



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión y función de la oxidasa alterna (Aox1) de *Ustilago maydis*, ante la inhibición de la vía citocrómica

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Christian Adrián Cárdenas Monroy

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alicia González Manjarrez
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Diego González Halphen
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México, octubre del 2017



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.

RECONOCIMIENTOS

- A mi Tutor principal, el Dr. Juan Pablo Pardo V. por abrirme las puertas de su laboratorio y ser guía constante en mi formación, por sus enseñanzas académicas o no y por su apoyo brindado de forma incondicional.
- A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Alicia González M. y el Dr. Diego González H. por sus comentarios, críticas, aportaciones y la confianza que me hicieron sentir durante mis tutorales y mi doctorado.
- To Professor Dr. Michael Feldbrügge and his entire team for receiving me in their lab. I specially thank Dr. Thomas Pohlmann for his academic and technical help, hospitality and friendship during my academic stay in Düsseldorf, Germany.
- A los miembros de mi jurado de examen de grado, por sus comentarios y valiosas críticas que hicieron de este trabajo un mejor escrito.
- A la Dra. Gabriela Piñón, a la Dra. Katia Jarquin, a la Dra. Ute Gengenbacher, a la M. en C. Deyamira Matuz, a la Biol. Sofía Sánchez y al M. en C. Héctor Vázquez, por el apoyo técnico que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.
- A mi Alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por dejarme ser parte de ella en el Posgrado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Medicina.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para la realización de una estancia académica durante mis estudios de doctorado en la Universidad Düsseldorf en la Ciudad de Düsseldorf, Alemania.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme una Beca Nacional y Mixta (218133), durante mis estudios de Doctorado.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN209614) de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-254904), por los recursos financieros otorgados para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

- A Gaby, mi esposa amada, por darme esas alas que creí haber perdido en más de una ocasión, por acompañarnos y permitirme estar juntos de la mano y hombro con hombro en este trayecto de vida y los subsecuentes.
- A mis papás, por su gran apoyo en todo este camino, por construir los cimientos de mis pilares y por darme ese voto de confianza.
- A mis hermanos, por depositar toda su confianza en mi y por todas esas palabras y hechos de aliento para seguir adelante.
- A toda mi familia por su apoyo moral y físico en todo momento.
- A Faviola Tavares, Cesar González, Marcela Rojas, Alejandra Aguirre, Daniel Flores y a todos mis grandes amigos porque aun en la distancia, siempre están presentes.
- A mis compañeros de laboratorio, Minerva Araiza, Melissa Carrada, Genaro Matus, Deyamira Matuz y Héctor Vázquez por permitirme aprender de ustedes tantas cosas y por hacer más amena la estancia en el laboratorio durante las horas de trabajo.
- A Dios, por otorgarme la paciencia y un poco de entendimiento para cumplir este objetivo más de vida.

DEDICATORIAS

- A Gaby, te amo con toda mi alma.
- A mis papás, este trabajo escrito es el resultado final.
- A mis hermanos, trabájenle duro, sigan adelante, nunca desistan.
- A mis sobrinas, nunca dejen de soñar, pero sobre todo, de construir realidades.
- A toda mi familia.

Nunca temas volar en la oscuridad de la noche,
si lo consigues, más adelante encontraras
la inmensa luz de la Bóveda Celeste.

CHAC

PMDCB/709/2017

Cárdenas Monroy Christian Adrián
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

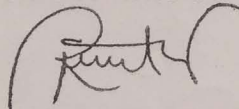
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Expresión y función de la oxidasa alterna (Aox1) de Ustilago maydis, ante la inhibición de la vía citocrómica**", dirigida por el/la Dr(a) **Pardo Vázquez Juan Pablo**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Peña Díaz Antonio Calvin
VOCAL	Ramírez Silva Leticia Haydee
VOCAL	Pérez Martínez Xochitl
VOCAL	Uribe Carvajal Salvador
SECRETARIO	González Pedrajo Bertha María Josefina

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2017.
COORDINADOR



Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Expresión y función de la oxidasa alterna (Aox1) de *Ustilago maydis*, ante la inhibición de la vía citocrómica

Índice general

	Página
Abreviaturas	05
Resumen	06
Abstract	08
Introducción	
- La oxidasa alterna. ¿Qué es, qué reacción cataliza y cómo se regula?	10
- ¿En qué organismos se puede encontrar y cuál es el interés por la oxidasa alterna?	13
- La AOX: su estructura, sitio activo e inhibición	14
- Evolución	16
- Funcionamiento	18
- Biología molecular con la oxidasa alterna	19
- <i>Ustilago maydis</i> , ¿un cáncer para el maíz?	21
Planteamiento del problema	24
Objetivos	
- Objetivo general	25
- Objetivos específicos	25
Material y Métodos	
- Reactivos y equipo	26
- Cepas y cultivos celulares	26
- Construcción de plásmidos	27
- Consumo de oxígeno	28
- Obtención de mitocondrias	28

-	Determinación de la concentración de proteína	29
-	Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunodetección de la Aox1	29
-	Purificación del RNA total, síntesis del cDNA y nivel de expresión del RNAm del <i>aox1</i> por qRT-PCR	29
-	Microscopía y citometría de flujo	30
-	Ensayo de desecación	31
Resultados		
-	La actividad de la oxidasa alterna es mayor en la fase estacionaria	32
-	Expresión de la Aox1 en <i>U. maydis</i>	36
-	La Aox1 se regula a nivel de la transcripción	42
-	La Aox1 no es indispensable para el crecimiento levaduriforme de <i>U. maydis</i> , ni como mecanismo de defensa ante diversos tipos de estrés	47
-	Análisis de desecación	49
-	La Aox1 y su papel en la defensa contra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	50
-	Crecimiento filamentoso e infeccioso de <i>U. maydis</i>	51
-	La Aox1 es determinante para hacer frente a la inhibición de la vía citocrómica en <i>U. maydis</i>	53
Discusión		
-	La Aox1 se encuentra en fase estacionaria de crecimiento	58
-	Nivel en el que se regula la expresión de la Aox1	60
-	En busca de un papel funcional de la Aox1 en <i>U. maydis</i>	60
-	El papel de la Aox1 en el crecimiento del esporidio y el filamento de <i>U. maydis</i> cuando la cadena citocrómica está inhibida	61
Conclusiones		63
Perspectivas		64
Anexos		
-	Anexo I	65
-	Anexo II	68
Bibliografía		75
Artículos publicados		85

Índice de figuras y tablas.

Figura	Página
Figura 1: Reacción catalizada por la AOX	11
Figura 2: Mecanismo de reacción propuesto para el ciclo redox de la AOX	12
Figura 3: Imagen cristalográfica del homodímero de la AOX de <i>T. brucei</i>	16
Figura 4: Árbol filogenético entre distintas AOX en diversos reinos de la naturaleza	18
Figura 5: Ciclo celular de <i>U. maydis</i>	21
Figura 6: Cadena transportadora de electrones en <i>U. maydis</i>	22
Figura 7: Curvas de crecimiento de <i>U. maydis</i> en distintas fuentes de carbono	33
Figura 8: Consumo de oxígeno de células cosechadas en fase exponencial (10 h) y fase estacionaria (24 h)	34
Figura 9: Capacidad respiratoria de la Aox1	35
Figura 10: Western blot de la Aox1 de <i>U. maydis</i>	37
Figura 11: Abundancia relativa del RNAm de la Aox1 de <i>U. maydis</i> por qRT-PCR	38
Figura 12: Esquema de las construcciones de las cepas de este trabajo	39
Figura 13: Localización de la Aox1-Gfp en <i>U. maydis</i>	40
Figura 14: Curva de crecimiento de <i>U. maydis</i> en distintas fuentes de carbono	41
Figura 15: Crecimiento celular de FB2aox1-Gfp	42
Figura 16: Microscopía de fluorescencia en células de fase exponencial y estacionaria de crecimiento	43
Figura 17: Curso temporal de células que expresan la Aox1-Gfp, cultivadas en YPD ..	44
Figura 18: Análisis de fluorescencia bajo la influencia de un promotor constitutivamente activo	45
Figura 19: Validación de las mutantes mediante oximetría	46
Figura 20: Porcentaje de respiración por la vía citocrómica de <i>U. maydis</i>	47
Figura 21: Gemación celular del esporidio de las mutantes de <i>U. maydis</i>	48
Figura 22: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del esporidio de <i>U. maydis</i> .	49
Figura 23: Efecto de la desecación en <i>U. maydis</i>	50
Figura 24: Efecto del estrés oxidativo en <i>U. maydis</i>	51
Figura 25: Crecimiento filamentoso de la cepa AB33 de <i>U. maydis</i>	52
Figura 26: Infección de la planta utilizando los pares celulares FB1 x FB2, y FB1aox1Δ x FB2aox1Δ	53

Figura 27: Radio de inhibición por la presencia de antimicina A	54
Figura 28: Unidades formadoras de colonias (cfu), en ausencia o presencia de antimicina A	55
Figura 29: Aumento en la expresión de la Aox1-Gfp por la presencia de antimicina A .	56
Figura 30: Crecimiento del filamento de <i>U. maydis</i> en ausencia o presencia de antimicina A	57
Tabla 1: Condiciones de cultivo empleadas para <i>U. maydis</i>	27
Tabla 2: Actividad respiratoria de <i>U. maydis</i> en diferentes medios de cultivo y cosechadas en la fase exponencial y en la fase estacionaria	36

Abreviaturas

AOX:	Oxidasa alterna
Aox1:	Oxidasa alterna de <i>Ustilago maydis</i> .
CFU:	Unidades formadoras de colonias.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
MOPS:	Ácido 3-[N-morfolino] propanolsulfónico.
nOG:	n-octilgalato
PMSF:	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno.
SHAM:	Ácido salicilhidroxámico
TAO:	Oxidasa alterna de <i>Trypanosoma brucei</i> .

Resumen

La oxidasa alterna (AOX) es una proteína monotópica que se encuentra en las mitocondrias de plantas, algunos metazoarios (Annelida, Sipuncula, Mollusca, Arthropoda), hongos y protistas. Los primeros modelos estructurales de la AOX sugirieron la presencia de dos regiones hidrofóbicas y dos motivos de unión a hierro, involucrados en la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH₂) hasta el oxígeno, el cual se reduce para formar agua. En 2013 se resolvió la estructura cristalográfica de la AOX de *Trypanosoma brucei* (TAO), y se confirmó la estructura propuesta en los modelos.

El papel que juega esta enzima en el metabolismo celular es de gran importancia, debido a que mantiene la actividad respiratoria de la mitocondria y el funcionamiento del ciclo de Krebs en presencia de inhibidores de la vía citocrómica, como el óxido nítrico o el cianuro, ambos inhibidores del complejo IV, o la antimicina A, inhibidor del complejo III. La AOX se inhibe por galatos como el n-propilgalato (nPG) o el n-octilgalato (nOG) y el ácido salicilhidroxámico (SHAM). Con base en su carácter monotópico, esta enzima no genera un gradiente electroquímico de protones y, aunque no se involucra directamente en la síntesis de ATP y en la conservación de la energía, sí favorece en ciertas condiciones el funcionamiento del metabolismo celular.

Hasta ahora, el papel de la AOX en muchos organismos es incierta, pero al menos se conocen tres funciones generales propuestas para esta proteína. Primero, evita la inhibición del ciclo de Krebs cuando la vía citocrómica de la mitocondria está bloqueada, permitiendo el funcionamiento de las reacciones anapleróticas que alimentan a las vías biosintéticas. Segundo, se ha descrito un efecto termogénico de la AOX en algunas plantas, y finalmente, la actividad de la AOX es un mecanismo celular de gran importancia para la defensa contra diferentes tipos de estrés, entre ellos el oxidativo. En las plantas y los hongos se ha reportado la regulación de la expresión de la AOX por especies reactivas de oxígeno. En protozoarios como *T. brucei*, es posible agregar una cuarta función de la AOX, ya que es importante para el desarrollo de este organismo, debido a que la cantidad de citocromos en las mitocondrias, cuando los parásitos se encuentran en el torrente sanguíneo del hospedero, es insuficiente. Aquí, la actividad de la TAO es esencial para la supervivencia del parásito, por lo que se ha propuesto que esta enzima puede servir como blanco de agentes terapéuticos.

En este trabajo se estudió el papel biológico de la Aox1 del basidiomiceto *Ustilago maydis*, que produce el llamado “carbón” en el maíz. Se definieron las fases de

crecimiento del esporidio cultivando en distintas fuentes de carbono y la importancia de esta enzima en el crecimiento del hongo en medios de cultivo artificiales y ante la inducción de determinados tipos de estrés, como el oxidativo, el cambio de temperatura y pH del medio de cultivo, así como la regulación de la expresión mediante la generación de diversas mutantes, que permitieron concluir que esta proteína se regula principalmente a nivel de la transcripción al entrar las células en la fase estacionaria del crecimiento. Los hallazgos en este trabajo indican que en *U. maydis*, la Aox1 no tiene un papel determinante en la infección de la planta y que su principal función es la de mantener activo el metabolismo del hongo, tanto en la forma de levadura como en la de micelio, cuando la cadena transportadora de electrones está comprometida por algún inhibidor de la vía citocrómica.

Abstract

Alternative oxidase (AOX) is a monotopic protein associated to mitochondria from plants, some metazoa (Annelida, Sipuncula, Mollusca, Arthropoda), fungi and protists. The first structural models of AOX suggested the presence of two hydrophobic regions and two iron-binding motifs, involved in the electron transfer from ubiquinol (QH₂) to oxygen, which is reduced to water. In 2013, the structure of *Trypanosoma brucei* AOX (TAO) was solved, confirming the proposed model.

The role of this enzyme in cellular metabolism is important to maintain the respiratory activity of mitochondria and the functioning of the Krebs cycle in the presence of inhibitors of the cytochrome pathway, such as nitric oxide or cyanide, both inhibitors of the complex IV, and antimycin A, a complex III inhibitor. The AOX is inhibited by gallates such as n-propylgallate (nPG) or n-octylgallate (nOG), and salicylhydroxamic acid (SHAM). Based on its monotopic character, this enzyme does not generate a proton electrochemical gradient, and although it is not directly involved in the synthesis of ATP, it allows the metabolic activity of the cells.

So far, the role of AOX in many organisms is uncertain; nevertheless, at least three general functions are proposed. First, AOX prevents the inhibition of the Krebs cycle when the cytochrome pathway of the mitochondria is blocked, allowing the functioning of anaplerotic reactions that feed biosynthetic pathways. Second, a thermogenic effect of AOX has been described in some plants and finally, the AOX activity is important for the defense against different types of stress, including oxidative stress. In plants and fungi, the regulation of the expression of AOX by reactive oxygen species has been reported. In protozoa like *T. brucei*, AOX has a fourth function, essential for the development of this organism, because the amount of cytochromes in mitochondria is insufficient when the parasites are in the bloodstream of the host. As a result, the activity of TAO is important for the survival of the parasite, and this enzyme has been proposed as a target for chemotherapeutic agents.

Here, we studied the biological role of Aox1 in *Ustilago maydis*. The growth phases of the sporidium were defined in different carbon and nitrogen sources. The importance of the enzyme for the growth in artificial culture media and under certain types of stress was analyzed. In addition, it was shown that regulation of AOX expression occurs mainly at the transcriptional level. The findings in this work indicate that the Aox1 does not play any role in the sporidial and filamentous growth, or in the infection of the plant; its main function is

to keep active the metabolism of the yeast and filamentous forms of *U. maydis*, when the electron transport chain is compromised by some inhibitor of the cytochrome pathway.

Introducción

El mundo de las proteínas es tan amplio, que su estudio es un campo fértil para nuevos descubrimientos. Con base en la hipótesis termodinámica propuesta por Christian Anfinsen, la estructura nativa y biológicamente activa de las proteínas se debe a la estrecha relación que guarda la secuencia de aminoácidos con su entorno [1], por lo que es posible explorar la adaptación de cada proteína a ciertos ambientes y encontrar un sinnúmero de posibles interacciones específicas y particulares.

Las proteínas se clasifican en cuatro tipos: globulares, de membrana, fibrosas y no globulares/intrínsecamente no estructuradas [2]. Las proteínas de membrana, a su vez, pueden ser politópicas, ditópicas y monotópicas [3]. Las ditópicas y politópicas son proteínas transmembranales que cruzan al menos una vez la bicapa lipídica y cuentan con dos o múltiples dominios hidrofílicos respectivamente, mientras que las proteínas monotópicas están ancladas a una de las caras de la bicapa. Un ejemplo de proteína monotópica es la oxidasa alterna (AOX), que en el caso específico de los eucariontes se localiza en la cara interna de la membrana interna mitocondrial [4, 5].

La oxidasa alterna. ¿Qué es, qué reacción cataliza y cómo se regula?

La AOX es una proteína de la superfamilia de las metaloenzimas, específicamente de la familia de las proteínas difierro carboxilato [6, 7]. Es una ubiquinol (QH₂) oxidasa, independiente de la vía citocrómica [7-10] y no transloca protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, por lo que no impulsa la formación de la fuerza protón motriz [7-9, 11]. Es una enzima sensible a los galatos, al ácido salicilhidroxámico (SHAM) y al AF2779OH, inhibidor derivado de la ascofuranona, que se purifica del hongo *Ascochyta viciae*, en parte porque asemejan la estructura del QH₂ [10]. Con base en reportes previos, la actividad de la AOX aumenta cuando se inhibe la cadena transportadora de electrones y cuando el nivel de reducción de la poza de quinonas está entre un 40 y un 50% [8, 12], lo que permite que la AOX catalice la transferencia de electrones desde el QH₂ hasta el O₂, para la formación de agua, como se puede observar en la figura 1.

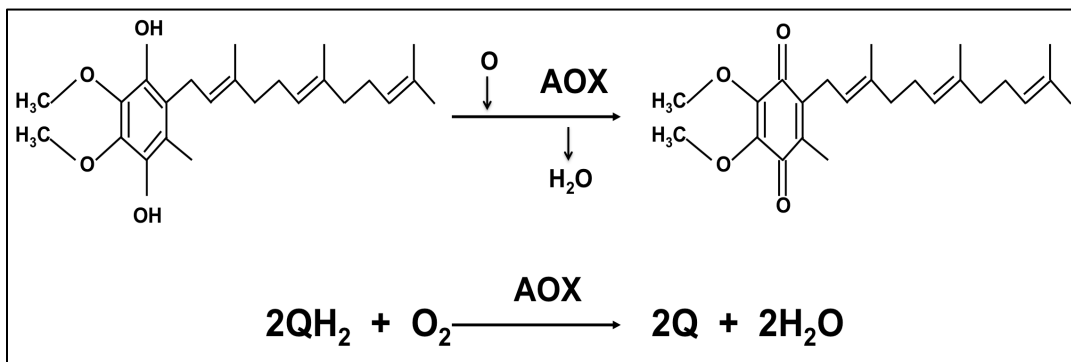


Figura 1. Reacción catalizada por la AOX. Oxidación del ubiquinol a través de la AOX mediante la transferencia de los electrones al oxígeno para formar agua.

El mecanismo catalítico de la AOX aún se desconoce, aunque se han propuesto diversos modelos para explicar cómo se realiza la reacción. El primer paso en todos ellos es la unión del oxígeno al sitio difierro que, en general, se da en todas las metaloenzimas que reaccionan con el oxígeno [13]. En 2013 Moore A. L. y cols., describieron un mecanismo de reacción en el que se propone la formación de dos intermediarios de vida corta, previo a la formación de una especie peroxodifierro.

En la figura 2 se observa el ciclo catalítico que lleva a cabo la AOX para la formación de H_2O a partir del QH_2 y del O_2 . Un primer electrón se transfiere al O_2 desde el centro difierro y forma una especie superoxo (1), que se reduce a un intermediario hidroxoperoxo, seguido de la transferencia de un protón y un electrón desde el QH_2 para su oxidación a semiquinona (QH') (2). Tras estas transferencias electrónicas, el centro difierro se reacomoda para formar especies peroxodifierro, liberando agua durante este proceso (3). Mediante un corte homolítico del enlace O-O, se obtiene una especie oxodifierro, seguida de la extracción de un protón y un electrón desde la tirosina 220 (Y220), generando un radical tirosilo que se volverá a reducir nuevamente por la QH' formada previamente (4). Las especies oxodifierro corresponden a un estado en que se permite la reducción por una segunda molécula de QH_2 y la regeneración del estado difierroso, para liberar una segunda molécula de agua (5) [13].

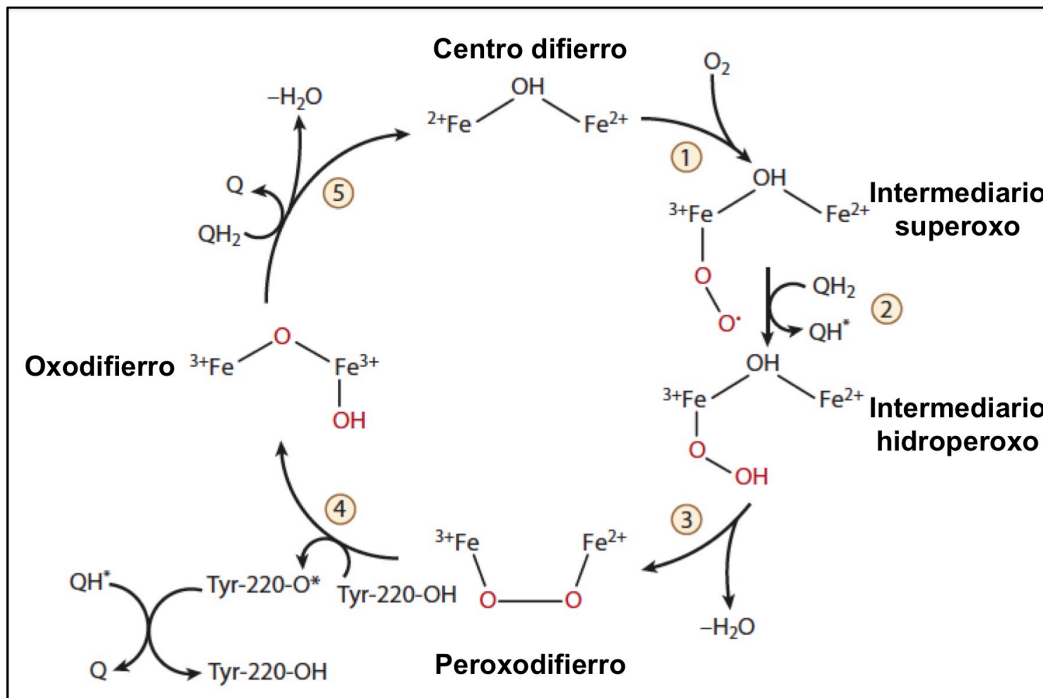


Figura 2. Mecanismo de reacción propuesto para el ciclo redox de la AOX. Secuencia de reacciones que generan intermediarios que permiten la transferencia de electrones desde el QH₂ hasta el oxígeno para la formación de H₂O. Figura modificada de [13].

Por otro lado, la regulación de la expresión génica de la AOX parece ser diferente en cada organismo, por lo que se abren un sinnúmero de posibilidades. Hay reportes que mencionan que la regulación de la proteína se puede dar a nivel transcripcional [14, 15], traduccional o postraduccional [16]. Por ejemplo, la regulación de la expresión génica de la AOX en las plantas se da por diversos factores donde pueden estar involucrados aspectos metabólicos como el estado redox, factores abióticos como la temperatura o el tejido en el que se encuentra la enzima [17, 18].

La AOX de las plantas es un homodímero cuya actividad depende del estado redox de la poza de quinonas y de la reducción de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína presentes en el dominio N-terminal de cada monómero [19]. En una segunda etapa de activación, la AOX forma un tiohemiacetal con un α -cetoácido, como el piruvato, en la mayoría de los casos, o al interactuar con el succinato; es decir, se activa por ácidos orgánicos [18-20]. Esta regulación es a nivel postraduccional y está dada por residuos de cisteínas conservados entre las AOX de las plantas [9, 16, 19]. En estudios realizados en

Arabidopsis, en los que se intercambi6 la cisteína conservada que forma el puente disulfuro por alanina o glicina, se obtuvo una actividad constitutiva para la AOX, indicando que la cisteína es importante en la regulaci6n de la proteína [21].

A diferencia de la regulaci6n de la AOX en las plantas, donde se involucra la reducci6n de un puente disulfuro y la formaci6n de un tiohemiacetal con α -cetoácidos, la actividad de la AOX en los hongos puede aumentar en respuesta a una disminuci6n en la relaci6n ATP:ADP en la matriz mitocondrial [16], al aumentar el AMP o el GMP [22, 23]. En el hongo *Ustilago maydis* se ha observado una aparente activaci6n de esta enzima por piruvato, para permitir la actividad del ciclo de Krebs y mantener la poza de quinonas en un estado mayor de oxidaci6n [23]. Por otro lado, se ha encontrado una mayor relaci6n de la proteína de hongos con la AOX de *Trypanosoma brucei* (TAO) que con la de plantas [4, 24].

En el grupo de los protistas, los estudios de regulaci6n de esta proteína se han enfocado a la AOX de *T. brucei*, TAO en el caso de este organismo. La actividad de la TAO depende de la etapa del ciclo de vida del parásito, misma que se da en la fase infectiva, en la forma de tripomastigote, en el torrente sanguíneo [24]. Ya que *T. brucei* es un organismo respiratorio [25], éste enciende su vía alterna para mantener la actividad del ciclo de Krebs y la síntesis de ATP, debido a la disminuci6n de los citocromos en la cadena respiratoria durante su fase infectiva. Tanto la actividad como el RNAm que codifica para la TAO est6 cinco veces por arriba de las que se encuentran en la forma procíclica, mientras que la cantidad de la proteína es 100 veces mayor en la fase infectiva [24]. Para tener actividad de la TAO en cultivos de *E. coli* que contienen el DNA recombinante de la AOX de Tripanosoma, se necesita ańadir Fe^{2+} al medio de cultivo [25].

¿En qu6 organismos se puede encontrar y cu6l es el inter6s por la oxidasa alterna?

Hasta el momento, se sabe que la AOX se encuentra en todas las plantas, en la mayoría de los hongos [9, 26], en protistas como *T. brucei* [27, 28] y tambi6n en diversos grupos de animales, de los cuales se descarta a los vertebrados y a los artr6podos [29, 30]. En un principio se pensaba que la AOX era una proteína exclusiva de eucariontes; sin embargo, se encontr6 en procariontes como la α -proteobacteria *Novosphingobium aromaticivorans* [4, 31, 32]. En la actualidad, se sabe que la AOX est6 presente en todos los reinos de la naturaleza, con excepci6n de las arqueas.

Desde la primera mitad del siglo XX, se sabe de una vía capaz de mantener el consumo de oxígeno en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria, como el cianuro, por lo que originalmente se le nombró respiración resistente a cianuro, y ésta se debe a la actividad de la AOX. Esta proteína es de importancia por su variabilidad filogenética, misma que genera un gran interés en su estructura cristalográfica que permitirá conocer más sobre sus regiones regulatorias y su mecanismo catalítico, el papel que juega en la reprogramación celular ante diversos tipos de estrés y por ser un buen modelo para el estudio de agentes quimioterapéuticos [33], por ejemplo, para combatir la tripanosomiasis.

La AOX: su estructura, sitio activo e inhibición.

En relación con la estructura de la AOX, los primeros trabajos predecían una proteína con cruces transmembranales, dados por dos hélices α [9]. Tiempo después, y con base en la secuencia de la AOX de la planta *Sauromatum guttatum* (Voodoo Lily) [34] y de la estructura de otras proteínas con las mismas características, como la subunidad α de la metano monooxigenasa y la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa [5], se generó un nuevo modelo de una proteína monotópica con cuatro hélices unidas por dos átomos de fierro no hémicos [10, 34-36].

Entre las características estructurales de este tipo de metaloenzimas se comparte la presencia de un grupo de cuatro hélices y motivos EXXH altamente conservados que participan en la unión de los dos fierros [7, 9, 24, 34]. La secuencia de aminoácidos de la TAO tiene una identidad con otras AOX que puede ir de un 20 a un 30% [24]. Por lo tanto, al tener la estructura cristalográfica de la TAO, se pueden extrapolar sus características a otras AOX.

La TAO es un homodímero con un sitio activo carboxilato difierro no hémico por monómero, en el interior de un grupo de cuatro hélices (figura 3). Cada monómero consta de 10 α -hélices, seis de las cuales son largas y se numeran de la $\alpha 1$ a la $\alpha 6$, además de otras cuatro hélices cortas que van de la $s 1$ a la $s 4$. Cuatro de las hélices largas ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$) están distribuidas de forma antiparalela y forman una cavidad, en la cual se encuentra el centro difierro [5, 7, 9, 10, 24]. La interacción de los monómeros del dímero se da a través de 18 residuos de aminoácidos, seis de ellos poco conservados (H138, L142, R143, R163, L166 y Q187), y 12 altamente conservados (M131, M135, L139, S141, M145, R147, D148, L156, A159, M167, R180 e I183), sugiriendo que las AOXs son

diméricas [10]. La región anclada a la membrana está comprendida por la $\alpha 1$, la $\alpha 4$, la región C-terminal de la hélice $\alpha 2$ y la región N-terminal de la hélice $\alpha 5$. La proteína se ancla a la membrana interna mitocondrial con una profundidad aproximada de 8.4 Å, equivalente al radio de una α -hélice [10]. La estructura de la TAO se depositó en el Protein Data Bank (PDB) con el ID 3VV9.

El sitio activo, que se encuentra en el interior de la proteína, en un ambiente hidrofóbico, se compone de un centro difierro coordinado por dos motivos proteicos muy conservados de glutamato (E123, E162, E213 y E266) e histidinas (H165 y H269), EXXH [10]. Por otro lado, dos residuos de tirosina, Y198 y Y220, podrían estar participando en la actividad catalítica, ya que la delección de la Y220 produce una enzima inactiva. Esta tirosina está en el interior del manejo de las cuatro hélices y está muy conservada. La tirosina Y198, ubicada en la porción C-terminal de la $\alpha 4$, está en coordinación con la histidina H206 altamente conservada de la $\alpha 5$, mediante un puente de hidrógeno y podría estar involucrada en la estabilidad de la estructura de la TAO para generar la unión con el QH_2 [10].

Con respecto al sitio de inhibición, se logró resolver el cristal de la proteína en presencia de AF2779OH, un potente inhibidor de la AOX. Se observó una cavidad donde se unió el inhibidor, cerca de la superficie de la membrana, entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 4$, con un arreglo en el que el anillo aromático queda cerca del sitio activo difierro [10]. La estructura del complejo de la TAO con el AF2779OH está en el Protein Data Bank (PDB) con el ID 3VVA.

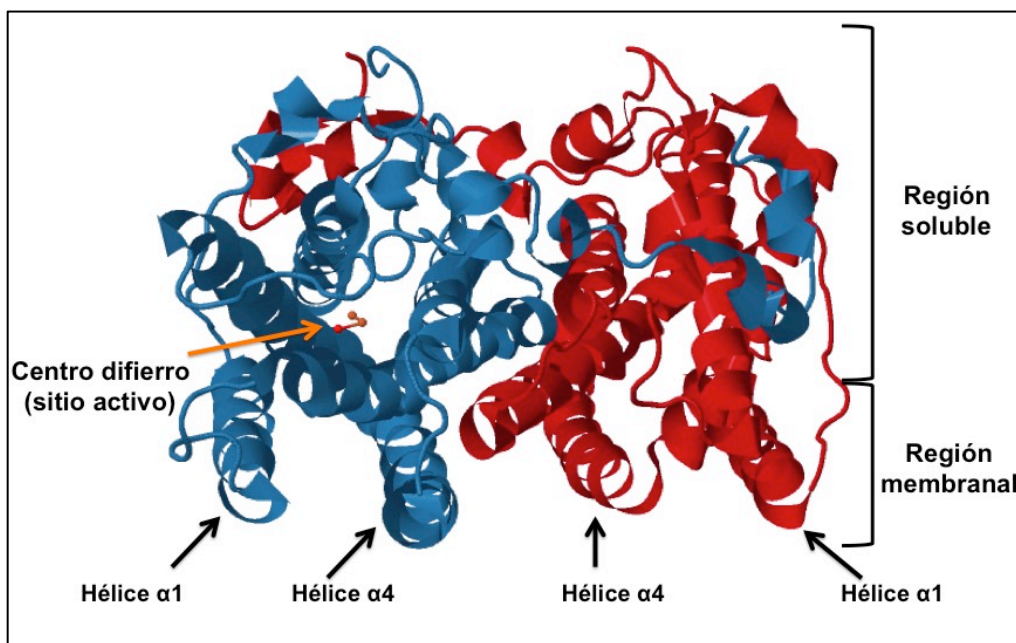


Figura 3. Imagen cristalográfica del homodímero de la AOX de *T. brucei*. Los corchetes hacen referencia a la región soluble y membranar de la proteína, las flechas en color negro, a las α -hélices ancladas a la membrana y la flecha en color anaranjado al sitio activo de la proteína. Imagen tomada y modificada del ID 3VV9, del PDB.

Evolución

La presencia de residuos altamente conservados en las distintas AOX [7, 9] es un indicio de que esta proteína evolucionó a partir de un ancestro común. Hasta la fecha, no se sabe en qué momento surgió la primera oxidasa alterna, pero al encontrarla en procariontes como la α -proteobacteria *N. aromaticivorans*, hace pensar que, a partir de un evento de endosimbiosis que dio origen a la mitocondria, la AOX llegó a formar parte de las células eucariontes mediante transferencia vertical [32, 37]. Otra evidencia es que aunque los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de esta familia muestran una muy baja identidad, la comparación de la AOX con la plastoquinol oxidasa terminal (PTOX, proteína asociada a la cadena transportadora de electrones fotosintética), muestra una identidad cercana al 25%, principalmente en su región catalítica, lo que refuerza la idea de un origen endosimbiótico de la AOX en todos los eucariontes [37, 38].

Por otro lado, en las plantas hay tres subfamilias, la AOX1, que está en todas las angiospermas, la AOX2 presente solo en dicotiledóneas [4, 11] y la AOX3 (AOX2b) que se ha descrito en raíz, cotiledones y hojas de la planta de soya (*Glycine max*) [17, 39]. En un análisis de las secuencias maduras de varias AOX de plantas, se muestra que en la región N-terminal hay dos residuos de cisteína (C128 y C78) conservados en la mayoría de las secuencias, de las tres subfamilias [17, 40].

En 1978 se obtuvieron preparaciones semipuras de la AOX que provenían de mitocondrias de la planta *Arum maculatum* [41], y en la década de los 80's se obtuvo una mejor preparación de la AOX de *Sauromatum guttatum* [42, 43]. Poco después, el mismo grupo generó anticuerpos monoclonales que reconocían a la AOX de *S. guttatum* [44] y a la AOX de hongos ascomicetos como *Neurospora crassa* [14], de basidiomicetos como *U. maydis* [45] y a la TAO de *T. brucei* [46].

