAB60009/5e ⁻¹⁰³	<i>Secreted</i> <i>0.961</i> <i>Plasma</i> <i>membrane</i>
UM03848.1	Nitrite reductase	602 aa/ with no introns	<i>Hebeloma cylindrosporum</i> /CAB60008.2/0.0	<i>Cytosolic</i> <i>0.751</i>
UM03847.1	Nitrate reductase (NADPH)	907 aa/ with no introns	<i>Hebeloma cylindrosporum</i> /CAB60009/0.0	<i>Cytosolic</i> <i>0.862</i>

Table 3. Alternative oxidase homolog in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM02774.1	Alternative oxidase	448aa/ with no introns	<i>Yarrowia lipolytica</i> /AAQ08896/4e ⁻⁵⁸	<i>Mitochondrion</i> <i>0.9740</i>

Table 4. Superoxide dismutase homologs in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM03085.1	Mn SOD	206 aa/ 1 intron	<i>Taiwanofungus camphoratus</i> /AAQ16628/5e ⁻⁷¹	<i>Cytosolic</i> 0.946
UM02453.1	Mn SOD	227 aa/ with no introns	<i>Cryptococcus bacillisporus</i> /AAQ98967/3e ⁻⁷⁴	<i>Mitochondrion</i> 0.936
UM06417.1	Fe SOD	305 aa/ with no introns	<i>Neosartorya tischeri</i> /XP_001257839/5e ⁻¹⁶	<i>Mitochondrion</i> 0.944

Table 5. Peroxidases homologs in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM03399.1	Catalase- peroxidase	702 aa/ 2 introns	<i>Aspergillus fumigatus</i> /XP_747039/ 0.0	<i>Cytosolic</i> 0.781
UM01947.1	Cytochrome c peroxidase	330 aa/ with no introns	<i>Aspergillus terreus</i> /XP_001212584 /9e ⁻¹²⁴	<i>Cytosolic</i> 0.756
UM02377.1	Cytochrome c peroxidase	398 aa/ with no introns	<i>Emericella nidulans</i> /POCOV3/1e ⁻¹⁰⁹	<i>Mitochondrion</i> 0.931

Table 6. Genes involved in glutathione system in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM04004.1	Glutamate- cysteine ligase	705 aa / with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_568556/0.0	<i>Cytosolic</i> 0.836
UM05504.1	GSH synthase	542 aa / with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_567465.1/9e ⁻¹⁰⁷	<i>Cytosolic</i> 0.864
UM04948.1	GSH reductase	102aa / 1 intron	<i>Aspergillus niger</i> /CAk43281/2e ⁻¹⁷	<i>Cytosolic</i> 0.832
UM05435.1	Glutaredoxin	345 aa / with no introns	<i>Candida albicans</i> /XP_721347/ 8e ⁻¹¹	<i>Cytosolic</i> 0.651
UM03211.1	Thiol- peroxidase	721aa / with no introns	<i>Chlorobium chlorochromatii</i> /YP_379900/8e ⁻²⁰	<i>Cytosolic</i> 0.473
UM04801.1	GSH S- transferase	233 aa/2 introns	<i>Neosartorya fischeri</i> /XP_001267449/6e ⁻⁴⁷	<i>Cytosolic</i> 0.603
UM06325.1	GSH S- transferase	384 aa/3 introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_572592/5e ⁻⁴²	<i>Mitochondrion</i> 0.683
UM02241.1	GSH S- transferase	293 aa/2 introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_572592/7e ⁻⁴⁷	<i>Cytosolic</i> 0.872
UM01784.1	GSH peroxidase2	161 aa/2 introns	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /NP_009803/e ⁻⁵¹	<i>Cytosolic</i> 0.892
UM06244.1	GSH dependent	313 aa/2	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Cytosolic</i>

	formaldehyde dehydrogenase	introns	/XP_001246427/3e ⁻¹²²	0.909
UM02387.1	GSH oligopeptide transporter	985 aa/ with no intron	<i>Candida albicans</i> /AAT95227/9e ⁻¹⁴⁶	Mitochondrion 0.627
UM01140.1	GSH disulfide reductase	1220 aa/1 introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_570771/6e ⁻¹⁴⁵	Cytosolic 0.429

Table 7. Genes involved in thioredoxin system in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM02947.1	Thioredoxin reductase	253 aa/ 1 intron	<i>Malassezia furfur</i> /P56577/3e ⁻⁵¹	Mitochondrion 0.825
UM03177.1	Thioredoxin peroxidase	172 aa/ with no introns	<i>Candida albicans</i> /XP_715909/2e ⁻²⁶	Cytosolic 0.92
UM06512.1	Thioredoxin	160 aa/2 introns	<i>Malassezia sympodialis</i> /CAI78451/ 7e ⁻³⁵	Cytosolic 0.954
UM01370.1	Thioredoxin	178 aa/1 intron	<i>Xenopus tropicalis</i> /CAJ81685 /5e ⁻¹⁹	Cytosolic 0.894

Table 8. Genes involved in NADPH regeneration in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequences	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM04930.1	Glucose-6- phosphate dehydrogenase	502 aa/ 2 introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_572045/0.0	<i>Cytosolic</i> 0.79
UM02577.1	6- phosphogluconate dehydrogenase	492 aa/ 3 introns	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_661558.1/0.0	<i>Cytosolic</i> 0.56