Con estos hallazgos, más la presencia de residuos altamente conservados en las AOX [7, 9], así como la existencia de esta enzima en ciertos procariontes, se puede proponer su evolución a partir de un ancestro común [37]. Sin embargo, no se ha podido confirmar dicha hipótesis, ya que aunque las relaciones filogenéticas de la AOX sugieren que tiene un origen monofilético en muchos eucariontes, inclusive en eubacterias, en ciertos hongos pareciera que el origen se dio de manera independiente [47]. En la figura 4 se muestra un árbol filogenético de la AOX de organismos que pertenecen a distintos reinos de la naturaleza. Se puede observar una distribución monofilética en plantas y bacterias, mientras que en el grupo de los hongos se observa la rama en color turquesa de los basidiomicetos y otra que agrupa a los ascomicetos (color café). En el caso específico del zigomiceto *Rhizopus microsporus*, se observa que sale del grupo de los hongos y se encuentra emparentado con las bacterias.

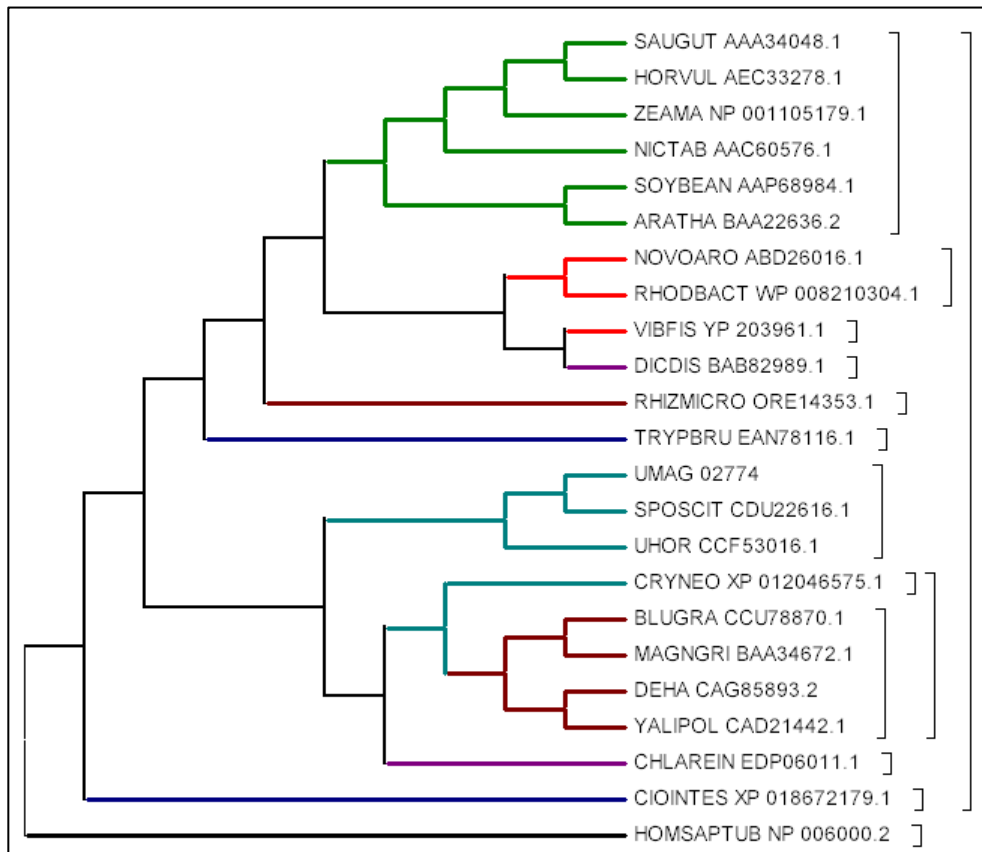


Figura 4. Árbol filogenético entre distintas AOX en diversos reinos de la naturaleza.

En color verde están representadas las plantas (*Sauromatum guttatum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Glicine max*, *Arabidopsis thaliana*); en color rojo las bacterias (*Novosphingobium aromaticivorans*, *Rhodanobacter sp. 115*, *Vibrio fischeri* ES114); en color morado una amiba (*Dictyostelium discoideum*) y una alga (*Chlamydomonas reinhardtii*); color azul representa a los animales (*Ciona intestinalis*, *Trypanosoma brucei*); color café corresponde a los hongos ascomicetos (*Blumeria graminis*, *Magnaporthe grisea*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*) y zigomicetos (*Rhizopus microsporus*); color turquesa pertenece a los hongos basidiomicetos (*Ustilago maydis*, *Sporisorium scitamineum*, *Ustilago hordeii*, *Cryptococcus neoformans*); color negro corresponde a la raíz del árbol, tubulina de humano.

Funcionamiento

La función fisiológica de la AOX es incierta para muchos organismos, pero existen algunas propuestas. La mayoría de los reportes la consideran como una proteína que

disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno [4]. En el caso de la TAO de *T. brucei*, funciona como una alternativa al consumo de oxígeno del protozoario cuando se encuentra en el torrente sanguíneo del hospedero, condición en la cual la cantidad de citocromos no es suficiente para mantener activo al ciclo de Krebs y la síntesis de ATP [24]. Por otro lado, y como se dijo antes, la AOX es una proteína de la superficie interna de la membrana interna mitocondrial, resistente a cianuro u otros inhibidores de la vía de la citocromo oxidasa [8, 24], lo que permite mantener activo el metabolismo en presencia de inhibidores de la vía citocrómica [48]. En las plantas, en donde se ha estudiado con más detalle a la AOX, se ha propuesto como un mecanismo para aumentar la temperatura mediante la generación de calor, debido a la disipación de energía en las mitocondrias [8], lo que les permite atraer insectos para la polinización [17, 49].

Biología molecular con la oxidasa alterna

Los organismos aerobios tienen componentes comunes en su cadena transportadora de electrones; sin embargo, a diferencia de las plantas o algunos hongos, en las arqueas, *Saccharomyces cerevisiae* y en los mamíferos, no se cuenta con una oxidasa alterna resistente a cianuro, como la AOX. En los eucariontes, el gen que codifica para la AOX (*aox1*) está presente en el núcleo [34] y su síntesis se lleva a cabo en el citosol, con una secuencia señal que sirve para exportarla a la mitocondria [50], organelo en donde lleva a cabo su función.

Al no estar presente la AOX en células de mamíferos, resulta de gran interés utilizarlas como modelo de expresión para esta proteína. El principal objetivo de sobreexpresar a la AOX es disminuir y contrarrestar los efectos negativos de una cadena respiratoria disfuncional. Así, con base en los datos de genómica [29], se expresó la AOX de *Ciona intestinalis*, pariente lejano de los vertebrados, en células embrionarias de riñón. El resultado fue un metabolismo energético semejante, tanto en la cepa silvestre como en la cepa transformada con la AOX a partir de la silvestre, lo que indica que la expresión de esta proteína en células humanas podría utilizarse para contrarrestar una respiración disfuncional sin afectar el crecimiento celular [51]. Los defectos en la respiración y la posible sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, son temas de estudio en el campo de las patologías humanas, como las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. Eventualmente, la AOX se expresó en *Drosophila melanogaster* y permitió una respiración parcialmente resistente a cianuro y a antimicina A [52]. También

se expresó la AOX de la planta *Arum concinatum* en células de cáncer cervical [53], y se mostró que esta proteína es funcional en células humanas. Finalmente, se construyó un ratón transgénico en donde se expresó la AOX en todas las células. Estos ratones podían heredar la AOX a su descendencia, y las células de la progenie tenían una respiración resistente a cianuro que no interfería con la vía citocrómica; la AOX era funcional solo al bloquear la vía citocrómica o cuando la poza de quinonas estaba altamente reducida [54]. En conclusión, con estos trabajos de expresión de la AOX se muestra que esta proteína es inocua en células de cultivo humano, mosca y ratón [55], y que puede prevenir/evitar un daño por las especies reactivas de oxígeno.

***Ustilago maydis*, ¿un cáncer para el maíz?**

U. maydis es un hongo dimórfico que se distribuye a nivel mundial. Pertenece al grupo de los basidiomicetos y es de gran importancia económica en el sector agrícola, por ser el principal causante en la formación de carbones en plantas de maíz, generando grandes pérdidas económicas en muchos países [22]. En México, lejos de generar pérdidas económicas, la formación de carbones por *U. maydis* reditúa en ganancias económicas, debido a su comercialización. El esporidio, fase haploide, no es infectivo, mientras que la fase patogénica necesita de dos células compatibles para formar un filamento dicariótico mediante una fusión celular, como se observa en la figura 5 [56].

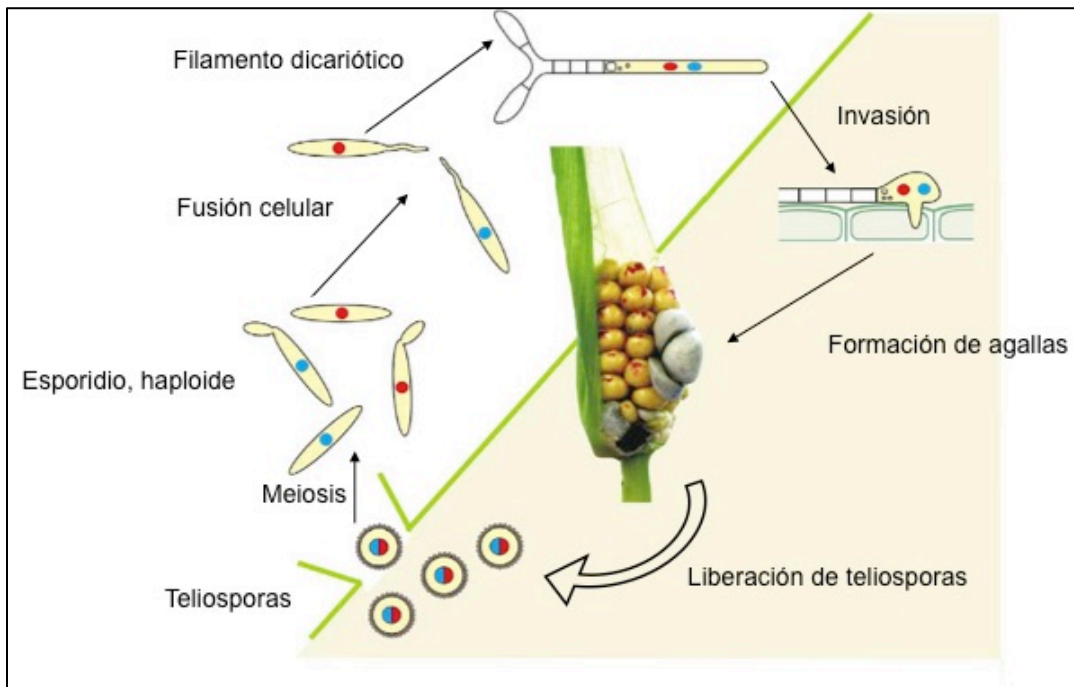


Figura 5. Ciclo celular de *U. maydis*. Los círculos señalados en color azul o rojo al interior del esporidio (células haploides), señalan los dos distintos alelos que después de la conjugación celular, formarán un filamento diploide que dependerá de la planta para completar el proceso infectivo formando agallas y liberando las teliosporas. Modificado de [56].

En la naturaleza existen otras especies del género *Ustilago* que son más agresivas y que infectan a plantas como el arroz, la caña de azúcar y el sorgo [57], por lo que el estudio con *U. maydis* se debe, en gran parte, al gran parecido con esos hongos. Este

organismo es un modelo para el estudio de diversos procesos biológicos, que incluyen las relaciones hospedero-parásito [58-61], la transición levadura-micelio [56, 60], la regulación genética [62] y el metabolismo intermediario [23, 63, 64].

En comparación con *S. cerevisiae*, la mitocondria de *U. maydis* contiene una cadena transportadora de electrones con los cuatro complejos clásicos, la NADH-ubiquinona óxido-reductasa o complejo I, la succinato deshidrogenasa o complejo II, la ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa o complejo III, la citocromo oxidasa o complejo IV y al menos un par de elementos alternos en los que se encuentran una NADH deshidrogenasa externa y una oxidasa alterna (Aox1) que se puede activar por AMP y es sensible a los inhibidores tradicionales como los galatos (figura 6) [22, 23]. A diferencia de las levaduras fermentativas como *S. cerevisiae*, *U. maydis* depende principalmente de la actividad respiratoria y su fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP [63].

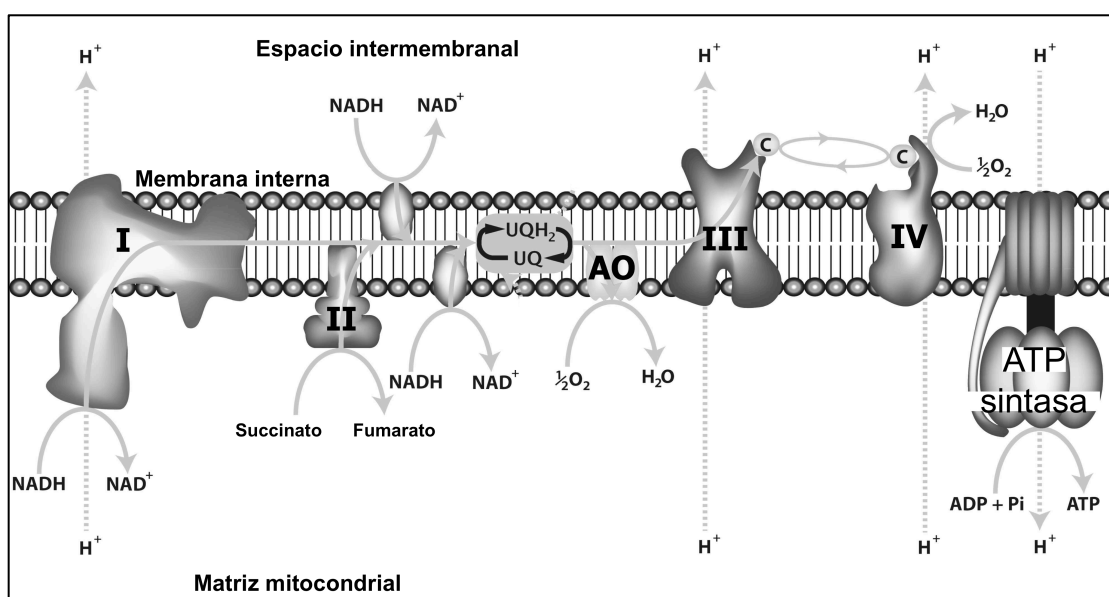


Figura 6. Cadena transportadora de electrones en *U. maydis*. *U. maydis* cuenta con los cuatro complejos clásicos de la cadena transportadora de electrones y dos elementos alternos que involucran al menos una deshidrogenasa externa y otra interna interna y una oxidasa alterna. Figura tomada y modificada de [9].

La Aox1 de *U. maydis* ha sido poco estudiada, por lo que en este proyecto se planteó hacer un estudio más detallado de su función, durante diversos aspectos de la

biología del hongo, como es el papel que tiene en la defensa contra distintos tipos de estrés, así como su importancia en el desarrollo del proceso infectivo en el maíz.

Puesto que la forma de esporidio (levadura) de *U. maydis* es fácil de cultivar en el laboratorio con medios artificiales, se decidió utilizar esta fase del organismo como modelo para estudiar la expresión de la Aox1, tanto en fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento, utilizando distintas fuentes de carbono (glucosa, etanol, glicerol o lactato) y nitrógeno (mezcla de aminoácidos, amonio o nitrato), tomando ventaja de anticuerpos comerciales que reconocen a la proteína. Adicionalmente, se construyó una mutante que carece del gen que codifica para esta proteína para determinar su importancia para el crecimiento levaduriforme y filamentos de las células y para la infección de la planta. Además, el gen de la Aox1 se fusionó con el de la proteína verde fluorescente para seguir a la proteína ante diversos tipos de estrés.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas a nivel mundial es la infección con hongos generadores de carbones, que genera pérdidas económicas en la agricultura. Sin embargo, en México la infección de los cultivos del maíz endémico (*Zea mays*) por *U. maydis* genera beneficios económicos a los agricultores, debido al consumo de este hongo entre los mexicanos y a nivel internacional. Existen otras especies del género *Ustilago* que infectan al trigo, la cebada, la caña de azúcar o al sorgo, entre otros, y que causan grandes pérdidas económicas. Una posible solución a este problema es evitar el daño mediante inhibidores específicos contra los hongos.

Nuestra propuesta es que para encontrar una posible solución a este problema, se puede usar a *U. maydis*, un hongo que se utiliza como modelo de estudio por su fácil crecimiento en medios artificiales y su capacidad de adaptación ante cambios en las condiciones abióticas como la temperatura, el pH, el estrés oxidativo, así como por su relación filogenética con otros hongos, para extrapolar los resultados a otros miembros de la familia de los Ustilaginales.

La oxidasa alterna (Aox1) está presente en el género *Ustilago*. Es una ubiquinol (QH₂) oxidasa independiente de la vía citocrómica, que se encuentra en la membrana interna mitocondrial. Uno de los principales papeles que se le ha dado es el de protección ante diferentes tipos de estrés, como el cambio en la osmolaridad, sequía e incluso el oxidativo. Con base en estas características, y como justificación para la realización de este trabajo, nos preguntamos: ¿cuál es la función y/o el factor determinante en la expresión de esta proteína en *U. maydis*? ¿Será posible combatir las infecciones agrícolas causadas por *Ustilago* mediante la inhibición de la Aox1?

Para dar respuesta a estas preguntas, se estudió el crecimiento y el metabolismo respiratorio. Además, con la construcción de varias mutantes de *U. maydis*, entre nulas y de sobreexpresión de la Aox1 con la Gfp, se siguió la expresión de esta proteína durante su crecimiento. Por otro lado, también se estudió el comportamiento de las células que carecen de la Aox1 ante distintos estímulos y se comparó la capacidad de infección del hongo en las plantas de maíz con respecto a las cepas silvestre.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la expresión de la oxidasa alterna (Aox1) de *U. maydis* y cómo influye la ausencia de esta enzima en el crecimiento levaduriforme, filamentoso y en la respuesta del hongo ante diversos tipos de estrés y fuentes de carbono y nitrógeno.

Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento de *U. maydis* en diversas fuentes de carbono y nitrógeno.
- Generar una mutante que carezca del gen que codifica para la Aox1.
- Generar mutantes que contengan fusionado el gen de la Aox1 con el de la proteína verde fluorescente (Gfp), bajo la regulación de diferentes promotores.
- Validar el correcto funcionamiento de las cepas mutantes.
- Realizar ensayos de expresión de la Aox1 ante diversos tipos de estrés.
- Determinar el crecimiento filamentoso de las distintas mutantes generadas.
- Realizar estudios de infección en plantas de maíz, con las diferentes cepas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y equipo

Los reactivos y el equipo utilizados en este proyecto se adquirieron en diversas compañías: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), E. Merck (Darmstadt, Alemania), BioRad (Hercules, CA, EUA), Agilent Technologies (La Jolla, CA, EUA), Axygen Biosciences (Union City CA, EUA), Qiagen (Hilden, Alemania), Millipore (Billerica, MA, EUA) e Invitrogen life technologies (Darmstadt, Alemania).

Cepas y cultivos celulares

Se utilizaron las cepas silvestres FB1, la cepa de *U. maydis* ATCC 201384 FB2, que se obtuvo del American Type Cell Collection (Manassas, VA, EUA), además de diversas mutantes, que se generaron durante una estancia académica con el Prof. Dr. Michael Feldbrügge de la Universidad Heinrich-Heine Düsseldorf en Düsseldorf, Alemania (anexo II). El procedimiento fue descrito previamente por Pohlmann T. y cols. [65].

Las cepas se mantuvieron en viales con 2 ml de medio YPD-glicerol, dentro de un ultracongelador a -70 °C. Para recuperar a las células se estrió un inóculo en un medio sólido de YPD, con un palillo de madera estéril, y se dejó durante 2-3 días a 28°C. Inicialmente se tomó una asada y se cultivó en 100 ml de medio YPD durante 18-24 h a 28°C; se cosecharon las células por centrifugación a 1000 x g y se lavaron dos veces con H₂O estéril. La suspensión final se llevó a una relación de 1.0 g de peso húmedo/1.0 mL de H₂O. Para iniciar los cultivos en las diferentes condiciones (tabla 1), se inocularon 20 unidades de absorbencia (D.O._{.600nm}) por cada litro de medio en matraces bafleados de 2.0 L a 28 °C, con agitación constante a 180 rpm y el crecimiento celular se detuvo tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria. Las células se cosecharon por centrifugación a 1000 x g con dos lavados con H₂O destilada y se resuspendieron con H₂O destilada a una relación de 1 mL/g de peso húmedo.

Las fases de crecimiento en los diferentes cultivos se determinaron mediante curvas de crecimiento, midiendo la densidad óptica a 600 nm. La composición de los distintos medios de cultivo se describe detalladamente en el anexo I.

	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno
YPD	Medio rico	
MM	Glucosa	Amonio – (NH ₄) ₂ SO ₄
MM	Glucosa	Nitrato – KNO ₃
MM	Etanol	Amonio
MM	Lactato	
MM	Glicerol	

Tabla 1. Condiciones de cultivo empleadas para *U. maydis*. YPD-medio completo con diversas fuentes de nitrógeno. MM-medio mínimo suplementado con las distintas fuentes de carbono y nitrógeno indicadas.

Construcción de plásmidos

Para los experimentos de biología molecular, se utilizó la cepa Top10 de *Escherichia coli* (Invitrogen/Life Technologies). El cultivo de las células y la clonación de los genes se realizó mediante técnicas convencionales y la técnica de ingeniería genética, Golden Gate (anexo II) [66]. Se amplificaron las regiones que se ubican río arriba (UF) y río abajo (DF) del marco de lectura abierta (ORF) del gen *aox1*, (número de acceso, umag_02774), y se construyó el plásmido pUMa2163 (anexo II) [67]. Los flancos UF y DF se generaron por PCR, utilizando como templado el DNA genómico de la cepa UM521 de *U. maydis* y la combinación de oligonucleótidos oRL1400/oRL1401 y oRL1402/oRL1403 (anexo II). Los productos de PCR y el plásmido pUMa1507 con el gen de resistencia a la higromicina, HygR, se cortaron y se ligaron en el vector pUMa1467 (vector destino), en una sola reacción de restricción/ligación con la enzima BsaI.

Para la construcción del plásmido pUMa2169, que tiene la fusión Aox1-Gfp, se generó un nuevo UF de 2.4 kb que contiene tanto el ORF del *aox1* como 1015 pb río arriba del gen, utilizando la combinación de oligonucleótidos oRL1400/oRL1425 (anexo II) y el DNA genómico de UM521 como templado. El producto final se digirió con las enzimas SfiI/XcmI y se ligó con un fragmento de 4300 pb con extremos para SfiI/XcmI, pertenecientes al vector pUMa2163, y un fragmento de 2448 pb con extremos complementarios a SfiI/SfiI, del vector pUMa389, con el gen que codifica para la proteína

verde fluorescente, eGfp y un cassette de resistencia a nourseotricina [68]. La correcta construcción de los plásmidos se verificó mediante reacciones de restricción y por secuenciación de todas las regiones amplificadas por PCR.

Para la expresión ectópica de *aox1*-Gfp bajo un promotor constitutivamente activo, P_{otef} , el ORF del *aox1* se amplificó por PCR utilizando la combinación de los oligonucleótidos oDD808/oMF894 (que contiene la región 5'UTR), y oDD809/oMF894, utilizando como templado el DNA genómico de UM521 [69].

En el anexo II se describen detalladamente los plásmidos utilizados y generados para este estudio.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó con un electrodo tipo Clark, conectado a un monitor de oxígeno YSI5300A, en una cámara de 1.5 mL a una temperatura de 30°C [22, 23]. Para los ensayos se utilizaron de 5-10 mg de células, peso húmedo, en una solución ajustada a pH 7.0 con 20 mM de Tris-HCl y suplementada con 10.0 mM glucosa. Para inhibir la actividad de la vía citocrómica, se utilizó 1.0 mM de cianuro de potasio (KCN), y 6.0 μ M de *n*-octilgalato (nOG) para inhibir la oxidasa alterna, Aox1. El nOG se disolvió en etanol o dimetil sulfóxido (DMSO), para preparar una solución de trabajo 4.0 mM. Para cada curso temporal se determinó la pendiente antes y después de la adición de los inhibidores.

Obtención de mitocondrias

Con el fin de obtener mitocondrias para los ensayos de Western blot, se cultivaron y cosecharon las células de *U. maydis* por centrifugación a 3000 x g durante cinco minutos, se lavaron dos veces con H₂O destilada y se resuspendieron y mantuvieron durante todo el proceso en un amortiguador de lisis a 4°C (anexo I), a una relación final de 3.5 ml/g de peso húmedo. La lisis celular se realizó en tubos de 5 ml, con una relación 1:1 con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, en presencia de 1.0 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), como inhibidor de proteasas. El tubo de lisis se colocó en un Mini-BeadBeater (productos Biospec, EE.UU.) y se aplicaron cuatro pulsos de agitación de 30 segundos, cada uno separado por intervalos de dos minutos en hielo. Con la suspensión obtenida, se aislaron las mitocondrias por centrifugación diferencial como lo

reportó Sierra-Campos y colaboradores [23]. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3000 x *g* durante 10 min. El paquete mitocondrial se obtuvo por centrifugación del sobrenadante por 10 min a 12,000 x *g*. Después de la segunda centrifugación, se desechó el sobrenadante para evitar contaminación citosólica y el botón se suspendió cuidadosamente con la misma solución de lisis, a una concentración final de proteína de 10 a 30 mg/mL.

Determinación de la concentración de proteína

Para cuantificar la cantidad de proteína mitocondrial, se utilizó la técnica descrita por Lowry y colaboradores en 1951 [70], utilizando la albúmina bovina sérica (BSA) como estándar.

Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunodetección de la Aox1

Las proteínas de la mitocondria se separaron mediante electroforesis con geles desnaturalizantes al 7.5% de poliacrilamida y 0.1% de SDS, [71] y se transfirieron a una membrana de PVDF con el sistema discontinuo de amortiguamiento [72]. Los sitios no específicos de unión del anticuerpo se bloquearon con una solución de TBST (tris-buffered saline-tween) con 5% de leche libre de grasa. La detección de la Aox1 se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal anti-AOX, con una dilución 1:100, desarrollado contra la oxidasa alterna de *S. guttatum* (voodoo lily) [44]. Para detectar a la Gfp, se utilizaron anticuerpos comerciales contra la proteína (clonas 7.1 y 13.1 de Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Para la detección de la unión de los anticuerpos con sus respectivos sitios antigénicos, se utilizó el anticuerpo secundario marcado con la peroxidasa de rábano (HRP) y el sustrato de quimioluminiscencia HRP Immobilon western de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania).

Purificación del RNA total, síntesis del cDNA y nivel de expresión del RNAm del *aox1* por qRT-PCR

Para cuantificar la expresión del gen *aox1* de *U. maydis* por qRT-PCR, se cultivaron las células en las distintas condiciones y se cosecharon en ambas fases de crecimiento para la subsecuente purificación del RNA, mediante el kit AxyPrep Multisource Total RNA

Miniprep, de Axygen Biosciences (Union City CA, EUA). Con base en el protocolo del kit, iScript™ Select cDNA Synthesis, se utilizó un microgramo de RNA total para sintetizar el cDNA del gen a través de la reacción de transcriptasa reversa [73]. Los oligonucleótidos que se utilizaron eran específicos para el gen de la *Aox1* (cDNA.Aox1) y el gen que codifica para eIF-2B (cDNA.elf2B), con un número de identificación UMAG04869, que se usó como control endógeno.

Se utilizó como templado la décima parte del cDNA y la mezcla de oligonucleótidos Fwd.Aox1/Rev.Aox1 para el gen *aox1* y Fwd.eIF2B/Rev.eIF2B para el control, con el fin de llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Se utilizó un sistema ABI Prism 7000 (Applied biosystems, Carlsbad, CA, EUA) y para determinar el número máximo de ciclos, se utilizó el software del ABI Prism. Las reacciones de la qRT-PCR se realizaron por triplicado. Para obtener los distintos niveles de expresión génica del *aox1*, la cantidad relativa del RNA de las distintas condiciones se normalizó contra la cantidad del control endógeno (eIF2B), y estos valores se normalizaron con respecto a la condición de las células cultivadas hasta la fase exponencial en YPD.

Microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

El análisis microscópico de las células e hifas de *U. maydis* se llevó a cabo como lo reportaron Pohlmann y colaboradores [65]. Las células se cultivaron a una densidad óptica de 0.5 (D. O. a 600 nm), se incubaron con 1 mg/mL de Mitotracker Red CM-H₂ROS (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) durante 5 minutos, se lavaron con medio de cultivo nuevo y se analizaron directamente mediante la observación en un microscopio de fluorescencia, Zeiss Axio Observer.Z1 acoplado a una cámara CCD (Photometrics CoolSNAP HQ2). La excitación de la señal fluorescente se llevó a cabo con una lámpara de mercurio HBO 103 en combinación con el juego de filtros adecuados para la Gfp (ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP) y para el Mitotracker Red (ET560/40BP, ET585LP, ET630/75BP; Chroma, Bellow Falls, VT, EUA). Para la tinción de la pared celular con biotina, las células se cosecharon y lavaron dos veces con PBS 50 mM a pH 8.0. Las células se resuspendieron en la misma solución de PBS suplementada con 1mg/mL de biotina e incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Las células se lavaron tres veces con el amortiguador TM (anexo I), y se llevó a una relación 1:6 peso/volumen. Para la subsecuente tinción de la biotina con la avidina, las células se lavaron dos veces con H₂O y se resuspendieron en 1 mL de H₂O suplementada con 1 µl de Extravidina-TRITC,

una avidina modificada y conjugada al fluorocromo isotiocianato de tetrametil-rodamina (Sigma-Aldrich), y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con H₂O y se resuspendieron en medio nuevo.

Para los análisis de la expresión de la Aox1-Gfp por citometría de flujo, las células se cultivaron en YPD y se colectaron muestras cada dos horas que se fijaron con una solución de paraformaldehído (ver anexo I). Para determinar la expresión de la Aox1-Gfp por la inhibición de la vía citocrómica con antimicina A, las células se cultivaron en MM-etanol hasta la fase estacionaria y después de cosecharlas, se incubaron en una solución de fosfatos con glucosa (anexo I). Durante la incubación se tomaron muestras cada hora y se fijaron con la solución de paraformaldehído (anexo I). Los datos de fluorescencia se adquirieron con un citómetro de flujo BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA), FACScalibur y se analizaron con el software Flow Jo [74].

Ensayo de desecación.

Para los ensayos de desecación, se modificó parcialmente el protocolo descrito por Capece y colaboradores en el 2016 [75]. Los cultivos de *U. maydis* se dejaron hasta alcanzar la fase estacionaria de cultivo y se diluyeron a una absorbancia de 1.0 a 600 nm. Subsecuentemente, se tomaron alícuotas de 1 mL y se transfirieron a tubos de 1.5 ml, se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El botón celular se dejó secar durante 4 horas a 28°C y posteriormente se resuspendió con 1 mL de H₂O estéril. Las células resuspendidas se plaquearon en medio rico y después de tres días de crecimiento a 28°C, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (cfu).

RESULTADOS

La actividad de la oxidasa alterna es mayor en fase estacionaria.

La disponibilidad de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno determina la expresión de genes específicos del metabolismo celular [76]. *U. maydis*, un hongo 100% respiratorio, puede utilizar como fuente de carbono sustratos fermentativos como la glucosa o respiratorios como el etanol, el glicerol y el lactato [77], además de distintas fuentes de nitrógeno como aminoácidos, amonio, nitrato o urea [77].

Para investigar el papel de la oxidasa alterna (Aox1) en la fisiología de *U. maydis*, se decidió determinar la actividad de la enzima en diferentes puntos de la fase de crecimiento. Lo primero que se hizo fue elaborar curvas de crecimiento para determinar y definir las fases exponencial y estacionaria en los diferentes medios de cultivo (tabla 1). La figura 7 muestra que hay dos comportamientos que dependen de la fuente de carbono. Con glucosa o etanol, el crecimiento es relativamente rápido, mientras que con lactato o glicerol, es más lento. Así, las mejores fuentes de carbono para el crecimiento de *U. maydis* fueron la glucosa y el etanol, independientemente de la fuente de nitrógeno. Con estos sustratos, los tiempos de duplicación se encuentran entre las 2 y las 5 horas; con esta información, se definió que a las 10 horas el cultivo se encuentra en fase exponencial, y a las 24 horas en fase estacionaria. Cuando se utilizó lactato o glicerol como fuente de carbono, el tiempo de duplicación fue superior a las 20 horas; con esto, se definió a las 50 horas como fase exponencial y las 125 horas como la fase estacionaria de crecimiento.

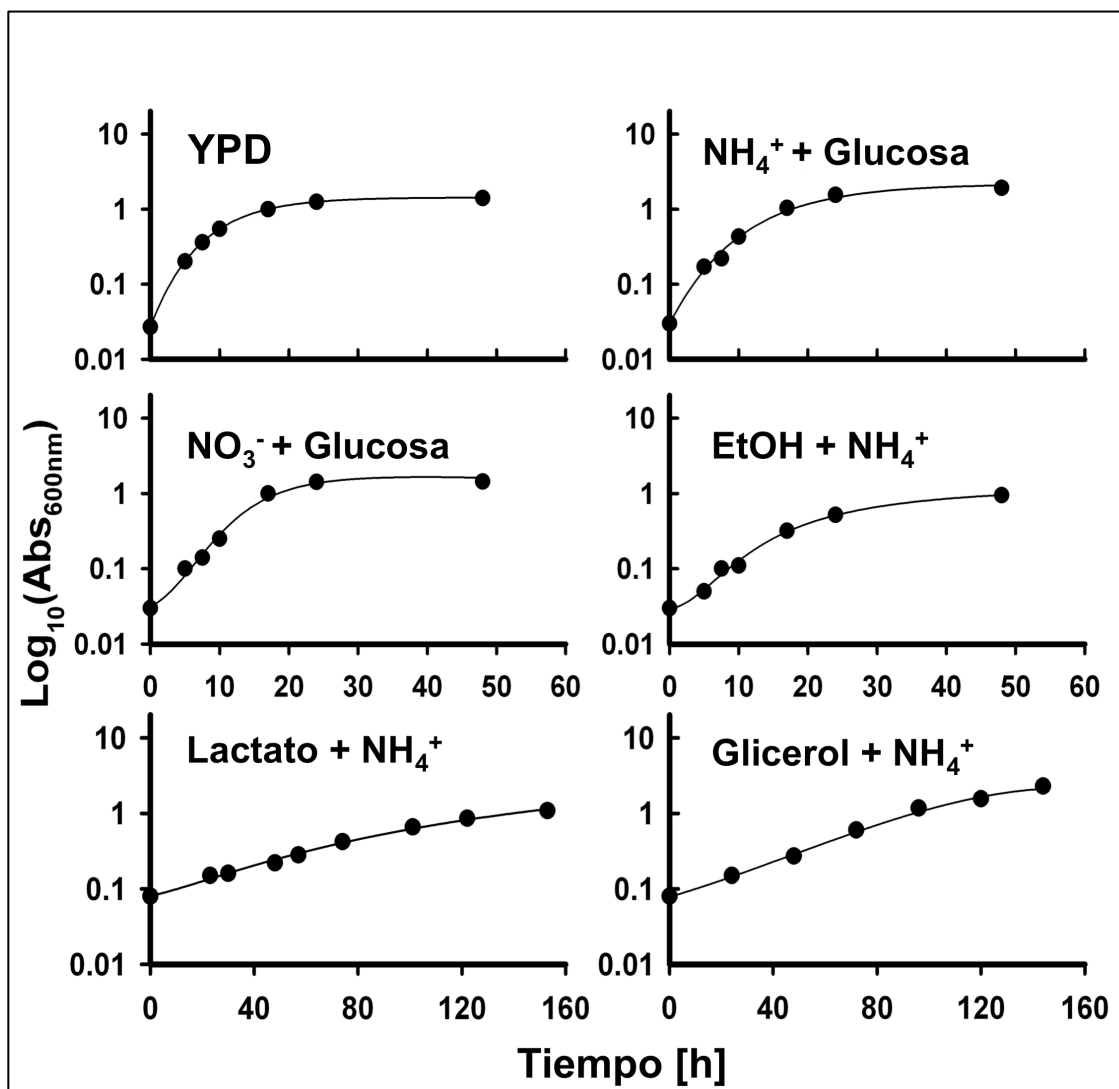


Figura 7. Curvas de crecimiento de *U. maydis* en distintas fuentes de carbono. Curva de crecimiento del esporidio de *U. maydis* silvestre en distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

El consumo de oxígeno por *U. maydis* depende de la vía citocrómica, que involucra a los cuatro complejos respiratorios clásicos, una lanzadera de glicerol-3-fosfato y al menos un par de elementos alternos, una NADH deshidrogenasa externa y una oxidasa alterna (Aox1) [22]. La Aox1 es insensible a cianuro, sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) y a los galatos como el n-octilgalato (nOG), y se activa con AMP o GMP [23]. Con el uso de inhibidores específicos de los complejos respiratorios, se

determinó la capacidad de las vías de consumo de oxígeno en células cultivadas en las distintas fuentes de carbono y nitrógeno y cosechadas en fase exponencial o estacionaria.

Como se observa en la figura 8, hay dos respuestas al añadir cianuro a los ensayos de respiración, que se explican por la cantidad de Aox1 en las células. El primer resultado muestra que las células de YPD en fase estacionara (24 h), tienen una tasa de respiración mayor tras la adición de cianuro, mientras que en la fase exponencial (10 horas) hay un 90% de inhibición con cianuro y la respiración residual (10%), que corresponde a la actividad de la Aox1, se inhibe con n-octilgalato.

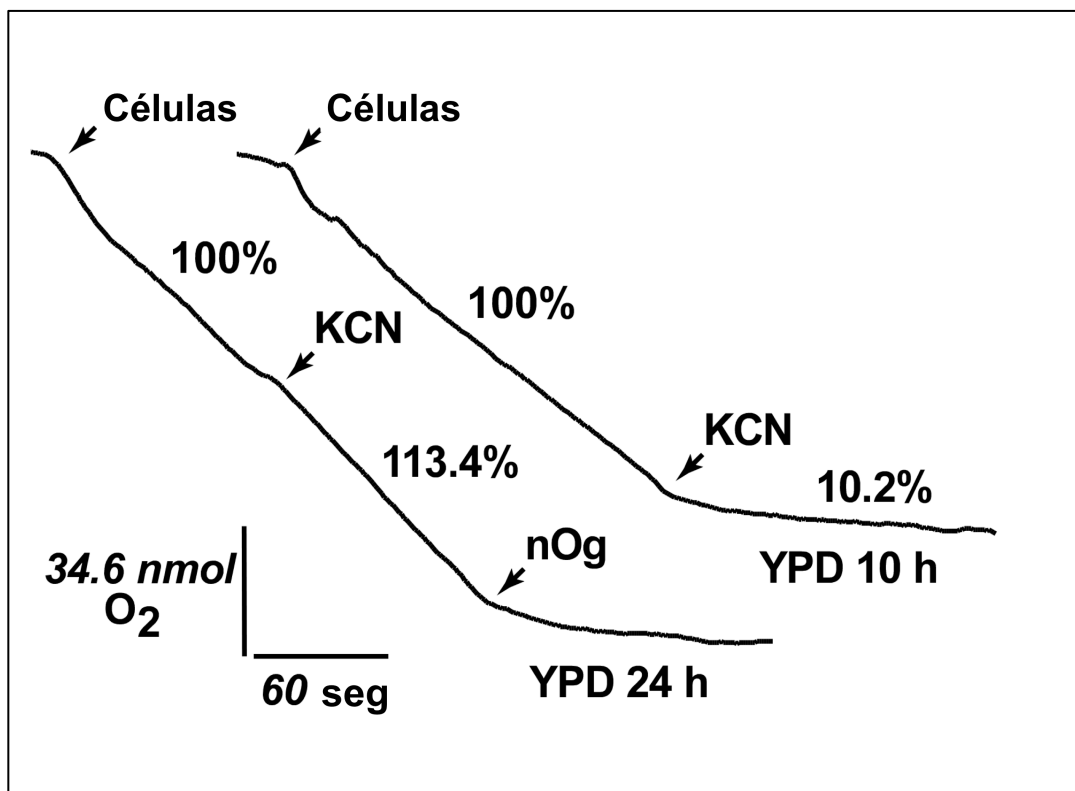


Figura 8. Consumo de oxígeno de células cosechadas en fase exponencial (10 h) y estacionaria (24 h). Gráfica representativa de las actividades respiratorias obtenidas tras la adición de cianuro y nOG. Se define como 100% a la velocidad de consumo de oxígeno antes de la adición de cianuro.

La figura 9 muestra que las células que se cultivaron en medio mínimo con glucosa y se cosecharon en fase estacionaria, también presentaron una mayor tasa de respiración tras la adición de cianuro, que indica una alta capacidad respiratoria de la Aox1 en las

células que crecen en este sustrato. Resultados semejantes se obtuvieron al inhibir con la antimicina A la vía citocrómica de *U. maydis* [78]. Cuando se utilizan fuentes de carbono como etanol, lactato o glicerol, la actividad de la Aox1 es semejante en las fases exponencial y estacionaria, o incluso mayor en la exponencial, como en el caso del lactato. Para todas las condiciones de cultivo, la actividad respiratoria residual se inhibió completamente con el nOG.

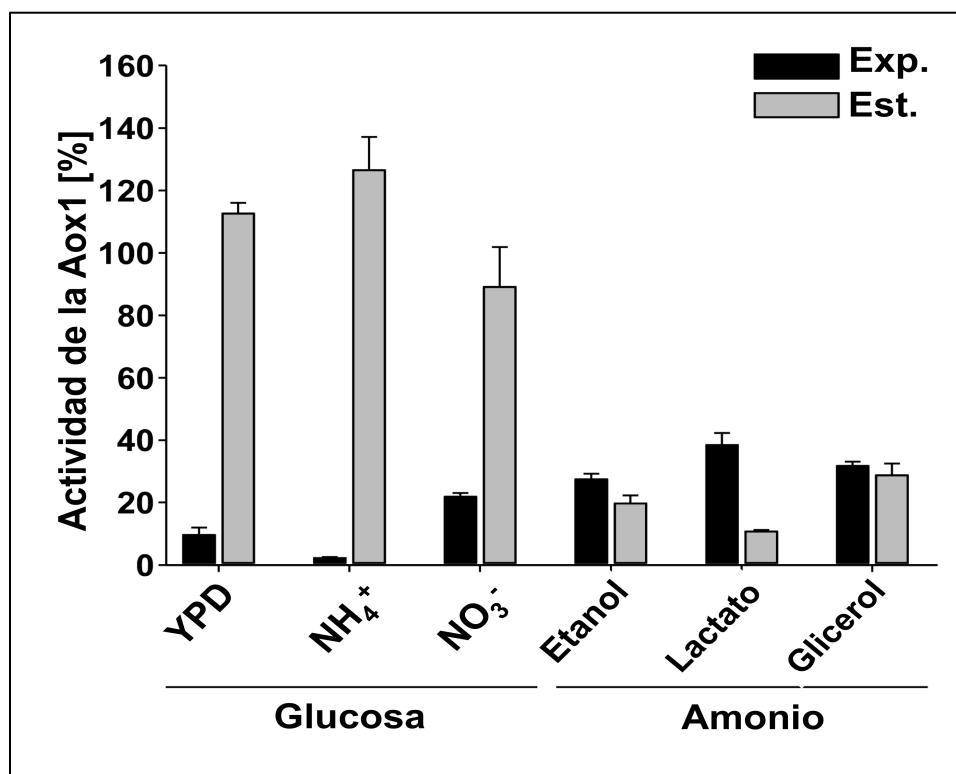


Figura 9. Capacidad respiratoria de la Aox1. Respiración resistente a cianuro que corresponde a la actividad de la Aox1. Ésta se obtuvo al añadir cianuro a las células que se cultivaron en los diferentes medios y que se cosecharon en las fases exponencial (barras en color negro) y estacionaria (barras en color gris). En la figura 8 se muestran los trazos obtenidos con células cultivadas en YPD.

En la tabla 2 se muestra la capacidad de la Aox1 en todas las condiciones de cultivo ensayadas. En resumen, la mayor capacidad de la Aox1 se presenta cuando las células se cultivaron en glucosa y se cosecharon en la fase estacionaria.

Condición de cultivo	Actividad respiratoria ($\mu\text{moles min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	
	Exponencial	Estacionaria
YPD		
- Glucosa	0.44 \pm 0.09	0.53 \pm 0.01
- CN	0.04 \pm 0.03	0.6 \pm 0.09
MM – NH ₄ ⁺		
- Glucosa	0.42 \pm 0.05	0.92 \pm 0.08
- CN	0.01 \pm 0.01	1.16 \pm 0.18
MM – NO ₃ ⁻		
- Glucosa	0.36 \pm 0.02	1.02 \pm 0.16
- CN	0.07 \pm 0.02	0.89 \pm 0.21
MM – Etanol		
- Etanol	0.68 \pm 0.04	1.14 \pm 0.14
- CN	0.18 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05
MM – Lactato		
- Glucosa	1.07 \pm 0.11	0.45 \pm 0.02
- CN	0.41 \pm 0.17	0.05 \pm 0.03
MM – Glicerol		
- Glucosa	1.04 \pm 0.04	0.65 \pm 0.09
- CN	0.33 \pm 0.3	0.18 \pm 0.04

Tabla 2. Actividad respiratoria de *U. maydis* en diferentes medios de cultivo y cosechadas en la fase exponencial y en la fase estacionaria. El consumo de oxígeno se midió antes y después de la adición de 1.0 mM de cianuro. El consumo de oxígeno posterior a la adición del cianuro se debe a la actividad de la Aox1. Los valores se reportan en $\mu\text{moles min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso húmedo.

Expresión de la Aox1 en *U. maydis*.

Los resultados indican que cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, hay un aumento en la expresión de la Aox1 en la fase estacionaria. Por tanto, para conocer el nivel donde se encuentra la regulación de la proteína, se siguieron tres estrategias experimentales que involucraron ensayos tipo Western blot para detectar la presencia de la proteína, qRT-PCR para cuantificar el transcrito y la generación de mutantes de *U. maydis*.

Los ensayos de Western blot se realizaron con un anticuerpo monoclonal contra la AOX de *S. guttatum* (voodoo lily), que nos proporcionó el Dr. T. Elthon de la Universidad

de Nebraska. Debido a la falta de anticuerpos comerciales contra las proteínas mitocondriales de *U. maydis* y a que los anticuerpos contra las proteínas de otros hongos no reconocen a las de *U. maydis*, se cuantificó la proteína de las fracciones mitocondriales mediante el método de Lowry. Se colocaron 30 μg de proteína mitocondrial en un gel desnaturalizante (PAGE-SDS) como control de carga (figura 10). El Western blot muestra una sola banda para las condiciones de cultivo en fase estacionaria y en presencia de glucosa o etanol como fuente de carbono, mientras que en los otros carriles, que corresponden a las células con glucosa o etanol cosechadas en fase exponencial y a las células con glicerol o lactato cosechadas en la fase exponencial o estacionaria, no apareció la señal de la Aox1, lo que indica una baja concentración de la Aox1 en estas mitocondrias. Estos datos confirman los resultados del consumo de oxígeno (figura 10).

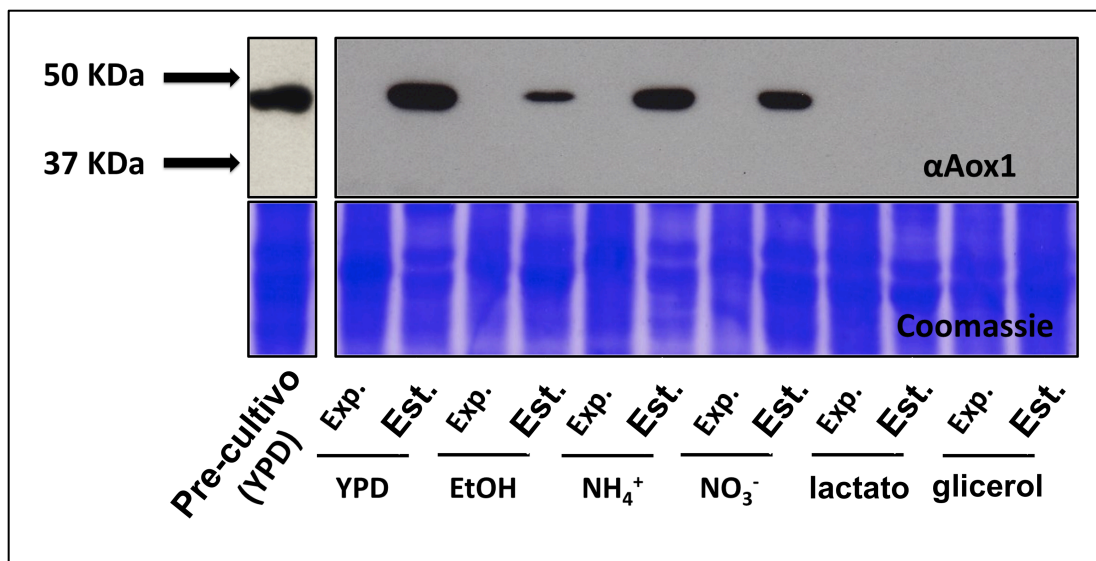


Figura 10. Western blot de la Aox1 de *U. maydis*. En la parte superior se muestra el Western blot utilizando anticuerpos contra la AOX de *S. guttatum*. En la parte inferior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, que sirvió como control de carga.

También se realizó una qRT-PCR a partir del RNA total de las células cultivadas en las distintas condiciones, para cuantificar el transcrito del gen que codifica para la Aox1. Como control de expresión se utilizó el RNA mensajero del factor del inicio de la traducción eIF-2B. Los datos se normalizaron utilizando la expresión del RNAm de la Aox1 de las células de YPD cosechadas en la fase exponencial. Los resultados muestran que a pesar de los grandes cambios en la actividad y en la expresión de la enzima, en

todas las condiciones de cultivo se expresó el RNA mensajero de la Aox1, y que solo en los cultivos de YPD y etanol de 24 horas aumentó casi al doble.

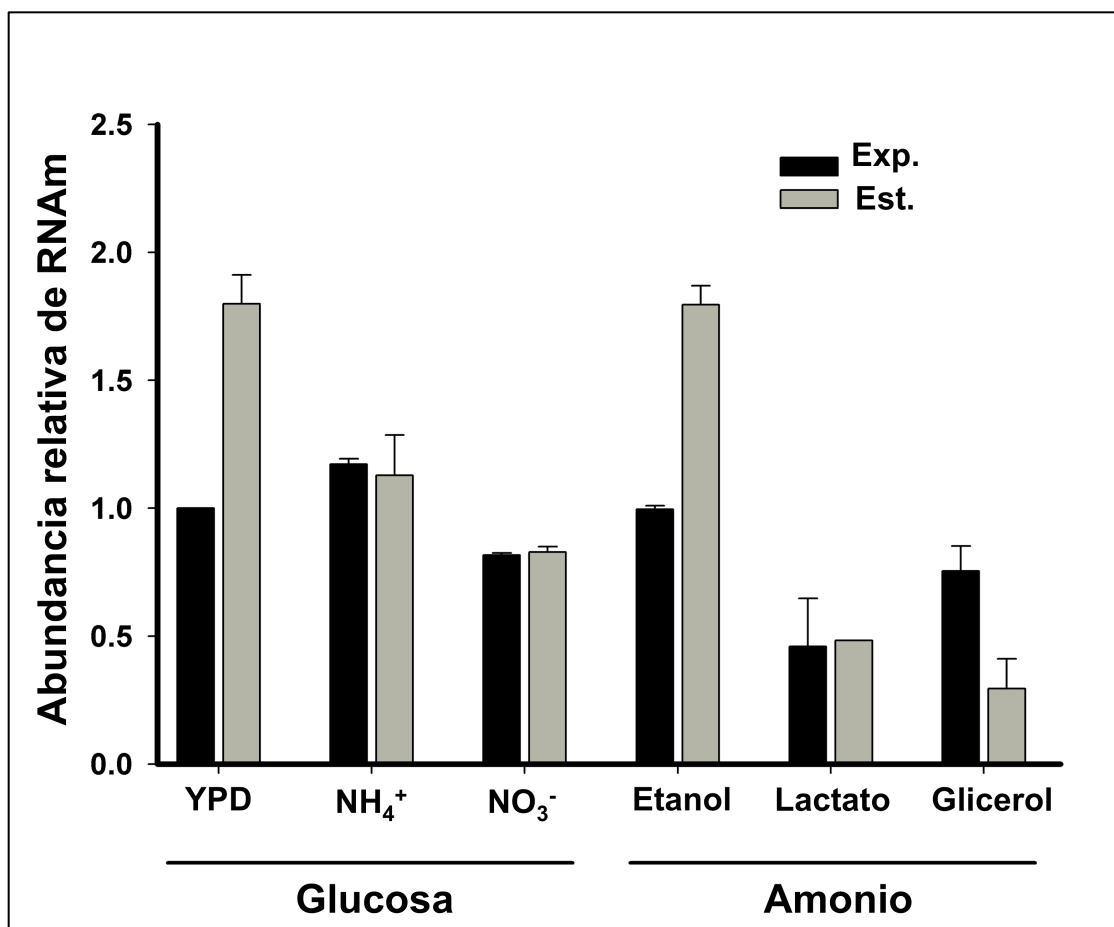


Figura 11. Abundancia relativa del RNAm de la Aox1 de *U. maydis* por qRT-PCR. Las células cosechadas en la fase exponencial se representan en barras color negro y las de fase estacionaria en barras en color gris. La fuente de carbono y nitrógeno se indican en la parte inferior.

La tercera estrategia consistió en estudiar con más detalle la expresión de la Aox1, por lo que se generaron varias mutantes de *U. maydis*, las cuales se describen de forma general en la figura 12 y con más detalle en la tabla del anexo II.

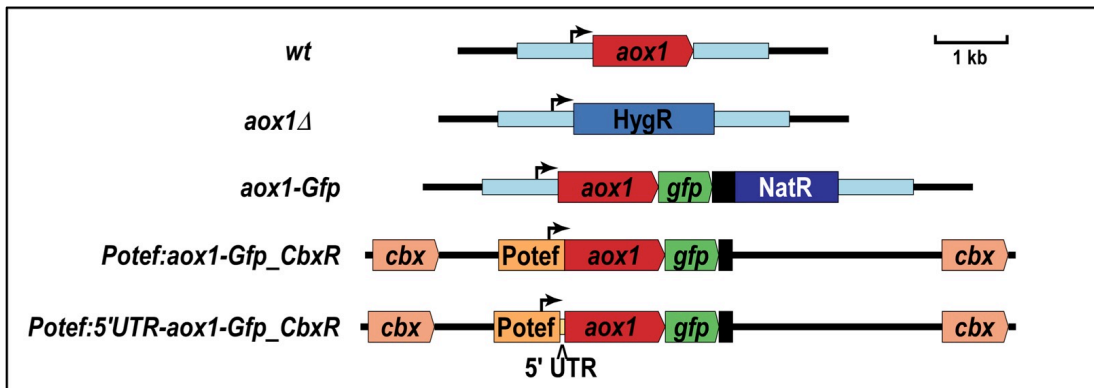


Figura 12. Esquema de las construcciones de las cepas de este trabajo. En esta figura se describen las características generales de las distintas mutantes generadas para este proyecto, así como la ubicación del gen de resistencia a higromicina y el de la proteína verde fluorescente. HygR: higromicina. *gfp*: proteína verde fluorescente.

Inicialmente se generó una cepa que expresa a la Aox1 con la proteína verde fluorescente (Gfp) en el extremo C-terminal, bajo su propio promotor (FB2aox1-Gfp). Para determinar la localización, la expresión y la funcionalidad de esta enzima que tiene pegada a la Gfp, se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia (figura 13), se observó su expresión durante el crecimiento celular (figura 14), y se determinó su capacidad catalítica (figura 19).

En la figura 13 se observa, mediante una microscopía en contraste de fases (DIC) [79], la morfología alargada característica del esporidio de *U. maydis* cuando se cultiva en medio completo y se cosecha en la fase estacionaria del crecimiento. Utilizando el mismo campo de observación pero con los filtros específicos para el color verde, se evidenció la expresión de la Aox1 mediante la fluorescencia de la proteína Gfp. Además, se obtuvo, por microscopía de fluorescencia, la localización de las mitocondrias en *U. maydis* utilizando el Mitotracker red. Al realizar una superposición de las microfotografías, se comprobó la co-localización de la Gfp con el marcador mitocondrial y por tanto, la correcta ubicación de la Aox1 en la mitocondria.

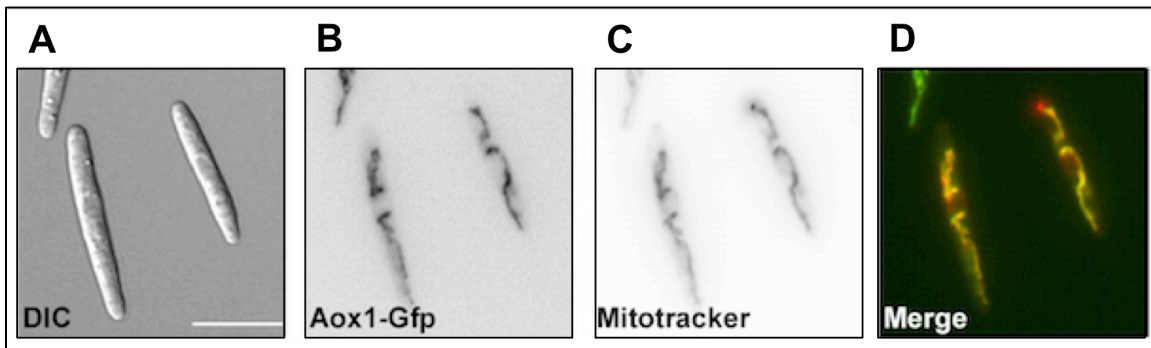


Figura 13. Localización de la Aox1-Gfp en *U. maydis*. En el panel A se muestra una micrografía de las células de *U. maydis* en contraste de fases (DIC). Utilizando el mismo campo, en el panel B se observa la fluorescencia de la Aox1-Gfp. En el panel C, se observan las mitocondrias teñidas con Mitotracker Red. En el panel D, se obtiene la sobreposición de los paneles B y C y se muestra el color amarillo debido a la co-localización de la Aox1-Gfp con el Mitotracker Red.

Para estudiar el papel de la Aox1 en el crecimiento del esporidio de *U. maydis*, se generó una mutante en donde se reemplazó el gen *aox1* por el gen de resistencia a higromicina, HygR (Figura 12 y anexo 2). En la figura 14 se observa que sin importar la fuente de carbono del medio de cultivo, el crecimiento de la cepa mutante que carece de la Aox1 (FB2 $aox1\Delta$) fue semejante al de la cepa silvestre, mostrando el mismo comportamiento en las fases de crecimiento, por lo que se puede concluir que esta enzima no es determinante para el crecimiento de *U. maydis* en medios de cultivo artificiales.

Por otro lado, en los cultivos de medio mínimo con glucosa, la acidificación del medio llevó el pH hasta 3 (datos no mostrados), lo que puede generar un estrés a las células y afectar el crecimiento de éstas y disparar la expresión de la Aox1 en la fase estacionaria. Para estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento celular, se cultivaron a las levaduras (FB2 y $aox1\Delta$) en medios de cultivo con y sin el amortiguador de pH MOPS. La figura 14 muestra que el crecimiento fue similar cuando el pH se mantiene constante o cuando éste varía, lo que sugiere que la acidificación del medio no afecta el crecimiento de las células.

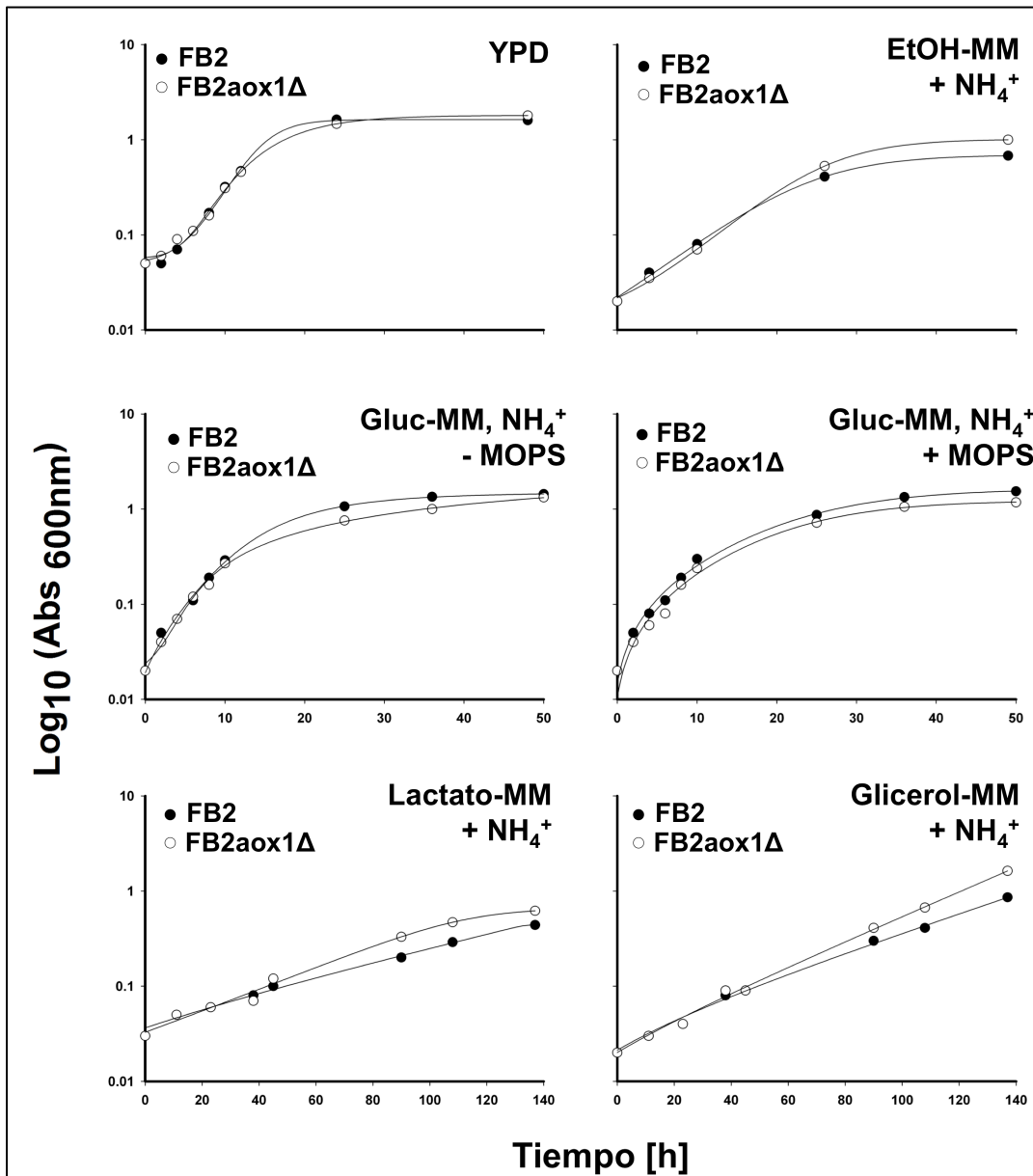


Figura 14. Curva de crecimiento de *U. maydis* en las distintas fuentes de carbono. Crecimiento celular de la cepa silvestre y la cepa que carece de la Aox1 en presencia de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno, determinado por la absorbencia a una D.O._{600nm}.

Adicionalmente, con la mutante que expresa a la Aox1-Gfp, se realizó un Western blot con el anticuerpo contra la Gfp, para identificar si la expresión de la Aox1 se afecta por el cambio de pH en el medio de cultivo. La figura 15 muestra que la expresión de la Aox1 es independiente de la acidificación del medio durante el crecimiento celular.

Asimismo, confirma que el posible estrés generado por el cambio en el pH no afecta ni el crecimiento ni el patrón de expresión de la Aox1.

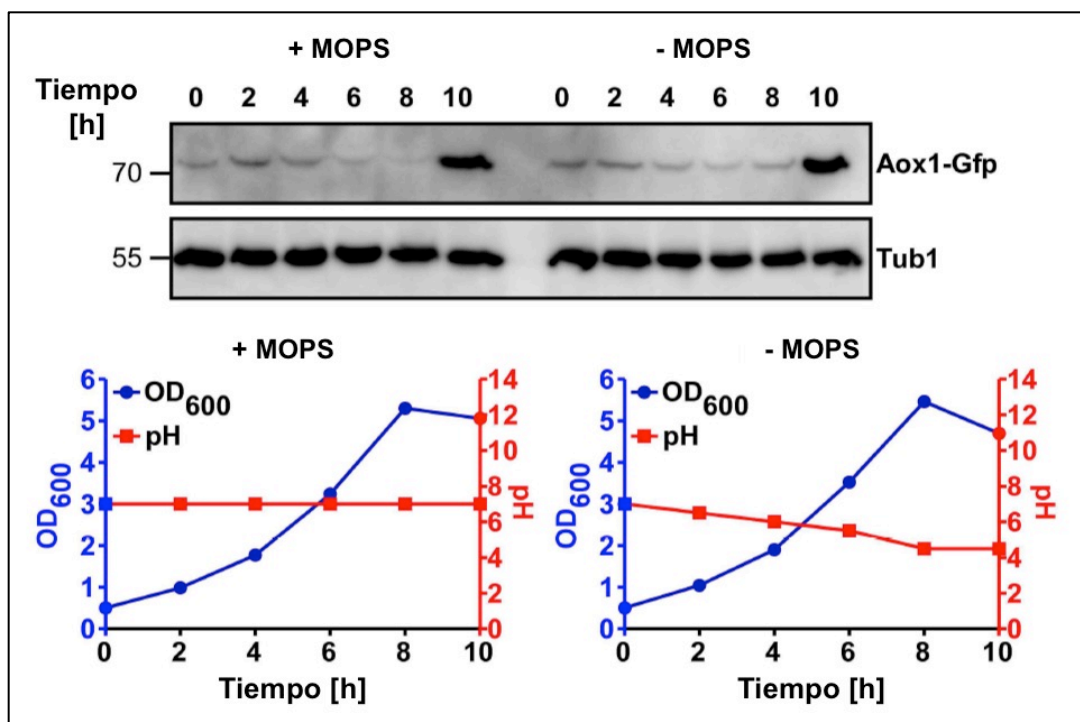


Figura 15. Crecimiento celular de FB2aox1-Gfp. Panel inferior, curva de crecimiento y pH de la mutante FB2aox1-Gfp, en medio de cultivo sin amortiguar y amortiguado con 100 mM de MOPS. Panel superior, Western blot de extractos celulares contra la Gfp, utilizando como control de carga, anticuerpos contra Tub1.

La Aox1 se regula a nivel de la transcripción

Después de validar la funcionalidad de las cepas mutantes, se decidió estudiar a qué nivel se da la regulación de la Aox1. Con microscopía de fluorescencia se confirmó, en la mutante FB2aox1-Gfp, la diferencia en cantidad de la Aox1 en las células de fase exponencial y de fase estacionaria. En la figura 16 se observan las células de fase exponencial identificadas con biotina marcada con TRITC, un fluorocromo acoplado a la avidina (biotina/avidina-TRITC) y células cosechadas en la fase estacionaria que no están marcadas con el fluorocromo, para comparar, en el mismo campo, los dos tipos de célula utilizando los filtros de fluorescencia específicos. Con este experimento se confirma que la expresión de la Aox1-Gfp sólo se da en la fase estacionaria del crecimiento.

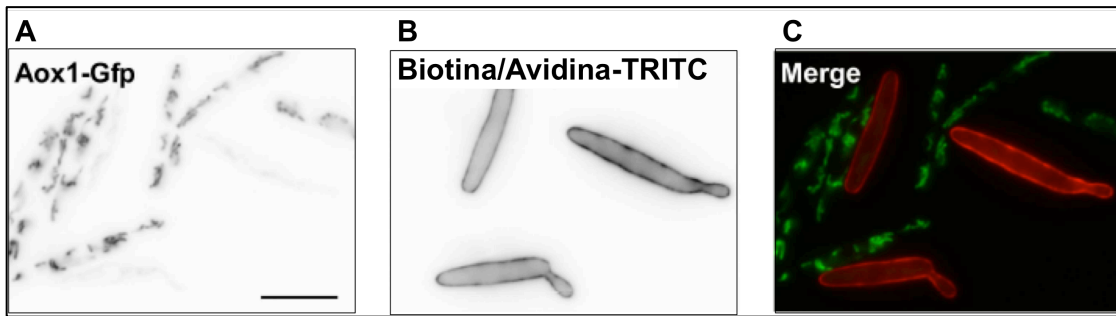


Figura 16. Microscopía de fluorescencia en células en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Panel A: células levaduriformes con la construcción Aox1-Gfp, cosechadas en la fase estacionaria de crecimiento. Panel B: células levaduriformes cosechadas en fase exponencial marcadas con biotina/avidinaTRITC. Panel C: mezcla de filtros que identifica a las células cosechadas en ambas fases de crecimiento.