Table 9. Genes involved in trehalose synthesis in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequencess	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM00429.1	α,α - Treholase phosphate synthase	614 aa/0 introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_572507/0.0	<i>Cytosolic</i> 0.77
UM03245.1	Trehalose phosphatase	1286 aa/1 intron	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_569183/0.0	<i>Mitochondrion</i> 0.808
UM02390.1	Trehalose phosphatase	1347 aa/ with no introns	<i>Ustilago hordei</i> /CAJ41935/ 0.0	<i>Nuclear</i> 0.445
UM01461.1	Trehalase	869 aa/1 intron	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_568867/0.0	<i>Cytosolic</i> 0.761

Table 10. Genes involved in melanin synthesis in *U. maydis*

<i>U. maydis</i> Accession number	Hypothetical protein	Number of aa and introns in sequencess	Organism/accession number/e-value	Predicting subcellular localisation
UM05861.1	Laccase 2	710 aa/ with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /AAV64894/6e ⁻¹⁰⁴	<i>Secreted</i> <i>0.840</i> <i>Extracellular</i>
UM05802.1	Laccase	695 aa/ with no introns	<i>Cryptococcus neoformans</i> /XP_571804/1e ⁻⁶⁶	<i>Mitochondrion</i> <i>0.494</i>

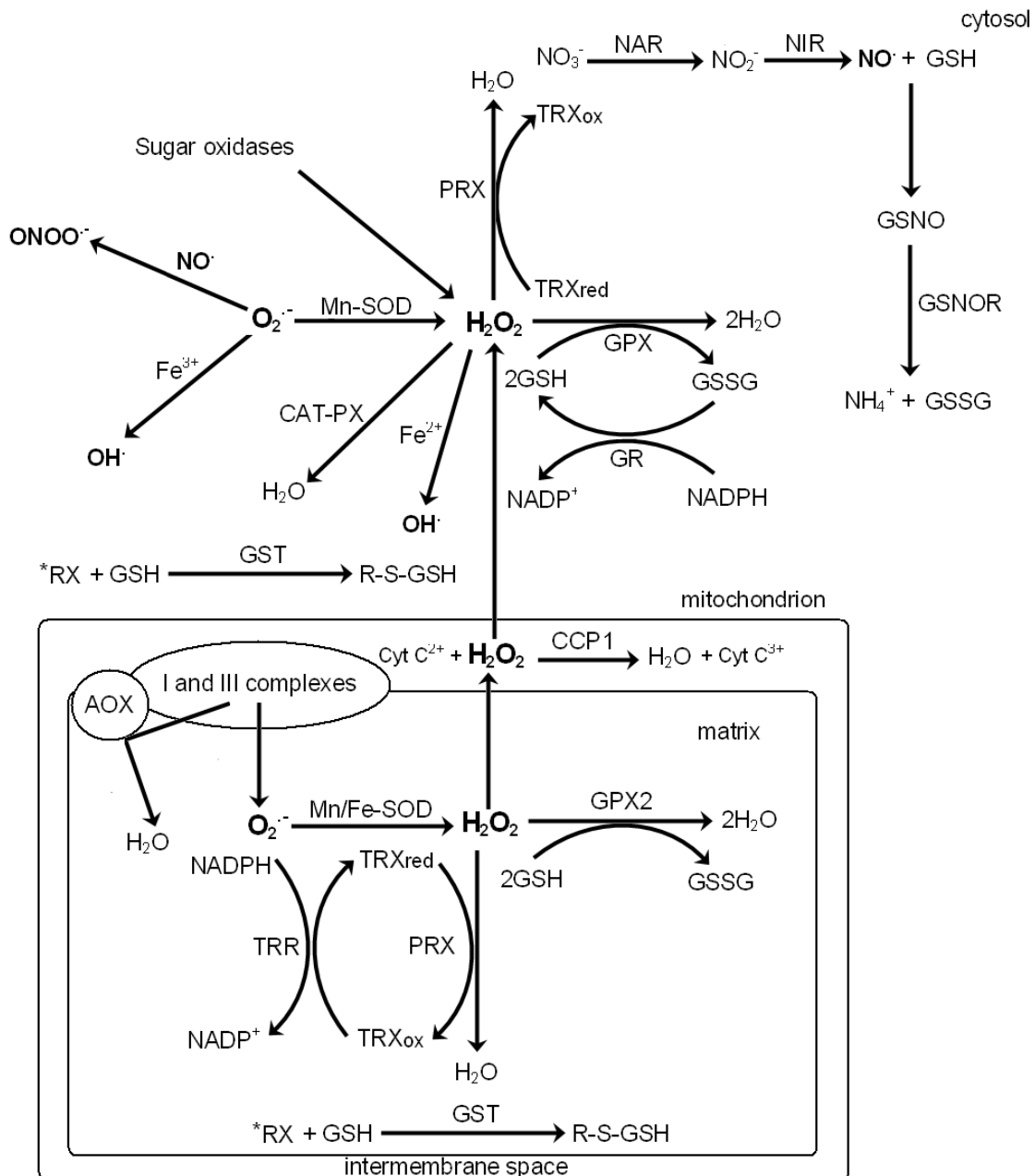


Fig. 1. Hypothetical model for the ROS and RNS detoxification systems in *U. maydis*. Sugar oxidases and mitochondrial respiratory complexes are the sources of ROS, while the enzymes of dissimilatory nitrate reduction are potential sources of NO in *U. maydis*. In addition, hydroxyl radicals are generated in the presence of free iron via the Fenton reaction. *R may be an aliphatic, aromatic or heterocyclic group; X may be a sulfate, nitrite or halide group. Cyt c, cytochrome c; NH_4^+ , ammonium cation. ROS and RNS shown include the following: $\text{O}_2^{\cdot -}$, superoxide anion; $\text{OH} \cdot$, hydroxyl radical; H_2O_2 , hydrogen peroxide; $\text{NO} \cdot$, nitric oxide; ONOO^- , peroxynitrite. See abbreviations to details.