Para estudiar la dinámica de la expresión de la Aox1 en *U. maydis*, se siguió en el tiempo el crecimiento levaduriforme, tomando muestras con intervalos de dos horas, y se analizó la fluorescencia de la Aox1-Gfp por citometría de flujo. El cultivo se inició con un inóculo de células de un pre-cultivo de 24 h en fase estacionaria, por lo que al tiempo cero debe de haber Aox1. La figura 17 muestra que en las primeras 10 h, en el medio de YPD, hay una disminución en la cantidad de la Aox1, seguida de su síntesis. Las células silvestres, que carecen de la Gfp, básicamente no emiten fluorescencia a esta longitud de onda. A las 10 horas de iniciar el cultivo (fase exponencial), la fluorescencia de la Gfp alcanzó el valor mínimo, mientras que a partir de las 12-14 horas de la curva de crecimiento, cuando se inicia la trayectoria hacia la fase estacionaria, la fluorescencia aumentó gradualmente, confirmando que la expresión de la Aox1 se da cuando las células se aproximan a la fase estacionaria.

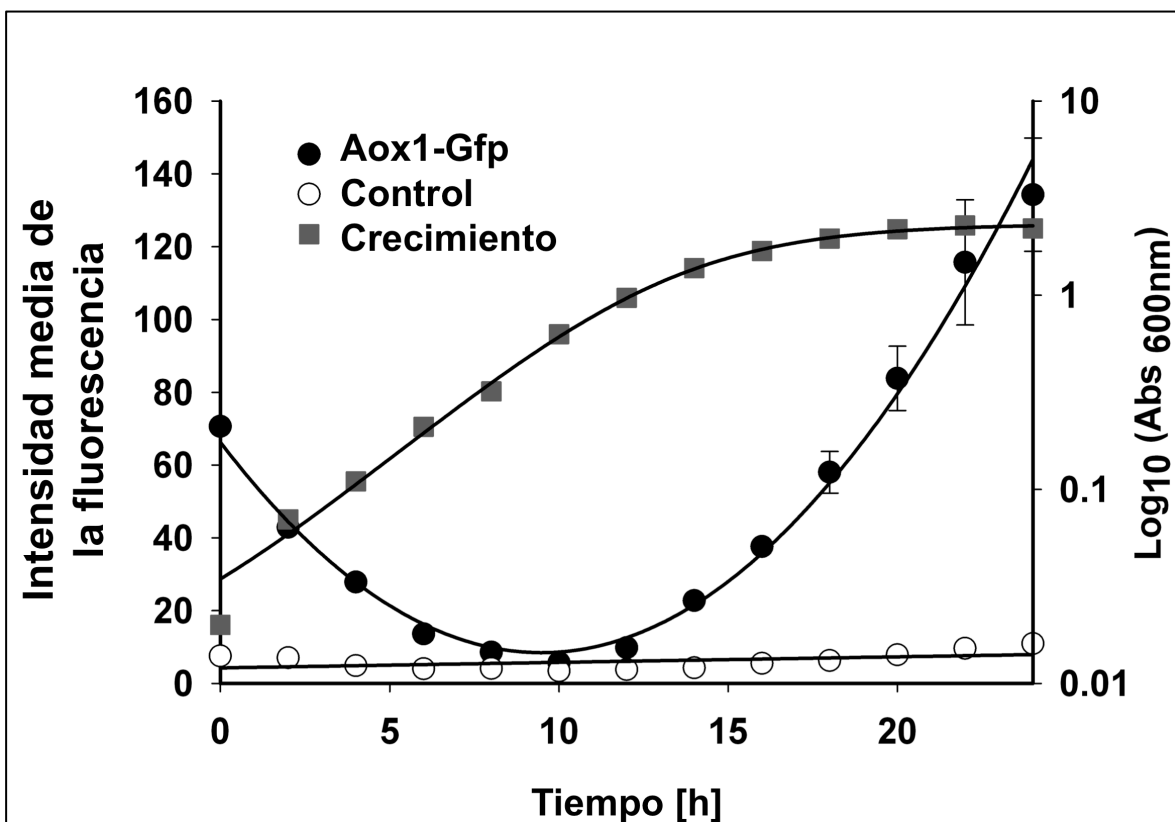


Figura 17. Curso temporal de células que expresan la Aox1-Gfp, cultivadas en YPD. Los círculos en color negro, indican la fluorescencia que se detectó por FACS. Los círculos en color blanco, señalan el control de fluorescencia endógena en células tipo silvestre. Los cuadros grises muestran el crecimiento celular a lo largo del tiempo.

Además de la mutante FB2aox1-Gfp, se generaron un par de cepas con el genotipo *aox1-Gfp* (anexo II), reemplazando el promotor de la cepa silvestre por un promotor constitutivamente activo, P_{otef} , con el fin de identificar, por medio de fluorescencia, el nivel en el que se regula la expresión de la Aox1 en las distintas fuentes de carbono. En una de las mutantes se mantuvo intacta la región 5' UTR del *aox1*, para estudiar una posible regulación a nivel de la traducción.

Con estas cepas se determinó, por microscopía de fluorescencia, la expresión de la Gfp en células cultivadas en medio completo y cosechadas en la fase exponencial y en la fase estacionaria. En la figura 18 se observa que la fluorescencia está presente en las dos fases de crecimiento, lo que indica que la regulación de la expresión de la Aox1 se da principalmente a nivel de la transcripción, ya que la síntesis constitutiva del RNAm de la

Aox1 produjo la síntesis de la proteína en las dos fases, exponencial y estacionaria. Este resultado descarta que la regulación a nivel de la traducción sea la única que se lleva a cabo.

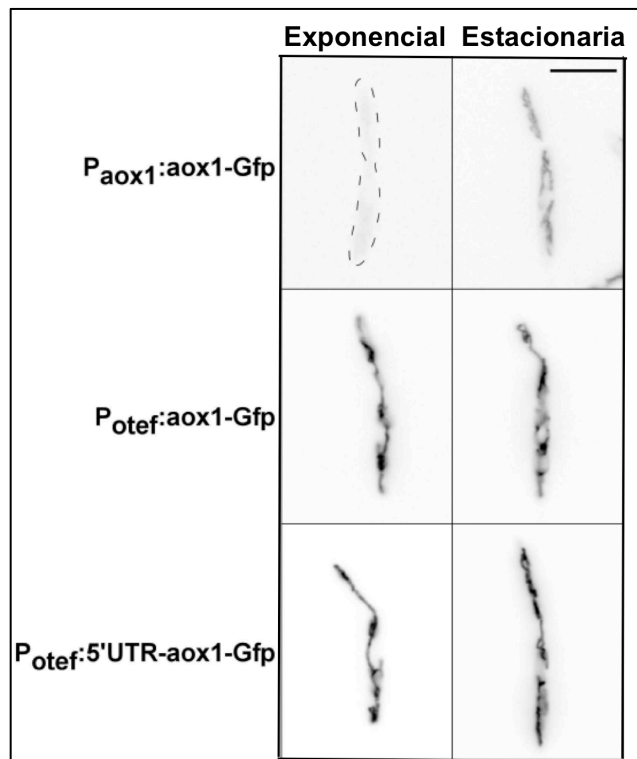


Figura 18. Análisis de fluorescencia bajo la influencia de un promotor constitutivamente activo. Panel superior: células mutantes Aox1-Gfp bajo el control del promotor silvestre para la Aox1. Panel medio e inferior: células mutantes Aox1-Gfp bajo el control de un promotor constitutivamente activo. Todas las células se cultivaron en medio completo y se cosecharon en la fase exponencial o en la fase estacionaria.

Con base en los ensayos de consumo de oxígeno, se determinó la capacidad de la Aox1 en las distintas células mutantes generadas en este estudio (figura 12 y anexo II). La figura 19 muestra los resultados en células de fase estacionaria. La capacidad de la Aox1 en la cepa silvestre es muy grande y en la cepa FB2aox1-Gfp, en donde la proteína está bajo el control del promotor silvestre, la capacidad de la Aox1 es menor. También se observa que la mutante FB2aox1 Δ perdió la capacidad respiratoria asociada a la Aox1. Por otro lado, en las mutantes con el promotor constitutivamente activo, la expresión de la Aox1-Gfp aumentó y la capacidad respiratoria de esta enzima fue comparable a la de las

células de tipo silvestre. En todos los ensayos de oximetría se asigna el 100% al consumo de oxígeno previo a la adición de cianuro, y el porcentaje de la respiración después de la adición de cianuro corresponde a la capacidad respiratoria de la Aox1.

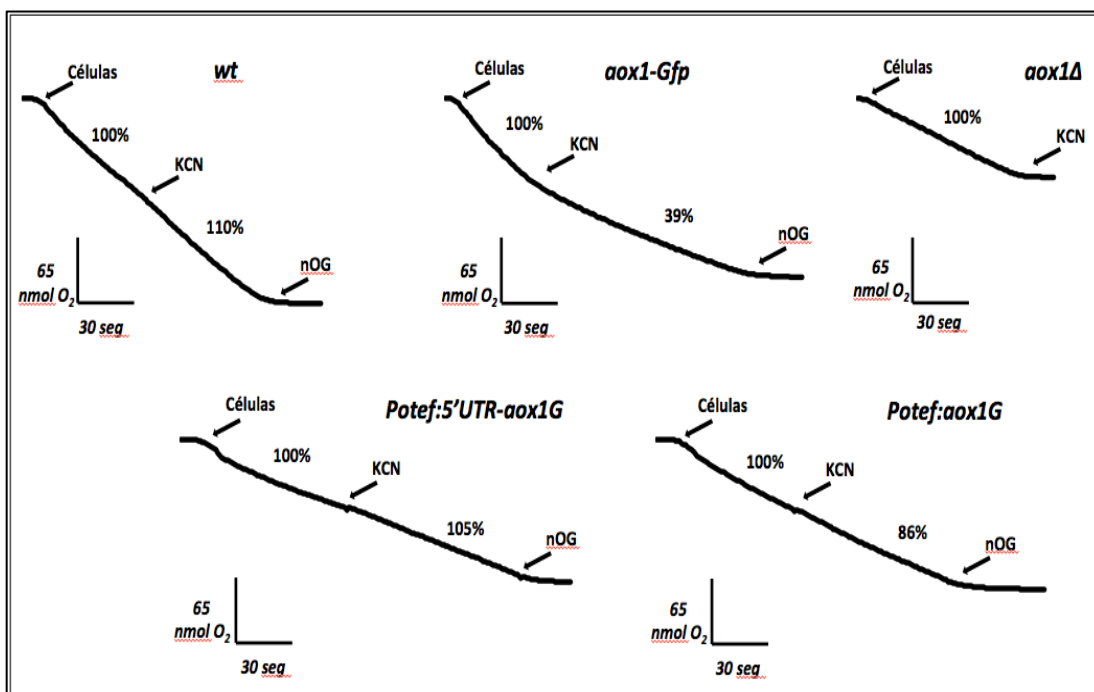


Figura 19. Validación de las mutantes mediante oximetría. Experimentos representativos del consumo de oxígeno de cada cepa mutante. En la parte superior de cada experimento representativo se indica la cepa utilizada.

Para determinar el aporte de la vía alterna al consumo de oxígeno en la cepa FB2, se invirtió el orden de adición de los inhibidores en los ensayos de oximetría. Con el objetivo de inhibir primero a la Aox1 y así determinar la actividad de la vía clásica, se adicionó nOG y posteriormente cianuro a los experimentos de respiración. En la figura 20 se observa que el porcentaje de inhibición con nOG fue de un 15% en todas las condiciones, inclusive en las células que carecen de la Aox1, lo que indica que la principal vía respiratoria de *U. maydis*, en condiciones normales, es la citocrómica y que cuando se inhibe la vía clásica, sin importar las fuentes de carbono y nitrógeno, la vía alterna es la que mantiene activo el metabolismo del hongo. La adición de nOG a la mutante que

carece de la Aox1 produjo una inhibición del 10%, que podría deberse a que el nOG, a esas bajas concentraciones, inhibe a alguno de los complejos respiratorios.

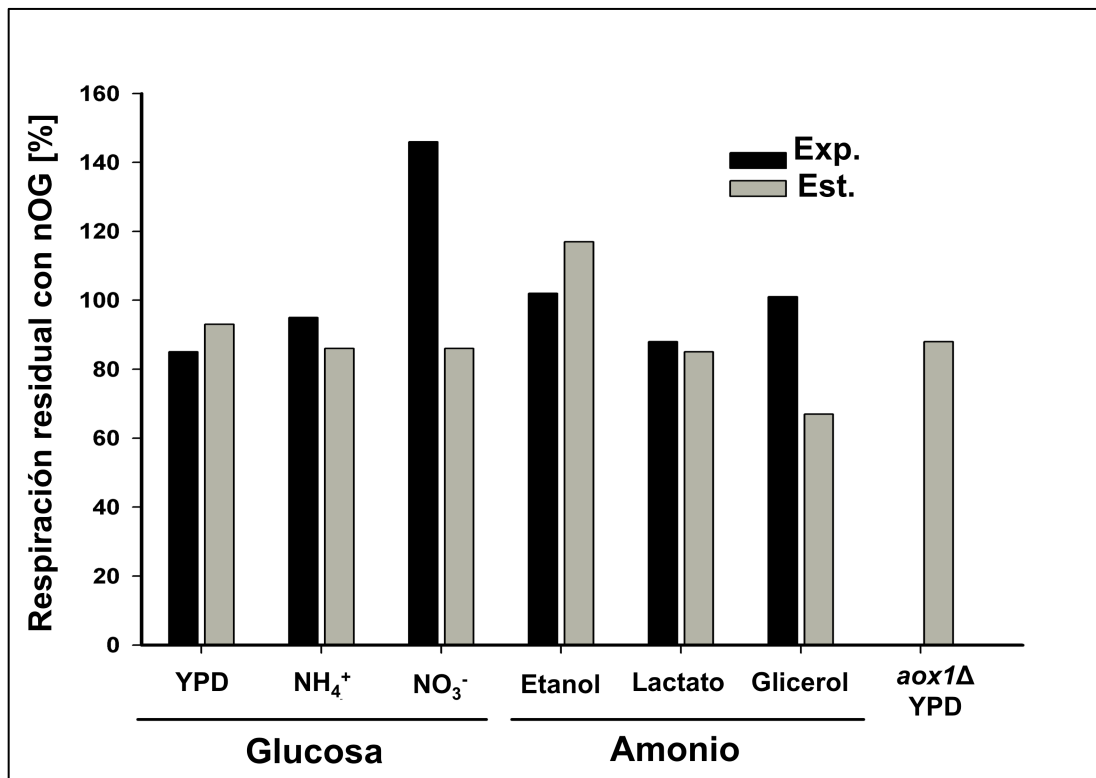


Figura 20. Porcentaje de respiración por la vía citocrómica de *U. maydis*. Respiración residual posterior a la adición de nOG en los ensayos de oximetría, las barras negras indican células cosechadas en fase exponencial y las barras en color gris, células cosechadas en fase estacionaria, en las condiciones de cultivo mencionadas. La mutante *aox1Δ* se cultivó en YPD.

La Aox1 no es indispensable para el crecimiento levaduriforme de *U. maydis*, ni como mecanismo de defensa ante diversos tipos de estrés.

Para un sistema *in vivo*, es complicado interpretar los resultados que se obtienen haciendo uso de los inhibidores para la AOX. Hay estudios que indican que estos compuestos afectan otros procesos metabólicos. Por ejemplo, el crecimiento de *S. cerevisiae* se inhibe en presencia de galatos, aun cuando esta levadura carece de la AOX

[80, 81]. En este trabajo se observó que el nOG produjo una ligera inhibición de la respiración en la cepa que carece de la Aox1 (figura 20), por lo que el uso de inhibidores de la AOX no es el mejor método para estudiar la función de esta enzima en procesos celulares. Por lo tanto, para conocer el papel biológico de la Aox1 en *U. maydis*, se decidió usar la mutante *aox1Δ* (figura 12) y analizar la participación de esta proteína en diferentes procesos.

Para estudiar la morfología del esporidio, se realizó una microscopía óptica de contraste de fases. La gemación en las células se lleva a cabo en la región apical, y un cambio en esta morfología indicaría algún tipo de estrés. Como se muestra en la figura 21, no hay diferencias ni en la morfología del esporidio ni en la gemación entre la cepa silvestre y las distintas mutantes, lo que sugiere que la Aox1 no participa en estos procesos.

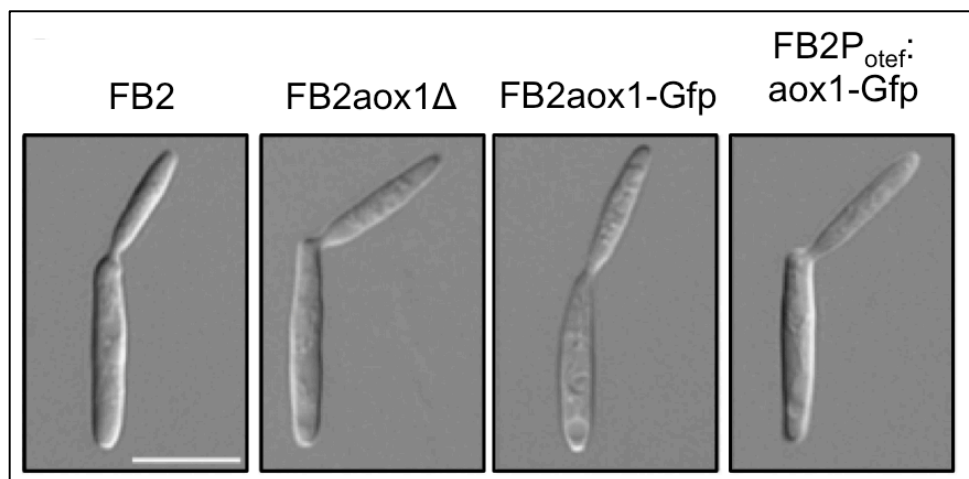


Figura 21. Gemación celular del esporidio de las mutantes de *U. maydis*. Micrografías en contraste de fases de la gemación de la cepa silvestre (FB2) y las distintas mutantes de la Aox1, generadas en *U. maydis*.

Además de estudiar la morfología, también se analizó si la Aox1 está relacionada con la resistencia al estrés por frío o calor, lo que permitiría el crecimiento de *U. maydis* ante los cambios de temperatura. Se realizaron ensayos de crecimiento a 20 °C, que es por debajo de la temperatura óptima de crecimiento (28 °C), a 28 °C y a 37 °C. Como se observa en la figura 22, el crecimiento a las diferentes temperaturas fue el mismo para las cepas silvestres (FB2 y AB33) y sus respectivas mutantes. Por lo tanto, la presencia de la

Aox1 no aumentó ni disminuyó el crecimiento en cada una de las temperaturas, lo que indica que esta enzima no está relacionada con un efecto protector ante un estrés térmico que afecte a *U. maydis*.

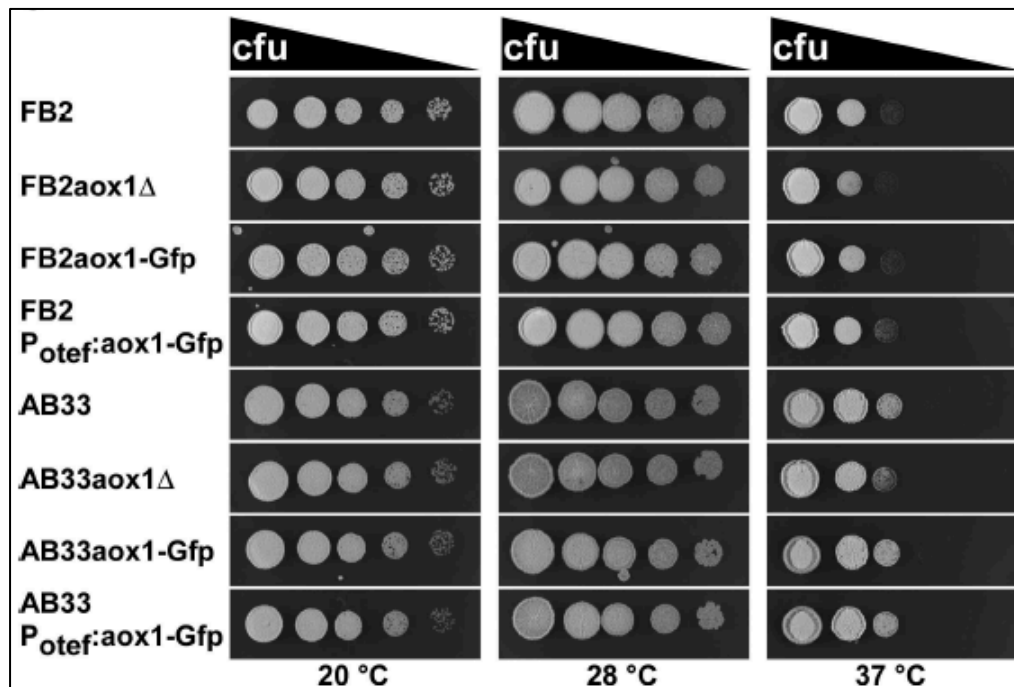


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del esporidio de *U. maydis*. Crecimiento celular del esporidio de las mutantes de *U. maydis*, mediante diluciones 1:5, iniciando con una densidad celular de 0.5 de abs. a 600 nm a dos temperaturas distintas a la óptima de crecimiento.

Análisis de desecación.

Como se ha reportado, el papel protector de la AOX contra diversos tipos de estrés es de gran importancia en muchos organismos. Recientemente, un estudio indicó que la AOX es esencial para mantener la respiración mitocondrial al exponer las plantas a la sequía, un estrés abiótico que inhibe la vía citocrómica [82]. Con base en este reporte y con el fin de probar una función similar de la Aox1, se estudió la capacidad protectora de esta enzima cuando *U. maydis* se enfrenta a factores de sequía, mediante el proceso de recuperación del crecimiento celular. Para esto se probaron todas las cepas de la FB2 y se sometieron a una prueba de desecación por cuatro horas. La figura 23 muestra que la tasa de

supervivencia se vio afectada tras la desecación, mostrando un 50% con respecto al tiempo cero; sin embargo, la presencia de la Aox1 no fue un factor determinante en la protección contra la desecación, ya que el número de colonias que se recuperaron fue semejante para todas las mutantes.

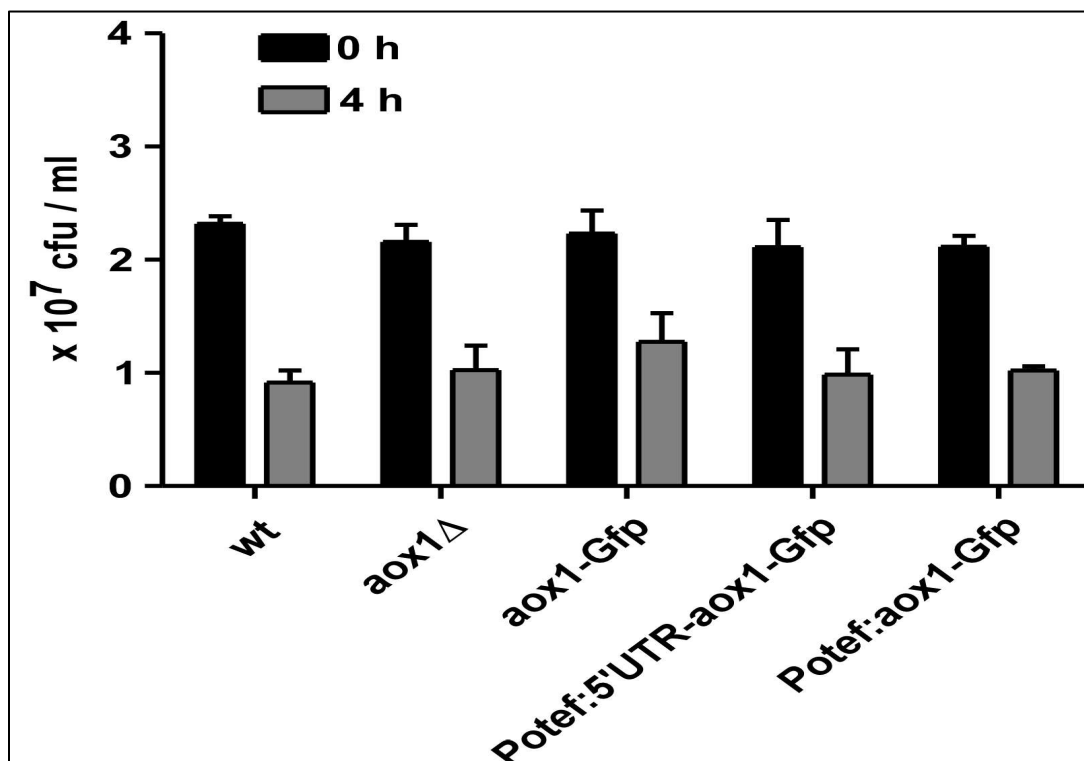


Figura 23. Efecto de la desecación en *U. maydis*. Unidades formadoras de colonias generadas tras un proceso de desecación de cuatro horas, a las distintas mutantes de *U. maydis* que se generaron.

La Aox1 y su papel en la defensa contra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Mediante un ensayo en medio sólido se determinó el radio de inhibición generado por la exposición directa a metil-viológeno (paraquat), un potente generador de ROS en el metabolismo celular, en cuatro de las cepas, la tipo silvestre, la mutante que carece de la Aox1 y las que sobreexpresan a la proteína con y sin la región 5'UTR, La figura 24 muestra que la inhibición que produce el paraquat en el crecimiento de *U. maydis* fue independiente de la presencia, ausencia o sobreexpresión de la Aox1. Con estos

resultados se puede concluir que esta proteína no participa en una disminución en la generación de especies reactivas de oxígeno.

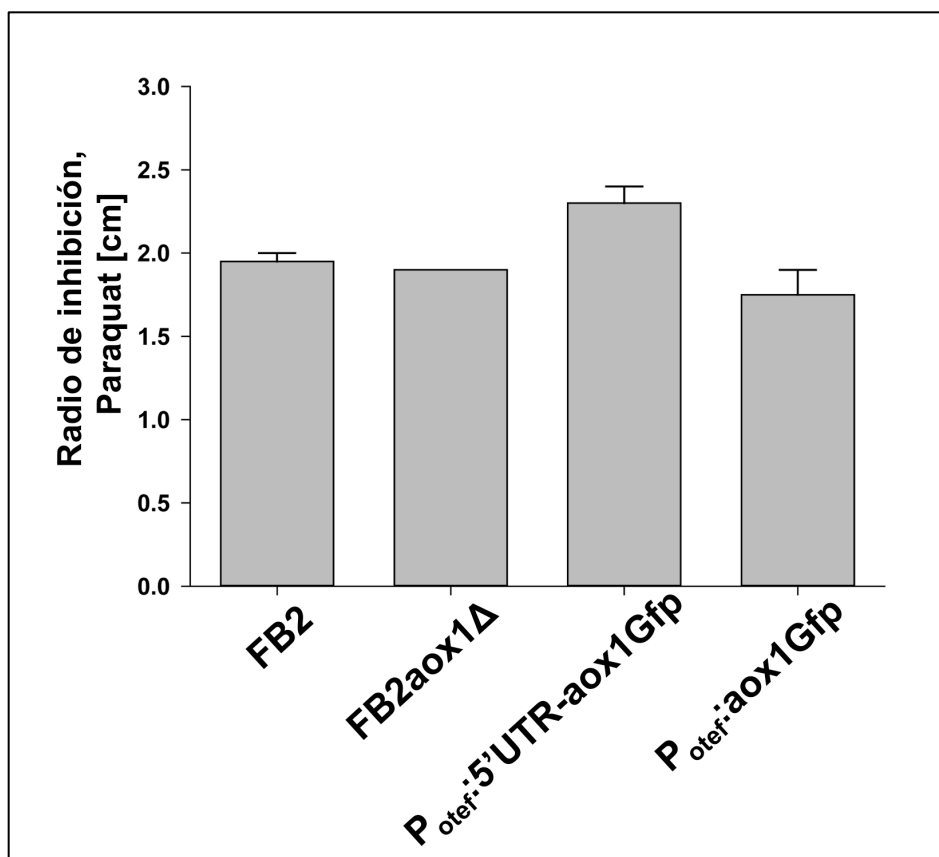


Figura 24. Efecto del estrés oxidativo en *U. maydis*. Radio de inhibición generado por células con diferente expresión de Aox1, expuestas en medio YPD sólido a 2.0 mmoles de paraquat.

Crecimiento filamentoso e infeccioso de *U. maydis*.

Para estudiar el crecimiento filamentoso de *U. maydis* se utilizaron las cepas AB33 con el genotipo silvestre y AB33 con el genotipo *aox1Δ*. La cepa AB33 tiene la capacidad de crecer en forma filamentosa. Como se observa en el panel A de la figura 25, la eliminación del gen *aox1* o su sobreexpresión no afectó la formación del septo en el polo basal de la hifa y tampoco se generaron grandes cambios en el crecimiento unipolar de la hifa. Adicionalmente, no hubo un aumento en el crecimiento bipolar de las células, lo que sugiere que los procesos que dependen de los microtúbulos no se afectaron. Por otro

lado, en el panel B se observa que cuando la enzima se expresa con la Gfp, hubo un aumento de aproximadamente un 5% en el crecimiento bipolar de la hifa.

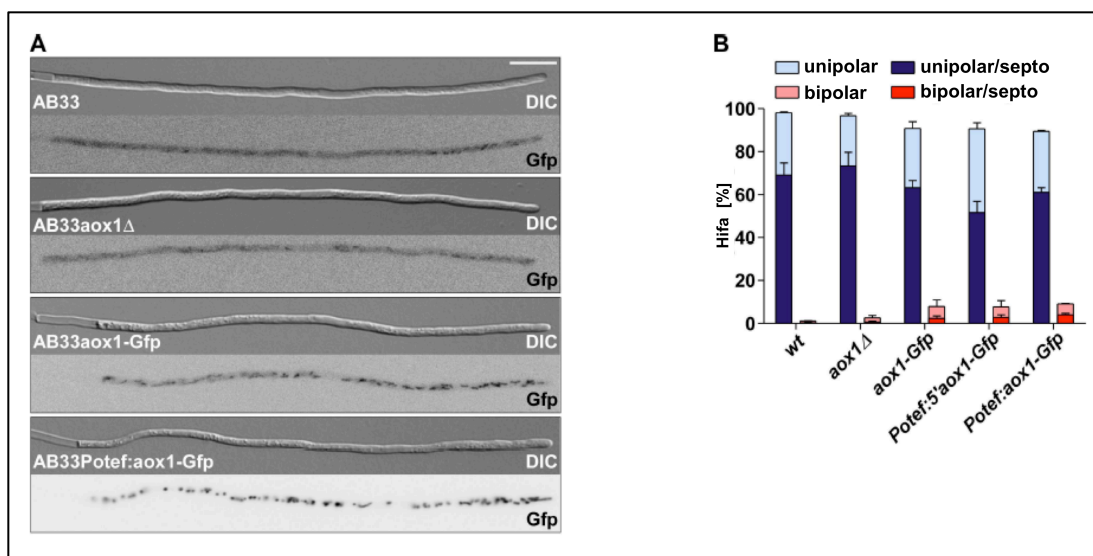


Figura 25. Crecimiento filamentoso de la cepa AB33 de *U. maydis*. A) Crecimiento obtenido tras 8 horas post-incubación (8 h.p.i), el tamaño de la barra equivale a 10 μ m. B) Porcentaje unipolar, bipolar y de formación del septo de la hifa. n=3 experimentos independientes con al menos 100 hifas analizadas. Los valores se normalizaron al 100%.

También se estudió la infección de las plantas de maíz usando las cepas compatibles FB1 y FB2, y las mutantes FB1aox1Δ y FB2aox1Δ. Para este ensayo se realizaron precultivos independientes de cada una de las cuatro cepas y se obtuvo una suspensión celular mezclando la misma proporción de cada par de cepas. Las plántulas del maíz se inyectaron, por un lado con las células tipo silvestre (FB1-FB2) y por otro con las células mutantes (FB1aox1Δ-FB2aox1Δ). El progreso de la infección y la capacidad infectiva se cuantificó por medio de la coloración de las hojas (antocianina) y la presencia de tumores de distintos tamaños. Como se muestra en la figura 26, la capacidad infectiva y el desarrollo de los síntomas de la infección fue similar en la cepa silvestre y en la mutante que carece de la Aox1, lo que indica que esta enzima tampoco tiene un papel relevante durante el desarrollo, temprano o tardío, de *U. maydis* en el interior de la planta.

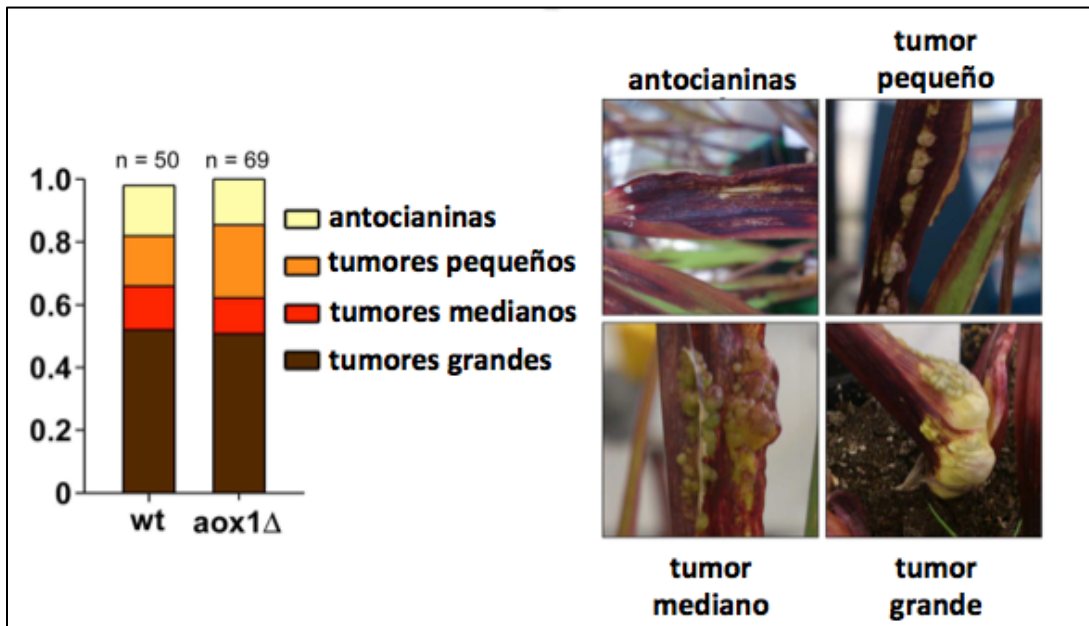


Figura 26. Infección de la planta utilizando los pares celulares FB1 x FB2, y FB1 $aox1\Delta$ x FB2 $aox1\Delta$. En la gráfica se indica el porcentaje de los niveles de infección encontrados en las plantas.

La Aox1 es determinante para hacer frente a la inhibición de la vía citocrómica en *U. maydis*.

Para conocer si la Aox1 tiene un papel importante en el esporidio y en el filamento cuando se inhibe la vía citocrómica, se realizaron ensayos de crecimiento utilizando la antimicina A para inhibir al complejo III. La figura 27 muestra que el radio del halo de inhibición del crecimiento en las células que tienen a la Aox1, independientemente de la fusión con la Gfp, fue menor, aproximadamente la mitad del que se obtiene con la mutante que carece de la Aox1. Este resultado no nos sorprendió, ya que el consumo de oxígeno -y por tanto, la síntesis de ATP- se inhibió completamente con cianuro en esta mutante.

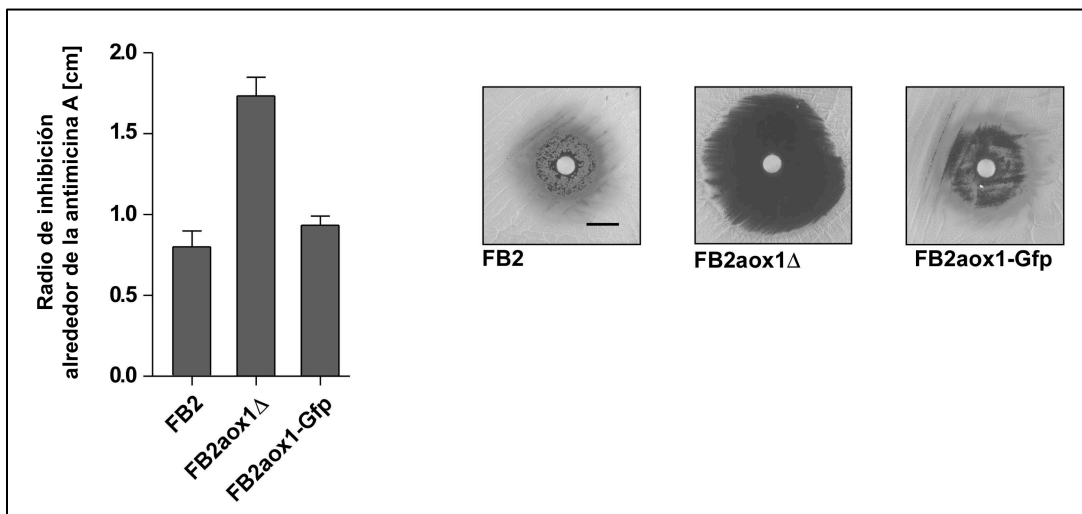


Figura 27. Radio de inhibición formado por la presencia de antimicina A. Al centro de las cajas de Petri se colocaron 10 μ moles de antimicina A en un papel filtro, a partir de allí, se midió el radio de inhibición del crecimiento celular en las cepas FB2, FB2aox1 Δ y FB2aox1-Gfp. La longitud de la barra es equivalente a 1.0 cm.

En otro experimento se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (cfu) generadas en presencia o ausencia de antimicina A (figura 28). En ausencia de antimicina A, el número de colonias fue independiente de la presencia de la Aox1 o de sus niveles de expresión en células cosechadas en la fase exponencial o en fase estacionaria. Es decir, las distintas mutantes de *U. maydis* presentan un crecimiento y viabilidad semejantes a los de la cepa silvestre. Por otro lado, y sin importar la fase de crecimiento, la generación de colonias con las mutantes aox1 Δ se inhibió completamente en presencia de la antimicina A. En las células que regulan la Aox1 con el promotor silvestre (FB2 y FB2Aox1-Gfp), el número de colonias fue mucho menor en la fase exponencial que en la fase estacionaria, lo que concuerda con la mayor cantidad de la Aox1 en la fase estacionaria, y que contrarresta los efectos inhibitorios de la antimicina A y permite que *U. maydis* mantenga activo su metabolismo energético para el crecimiento celular. En el caso de las células que sobreexpresan la Aox1 bajo promotores constitutivamente activos, se observó que sin importar la fase de crecimiento, el número de colonias que se obtiene es el mismo en ausencia o en presencia de la antimicina A. Con la sobreexpresión constitutiva de la proteína, las células sobreviven a pesar de la inhibición del complejo III, ya que un aumento en la Aox1 genera un mayor flujo de electrones a través del complejo I, lo cual mantiene la fuerza protón motriz y la síntesis de ATP por el complejo V.

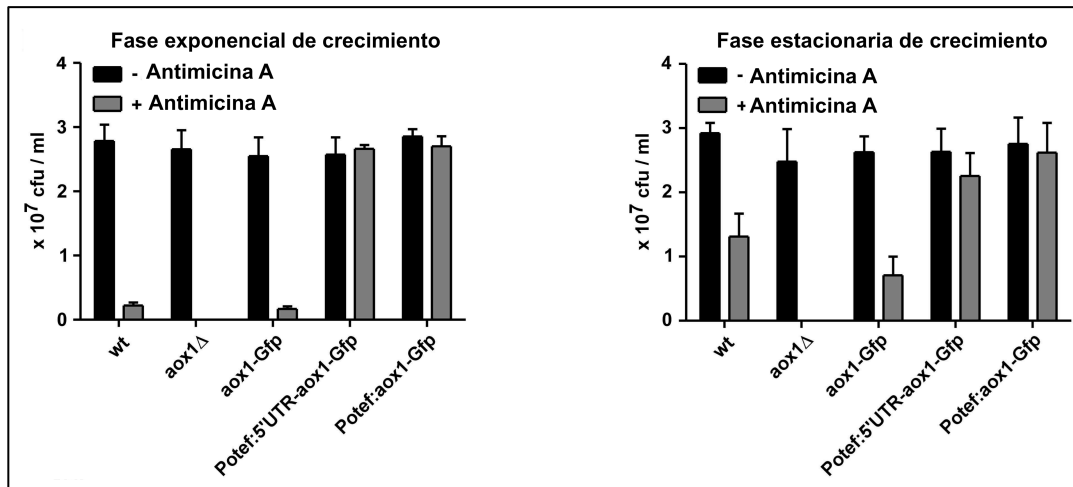


Figura 28. Unidades formadoras de colonias (cfu), en ausencia o presencia de antimicina A. Formación de cfu de las distintas células, por mililitro de suspensión celular en ausencia de antimicina A, barras negras o en presencia, barras grises, en fase exponencial (izquierda) y en fase estacionaria (derecha).

Para investigar si se aumentaba la expresión de la Aox1 por el uso de inhibidores de la cadena respiratoria, se realizó un curso temporal incubando a la mutante Aox1-Gfp en ausencia o presencia de antimicina A, tomando alícuotas cada hora durante cinco horas, y se analizó la fluorescencia de las muestras por citometría de flujo. Las células sin antimicina A mantuvieron una fluorescencia constante a lo largo del ensayo, pero en presencia del inhibidor, la fluorescencia aumentó con el paso del tiempo. Los resultados indican que la presencia de antimicina A induce la expresión de la Aox1 (figura 29). Se ha propuesto que el aumento en la síntesis de la AOX se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno, específicamente, el peróxido de hidrógeno [83, 84]. Sin embargo, en *U. maydis* aún se desconoce el circuito regulatorio de la expresión de la Aox1.

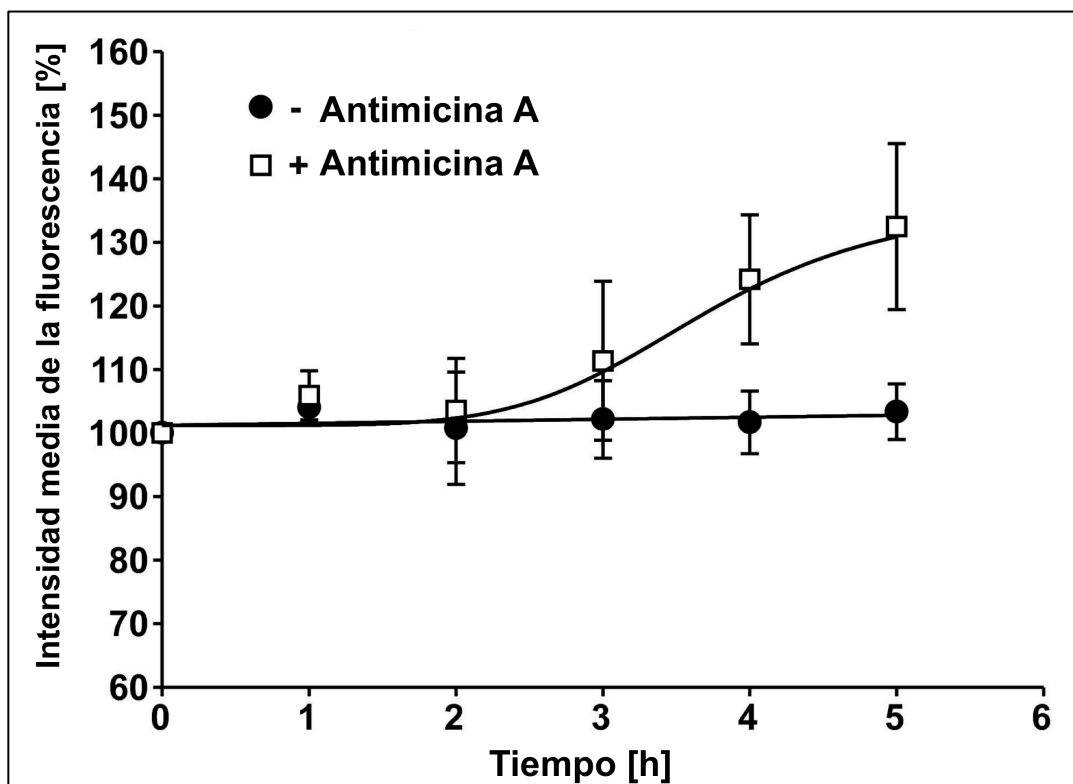


Figura 29. Aumento en la expresión de la Aox1-Gfp por la presencia de antimicina A. Intensidad media de la fluorescencia obtenida por citometría de flujo. Círculos negros, incubación celular en ausencia de antimicina A. Cuadros blancos, incubación celular en presencia de antimicina A.

Al analizar el crecimiento filamentoso de *U. maydis* también se observó un efecto protector de la Aox1 en presencia de la antimicina A (figura 30). En ausencia de este inhibidor, la longitud de la hifa fue semejante en todas las estirpes celulares de AB33, sin importar el grado de expresión de la Aox1. En contraste, cuando se utilizó antimicina A en el medio de cultivo, solo la cepa tipo silvestre y las dos cepas que sobreexpresan la Aox1, mostraron un crecimiento filamentoso. En la mutante que carece de la Aox1, la formación del filamento se inhibió completamente, mientras que la longitud del filamento de la cepa *aox1-Gfp* se redujo con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que la actividad de la Aox1-Gfp no es suficiente para mantener la síntesis de ATP que se requiere para este proceso.

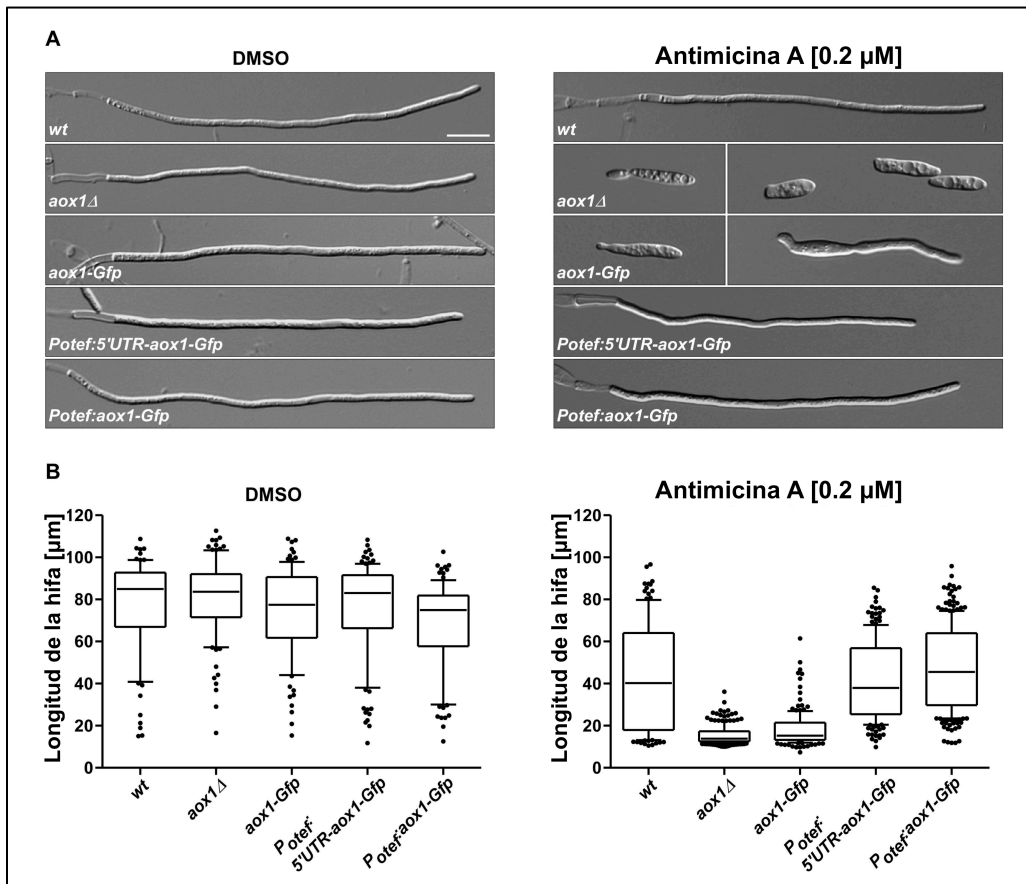


Figura 30. Crecimiento del filamento de *U. maydis* en ausencia o presencia de antimicina A. Panel A, crecimiento filamentosos de *U. maydis* en las distintas estirpes celulares de AB33 con y sin antimicina A. Panel B, datos cuantitativos de la longitud de la hifa.

DISCUSIÓN

Uno de los principales papeles que se le ha dado a la AOX en la mayoría de los organismos es el de defensa contra diversos tipos de estrés, que se produce a nivel metabólico, como el estrés oxidativo [83-85], o por factores abióticos como la temperatura [86, 87], la osmolaridad [85, 88-91] o la sequía [82], entre otros. Sin embargo, y como se muestra en el árbol filogenético de la figura 4, hay una clara separación evolutiva entre las distintas AOX. Por un lado se encuentran las bacterias, las plantas e inclusive algunos animales, y por otro, en un grupo separado, los hongos. Esto sugiere que, al estar tan separados evolutivamente, es posible que tenga una función distinta en cada organismo.

Para este proyecto se decidió trabajar con la AOX de *U. maydis* (Aox1). Este organismo es un buen modelo de estudio por distintas razones. Su Aox1 se regula de diferente manera que la de las plantas, que es la que se ha estudiado con mayor detalle; además, es un basidiomiceto fitopatógeno del maíz y los resultados de este trabajo con la Aox1 se podrían extrapolar a otros ustilaginales con una mayor importancia económica, debido a las grandes pérdidas en los cultivos como los de la cebada, que se infecta con *Ustilago hordei*, pariente cercano de *U. maydis* [92].

La Aox1 se encuentra en fase estacionaria de crecimiento

Cuando se compara la cepa silvestre y la cepa mutante que carece del gen *aox1*, no se encontraron diferencias en la capacidad de crecimiento en cada una de las condiciones de fuente de carbono y nitrógeno, lo que concuerda con los resultados publicados previamente para la glucosa en células con y sin la Aox1 [93]. A primera vista, este comportamiento tiene sentido para la condición de glucosa, porque en la fase exponencial las células se dividen rápidamente y se activan procesos biosintéticos que requieren de la síntesis de ATP [94, 95]. Puesto que la Aox1 disminuye la eficacia de la fosforilación oxidativa [78], su actividad debe disminuir cuando las células tienen un alto requerimiento de ATP. Por otro lado, cuando se encuentran en fase estacionaria, las células se enfrentan a un ambiente de hipoxia que se genera por la gran capacidad respiratoria de *U. maydis* y por la alta densidad celular presente en esta fase [63], condiciones que, en teoría, deberían generar un aumento en el estado de reducción de la poza de quinonas en las mitocondrias que supuestamente llevaría a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha propuesto que las AOX están implicadas en

la protección contra las ROS [15, 96], así que el aumento de la Aox1 en la fase estacionaria podría estar relacionado con esta función específica. Sin embargo, utilizando otras fuentes de carbono como el etanol, el lactato o el glicerol, la cantidad y la capacidad de la Aox1 fue esencialmente la misma en ambas fases del crecimiento, indicando un efecto específico de la glucosa sobre la expresión de la Aox1 durante el crecimiento del esporidio. También la AOX de *D. hansenii* está presente en ambas fases de crecimiento cuando se cultiva con lactato como fuente de carbono [94]. Los resultados sugieren que este efecto en *U. maydis* está relacionado con la fuente de carbono.

Para explicar a qué se debe este aumento de la Aox1 en la fase estacionaria, se siguieron diversas estrategias experimentales. De entrada, se utilizaron inhibidores específicos de la cadena transportadora de electrones clásica y alterna [22, 45], y se determinó la actividad respiratoria para las células cultivadas en cada una de las fuentes de carbono y cosechadas tanto en fase exponencial como estacionaria. Al añadir cianuro, las células cultivadas en glucosa mostraron un aumento en la capacidad respiratoria del esporidio cuando se cosecharon en la fase estacionaria, pero con otras fuentes de carbono y cosechadas en cualquier fase de crecimiento, el cianuro inhibió hasta en un 90% la actividad respiratoria de la célula. Estos resultados indican que la máxima capacidad respiratoria de la Aox1 se obtiene cuando se cultivan las células en la presencia de glucosa y se cosechan en la fase estacionaria.

El siguiente paso era mostrar que ante una inhibición de la vía citocrómica, el aumento en la actividad respiratoria se debía a una mayor cantidad de la Aox1. Para esto, se realizó un Western blot con las mitocondrias de todas las condiciones de cultivo y se confirmó que en las condiciones de glucosa y fase estacionaria hay un gran aumento en la cantidad de la Aox1, pero también con etanol y fase estacionaria se observa una banda de menor intensidad.

Con el fin de estudiar con más detalle la expresión de la Aox1 en células cultivadas en presencia de glucosa, se generaron cepas mutantes que tienen fusionada la Aox1 con la proteína verde fluorescente (Gfp). Tras validar por distintos medios la correcta construcción de las mutantes, se mostró, por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, que esta enzima se localiza en la mitocondria y que solo está presente cuando el esporidio entra a la fase estacionaria de crecimiento y que además, el cambio de pH en el medio no afecta su expresión.

Nivel en el que se regula la expresión de la Aox1.

Para determinar el nivel en que se lleva a cabo la regulación de la expresión de esta enzima, se realizó un ensayo de qRT-PCR para cuantificar la cantidad del RNA mensajero de la Aox1 en cada una de las condiciones de cultivo. La figura 11 muestra que la síntesis de RNA se llevó a cabo en todas las condiciones, lo que sugiere que la regulación se lleva a cabo a nivel postranscripcional o traduccional. Para confirmar esto, se decidió generar dos cepas mutantes partiendo de la cepa Aox1-Gfp, en donde el promotor del alelo silvestre se reemplazó por uno activo constitutivamente, con el fin de identificar si la expresión de la Aox1 se regula realmente después de la transcripción.

El análisis de estas cepas reveló que la cantidad de la Aox1-Gfp era la misma durante la fase exponencial y estacionaria, lo que sugiere que la principal etapa de regulación se lleva a cabo a nivel transcripcional, ya que la síntesis constitutiva del RNAm de la Aox1 dio lugar a la presencia de la Aox1-Gfp en ambas fases del crecimiento. Este resultado no descarta que haya un nivel de regulación posterior. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo que se ha visto en algunos organismos, en donde el aumento en la síntesis de la AOX se asoció con una activación de la síntesis del RNA, lo que indica que la expresión de la AOX en plantas y hongos se regula principalmente a nivel transcripcional [97-99].

En busca de un papel funcional de la Aox1 en *U. maydis*.

Como se mencionó anteriormente, hay reportes que indican que ante un estrés, ya sea oxidativo [83-85], cambio en la temperatura [86, 87], osmolaridad [85, 88-91] o sequía [82], una de las respuestas del organismo se da a través de la AOX. Para identificar si la Aox1 de *U. maydis* participaba en la respuesta al estrés, se sometieron a las diferentes mutantes a un estrés por pH (figuras 14 y 15), temperatura (figura 22), desecación (figura 23) y oxidativo (figura 24). A diferencia de lo que se ha reportado para otros organismos, con *U. maydis* no se encontraron diferencias en la respuesta de las células ante las situaciones de estrés, independientemente del grado de expresión de la Aox1.

Además de ese papel de defensa contra el estrés, también se ha reportado que en hongos patógenos la AOX participa en diversos procesos fisiológicos, por ejemplo, ayuda a mantener activo el ciclo de Krebs para alimentar las vías biosintéticas, cuando los complejos respiratorios de la vía citocrómica se encuentran inhibidos [10, 24], está

involucrada en las transiciones morfológicas (levadura-micelio) [100, 101], y en algunos casos en la infección específica del hospedero [102, 103]. Por ejemplo, cuando se incubaba el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de ácido salicilhidroxámico (SHAM), se inhibe el crecimiento micelial del organismo y disminuye el rendimiento de la biomasa [104]. En el hongo *Nomuraea rileyi* se obtuvieron resultados similares; cuando se incubó con SHAM o cuando se eliminó el gen para la AOX, la morfología de las hifas cambió drásticamente y se redujo el crecimiento del hongo [105]. Por otro lado, las mutantes de *C. neoformans*, *P. brasiliensis* y *Candida albicans*, carentes de la AOX, mostraron baja virulencia y baja tolerancia a diversos tipos de estrés, principalmente el oxidativo [101, 106-108]. Sin embargo, como se muestra en la figura 26, en *U. maydis*, con o sin la Aox1, el proceso de infección de la planta del maíz fue semejante, lo que indica que esta proteína no es indispensable para la infección. Un resultado similar se obtuvo con *M. grisea*, un hongo fitopatógeno, donde la delección del gen de la AOX no tuvo efecto sobre la patogenicidad y virulencia durante la infección de las hojas de la cebada, mientras que sí fue esencial cuando se llevaron a cabo ensayos de infección en presencia de azoxystrobin, un fungicida que inhibe al complejo III de la cadena respiratoria [109].

El papel de la Aox1 en el crecimiento del esporidio y del filamento de *U. maydis* cuando la cadena citocrómica está inhibida.

Para estudiar el crecimiento de las células en presencia de antimicina A, se realizaron distintos ensayos. Por un lado, se cuantificó el radio del halo de inhibición del crecimiento y la capacidad de formar colonias en presencia o ausencia de antimicina A, y por otro lado, por citometría de flujo, se estudió y cuantificó la inducción en la expresión de la Aox1 en células con la Aox1-Gfp. Los resultados muestran que la Aox1 fue de gran importancia para hacer frente a la inhibición de la cadena respiratoria por la antimicina A, ya que permitió un mayor crecimiento y una recuperación celular en presencia del inhibidor. Además, la expresión de la Aox1-Gfp aumentó cuando se interrumpió la actividad de la vía citocrómica.

Solamente en la mutante nula (*aox1* Δ) y en la que tiene una menor actividad (Aox1-Gfp), la antimicina A afectó el crecimiento filamentoso, a diferencia de las cepas que contienen una alta expresión y actividad de la Aox1, en donde la inhibición del complejo III no generó un cambio morfológico con respecto a la cepa silvestre. En

resumen, en ambas formas de crecimiento de *U. maydis*, la Aox1 fue crucial para hacer frente a la inhibición de la vía citocrómica.

Con algunas excepciones en plantas y hongos, la AOX aumenta su capacidad respiratoria cuando se incubaba con diversos agentes que impulsan la generación de radicales libres, como el H₂O₂, la menadiona o el paraquat [9, 96]. El aumento en la capacidad respiratoria se asocia con un aumento de la AOX en mitocondrias, detectado por Western blot [107], o por un aumento en los transcritos de la AOX [97, 99], lo que sugiere que la AOX tiene un papel importante para hacer frente al estrés oxidativo. Sin embargo, parece ser que en *U. maydis* la Aox1 no está relacionada con la respuesta al estrés. Cabe señalar que este es el primer trabajo en donde se estudió la Aox1 con respecto al crecimiento filamentoso en presencia de la antimicina A. Anteriormente sólo se había estudiado con el esporidio en presencia de azida de sodio, cianuro o antimicina, obteniéndose resultados similares a los que se reportan en este trabajo [78, 93].

Conclusiones

La mayoría de los reportes sugieren que la AOX es indispensable para enfrentar diversos tipos de estrés. En este trabajo se estudió exhaustivamente las posibles funciones de la Aox1, a nivel del ciclo de vida, de los diversos cambios morfológicos, metabólicos y situaciones con las que se puede enfrentar *U. maydis*.

- La Aox1 es una proteína que se induce cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento, solo cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, siendo su expresión independiente de la fuente de nitrógeno.
- Cuando se utilizan otras fuentes de carbono, como etanol, lactato o glicerol, la expresión de esta proteína es mucho menor y se presenta en la misma proporción tanto en fase la exponencial como en la estacionaria.
- La acidificación del medio de crecimiento no tiene implicaciones en la expresión de la Aox1.
- Cuando se utiliza medio rico, suplementado con glucosa, la regulación de la expresión de la Aox1 se da principalmente a nivel de la transcripción.
- A diferencia de lo reportado para otros organismos, en *U. maydis* esta enzima no participa en el crecimiento levaduriforme o filamentosos, ni en la adaptación de las células a los cambios en la temperatura, pH y estrés oxidativo, entre otros.
- La Aox1 no es indispensable para la infección del maíz. Sin embargo, ayuda a mantener el crecimiento celular cuando la vía citocrómica se ve afectada por la presencia de inhibidores.

Perspectivas

- Realizar estudios más detallados para identificar la señal que induce la expresión de la Aox1 en presencia de glucosa, como la cuantificación de intermediarios glucolíticos.
- Explicar los diferentes tiempos de duplicación, analizando las rutas metabólicas que se utilizan con las diferentes fuentes de carbono.
- Determinar si además de la regulación a nivel de la transcripción, la Aox1 presenta regulación a nivel traduccional o pos-traduccional, por ejemplo, por fosforilación de la enzima.

Anexo I:

Componentes de medios y de soluciones amortiguadoras utilizadas.

- YPD-Glicerol
 - 1.0% de glucosa.
 - 0.25% peptona.
 - 0.5% de extracto de levadura.
 - 30% de glicerol.

- YPD
 - 1.0% de glucosa.
 - 0.25% peptona.
 - 0.5% de extracto de levadura.
 - 2.0% de agar para medio sólido.

- MM [110]
 - Fuente de carbono; 1.0% de glucosa, 1.0% de lactato, 1.0% de glicerol o 0.4% de etanol.
 - Fuente de nitrógeno al 0.3%: amonio como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o nitrato como KNO_3 .
 - Solución de sales al 1X
 - Solución de minerales al 1X

- Solución de sales 200X
 - 32 g/L KH_2PO_4
 - 8 g/L Na_2SO_4
 - 16 g/L KCl
 - 4 g/L MgSO_4
 - 2 g/L CaCl_2
 - pH 2.8 – 3.0

- Solución de minerales 5000X
 - 80.9 mM ácido bórico
 - 32.2 mM $\text{MnCl}_2 - 4\text{H}_2\text{O}$
 - 13.9 mM ZnCl
 - 7.4 mM $\text{FeCl}_3 - 6\text{H}_2\text{O}$
 - 0.32 mM ácido molíbdico
 - 1.6 mM $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$
 - 47.6 mM ácido cítrico

- Solución fijadora
 - 0.5% de paraformaldehído disuelto en PBS

Solución amortiguadora, PBS

- 3.0 mM de fosfato de potasio monobásico
- 10 mM de fosfato de sodio dibásico
- 155 mM de cloruro de sodio
- pH 7.4

- Solución amortiguadora para la respiración celular
 - 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 10 mM de glucosa

- Solución amortiguadora, TM
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 50 mM MgCl_2

- Solución amortiguadora para la lisis celular
 - 300 mM manitol
 - 50 mM KH_2PO_4
 - 5.0 mM MgCl_2
 - 1.0 mM EDTA
 - 20 mM Hepes-KOH, pH 7.0

- Solución de incubación celular para la citometría de flujo
 - Glucosa al 1%
 - 10 mM KH_2PO_4
 - pH 7.0

- Solución amortiguadora SSC 20x
 - 3.0 M NaCl
 - 0.3 M citrato de sodio
 - pH 7.0-HCl

- Solución amortiguadora SCS, pH 5.8

Solución 1

- 20 mM citrato de sodio
- 1.0 M de sorbitol

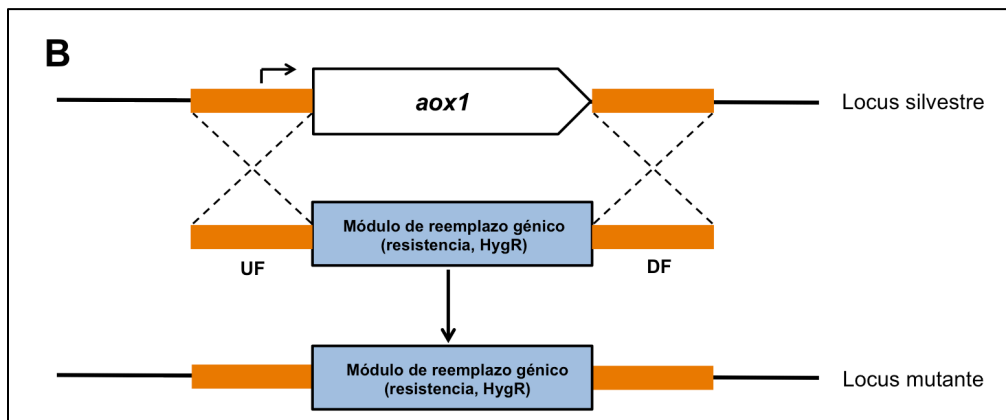
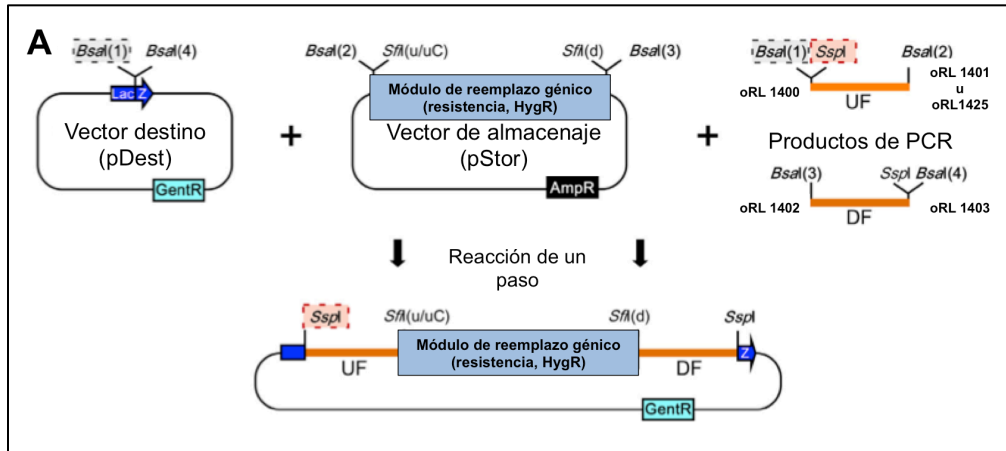
Solución 2

- 20 mM de ácido cítrico
- 1.0 M de sorbitol

Adicionar lentamente a la solución 1 la solución 2 hasta alcanzar un pH de 5.8.

Anexo II

Esquema de la estrategia de reemplazo genético mediante la técnica Golden gate.



- Mediante trabajo *in silico*, se diseñaron oligonucleótidos específicos con base en el genoma de *U. maydis*, que contenían los sitios de restricción para las enzimas *BsaI* y *SspI*. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar por PCR regiones de aproximadamente 1.0 kb, río arriba (UF) y río abajo (DF) del gen *aox1*, utilizando al DNA genómico de *U. maydis* como templado y la polimerasa Phusion.
- Por medio de una electroforesis en gel de agarosa se comprobó la amplificación de los flancos UF y DF.
- En un tubo para PCR se colocaron 40 ng de cada uno de los flancos (UF y DF), 75 ng del vector destino que contiene el gen de resistencia y 75 ng del vector de

almacenaje que contiene el módulo de reemplazo génico que incluye al gen de resistencia a higromicina, 400 U de DNA ligasa T4 y 5 U de la enzima de restricción de alta fidelidad *BsaI*, con el fin de cortar y ensamblar mediante la técnica de ingeniería genética Golden gate, el módulo de reemplazo génico con los fragmentos UF y DF. El volumen final fue de 15 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, en donde se mantuvo primero a 37 °C por dos minutos y luego a 16 °C por cinco minutos, hasta completar 50 ciclos. Para detener la reacción, las enzimas se desactivaron mediante un choque térmico en el mismo termociclador. Como control negativo, en uno de los tubos para PCR no se utilizó el flanco DF (panel A).

- El producto obtenido mediante la técnica Golden gate se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Top10, que se plaquearon en cajas suplementadas con galactosa para seleccionar colonias transformadas (en color blanco), que indica que el gen *lacZ* se interrumpió.
- De las cajas de cultivo se seleccionaron 12 colonias transformadas y se cultivaron por separado en medio líquido (LB), con agitación constante a 37 °C durante toda la noche.
- De cada uno de los 12 cultivos de bacterias transformadas se realizó una purificación de DNA plasmídico y se digirió con la enzima *EcoRI* para comprobar el correcto patrón de restricción.
- A tres de los DNA plasmídicos que mostraron el correcto patrón de restricción, se les realizó una segunda digestión utilizando la enzima *SspI*, que arrojó un patrón que permitió identificar el módulo de reemplazo génico con los fragmentos UF y DF.
- Por otro lado, se generaron protoplastos de *U. maydis* inoculando células en 3.0 ml de medio, durante toda la noche.

- Al día siguiente y teniendo una D.O._{600nm} de 0.8, se cosecharon las células por centrifugación, se lavaron con 25 ml de SCS (anexo I) y se resuspendieron con 2.0 ml de SCS, suplementado con 3.5 mg/ml de enzima Novozima.
- Las células se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se les añadieron 10 ml de SCS a 4.0 °C para hacer un lavado por centrifugación.
- El paquete celular se resuspendió con 10 ml de amortiguador STC (anexo I), se centrifugaron las células y el paquete se resuspendió en 1.0 ml de STC para realizar alícuotas de 100 µl de los protoplastos de *U. maydis*.
- A partir del gel de agarosa, se purificó el fragmento de DNA con la construcción **UF-módulo de reemplazo génico-DF**, para transformar los protoplastos de *U. maydis* (100 µl) utilizando 4.0 µg de DNA y 0.1 µg de heparina. La suspensión se incubó por 10 minutos en hielo y se le adicionó 500 µl de STC/Polietilenglicol (PEG), se mezcló por inversión y se incubó por otros 15 minutos en hielo.
- Las células se plaquearon en cajas de Petri suplementadas con 400 µg/ml de higromicina en medio de cultivo sólido y, por medio de recombinación homóloga (panel B), el gen de la Aox1 se reemplazó por el gen de la higromicina cinasa.
- Las cajas se colocaron a 25°C durante 7 días hasta obtener células transformadas.

Nota: al diseñar los oligonucleótidos hay que tener cuidado de que no existan secuencias de reconocimiento al interior de los flancos UF y DF para las enzimas de restricción que se utilizan; en caso de que esto ocurra, se puede utilizar otra enzima de restricción del tipo IIS como *BbsI* o *SapI*.

Descripción de las cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Locus	Cepa progenitora	Descripción
FB1			<i>Cepa silvestre</i> [111]
FB2			<i>Cepa silvestre</i> [111]
AB33	<i>b</i>	FB2	<i>Pnar:bW2bE1</i> , expresión activa del heterodímero <i>b</i> bajo control del promotor de <i>nar1</i> , las cepas presentan un crecimiento filamentososo ante los cambios de la fuente de nitrógeno [69].
FB1 Δ aox1	<i>aox1</i>	FB1	Eliminación del <i>aox1</i> .
FB2 Δ aox1	<i>aox1</i>	FB2	Eliminación del <i>aox1</i> .
AB33 Δ aox1	<i>aox1</i>	AB33	Eliminación del <i>aox1</i> .
FB2aox1-Gfp	<i>aox1</i>	FB2aox1 Δ	Expresión de Aox1 fusionada a eGfp en C-terminal.
AB33aox1-Gfp	<i>aox1</i>	AB33aox1 Δ	Expresión de Aox1 fusionada a eGfp en C-terminal.
FB2P _{otef} :aox1-Gfp	<i>ip^S</i>	FB2	La construcción <i>aox1-Gfp</i> , está integrada ectópicamente en el locus <i>ip^S</i> , bajo el control del promotor fuertemente constitutivo, P _{otef} .
FB2P _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp	<i>ip^S</i>	FB2	La construcción <i>aox1-Gfp</i> , está integrada ectópicamente en el locus <i>ip^S</i> , bajo el control del promotor fuertemente constitutivo, P _{otef} . En esta construcción, se mantuvo la región nativa 5'UTR.
AB33P _{otef} :aox1-Gfp	<i>ip^S</i>	AB33	La construcción <i>aox1-Gfp</i> , está integrada ectópicamente en el locus <i>ip^S</i> , bajo el control del promotor fuertemente constitutivo, P _{otef} .
AB33P _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp	<i>ip^S</i>	AB33	La construcción <i>aox1-Gfp</i> , está integrada ectópicamente en el locus <i>ip^S</i> , bajo el control del promotor fuertemente constitutivo, P _{otef} . En esta construcción, se mantuvo la región nativa 5'UTR.

Generación de las cepas de *U. maydis* utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Uma	Referencia	Plásmido transformado	Locus	Progenitor
AB33	<i>a2 P_{nar}:bW2 bE1</i>	133	[69]	pAB33	<i>b</i>	FB2
FB1aox1Δ	<i>aox1Δ</i>	1328	Este estudio	pAox1Δ_HygR (pUMa2163)	<i>aox1</i>	FB1
FB2aox1Δ	<i>aox1Δ</i>	1329	Este estudio	pAox1Δ_HygR (pUMa2163)	<i>aox1</i>	FB2
AB33aox1Δ	<i>aox1Δ</i>	1330	Este estudio	pAox1Δ_HygR (pUMa2169)	<i>aox1</i>	AB33
FB2aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1333	Este estudio	pAox1-Gfp_NatR (pUMa2169)	<i>aox1</i>	FB2aox1Δ
AB33aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1369	Este estudio	pAox1-Gfp_NatR (pUMa2169)	<i>aox1</i>	AB33aox1Δ
FB2P _{otef} :aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1816	Este estudio	pP _{otef} :aox1-Gfp_CbxR (p2768)	<i>ip^S</i>	FB2
FB2P _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1814	Este estudio	pP _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp (p2767)	<i>ip^S</i>	FB2
AB33P _{otef} :aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1817	Este estudio	pP _{otef} :aox1-Gfo_CbxR (p2768)	<i>ip^S</i>	AB33
AB33P _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp	<i>aox1-Gfp</i>	1815	Este estudio	pP _{otef} :5'UTR-aox1-Gfp (p2767)	<i>ip^S</i>	AB33

Descripción de plásmidos usados para la generación de cepas de *U. maydis*.

Plásmido	pUMa	Casete de resistencia	Descripción
pAox1Δ_HygR	2163	Inserto de Sfil de MF1hs	Plásmido para la generación de las mutantes con la eliminación del <i>aox1</i> . El cassette de resistencia está flanqueado, río arriba y río debajo de la región del <i>aox1</i> , por 1kb. La región flanqueada se amplificó por PCR usando los oligos oRL1400/oRL1401 y oRL1402/oRL1403. El molde de DNA viene de la cepa silvestre UM521. El plásmido se generó por la técnica de clonación Golden Gate [67].
pAox1-Gfp_NatR	2169	Inserto de Sfil de pMF5-1n	Plásmido para generar las fusiones de <i>aox1</i> con eGfp. Un cassette que contiene la Gfp, el terminador T _{nos} y el gen de resistencia a nourseotricina, fue flanqueado por una región río arriba de 2.4 kb, que incluye 1.3 kb del ORF del <i>aox1</i> y una región río abajo de 1 kb <i>aox1</i> . Las regiones de los flancos, se amplificaron por PCR usando los oligos oRL1400/oRL1425 y oRL1402/oRL1403. El molde de DNA viene de la cepa silvestre UM521.
pP _{otef} :5UTR- <i>aox1</i> -Gfp	2767	CbxR para la integración al locus <i>ip^S</i> .	Plásmido con integración ectópica y expresión de <i>aox1-Gfp</i> . Contiene 1.3 kb del marco de lectura abierta (ORF), del <i>aox1</i> N-terminal, fusionado con eGfp, flanqueado río arriba por un promotor fuerte, P _{otef} , constitutivamente activo y río abajo por el terminador transcripcional T _{nos} . Esta construcción, mantiene la región 5' UTR de 65 bp del <i>aox1</i> . El ORF y la 5' UTR, fueron amplificados por PCR utilizando los oligos, oMF894/oDD808 y como templado se utilizó DNA del pAox1-Gfp_NatR.
pP _{otef} : <i>aox1</i> -Gfp_CbxR	2768	CbxR para la integración al locus <i>ip^S</i> .	Plásmido con integración ectópica y expresión de <i>aox1-Gfp</i> . Contiene 1.3 kb del marco de lectura abierta (ORF), del <i>aox1</i> N-terminal, fusionado con eGfp, flanqueado río arriba por un promotor fuerte, P _{otef} , constitutivamente activo y río abajo por el terminador transcripcional T _{nos} . El ORF fue amplificado por PCR utilizando los oligos, oMF894/oDD808 y como templado se utilizó DNA del pAox1-Gfp_NatR.

Oligonucleótidos de DNA usados en este estudio.

Designación	Secuencia de nucleótidos (5' --> 3')	Características
oRL1400	GGTCTCGCCTGCAATATTCCACTGAGATAGTCGTTGAGG	<i>aox1</i> u2
oRL1401	GGTCTCCAGGCCGGTTACTGGCTTGGGCTG	<i>aox1</i> u3
oRL1402	GGTCTCCGGCCCTGCTTTCCAAGTGGATTCTG	<i>aox1</i> d1
oRL1403	GGTCTCGCTGCAATATTTTTCCCATGAGATGCTGC	<i>aox1</i> d2
oRL1425	AATGGCCGCGTTGGCCGCGAGCGGTCTTTTCGGCCGC	<i>aox1</i> u3-fus
oMF894	TCGCAAGACCCGGCAACAG	
oDD808	GGCGAATTCCAGACTTTTAGCAACCATACCAAAGC	Ectópico con 5'UTR
oDD809	CGGGAATTCATGTACGTTAGTACGCCCATC	Ectópico sin 5'UTR
oRL1399	GTTCAACACGTCCGGAGG	<i>aox1</i> u1
oRL1404	CGCTGTTGCTCCATTCTGG	<i>aox1</i> d3
oRL1405	AGGTACCCGGACCACAAC	<i>aox1</i> p1
oRL1406	GATTGAGCCAACCGTCTGG	<i>aox1</i> p2
cDNA <i>Aox1</i>	TCAAGCGGTCTTTTCGGCC	<i>aox1</i>
cDNA <i>elf2B</i>	TACTCCGAATCCTCTTCCTCC	<i>elf2B</i>
Fwd <i>Aox1</i>	AGAGAATGCACCTCCTCGTT	<i>aox1</i> , 200pb
Rev <i>Aox1</i>	GGCAGTCTTCCTTCCTTGAG	<i>aox1</i> , 200pb
Fwd <i>elf2B</i>	CTAGGGCCAAATCTCAGCAG	<i>elf2B</i> , 200pb
Rev <i>elf2B</i>	TGGCAAGGATGAAAATCTCC	<i>elf2B</i> , 200pb

Bibliografia

1. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973;181(4096):223-30.
2. Andreeva A, Howorth D, Chothia C, Kulesha E, Murzin AG. SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D310-4.
3. Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1496-500.
4. Albury MS, Elliott C, Moore AL. Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiologia plantarum*. 2009;137(4):316-27.
5. Siedow JN, Umbach AL, Moore AL. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett*. 1995;362(1):10-4.
6. Andersson ME, Nordlund P. A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett*. 1999;449(1):17-22.
7. Young L, May B, Pendlebury-Watt A, Shearman J, Elliott C, Albury MS, et al. Probing the ubiquinol-binding site of recombinant *Sauromatum guttatum* alternative oxidase expressed in *E. coli* membranes through site-directed mutagenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1837(7):1219-25.
8. Moore AL, Albury MS. Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 5):1022-6.
9. Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagilskaya RA. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry Biokhimiia*. 2014;79(13):1615-34.
10. Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, et al. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):4580-5.
11. Considine MJ, Holtzapffel RC, Day DA, Whelan J, Millar AH. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol*. 2002;129(3):949-53.
12. Borecky J, Vercesi AE. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience reports*. 2005;25(3-4):271-86.
13. Moore AL, Shiba T, Young L, Harada S, Kita K, Ito K. Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. *Annual review of plant biology*. 2013;64:637-63.

14. Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol.* 1989;9(3):1362-4.
15. Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A, et al. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta.* 1998;1442(2-3):161-9.
16. Joseph-Horne T, Babij J, Wood PM, Hollomon D, Sessions RB. New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett.* 2000;481(2):141-6.
17. Finnegan PM, Whelan J, Millar AH, Zhang Q, Smith MK, Wiskich JT, et al. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol.* 1997;114(2):455-66.
18. Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, Day DA. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 1993;329(3):259-62.
19. Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN. 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. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(46):30750-6.
20. Umbach AL, Ng VS, Siedow JN. Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochimica et biophysica acta.* 2006;1757(2):135-42.
21. Djajanegara I, Holtzapffel R, Finnegan PM, Hoefnagel MH, Berthold DA, Wiskich JT, et al. A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation. *FEBS Lett.* 1999;454(3):220-4.
22. Juarez O, Guerra G, Martinez F, Pardo JP. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochimica et biophysica acta.* 2004;1658(3):244-51.
23. Sierra-Campos E, Velazquez I, Matuz-Mares D, Villavicencio-Queijeiro A, Pardo JP. Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions. *Mitochondrion.* 2009;9(2):96-102.
24. Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in parasitology.* 2006;22(10):484-91.
25. Ajayi WU, Chaudhuri M, Hill GC. Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(10):8187-93.

26. Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2003;3(3):239-45.
27. Chaudhuri M, Hill GC. Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. *Molecular and biochemical parasitology.* 1996;83(1):125-9.
28. Nihei C, Fukai Y, Kawai K, Osanai A, Yabu Y, Suzuki T, et al. Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase. *FEBS Lett.* 2003;538(1-3):35-40.
29. McDonald A, Vanlerberghe G. Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB life.* 2004;56(6):333-41.
30. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *The Journal of experimental biology.* 2009;212(Pt 16):2627-34.
31. Pu X, Lv X, Tan T, Fu F, Qin G, Lin H. Roles of mitochondrial energy dissipation systems in plant development and acclimation to stress. *Annals of botany.* 2015;116(4):583-600.
32. Vanlerberghe GC. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(4):6805-47.
33. Nihei C, Fukai Y, Kita K. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochimica et biophysica acta.* 2002;1587(2-3):234-9.
34. Rhoads DM, McIntosh L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(6):2122-6.
35. Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P, Graslund A, Nordlund P. EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(46):43608-14.
36. Moore AL, Carre JE, Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Kita K, et al. Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein. *Biochimica et biophysica acta.* 2008;1777(4):327-30.
37. McDonald AE, Vanlerberghe GC. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative biochemistry and physiology Part D, Genomics & proteomics.* 2006;1(3):357-64.

38. Berthold DA, Stenmark P. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. Annual review of plant biology. 2003;54:497-517.
39. McCabe TC, Finnegan PM, Harvey Millar A, Day DA, Whelan J. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. Plant Physiol. 1998;118(2):675-82.
40. Pu XJ, Lv X, Lin HH. Unraveling the evolution and regulation of the alternative oxidase gene family in plants. Development genes and evolution. 2015;225(6):331-9.
41. Huq S, Palmer JM. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. FEBS Lett. 1978;95(2):217-20.
42. Elthon TE, McIntosh L. Characterization and Solubilization of the Alternative Oxidase of *Sauromatum guttatum* Mitochondria. Plant Physiol. 1986;82(1):1-6.
43. Elthon TE, McIntosh L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987;84(23):8399-403.
44. Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. Plant Physiol. 1989;89(4):1311-7.
45. Sierra-Campos E, Valdez-Solana MA, Matuz-Mares D, Velazquez I, Pardo JP. Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate. Microbiology. 2009;155(Pt 2):604-11.
46. Chaudhuri M, Ajayi W, Temple S, Hill GC. Identification and partial purification of a stage-specific 33 kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of the *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes. The Journal of eukaryotic microbiology. 1995;42(5):467-72.
47. Pennisi R, Salvi D, Brandi V, Angelini R, Ascenzi P, Polticelli F. Molecular Evolution of Alternative Oxidase Proteins: A Phylogenetic and Structure Modeling Approach. Journal of molecular evolution. 2016;82(4-5):207-18.
48. Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE, McIntosh L. Molecular Genetic Evidence of the Ability of Alternative Oxidase to Support Respiratory Carbon Metabolism. Plant Physiol. 1997;113(2):657-61.
49. Onda Y, Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Seymour RS, Umekawa Y, et al. Transcriptome analysis of thermogenic *Arum concinatum* reveals the molecular components of floral scent production. Scientific reports. 2015;5:8753.

50. Kirimura K, Matsui T, Sugano S, Usami S. Enhancement and repression of cyanide-insensitive respiration in *Aspergillus niger*. *FEMS microbiology letters*. 1996;141(2-3):251-4.
51. Hakkaart GA, Dassa EP, Jacobs HT, Rustin P. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO reports*. 2006;7(3):341-5.
52. Fernandez-Ayala DJ, Sanz A, Vartiainen S, Kempainen KK, Babusiak M, Mustalahti E, et al. Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*. 2009;9(5):449-60.
53. Kakizaki Y, Ito K. Engineering plant alternative oxidase function in mammalian cells: substitution of the motif-like sequence ENV for QDT diminishes catalytic activity of *Arum concinatum* AOX1a expressed in HeLa cells. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;170(5):1229-40.
54. El-Khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Csaba Z, et al. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS genetics*. 2013;9(1):e1003182.
55. El-Khoury R, Kempainen KK, Dufour E, Szibor M, Jacobs HT, Rustin P. Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. *British journal of pharmacology*. 2014;171(8):2243-9.
56. Feldbrugge M, Kamper J, Steinberg G, Kahmann R. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology*. 2004;7(6):666-72.
57. Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual review of phytopathology*. 2009;47:423-45.
58. Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog*. 2012;8(11):e1002955.
59. Kahmann R, Kämper, J. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol*. 2004(164):31-42.

60. Leuthner B, Aichinger C, Oehmen E, Koopmann E, Muller O, Muller P, et al. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 2005;272(6):639-50.
61. Schirawski J, Mannhaupt G, Munch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, et al. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*. 2010;330(6010):1546-8.
62. Kaffarnik F, Muller P, Leibundgut M, Kahmann R, Feldbrugge M. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J*. 2003;22(21):5817-26.
63. Juarez O, Guerra G, Velazquez I, Flores-Herrera O, Rivera-Perez RE, Pardo JP. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *The FEBS journal*. 2006;273(20):4603-15.
64. Saavedra E, Ramos-Casillas LE, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R, Guerra-Sanchez G. Glycolysis in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(8):1313-23.
65. Pohlmann T, Baumann S, Haag C, Albrecht M, Feldbrugge M. A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *eLife*. 2015;4.
66. Sambrook J FE, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
67. Terfruchte M, Joehnk B, Fajardo-Somera R, Braus GH, Riquelme M, Schipper K, et al. Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2014;62:1-10.
68. Brachmann A, Konig J, Julius C, Feldbrugge M. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 2004;272(2):216-26.
69. Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J, Kahmann R. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*. 2001;42(4):1047-63.
70. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
71. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
72. Lauriere M. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Analytical biochemistry*. 1993;212(1):206-11.

73. Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *The Biochemical journal*. 1999;337 (Pt 2):231-41.
74. Pinon-Zarate G, Herrera-Enriquez MA, Hernandez-Tellez B, Jarquin-Yanez K, Castell-Rodriguez AE. GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *Journal of immunology research*. 2014;2014:158980.
75. Capece A, Votta S, Guaragnella N, Zambuto M, Romaniello R, Romano P. Comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains to identify potential marker genes correlated to desiccation stress tolerance. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(3).
76. Wu J, Zhang N, Hayes A, Panoutsopoulou K, Oliver SG. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(9):3148-53.
77. T. Boekhout JWF. 103. *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda. In: C.P. Kurtzman JWF, editor. *The Yeast, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998. p. 790-7.
78. Sherald JL, Sisler HD. Antimycin A-resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. *Plant Physiol*. 1970;46(1):180-2.
79. Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(4):414-30.
80. Fujita K, Kubo I. Antifungal activity of octyl gallate. *International journal of food microbiology*. 2002;79(3):193-201.
81. Fujita K, Kubo I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology*. 2002;92(6):1035-42.
82. Dahal K, Vanlerberghe GC. Alternative oxidase respiration maintains both mitochondrial and chloroplast function during drought. *New Phytol*. 2016.
83. Andronis EA, Moschou PN, Touni I, Roubelakis-Angelakis KA. Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*. 2014;5:132.
84. Xiao M, Ma J, Li H, Jin H, Feng H. Effects of hydrogen sulfide on alternative pathway respiration and induction of alternative oxidase gene expression in rice

suspension cells. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*. 2010;65(7-8):463-71.

85. Honda Y, Hattori T, Kirimura K. Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng*. 2012;113(3):338-42.

86. Vanlerberghe GC, McIntosh L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol*. 1992;100(1):115-9.

87. Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia plantarum*. 2011;142(4):339-51.

88. Costa JH, Jolivet Y, Hasenfratz-Sauder MP, Orellano EG, da Guia Silva Lima M, Dizengremel P, et al. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. *Journal of plant physiology*. 2007;164(6):718-27.

89. Skiryicz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, et al. Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol*. 2010;152(1):226-44.

90. Smith CA, Melino VJ, Sweetman C, Soole KL. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*. 2009;137(4):459-72.

91. Garcia-Neto W, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Kowaltowski AJ, Alberto Luevano-Martinez L. High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces Hansenii*. *PloS one*. 2017;12(1):e0169621.

92. Hof A, Zechmann B, Schwammbach D, Huckelhoven R, Doehlemann G. Alternative cell death mechanisms determine epidermal resistance in incompatible barley-Ustilago interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2014;27(5):403-14.

93. Georgopoulos SG, Sisler HD. Gene mutation eliminating antimycin A-tolerant electron transport in *Ustilago maydis*. *Journal of bacteriology*. 1970;103(3):745-50.

94. Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S. Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie*. 2014;102:124-36.

95. Dejean L, Beauvoit B, Guerin B, Rigoulet M. Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1457(1-2):45-56.

96. Magnani T, Soriani FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C, et al. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS microbiology letters*. 2007;271(2):230-8.
97. Dojcinovic D, Krosting J, Harris AJ, Wagner DJ, Rhoads DM. Identification of a region of the *Arabidopsis* AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Mol Biol*. 2005;58(2):159-75.
98. Edwards DL, Rsenberg E, Maroney PA. Induction of cyanide-insensitive respiration in *Neurospora crassa*. *The Journal of biological chemistry*. 1974;249(11):3551-6.
99. Nargang FE, Adames K, Rub C, Cheung S, Easton N, Nargang CE, et al. Identification of genes required for alternative oxidase production in the *Neurospora crassa* gene knockout library. *G3*. 2012;2(11):1345-56.
100. Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, Tamayo D, Gonzalez A, Restrepo A, et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast*. 2011;28(11):771-81.
101. Martins VP, Dinamarco TM, Soriani FM, Tudella VG, Oliveira SC, Goldman GH, et al. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*. 2011;10(2):237-48.
102. Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*. 2003;20(5):381-8.
103. Walker R, Jr., Saha L, Hill GC, Chaudhuri M. The effect of over-expression of the alternative oxidase in the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2005;139(2):153-62.
104. Xu T, Yao F, Liang WS, Li YH, Li DR, Wang H, et al. Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of microbiology*. 2012;50(4):594-602.
105. Zhou G, Song Z, Yin Y, Jiang W, Wang Z. Involvement of an alternative oxidase in the regulation of hyphal growth and microsclerotial formation in *Nomuraea rileyi* CQNr01. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2015;31(9):1343-52.
106. Akhter S, McDade HC, Grolach JM, Heinrich G, Cox GM, Perfect JR. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*. 2003;71(10):5794-802.
107. Huh WK, Kang SO. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *The Biochemical journal*. 2001;356(Pt 2):595-604.

108. Ruy F, Vercesi AE, Kowaltowski AJ. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr.* 2006;38(2):129-35.
109. Avila-Adame C, Koller W. Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI.* 2002;15(5):493-500.
110. Holliday R. *Ustilago maydis*. In: King R, editor. *Handbook of Genetics*. New York: Plenum; 1974. p. 575-95.
111. Banuett F, Herskowitz I. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(15):5878-82.

Artículos publicados

RESEARCH ARTICLE

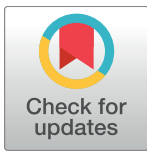
The mitochondrial alternative oxidase Aox1 is needed to cope with respiratory stress but dispensable for pathogenic development in *Ustilago maydis*

Christian A. Cárdenas-Monroy¹✉, Thomas Pohlmann²✉, Gabriela Piñón-Zárate³, Genaro Matus-Ortega¹, Guadalupe Guerra⁴, Michael Feldbrügge², Juan Pablo Pardo¹*

1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México, México, **2** Institute for Microbiology, Cluster of Excellence on Plant Sciences, Department of Biology, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, **3** Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México, México, **4** Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México

✉ These authors contributed equally to this work.

* pardov@bq.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Cárdenas-Monroy CA, Pohlmann T, Piñón-Zárate G, Matus-Ortega G, Guerra G, Feldbrügge M, et al. (2017) The mitochondrial alternative oxidase Aox1 is needed to cope with respiratory stress but dispensable for pathogenic development in *Ustilago maydis*. PLoS ONE 12(3): e0173389. doi:10.1371/journal.pone.0173389

Editor: Wagner L. Araujo, Universidade Federal de Vicosa, BRAZIL

Received: July 29, 2016

Accepted: February 20, 2017

Published: March 8, 2017

Copyright: © 2017 Cárdenas-Monroy et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Juan Pablo Pardo received a grant from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN209614), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 254904). Christian A. Cárdenas-Monroy received a doctoral fellowship

Abstract

The mitochondrial alternative oxidase is an important enzyme that allows respiratory activity and the functioning of the Krebs cycle upon disturbance of the respiration chain. It works as a security valve in transferring excessive electrons to oxygen, thereby preventing potential damage by the generation of harmful radicals. A clear biological function, besides the stress response, has so far convincingly only been shown for plants that use the alternative oxidase to generate heat to distribute volatiles. In fungi it was described that the alternative oxidase is needed for pathogenicity. Here, we investigate expression and function of the alternative oxidase at different stages of the life cycle of the corn pathogen *Ustilago maydis* (Aox1). Interestingly, expression of Aox1 is specifically induced during the stationary phase suggesting a role at high cell density when nutrients become limiting. Studying deletion strains as well as overexpressing strains revealed that Aox1 is dispensable for normal growth, for cell morphology, for response to temperature stress as well as for filamentous growth and plant pathogenicity. However, during conditions eliciting respiratory stress yeast-like growth as well as hyphal growth is strongly affected. We conclude that Aox1 is dispensable for the normal biology of the fungus but specifically needed to cope with respiratory stress.

Introduction

The alternative oxidase (AOX) is a widespread monotopic protein associated with mitochondria of plants [1, 2], some metazoa (Annelida, Sipuncula, Mollusca, Arthropoda) [3], fungi [1, 4–9] and protists [2, 10–13]. Early structural modeling suggested that the protein contains two hydrophobic regions and two iron binding motifs, which are involved in the transfer of electrons from two molecules of ubiquinol (QH₂) to oxygen, resulting in the production of water

grant from CONACyT, 218133, México. Guadalupe Guerra received a grant from Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP 20150761), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Christian A. Cárdenas-Monroy received a doctoral fellowship grant from CONACyT, México. Research in the laboratory of M Feldbrügge was supported by DFG/CONACyT FOR1334.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

[10]. This architecture was confirmed by the crystal structure of the protein from *Trypanosoma brucei* [14].

AOX facilitates respiratory activity of mitochondria and therefore the functioning of the Krebs cycle in the presence of inhibitors of the cytochrome pathway, such as nitric oxide or cyanide (both inhibitors of complex IV), and antimycin A (inhibitor of complex III) [2, 10, 15]. Furthermore, AOX is specifically inhibited by n-propylgallate (nPG) or n-octylgallate (nOG), and salicylhydroxamic acid (SHAM) [16]. As expected from its monotopic nature, the enzyme does not generate a proton electrochemical potential gradient, and thus it is not involved directly in the synthesis of ATP and the conservation of energy [2]. Regulation of AOX activity is similar in fungi and protists, but different in plants. In plants the enzyme is a homodimer which is activated by the reduction of a disulfide bridge between two cysteine residues located in different subunits of the homodimer, followed by the formation of a thiohemiacetal with a ketoacid, mostly pyruvate [15, 17–22]. In contrast, the AOX in fungi and protists is activated by AMP and GMP [23–26].

So far, the role of the alternative oxidase (AOX) in the majority of the organisms is unclear, but at least four general functions have been proposed for this protein. First, the presence of AOX prevents the inhibition of the Krebs cycle when the mitochondrial cytochrome pathway is blocked [27]. This allows anaplerotic reactions to feed biosynthetic pathways that maintain cell growth and survival under harmful conditions [28]. Second, a thermogenic effect generated by the activity of AOX in some plants has been described [29]. Third, AOX activity is an important cellular mechanism for the prevention of oxidative stress. Indeed, regulation of AOX expression by ROS has been reported for plants [30] and fungal cells [31]. Finally, AOX is important for the development of the parasite *T. brucei* [10]. Because the amount of mitochondrial cytochromes is insufficient when *T. brucei* is living in the bloodstream of its host, the activity of AOX is essential for the survival of the parasite [10]. Therefore, this enzyme has been proposed as a target for chemotherapeutic treatment of *T. brucei* infections [32].

In fungi it has been proposed that AOX participates in the response of cells against different types of stress. This is mainly based on observations that the amount of AOX transcripts is increased during e.g. heat shock in *Aspergillus niger* and *Yarrowia lipolytica* [31, 33], during an oxidative stress in *Aspergillus fumigatus* [34], *A. niger* [31], *Magnaporthe grisea* [8], *Candida albicans* [35], *Hansenula anomala* [36], *Paracoccidioides brasiliensis* [37], and under osmotic stress in *A. niger* [31]. In pathogenic fungi such as *Cryptococcus neoformans* [38] and *P. brasiliensis* [39] virulence was decreased when AOX gene was deleted, suggesting an important role for this enzyme during the infection process.

We study mitochondrial functions in *Ustilago maydis*, a dimorphic fungus of the basidiomycetes phylum, which infects the economically important crop maize [40, 41]. *U. maydis* represents a versatile eukaryotic model organism due to its easy cultivation and a set of established molecular, cell biological as well as biochemical tools. In the past *U. maydis* has been used to study several biological processes, such as host-parasite relationships [42–45], yeast-mycelium transition [45, 46], gene regulation [47], and more recently, intermediary metabolism [5, 23, 48].

Importantly, in comparison with other model yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria of *U. maydis* do contain an electron transport chain with the four classic respiratory complexes (complex I, II, III, and IV), the glycerol 3 phosphate shuttle, and a pair of alternative elements, at least an external NADH dehydrogenase, and the alternative oxidase, Aox1, which is activated by AMP [4, 23]. In contrast with the yeast *S. cerevisiae*, which can produce ethanol through fermentation [49], *U. maydis* is a fully respiratory microorganism that depends on mitochondrial activity for the synthesis of ATP [5, 50]. Previously, we have shown that inhibition of Aox1 activity by nOG induces lipid peroxidation [51]. In the present study we analyzed

the biological function of the enzyme in more detail by combining expression studies and reverse genetics.

Materials and methods

Materials

Analytical grade reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), E. Merck (Darmstadt, Germany), BioRad (Hercules, CA, USA), Agilent Technologies (La Jolla, CA, USA), Axygen Biosciences (Union City CA, USA), Qiagen (Hilden, Germany), Millipore (Billerica, MA, USA) and Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Germany). *U. maydis* ATCC 201384 FB2 was obtained from the American Type Cell Collection (Manassas, VA, USA).

Strains and cell cultures

Strains were constructed as described elsewhere [52]. *U. maydis* strains were grown at 28°C in rich YPD medium (1.0% glucose, 0.25% peptone, and 0.5% yeast extract), minimal medium (MM) with different carbon sources (1.0% glucose, 0.4% ethanol, 1.0% glycerol or 1.0% lactate) and nitrogen sources (0.3% of ammonium as (NH₄)₂SO₄ or 0.3% of nitrate as KNO₃), 1x salt and 1x mineral solutions [53]. In all cases, cells were cultured in 100 mL of YPD for 18–24 h, harvested by centrifugation at 1000 g, washed twice with H₂O, and the final suspension (1 mL/g wet weight) was used to inoculate 1 L of medium with 20 absorption units (A_{600nm}). The cells were harvested at the exponential or stationary phases and suspended with distilled H₂O at a final ratio of 1 mL/g wet weight. Duplication times were obtained from measurements of the optical density at 600 nm.

Plasmid construction

Escherichia coli Top10 (Invitrogen/Life Technologies) was used for cloning purposes with conventional culture and transformation techniques [54]. Plasmid pUMa2163 was generated using the Golden Gate cloning technology [55]. Briefly, upstream flank (UF) and downstream flank (DF) of *aox1* (accession number umag_02774) were generated by PCR on UM521 genomic DNA using oligonucleotide combinations oRL1400/oRL1401 and oRL1402/oRL1403 (S1 File), respectively. PCR products and pUMa1507 (storage vector I for simple knockout with HygR) were cut and ligated into pUMa1467 (destination vector) in a one-pot BsaI restriction/ligation reaction. For the construction of pUMa2169 a new UF containing the *aox1* ORF and 1015 bps upstream region was generated by PCR using oligonucleotide combination oRL1400/oRL1425 (S1 File) on UM521 genomic DNA. The product was cut with SfiI/XcmI and ligated with a 4300 bps SfiI/XcmI fragment derived from pUMa2163 as well as a 2448 bps SfiI/SfiI fragment derived from pUMa389, containing eGfp and a Nourseothricin-resistance cassette for C-terminal protein fusions [56]. Plasmid constructions were verified by analytical restriction reactions as well as by sequencing of all regions amplified by PCR. For ectopic expression of *aox1*-Gfp under control of the Potef promoter, the ORF of *aox1* was amplified by PCR using oligonucleotide combinations oDD808/oMF894 (with 5' UTR), and oDD809/oMF894 on UM521 DNA and was introduced into p123 [57].

Oxygen consumption measurement

Oxygen consumption was measured in a 1.5 mL chamber at 30°C, using a Clark-type electrode connected to an YSI5300A biologic oxygen monitor [4, 23]. The assays were carried out in 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 to 10 mg of cells (wet weight), and 7.0 mM glucose as substrate. 1.0

mM potassium cyanide (CN) was used to inhibit the cytochrome pathway and 6.0 μ M of n-octylgallate (nOG) to inhibit the alternative oxidase (Aox1). Ethanol or dimethyl sulfoxide (DMSO), were used to prepare the 4.0 mM stock solution of nOG.

Mitochondria isolation

U. maydis cells were harvested by centrifugation (3000 g, 5 min), washed twice with distilled H₂O, and resuspended in lysis buffer (300 mM mannitol, 50 mM KH₂PO₄, 5.0 mM MgCl₂, 1.0mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7.0) to a final ratio of 3.5 mL/g wet weight. Subsequent steps were carried out in the same buffer at 4°C. Cells were disrupted with glass beads, in the presence of 1.0 mM of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF); the tubes were agitated 4 times for 30 s, at 2 min intervals in a Mini-Beadbeater (Biospec products, USA). Mitochondria were isolated by differential centrifugation as previously described [23]. Briefly, cell debris was eliminated by centrifugation at 3000 g for 10 min. The mitochondrial pellet was obtained by spinning the 3000 g supernatant for 10 min at 12000 g, washed once to eliminate cytosolic contamination, and suspended with lysis buffer to a final protein concentration of 10–30 mg/mL.

Determination of protein concentration

Protein concentration was determined as described by Lowry et al. [58]. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

Microscopy, image quantitative analysis and flow cytometry

Microscopic analysis of sporidial and hyphal cells of *U. maydis* was performed as described before [52]. For staining with Mitotracker Red *U. maydis* cultures were grown to an OD₆₀₀ = 0.5 incubated with 1 mg/ml Mitotracker Red CM-H₂ROS (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 5 minutes, washed with CM and then directly analysed. For biotin staining of the cell wall, *U. maydis* cells were harvested and washed twice with 50 mM PBS (pH 8.0), resuspended in PBS with 1mg/ml biotin and incubated for 30 min at room temperature. Washed thrice with 6x Vol. TM buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, pH 7.5), and 1x with 6x Vol. PBS. For subsequent biotin staining with avidin cells were washed twice with 6x Vol. H₂O, resuspended in 1ml H₂O + 1 μ l Extravidin-TRITC (a modified avidin conjugated to the fluorochrome tetramethyl-rhodamine isothiocyanate; Sigma-Aldrich) and incubated for 10 min at room temperature. Cells were washed twice with 1 ml H₂O and resuspended in fresh medium. For Aox1-Gfp expression analysis by flow cytometry the Uma1333 (Aox1-Gfp) strain was used. Samples of cells grown in minimal media supplied with ethanol as carbon source, harvested in the stationary phase, incubated in the presence of glucose 1.0% and in the presence or absence of antimycin A were taken every hour for 5 hours. Cellular samples were fixed with paraformaldehyde 0.5% in PBS buffer (monobasic potassium phosphate 3.0 mM; dibasic sodium phosphate 10 mM; sodium chloride 155 mM, pH 7.4) and then the data acquired on a BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA), FACScalibur flow cytometer and analysed with the Flow Jo software [59].

Desiccation test

The desiccation test was adapted from Capece *et al.* 2016. [60]. Cultures of *U. maydis* strains were grown until they reached stationary phase. Cultures were then diluted to an OD₆₀₀ of 1.0. Subsequently, 1 ml aliquots of the cell cultures were transferred to 1.5 ml reagent tubes. After centrifugation, the supernatant was discarded and the cell pellets were dried for 0 or 4 hours at 28°C. Subsequently, the pellets were suspended in 1 ml H₂O and cells resuspended by

incubating at 28°C and 1,000 rpm. The resuspended cells were plated on CM + glucose plates and after three days of growth, the colony forming units (cfu) were quantified.

SDS-PAGE and Aox1 immunodetection

Proteins from mitochondrial preparations were separated by SDS-PAGE on 7.5% (w/v) polyacrylamide slab gels [61], and transferred to a PVDF membrane by a discontinuous buffer system [62]. Nonspecific antibody-binding sites were blocked in a Tris-buffered saline-Tween solution (TBST) with 5% of nonfat milk. Detection of the wild type Aox1 protein was carried out with a monoclonal anti-AOX antibody (dilution 1:100), raised against *Sauromatum guttatum* (voodoo lily) AOX [63]. Detection of Gfp fusion proteins was carried out with a mixture of two monoclonal antibodies against Gfp (clones 7.1 and 13.1, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Bound antibodies were detected with the appropriate HRP-labeled secondary antibodies and the immobilon western chemiluminescence HRP substrate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Results and discussion

Aox1 capacity and protein amount is highly elevated during stationary phase

In order to learn more about the function of Aox1 we settled out to investigate enzyme capacity during the saprophytic yeast phase at different nutritional conditions. To this end we tested different nutrients and generated growth curves to define the exponential and stationary phases for each condition. An association between AOX expression and both the growth phase and the carbon source has been observed in other fungi, although the expression patterns depended on the fungus species. For instance, AOX capacity was insignificant during the exponential phase when *Pichia membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, and *Y. lipolytica* were cultured in the presence of glucose, and increased when cells reached the stationary phase [50, 64, 65]. *C. albicans* contains two alternative oxidases, Aox1A and Aox1B; Aox1A is constitutive, while Aox1B is expressed during the exponential phase when cells were grown in the presence of non-fermentable sources, but there was no expression of Aox1B in the presence of glucose [66, 67]. When *Pichia pastoris* was cultured in a medium containing glucose as carbon source, the expression of the AOX occurred in both the exponential and stationary phases ([68]).

Glucose, regardless the nitrogen source, and ethanol were good substrates for *U. maydis*, growing with duplication times between 2.0 ± 0.1 and 4.9 ± 0.3 h (S1 Fig). For glucose and ethanol 10 h corresponded to the exponential phase and 24 h to the stationary phase (S1 Fig). In contrast, cell growth in the presence of glycerol or lactate was quite slow (S1 Fig), such that 50 h corresponded to the exponential phase, and 125 h to the early stationary phase. Importantly, we can now differentiate precisely between exponential and stationary phases under the different growth conditions.

Previously, we reported that mitochondrial oxygen consumption by *U. maydis* depends on the classic cytochrome pathway (complexes I, II, III, and IV) and the Aox1 [4], which is inhibited by nOG and activated by AMP [23]. Taking advantage of this specific inhibition, we determined the respiratory activity of *U. maydis* cells cultured in media with different carbon and nitrogen sources, and harvested in the exponential or stationary phase. As shown in Fig 1A, two types of results were observed upon the addition of cyanide, which can be explained by the amount of Aox1 in the inner mitochondrial membrane. Cells grown in YPD and harvested in the stationary phase showed a more a less continuous rate of oxygen consumption when the cytochrome pathway was inhibited by cyanide, indicating a high capacity of the Aox1. The

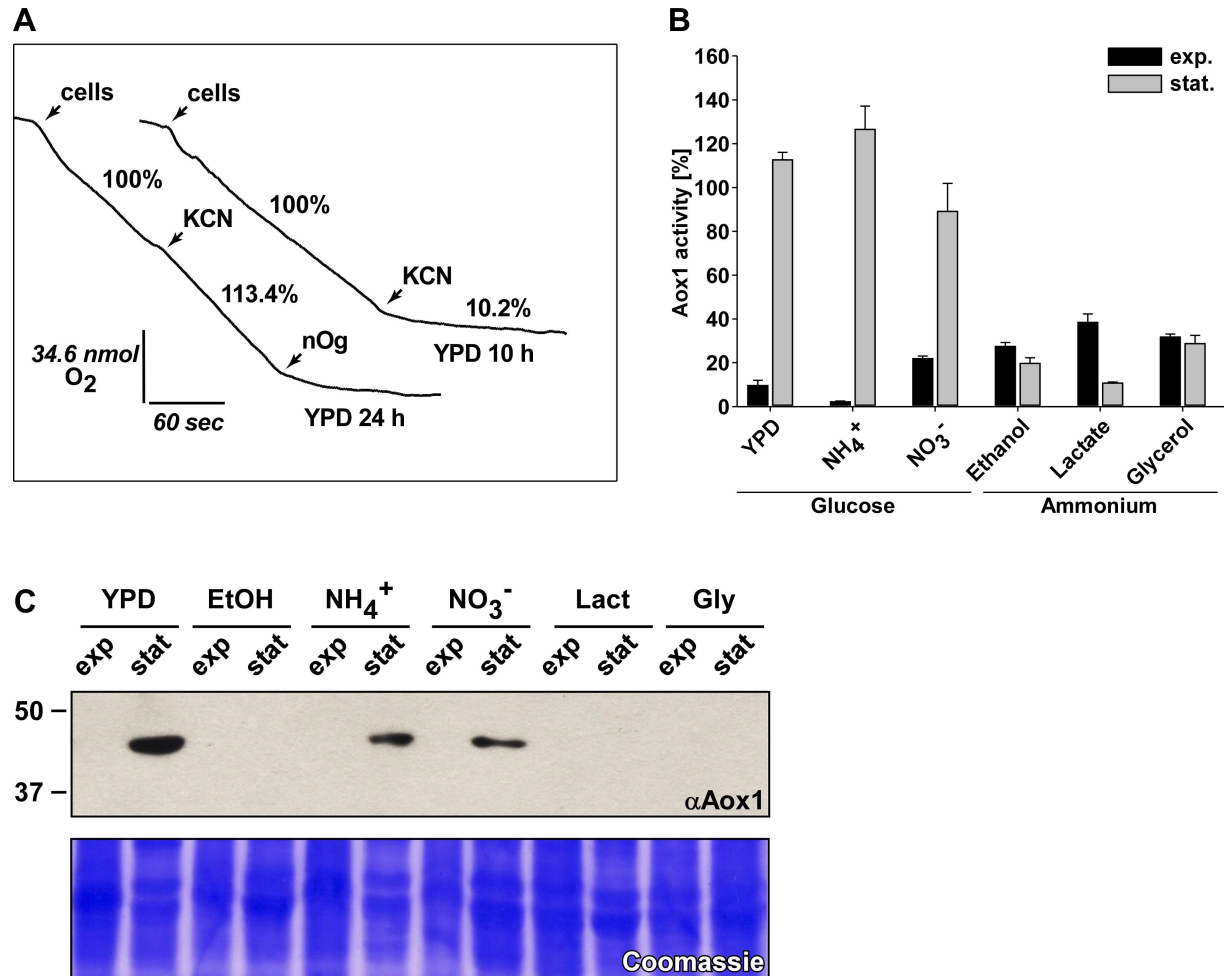


Fig 1. Aox1 is expressed in the stationary phase. **A)** Representative oxygen consumption measurements of FB2 sporidia in exponential and stationary phases. Respiration resistant to potassium cyanide (KCN) in *U. maydis* was due to the alternative oxidase (Aox1), which was inhibited by the addition of 6.0 μ M of n-octylgallate (nOG). **B)** Percent of Aox1 capacity of cells cultured in several carbon and nitrogen sources and harvested at the exponential and stationary phases. The respiratory activity was determined from the slope obtained before and after the addition of cyanide, as shown in Fig 1A. **C)** Western blot of the Aox1 in mitochondria of cells cultured in different carbon and nitrogen sources. The Coomassie stain shows similar protein load for the different lanes.

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g001

same holds true for cells cultivated in minimal medium with glucose and ammonium or nitrate as nitrogen sources (Fig 1B). This result was not unexpected since an increase of oxygen uptake in *U. maydis* cells upon the addition of antimycin A was described previously [69, 70]. However, for cells grown in the presence of glucose and harvested in the exponential phase, there was a large inhibition of the respiratory activity (80–98%), pointing to a low capacity of the Aox1 (Fig 1A). This effect was observed with the three nitrogen sources and in the presence of glucose (Fig 1B), suggesting that this behavior strongly depends on the growth phase of the cells. For the other carbon sources (ethanol, glycerol, and lactate), an inhibition of the respiratory activity by cyanide was observed in both growth phases (Fig 1B). In all cases, the residual respiratory activity was inhibited by nOG, indicating the participation of Aox1. In essence, higher Aox1 capacities were obtained when cells were grown in the presence of glucose and harvested at stationary phase (Fig 1B). It should be noted that addition of nOG instead of

cyanide produced only 0–15% inhibition of oxygen consumption in nearly all conditions, even in the mutant lacking Aox1 (data not shown).

To verify these results we followed two different strategies. Firstly, we detect the amount of Aox1 in mitochondrial protein fractions. To this end we performed Western blot experiments using a monoclonal antibody raised against plant AOX from *S. guttatum* (voodoo lily) [23, 63]. The antibody detected only a single band in the expected size of 49 kDa (Fig 1C). In agreement with the results shown in Fig 1B, the presence of Aox1 was observed only in mitochondria isolated from cells grown in the presence of glucose and harvested at the stationary phase (Fig 1C). In contrast, Aox1 was not detected in cells grown in the presence of glucose but harvested in the exponential phase (Fig 1C), or when cells were cultured in ethanol, glycerol or lactate, independent of the growth phase (Fig 1C).

Secondly, we generated strains expressing Aox1 fused at its C-terminus with Gfp (Aox1-Gfp) at the homologous locus of laboratory strain FB2. In order to test the functionality of the fusion protein we compared its capacity to wild type and to gene deletion mutant *aox1Δ* (Fig 2A). Testing the latter strains revealed that, as expected, no alternative oxidase activity could be measured (Fig 2B). Aox1-Gfp was clearly functional although its capacity was reduced in comparison to wild type (Fig 2B).

Studying cells grown to stationary phase using fluorescence microscopy revealed that Aox1-Gfp localized to mitochondria *in vivo* (Fig 2C). In order to compare the amount of Aox1-Gfp in mitochondria from exponentially grown cells and cells from the stationary phase we analyzed a mixture of cells simultaneously (Fig 2D, exponentially grown cells were labeled with biotin/avidin-TRITC for identification). This showed unambiguously that mitochondrial Aox1-Gfp was only detected in cells from the stationary phase. In summary, Aox1 capacity and expression was specifically induced when cells enter the stationary phase.

At first sight, this behavior makes sense. In the exponential phase, cells are rapidly dividing and engaged in biosynthetic processes supported by ATP [65, 71]. Since Aox1 decreases the efficiency of the oxidative phosphorylation its activity should be turned off or decreased when cells have a high requirement of ATP. However, cells in the stationary phase will face an environment with hypoxia, due to the high cell density reached at the end of the exponential phase and the large respiratory capacity of *U. maydis* cells. These are indeed the conditions for reduction of the ubiquinone pool in mitochondria and the generation of reactive oxygen species (ROS). Since AOX has been implicated in the protection against ROS, the increase in AOX capacity at the stationary phase might be related to this specific function. However, with ethanol, lactate, and glycerol the Aox1 capacity was approximately the same when cells moved from the exponential into the stationary phase (Fig 1B) pointing to a specific effect of glucose on the expression and/or capacity of Aox1 during the growth curve. In agreement with our results AOX was present in both phases when *D. hansenii* was grown with lactate as the carbon source, suggesting that this effect is related with the presence of glucose and the growth phase [65].

Aox1 expression is transcriptionally induced at the early stationary phase

In order to analyze the precise timing of Aox1 expression we performed time course experiments with Aox1-Gfp. We observed an increase of Aox1-Gfp amount at the onset of the stationary phase (Fig 3A). Since changes in pH of the culture medium during the cell growth might be associated with the expression of Aox1 we grew the cells in the presence of 100 mM MOPS (pH 7) to avoid acidification. Changes in the amount of Aox1 during incubation time were detected in cell extracts using anti-Gfp antibodies. The expression pattern of Aox1 was

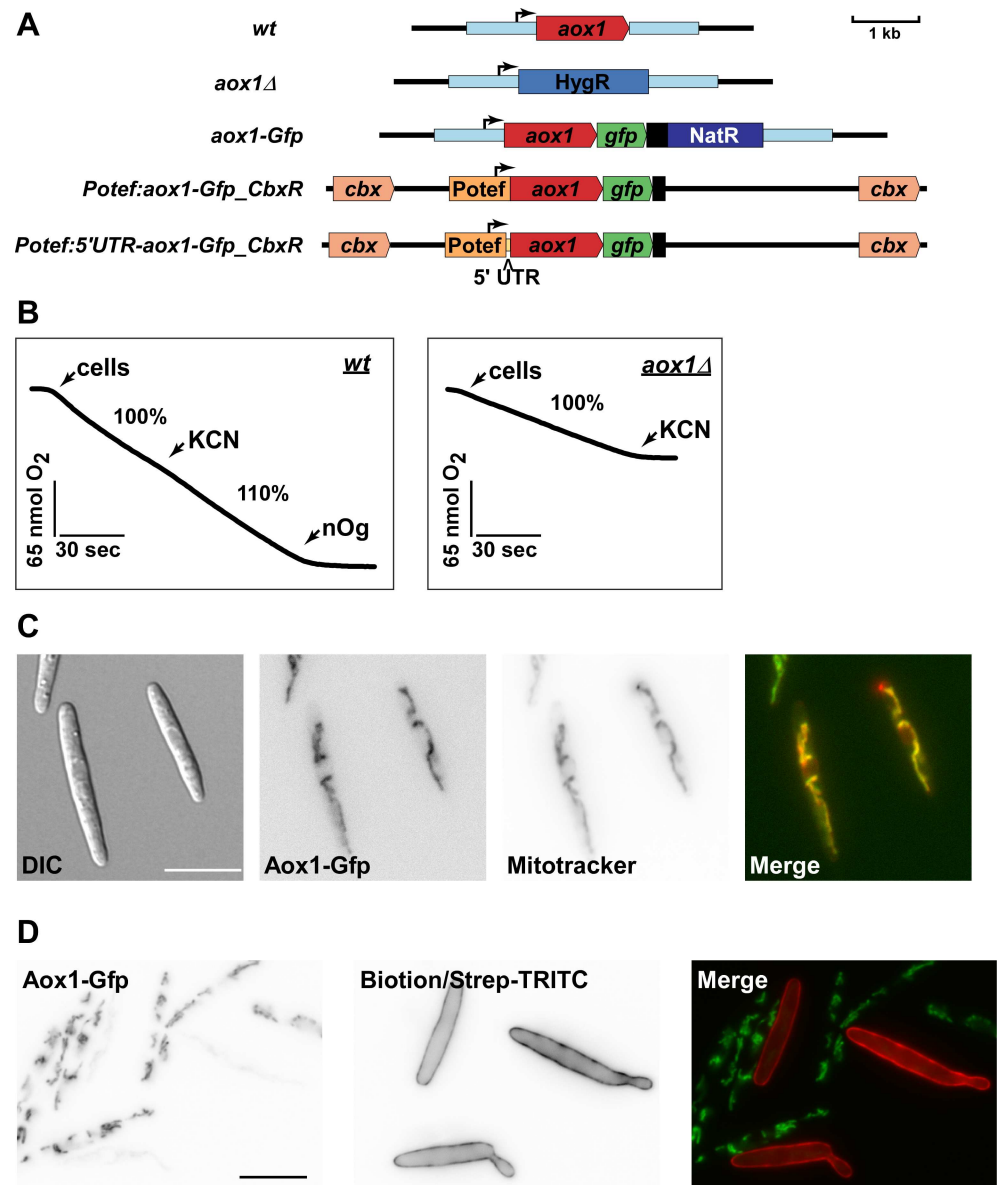


Fig 2. Validation of the function and localization of Aox1-Gfp and other mutants. **A)** Schematic depiction of the genomic loci of the investigated strains. For deletion the ORF of *aox1* was replaced by a hygromycin resistance cassette. The strains with the genotype *aox1-Gfp* express a C-terminal Gfp fusion of *aox1* under control of the native *aox1* promoter. Ectopic expression of *aox1-gfp* was achieved by introducing a C-terminal fusion with Gfp in the defined *cbx* locus. These constructs were expressed by the constitutive active P_{otef} promoter. Where indicated, constructs included the 65 bp native 5' UTR of *aox1*. **B)** Representative respiration profiles of FB2 (*wt*) and *aox1Δ* sporidia in the stationary phase upon addition of respiratory inhibitors. Potassium cyanide (KCN), inhibits complex IV of the respiratory chain. Residual respiration is due to the activity of alternative oxidase (Aox1) and can be inhibited by addition of n-octylgallate (nOG). Note that FB2 $aox1Δ$ does not show any respiration after addition of CN. Furthermore, oxidase capacity of *aox1-Gfp* in FB2 $aox1-Gfp$ seems to be attenuated, due to lower oxygen consumption (S2 Fig). **C)** Localization of Aox1-Gfp into the mitochondria of stationary phase sporidia of *U. maydis*. Sporidial cells were stained with Mitotracker Red and Aox1-Gfp. Fluorescence signals were analyzed by fluorescence microscopy. **D)** Aox1-Gfp signal can only be seen in the stationary phase of growth. Mixed culture of sporidial cells in exponential phase (OD₆₀₀ ~0.5) labeled with biotin/avidin-TRITC, and a stationary phase culture of *U. maydis*.

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g002

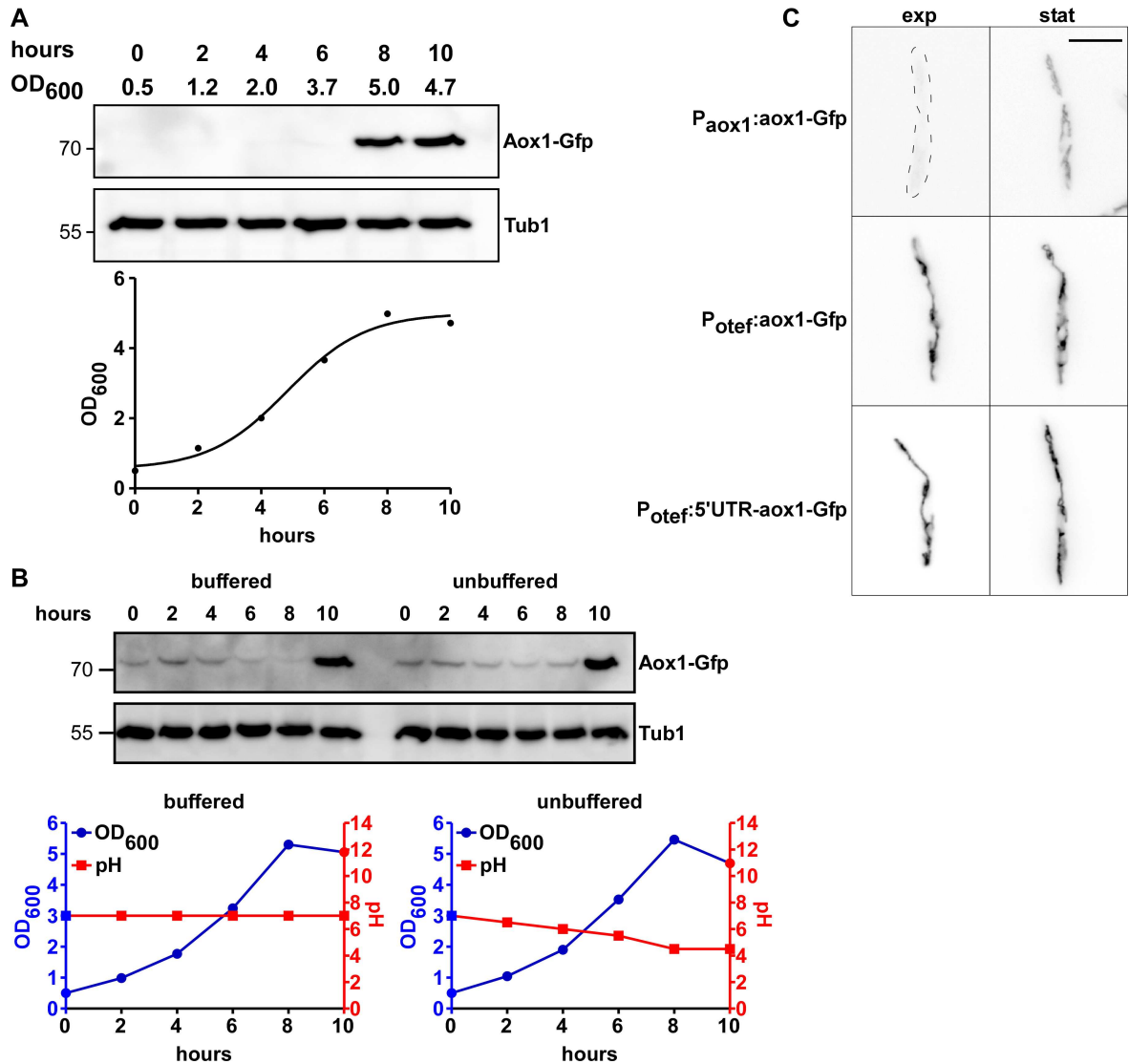


Fig 3. Expression of Aox1-Gfp. **A**) Expression of Aox1-Gfp dependent on OD and growth phase. Aox1-Gfp is expressed in the stationary phase. Aox1-Gfp was detected by anti-Gfp. Tub1 serves as loading control. **B**) Expression of Aox1-Gfp is not dependent on acidification of the media. Western Blot, growth curve, and pH values of the media (unbuffered = CM; buffered = CM + 100 mM MOPS) depending on time. **C**) Sporidia of FB2, FB2P_{otef}:aox1-Gfp, and FB2P_{otef}:5'UTR-aox1-Gfp showing that aox1-Gfp under the control of the ot_{ef}-promoter is expressed irrespective of the growth phase.

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g003

the same regardless of the acidification of the extracellular environment (Fig 3B). This observation is in agreement with our results that the pH value of the cultivation medium did not have any influence on the growth of FB2 or FB2aox1Δ (S3 Fig).

To explore the main regulatory step of Aox1 expression we constructed two mutants in which the wild type promoter was replaced by the constitutively active promoter P_{otef} (Fig 2A). In one case we included the 5' untranslated region of aox1 to account for potential translational regulation (P_{otef}:5'UTR-aox1-Gfp; Fig 2A). In both cases Aox1 capacity was comparable to wild type (S2 Fig), indicating that the increased expression of Aox1-Gfp rescued the slight defect of the C-terminal fusion of Aox1 with Gfp (compare Fig 2B and S2 Fig) [72].

Analyzing these strains revealed that the Aox1-Gfp amount was detectable at the same levels during the exponential and stationary phases (Fig 3C). This suggests that the main regulatory step takes place at the transcriptional level since the constitutive synthesis of *aox1* mRNA resulted in the presence of the Aox1-Gfp in mitochondria from cells harvested in both the exponential and stationary growth phases. In some plants and fungi, the presence of oxidative stress [73, 74], low or high temperature [75, 76], or osmotic stress [77–79], induces an increase in the concentration of AOX in mitochondria [66]. In the majority of the cases, this was associated with an activation of the synthesis of RNA, indicating that the expression of AOX in plants and fungi is mainly regulated at the transcriptional level [80–82].

Aox1 is dispensable for yeast-like growth and for the response to different temperatures

Next we wanted to learn more about the biological role of Aox1. It is difficult to interpret the results from experiments with the AOX inhibitors because they affect other processes in cells. For example, gallates inhibit the growth of *S. cerevisiae* in spite of the absence of an AOX in this organism [83, 84]. Therefore, we used the *aox1Δ* mutant (Fig 2A) to study the participation of this enzyme at different stages of the life cycle of *U. maydis*. First we used the FB2 strain to analyze the influence of Aox1 on the saprophytic growth of *U. maydis* [57]. In contrast to other reports in fungi (see below) we did not observe any difference between the FB2 wild type and the *aox1Δ* mutant. Cell budding (Fig 4A), growth rate in complete medium (Fig 4B), and sensitivity to low (20°C) or high (37°C) temperatures (Fig 4C) were basically the same regardless the presence of Aox1, indicating that this enzyme was not involved in any of these processes. The growth rate of FB2 and FB2*aox1Δ* was even comparable when using different carbon sources (S3 Fig). It is worth noting that similar growth rates for wild type and the mutant lacking Aox1 cultured in liquid rich medium were reported previously in *U. maydis* [69].

Next we studied both the filamentous growth using the AB33 strain (wt and *aox1Δ*) and corn infection using the compatible FB1 and FB2 strains. Deletion of the *aox1* gene had no effect on the filamentous growth of the cell as hyphae grew unipolarly, and inserted septa at the basal pole (Fig 5A). Also the rate of bipolar cells were not drastically increased (Fig 5B) suggesting that microtubule-dependent processes were not disturbed, since it is known that this results in an increased rate of bipolarity [52, 85]. Also, overexpression of the enzyme did hardly affect the filamentous growth programme although we observed a slight increase in the amount of bipolar hyphae in strains expressing Aox1-Gfp (Fig 5A and 5B). More interestingly, infection of the maize plant was not affected by the absence of the Aox1 (Fig 5C) indicating that this enzyme does not have a role during the initial infection and the further development of *U. maydis* inside the plant.

In several pathogenic fungi, this enzyme participates in cellular growth, morphological transitions (yeast-mycelium) [37, 86], and in some cases in the infection of the specific host [87, 88]. Incubation of *Sclerotinia sclerotiorum* in the presence of salicylhydroxamic acid (SHAM) inhibits the mycelial growth of the organism and diminished the biomass yield [89]. Similar results were obtained with *Nomuraea rileyi* [90]. Either incubation of *N. rileyi* with SHAM or knock-down of the AOX gene drastically changed the hyphae morphology, decreased the microsclerotial production, and reduced the growth yield of the fungus [90]. Mutants of *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, and *C. albicans* lacking the AOX showed low virulence and low tolerance to oxidative and other types of stress [37, 38, 66, 91]. In *M. grisea* loss of Aox1 had no effect on the pathogenicity and virulence of this organism during the infection of barley leaves. Interestingly, AOX was essential when the infection assays were conducted in

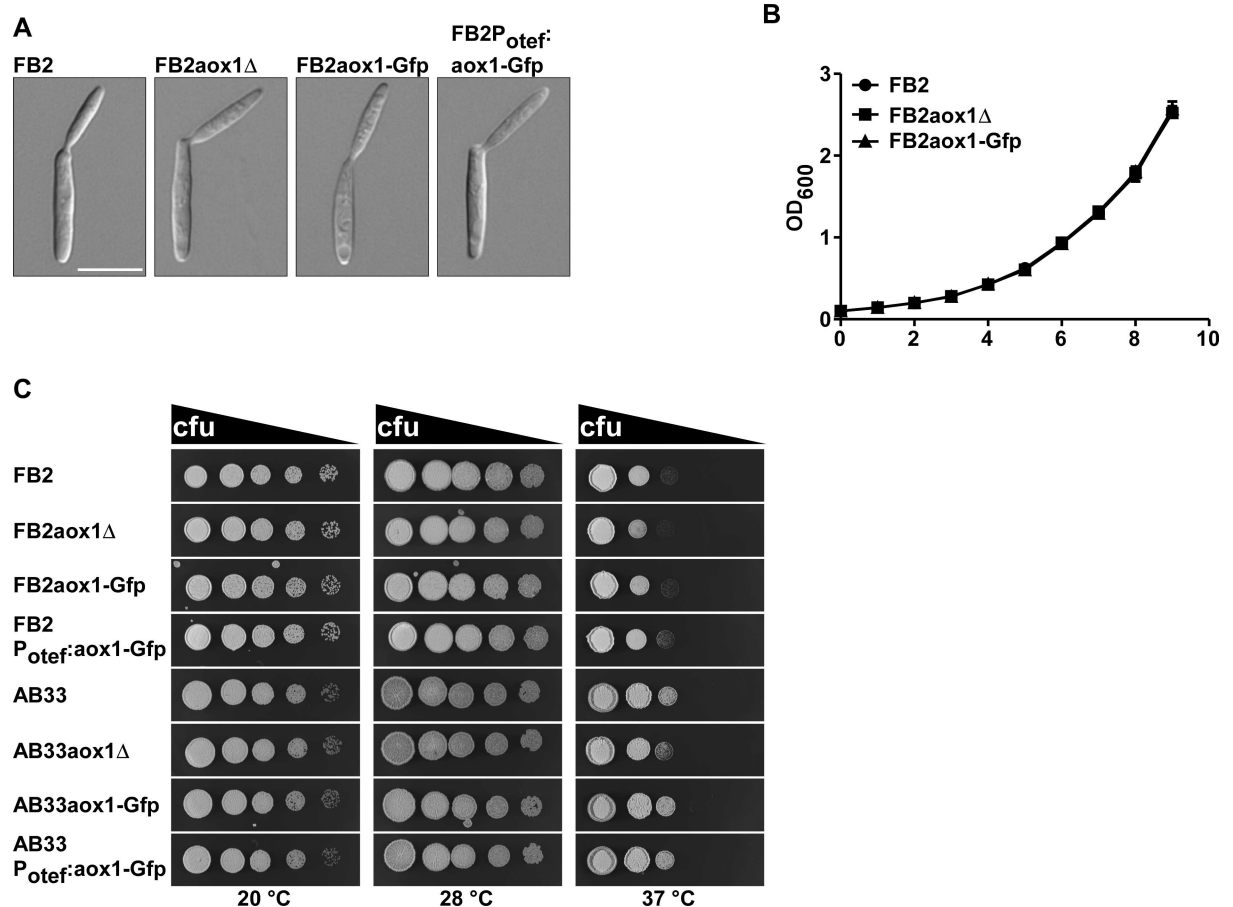


Fig 4. Effect of Aox1 on the sporidia growth of *U. maydis* and sensitivity to temperature. **A**) Budding of yeast cells. Sporidia of FB2 (wt), FB2aox1Δ, FB2aox1-Gfp, and FB2P_{otef}:aox1-Gfp. **B**) Time course of cell growth in rich medium as measured by the absorbance at 600 nm. **C**) Effect of temperature on the growth of sporidia. Growth plates with 1:5 dilutions (starting with OD = 0.5).

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g004

the presence of azoxystrobin, a fungicide that interacts with the respiratory complex III of *M. grisea* [92].

Aox1 is crucial in coping with respiratory stress in the yeast and hyphal form

Thus far we only tested normal unstressed conditions. In order to investigate a role of Aox1 during respiratory stress we used antimycin A to block complex III resulting in respiratory defects. Like some commercial antifungal molecules that inhibit complex III (azoxystrobin or metominostrobin [93]), antimycin A also induces a respiratory stress. Loss of Aox1 renders yeast-like cells of *U. maydis* completely sensitive to antimycin A whereas the growth of the wild type and of strains expressing Aox1-Gfp was similar, supporting our previous conclusion that Aox1-Gfp was at least partially functional. To better outline the differences between cells lacking Aox1 (FB2aox1Δ), cells containing normal amounts of Aox1 but with different activities (WT, FB2aox1-Gfp), and cells overexpressing the enzyme (P_{otef}:5'UTR-aox1-Gfp and P_{otef}:aox1-Gfp) we measured the number of colonies forming units (cfu) in the presence or absence of antimycin A. In the absence of the inhibitor, the number of colonies was independent of the presence of Aox1 or the expression levels of this enzyme in cells from both the exponential and

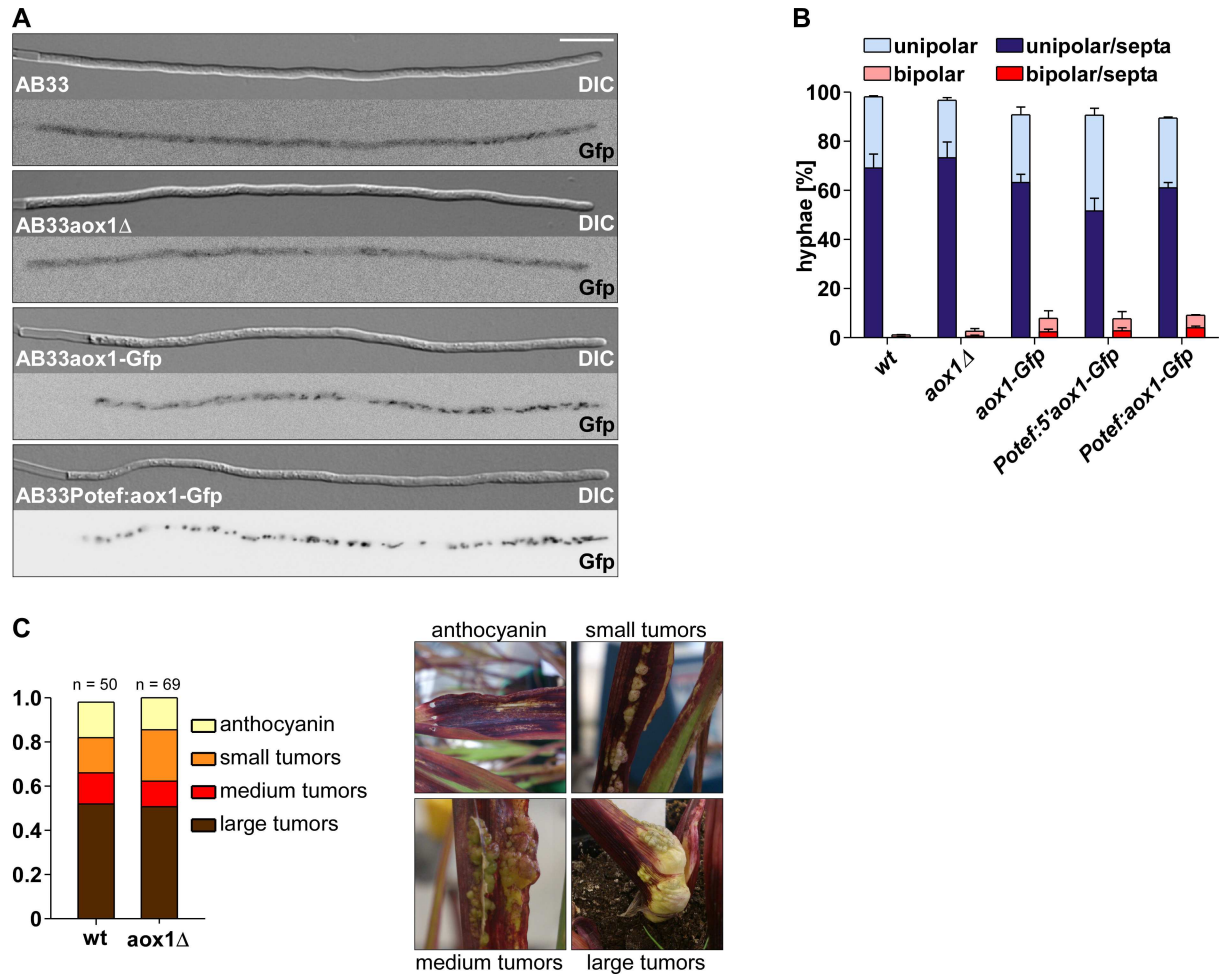


Fig 5. Effect of Aox1 on the growth of *U. maydis* and infectivity. **A)** Filamentous growth of *U. maydis* AB33 derivatives 8 h.p.i., size bar, 10 μ m. DIC and Gfp fluorescence images are depicted for each strain. Note that the Gfp-labelled images in AB33 and AB33aox1 Δ depict unspecific fluorescence, which is detectable with low intensity in these control strains. **B)** Percentage of hyphae (8 h.p.i.): unipolarity, bipolarity, and septum formation was quantified (error bars, s.e.m.; n = 3 independent experiments; >100 hyphae were counted per experiment; note that septum formation is given relative to the values of unipolar or bipolar hyphae set to 100%). **C)** Results of plant infection experiments with wt strains (FB1 x FB2) and the aox1 Δ strains (FB1aox1 Δ x FB2aox1 Δ). The percentage of plants with typical disease symptoms is given (two experiments, at least 50 plants infected with each strain).

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g005

stationary growth phases, indicating similar viability in all conditions (Fig 6B). Growth in the presence of antimycin A was fully inhibited in cells lacking the aox1 gene, regardless of the growth phase, indicating the importance of this enzyme for cell growth when the cytochrome pathway was inhibited (complex III or IV; Fig 6A and 6B). For cells expressing the normal amount of the protein, FB2 and FB2aox1-Gfp strains, their viability on media containing antimycin A was smaller in the exponential phase than in the stationary phase in agreement with the lower amount of Aox1 in the exponential phase (Fig 6A and 6B). Interestingly, viability or cell survival in the presence of antimycin A was fully recovered when cells overexpressed the Aox1 (P_{otef}:5'UTR-aox1-Gfp and P_{otef}:aox1-Gfp), in both growth phases (Fig 6B), indicating that the alternative oxidase is important to deal with the inhibition of the respiratory chain, allowing the generation of a proton motive force via complex I, and restoring the growth capacity. In agreement with previous reports the presence of antimycin A induced the synthesis of Aox1 (Fig 6C) [23], pointing to an unknown regulatory circuit. It has been proposed that

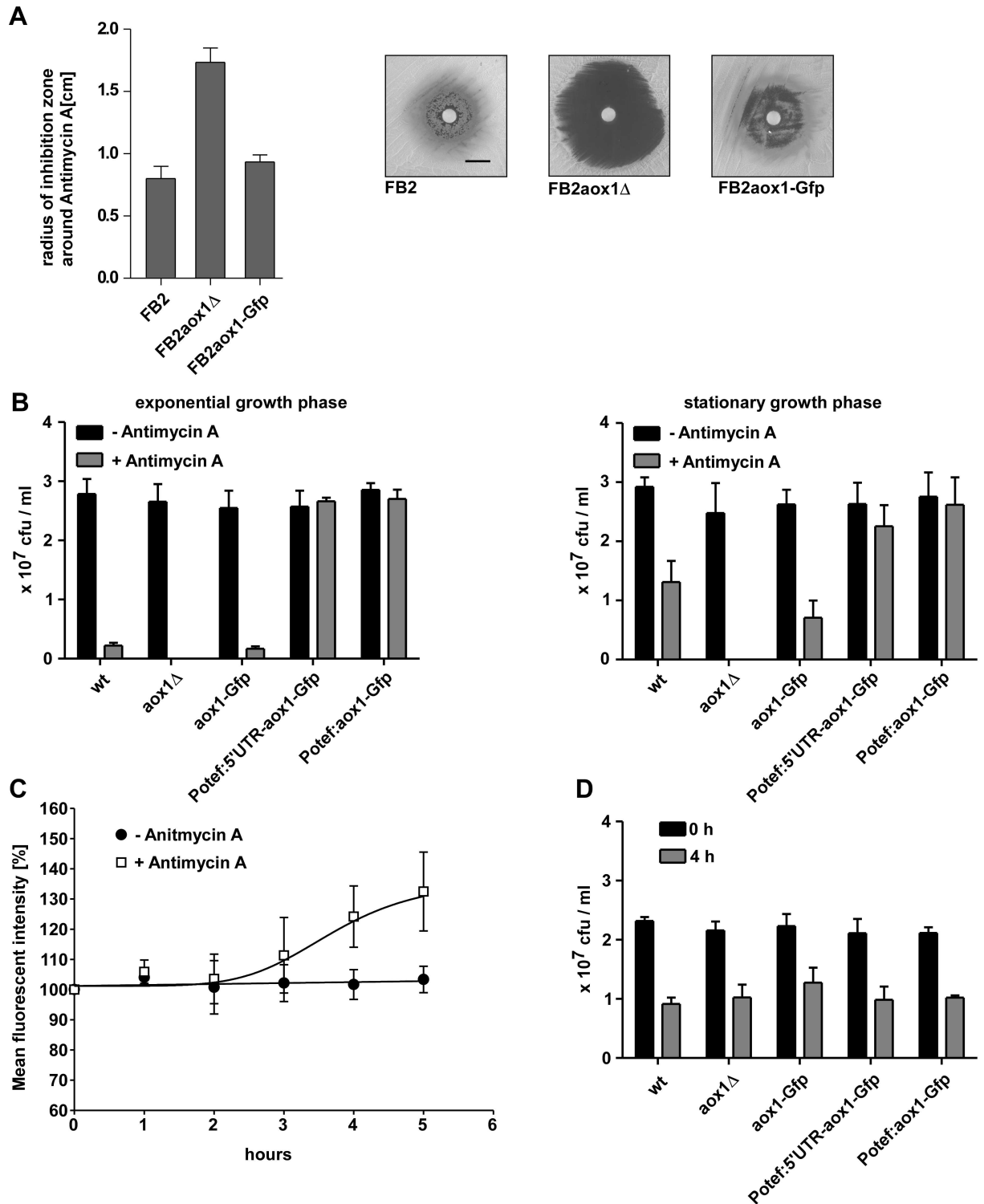


Fig 6. Effect of the presence of Aox1 on the sensitivity of sporidia to antimycin A. **A)** Sensitivity of *U. maydis* WT (FB2) and mutants (FB2aox1Δ and FB2aox1-Gfp) to antimycin A. 10 μl of antimycin A (10 mg/ml) was placed in the center of the plate with *U. maydis* cells, and the radius of inhibition of the growth for FB2, FB2aox1Δ and FB2aox1-Gfp was measured. **B)** Colony forming units obtained in presence or absence of antimycin A by cells harvested at the exponential and stationary phases. **C)** Induction of Aox1-Gfp expression by antimycin A (2 μM final concentration). The fluorescent signal was measured by flow cytometry. **D)** Sensitivity of *U. maydis* WT and mutants to desiccation.

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g006

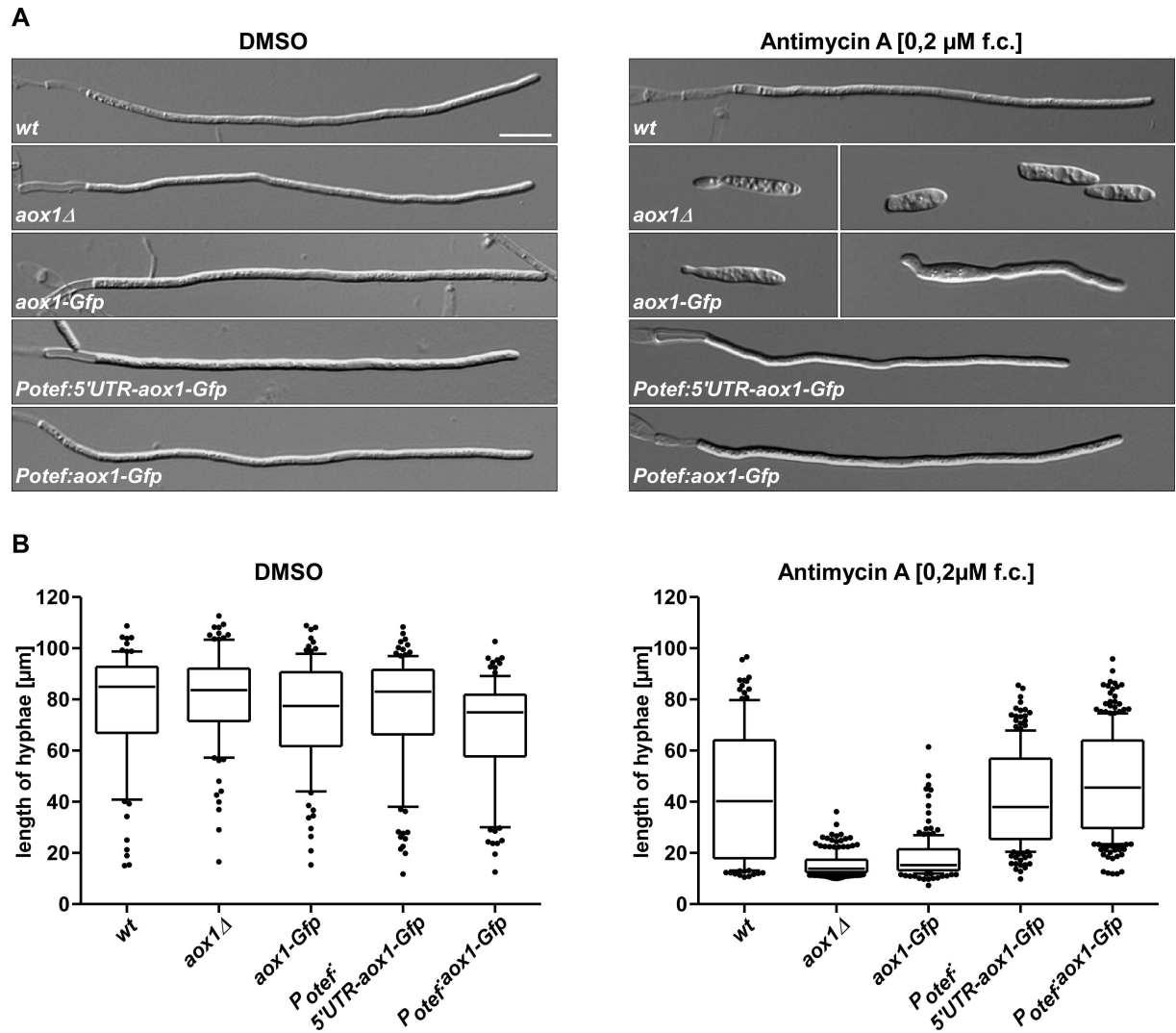


Fig 7. Effect of the presence of Aox1 and antimycin A on the filamentous growth of *U. maydis*. **A)** Filamentous growth of *U. maydis* AB33 wt and mutants in the presence or absence of antimycin A. **B)** Measurement of the length of the hyphae formed by *U. maydis* AB33 and derivatives in the presence or absence of antimycin A.

doi:10.1371/journal.pone.0173389.g007

the signal underlying the synthesis of AOX is an increase in ROS, specifically hydrogen peroxide [73, 74]. A recent study reports that the AOX was essential to maintain mitochondrial respiration when plants were exposed to drought, an abiotic stress that inhibits the cytochrome pathway [94]. In order to test for a similar function of Aox1 in *U. maydis*, we subjected FB2 derivatives to desiccation. However, comparable survival rates were obtained for all *aox1* alleles (Fig 6D).

Importantly, the same protection of Aox1 during respiratory stress is also operational during hyphal growth. In the absence of antimycin A growth of AB33 strains (*wt*, *aox1Δ*, *aox1-Gfp*, *Potef:5'UTR-aox1-Gfp* and *Potef:aox1-Gfp*), measured by the increase in the length of the hyphae, was basically the same independent of the expression of Aox1 (Fig 7A and 7B). With antimycin A in the medium only the wt (AB33) and the two strains overexpressing the protein (AB33 $P_{otef:5'UTR-aox1-Gfp}$, and AB33 $P_{otef:aox1-Gfp}$) displayed normal filamentous growth. In the *aox1Δ*, filamentous growth was fully inhibited, whereas cells

containing the fusion of Aox1 with Gfp showed a reduced filamentous growth, suggesting that the smaller capacity of Aox1-Gfp was not enough to support the synthesis of ATP required for this process. In summary, in both growth forms of *U. maydis*, i.e. yeast-like and hyphal growth, Aox1 is crucial to cope with respiratory stress. With few exceptions plants and fungi increase their AOX capacity when incubated with H₂O₂, menadione or paraquat [34, 66, 67], suggesting an important role of the AOX to cope with oxidative stress. Western blot analysis also indicates an increase in the mitochondrial AOX content for some of these studies [66] and also an increase in AOX transcripts [81, 82]. After a 3–4 h incubation of *U. maydis* sporidia in the presence of sodium azide, cyanide or antimycin A, there was an increase in the rate of oxygen uptake in the presence of cyanide [69, 70] pointing to an increase in the AOX content.

Conclusion

Aox1 is specifically induced during the stationary phase when cells are cultured in the presence of glucose, independent of the nitrogen source. With other carbon sources the expression of Aox1 was much smaller than with glucose and approximately the same in both growth phases. Acidification of the growth media was not implicated in the expression of Aox1 in the stationary phase. It seems that in rich YPD medium expression of Aox1 is mainly regulated at the transcriptional level. In spite of the many roles proposed for AOX in fungal cells, in *U. maydis* this enzyme does not participate in the growth of yeast cells or in the adaptation of cells to high or low temperatures. Aox1 is dispensable for infectious growth and plant infection. However, Aox1 allows the cells to grow in the presence of respiratory chain inhibitors. Thus, although Aox1 is not essential for the known normal biology of the fungus, it is clearly needed to cope with respiratory stress at different stages of the life cycle. It is important to note that Aox1 might carry out additional functions during specific environmental conditions that escaped our analysis, such as the survival and pathogenicity of *U. maydis* in the presence of fungicides.

Supporting information

S1 File. Description of strains, plasmids and oligonucleotides used in this study. (PDF)

S1 Fig. Growth curves of *Ustilago maydis*. *Ustilago maydis* was grown in different carbon and nitrogen sources and the absorbance at 600nm measured at the indicated time. **YPD**, rich medium (1.0% glucose, 0.25% peptone, and 0.5% yeast extract); **NH₄⁺**, minimal medium with glucose (1.0%) and ammonium sulfate (0.3%); **NO₃⁻**, minimal medium with glucose (1.0%) and potassium nitrate (0.3%); **EtOH**, minimal medium with ethanol (0.4%) and ammonium sulfate (0.3%); **Lactate**, minimal medium with lactate (1.0%) and ammonium sulfate (0.3%); **Glycerol**, minimal medium with glycerol (1.0%) and ammonium sulfate (0.3%). (TIF)

S2 Fig. Respiratory activity of strains with the Aox1 fuse to Gfp. Oxygen consumption was measured as indicated under material and methods. Respiratory traces of ***aox1-Gfp***, ***Potef:5'UTR-aox1-Gfp***, and ***Potef:aox1-Gfp*** sporidia in the stationary phase. Arrows show the addition of KCN and n-octylgallate (nOG). (TIF)

S3 Fig. Growth curves of *Ustilago maydis* FB2 and FB2aox1Δ. *Ustilago maydis* wild type and the strain lacking *aox1* were grown in different carbon sources as in [S1 Fig](#), using ammonium sulfate (0.3%) as nitrogen source. Minimal medium with glucose was prepared with or without

50 mM MOPS.
(TIF)

Acknowledgments

We thank Sofía Olvera-Sánchez, Héctor Vázquez-Meza, and Ute Gengenbacher for their technical assistance. This work is part of the Ph.D. studies of Christian A. Cárdenas-Monroy in the Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Author Contributions

Conceptualization: MF JPP.

Formal analysis: CACM TP GPZ MF JPP.

Funding acquisition: GG MF JPP.

Investigation: CACM TP GPZ.

Methodology: MF JPP.

Project administration: MF JPP.

Resources: GG MF JPP.

Supervision: MF JPP.

Validation: CACM TP MF JPP.

Visualization: CACM TP GMO.

Writing – original draft: CACM TP GG MF JPP.

Writing – review & editing: CACM TP GG MF JPP.

References

1. Albury MS, Elliott C, Moore AL. Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiol Plant*. 2009; 137(4):316–27. doi: [10.1111/j.1399-3054.2009.01270.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01270.x) PMID: [19719482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19719482/)
2. Moore AL, Albury MS. Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(Pt 5):1022–6. doi: [10.1042/BST0361022](https://doi.org/10.1042/BST0361022) PMID: [18793182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18793182/)
3. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J Exp Biol*. 2009; 212(Pt 16):2627–34. doi: [10.1242/jeb.032151](https://doi.org/10.1242/jeb.032151) PMID: [19648408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19648408/)
4. Juarez O, Guerra G, Martinez F, Pardo JP. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1658(3):244–51. doi: [10.1016/j.bbabi.2004.06.005](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.06.005) PMID: [15450962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15450962/)
5. Juarez O, Guerra G, Velazquez I, Flores-Herrera O, Rivera-Perez RE, Pardo JP. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *Febs J*. 2006; 273(20):4603–15. doi: [10.1111/j.1742-4658.2006.05463.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05463.x) PMID: [16965537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16965537/)
6. Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC. Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 190(1):93–7. PMID: [10981696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10981696/)
7. Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2003; 3(3):239–45. PMID: [12689632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12689632/)
8. Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A, et al. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1442(2–3):161–9. PMID: [9804939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9804939/)
9. Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1989; 9(3):1362–4. PMID: [2524649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2524649/)

10. Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 2006; 22(10):484–91. doi: [10.1016/j.pt.2006.08.007](https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.007) PMID: [16920028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16920028/)
11. Jarmuszkiewicz W, Wagner AM, Wagner MJ, Hryniewiecka L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 411(1):110–4. PMID: [9247153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9247153/)
12. Castro-Guerrero NA, Krab K, Moreno-Sanchez R. The alternative respiratory pathway of euglena mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2004; 36(5):459–69. doi: [10.1023/B:JOB.0000047328.82733.ef](https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000047328.82733.ef) PMID: [15534393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15534393/)
13. Chaudhuri M, Ott RD, Saha L, Williams S, Hill GC. The trypanosome alternative oxidase exists as a monomer in *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Parasitol Res.* 2005; 96(3):178–83. doi: [10.1007/s00436-005-1337-3](https://doi.org/10.1007/s00436-005-1337-3) PMID: [15864649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15864649/)
14. Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, et al. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(12):4580–5. doi: [10.1073/pnas.1218386110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218386110) PMID: [23487766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23487766/)
15. Moore AL, Shiba T, Young L, Harada S, Kita K, Ito K. Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu Rev Plant Biol.* 2013; 64:637–63. doi: [10.1146/annurev-arplant-042811-105432](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105432) PMID: [23638828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638828/)
16. Grahl N, Dinamarco TM, Willger SD, Goldman GH, Cramer RA. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2012; 84(2):383–99. doi: [10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x) PMID: [22443190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22443190/)
17. Moore AL, Siedow JN. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1059(2):121–40. PMID: [1883834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1883834/)
18. Moore AL, Siedow JN. The nature and regulation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 1992; 20(2):361–3. PMID: [1397631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1397631/)
19. Day DA, Millar AH, Wiskich JT, Whelan J. Regulation of Alternative Oxidase Activity by Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Plant Physiol.* 1994; 106(4):1421–7. PMID: [12232419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12232419/)
20. Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, Day DA. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 1993; 329(3):259–62. PMID: [8365467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8365467/)
21. Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Moore AL. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* 2002; 510(3):121–6. PMID: [11801238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11801238/)
22. McIntosh L. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* 1994; 105(3):781–6. PMID: [8058835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8058835/)
23. Sierra-Campos E, Velazquez I, Matuz-Mares D, Villavicencio-Queijeiro A, Pardo JP. Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions. *Mitochondrion.* 2009; 9(2):96–102. doi: [10.1016/j.mito.2009.01.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.01.003) PMID: [19460302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460302/)
24. Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504(2–3):179–95. PMID: [11245784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11245784/)
25. Jarmuszkiewicz W, Czarna M, Sluse FE. Substrate kinetics of the *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase and the effects of GMP. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1708(1):71–8. doi: [10.1016/j.bbabi.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.01.003) PMID: [15949985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15949985/)
26. Michea-Hamzehpour M, Turian G. GMP-stimulation of the cyanide-insensitive mitochondrial respiration in heat-shocked conidia of *Neurospora crassa*. *Experientia.* 1987; 43(4):439–40. PMID: [3032673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3032673/)
27. Hans L. Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol Plant.* 1982; 55:478–85.
28. Moore AL, Rich PR. The bioenergetics of plant mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 1980; 5:284–8.
29. Zhu Y, Lu J, Wang J, Chen F, Leng F, Li H. Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J Integr Plant Biol.* 2011; 53(1):7–13. doi: [10.1111/j.1744-7909.2010.01004.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01004.x) PMID: [21205176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205176/)
30. Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, et al. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2005; 58(2):193–212. doi: [10.1007/s11103-005-5514-7](https://doi.org/10.1007/s11103-005-5514-7) PMID: [16027974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16027974/)
31. Honda Y, Hattori T, Kirimura K. Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (aox1) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng.* 2012; 113(3):338–42. doi: [10.1016/j.jbiosc.2011.10.026](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.026) PMID: [22138384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138384/)
32. Nihei C, Fukai Y, Kita K. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1587(2–3):234–9. PMID: [12084465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12084465/)
33. Biriukova EN, Medentsev AG, Arinbasarova A, Akimenko VK. Respiratory activity of yeast *Yarrowia lipolytica* under oxidative stress and heat shock. *Mikrobiologiya.* 2008; 77(4):448–52. PMID: [18825969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18825969/)

34. Magnani T, Soriani FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C, et al. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 271(2):230–8. doi: [10.1111/j.1574-6968.2007.00716.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00716.x) PMID: [17425662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17425662/)
35. Yan L, Li M, Cao Y, Gao P, Cao Y, Wang Y, et al. The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(4):764–73. doi: [10.1093/jac/dkp273](https://doi.org/10.1093/jac/dkp273) PMID: [19656781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19656781/)
36. Minagawa N, Koga S, Nakano M, Sakajo S, Yoshimoto A. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 1992; 302(3):217–9. PMID: [1318225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1318225/)
37. Martins VP, Dinamarco TM, Soriani FM, Tudella VG, Oliveira SC, Goldman GH, et al. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell.* 2011; 10(2):237–48. doi: [10.1128/EC.00194-10](https://doi.org/10.1128/EC.00194-10) PMID: [21183691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21183691/)
38. Akhter S, McDade HC, Gorchach JM, Heinrich G, Cox GM, Perfect JR. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2003; 71(10):5794–802. doi: [10.1128/IAI.71.10.5794-5802.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5794-5802.2003) PMID: [14500501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500501/)
39. Ruiz OH, Gonzalez A, Almeida AJ, Tamayo D, Garcia AM, Restrepo A, et al. Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(10):e1353. doi: [10.1371/journal.pntd.0001353](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001353) PMID: [22039556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22039556/)
40. Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol.* 2009; 47:423–45. doi: [10.1146/annurev-phyto-080508-081923](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923) PMID: [19400641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19400641/)
41. Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012; 13(4):414–30. doi: [10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x) PMID: [22471698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471698/)
42. Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog.* 2012; 8(11):e1002955. doi: [10.1371/journal.ppat.1002955](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002955) PMID: [23133380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23133380/)
43. Schirawski J, Mannhaupt G, Munch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, et al. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science.* 2010; 330(6010):1546–8. doi: [10.1126/science.1195330](https://doi.org/10.1126/science.1195330) PMID: [21148393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148393/)
44. Kahmann R, Kämper J. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol.* 2004(164):31–42.
45. Leuthner B, Aichinger C, Oehmen E, Koopmann E, Muller O, Muller P, et al. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics.* 2005; 272(6):639–50. doi: [10.1007/s00438-004-1085-6](https://doi.org/10.1007/s00438-004-1085-6) PMID: [15578222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15578222/)
46. Feldbrugge M, Kamper J, Steinberg G, Kahmann R. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7(6):666–72. doi: [10.1016/j.mib.2004.10.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.006) PMID: [15556041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15556041/)
47. Kaffarnik F, Muller P, Leibundgut M, Kahmann R, Feldbrugge M. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 2003; 22(21):5817–26. doi: [10.1093/emboj/cdg554](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg554) PMID: [14592979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14592979/)
48. Saavedra E, Ramos-Casillas LE, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R, Guerra-Sanchez G. Glycolysis in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8(8):1313–23. doi: [10.1111/j.1567-1364.2008.00437.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00437.x) PMID: [18803552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18803552/)
49. Pena A, Cinco G, Puyou AG, Tuena M. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1969; 180(1):1–8. PMID: [4239611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4239611/)
50. Guerrero-Castillo S, Cabrera-Orefice A, Vazquez-Acevedo M, Gonzalez-Halphen D, Uribe-Carvajal S. During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1817(2):353–62. doi: [10.1016/j.bbabi.2011.11.007](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.11.007) PMID: [22138628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138628/)
51. Sierra-Campos E, Valdez-Solana MA, Matuz-Mares D, Velazquez I, Pardo JP. Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate. *Microbiology.* 2009; 155(Pt 2):604–11. doi: [10.1099/mic.0.020800-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.020800-0) PMID: [19202109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19202109/)
52. Pohlmann T, Baumann S, Haag C, Albrecht M, Feldbrugge M. A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *Elife.* 2015; 4.
53. Holliday R. *Ustilago maydis*. In: King R, editor. *Handbook of Genetics.* New York: Plenum; 1974. p. 575–95.

54. Sambrook J FE, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
55. Terfruchte M, Joehnk B, Fajardo-Somera R, Braus GH, Riquelme M, Schipper K, et al. Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol*. 2014; 62:1–10. doi: [10.1016/j.fgb.2013.10.012](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.012) PMID: [24211735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24211735/)
56. Brachmann A, König J, Julius C, Feldbrugge M. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 2004; 272(2):216–26. doi: [10.1007/s00438-004-1047-z](https://doi.org/10.1007/s00438-004-1047-z) PMID: [15316769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15316769/)
57. Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J, Kahmann R. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*. 2001; 42(4):1047–63. PMID: [11737646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11737646/)
58. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265–75. PMID: [14907713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/)
59. Pinon-Zarate G, Herrera-Enriquez MA, Hernandez-Tellez B, Jarquin-Yanez K, Castell-Rodriguez AE. GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *J Immunol Res*. 2014; 2014:158980. doi: [10.1155/2014/158980](https://doi.org/10.1155/2014/158980) PMID: [25759825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25759825/)
60. Capece A, Votta S, Guaragnella N, Zambuto M, Romaniello R, Romano P. Comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains to identify potential marker genes correlated to desiccation stress tolerance. *FEMS Yeast Res*. 2016; 16(3).
61. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. PMID: [5432063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/)
62. Lauriere M. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal Biochem*. 1993; 212(1):206–11. doi: [10.1006/abio.1993.1313](https://doi.org/10.1006/abio.1993.1313) PMID: [8368495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8368495/)
63. Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol*. 1989; 89(4):1311–7. PMID: [16666702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16666702/)
64. Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC. Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(2):364–71. PMID: [12859770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12859770/)
65. Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S. Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie*. 2014; 102:124–36. doi: [10.1016/j.biochi.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.003) PMID: [24657599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657599/)
66. Huh WK, Kang SO. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J*. 2001; 356(Pt 2):595–604. PMID: [11368790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11368790/)
67. Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagilskaya RA. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79(13):1615–34.
68. Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, Leitner L, et al. *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration. *Microbiology*. 2007; 153(Pt 4):1250–60. doi: [10.1099/mic.0.2006/001404-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001404-0) PMID: [17379734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379734/)
69. Georgopoulos SG, Sisler HD. Gene mutation eliminating antimycin A-tolerant electron transport in *Ustilago maydis*. *J Bacteriol*. 1970; 103(3):745–50. PMID: [5474885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5474885/)
70. Sherald JL, Sisler HD. Antimycin A-resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. *Plant Physiol*. 1970; 46(1):180–2. PMID: [5481090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5481090/)
71. Dejean L, Beauvoit B, Guerin B, Rigoulet M. Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1457(1–2):45–56. PMID: [10692549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692549/)
72. Spellig T, Bottin A, Kahmann R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*. 1996; 252(5):503–9. PMID: [8914511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8914511/)
73. Xiao M, Ma J, Li H, Jin H, Feng H. Effects of hydrogen sulfide on alternative pathway respiration and induction of alternative oxidase gene expression in rice suspension cells. *Z Naturforsch C*. 2010; 65(7–8):463–71. PMID: [20737915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20737915/)
74. Andronis EA, Moschou PN, Toumi I, Roubelakis-Angelakis KA. Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2014; 5:132. doi: [10.3389/fpls.2014.00132](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00132) PMID: [24765099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24765099/)
75. Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiol Plant*. 2011; 142(4):339–51. doi: [10.1111/j.1399-3054.2011.01471.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01471.x) PMID: [21401618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401618/)
76. Vanlerberghe GC, McIntosh L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol*. 1992; 100(1):115–9. PMID: [16652932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16652932/)

77. Costa JH, Jolivet Y, Hasenfratz-Sauder MP, Orellano EG, da Guia Silva Lima M, Dizengremel P, et al. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. *J Plant Physiol.* 2007; 164(6):718–27. doi: [10.1016/j.jplph.2006.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.04.001) PMID: [16716451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716451/)
78. Smith CA, Melino VJ, Sweetman C, Soole KL. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 2009; 137(4):459–72. doi: [10.1111/j.1399-3054.2009.01305.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01305.x) PMID: [19941623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19941623/)
79. Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, et al. Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol.* 2010; 152(1):226–44. doi: [10.1104/pp.109.148965](https://doi.org/10.1104/pp.109.148965) PMID: [19906889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19906889/)
80. Edwards DL, Rsenberg E, Maroney PA. Induction of cyanide-insensitive respiration in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* 1974; 249(11):3551–6. PMID: [4275427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4275427/)
81. Nargang FE, Adames K, Rub C, Cheung S, Easton N, Nargang CE, et al. Identification of genes required for alternative oxidase production in the *Neurospora crassa* gene knockout library. G3 (Bethesda). 2012; 2(11):1345–56.
82. Dojcinovic D, Krosting J, Harris AJ, Wagner DJ, Rhoads DM. Identification of a region of the *Arabidopsis* AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Mol Biol.* 2005; 58(2):159–75. doi: [10.1007/s11103-005-5390-1](https://doi.org/10.1007/s11103-005-5390-1) PMID: [16027972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16027972/)
83. Fujita K, Kubo I. Antifungal activity of octyl gallate. *Int J Food Microbiol.* 2002; 79(3):193–201. PMID: [12371654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12371654/)
84. Fujita K, Kubo I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(6):1035–42. PMID: [12010543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12010543/)
85. Baumann S, Konig J, Koepke J, Feldbrugge M. Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep.* 2014; 15(1):94–102. doi: [10.1002/embr.201338037](https://doi.org/10.1002/embr.201338037) PMID: [24355572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24355572/)
86. Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, Tamayo D, Gonzalez A, Restrepo A, et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast.* 2011; 28(11):771–81. doi: [10.1002/yea.1902](https://doi.org/10.1002/yea.1902) PMID: [21960298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960298/)
87. Walker R Jr., Saha L, Hill GC, Chaudhuri M. The effect of over-expression of the alternative oxidase in the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 139(2):153–62. doi: [10.1016/j.molbiopara.2004.11.003](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.11.003) PMID: [15664650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15664650/)
88. Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast.* 2003; 20(5):381–8. doi: [10.1002/yea.968](https://doi.org/10.1002/yea.968) PMID: [12673621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12673621/)
89. Xu T, Yao F, Liang WS, Li YH, Li DR, Wang H, et al. Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol.* 2012; 50(4):594–602. doi: [10.1007/s12275-012-2015-7](https://doi.org/10.1007/s12275-012-2015-7) PMID: [22923107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22923107/)
90. Zhou G, Song Z, Yin Y, Jiang W, Wang Z. Involvement of an alternative oxidase in the regulation of hyphal growth and microsclerotial formation in *Nomuraea rileyi* CQNr01. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015; 31(9):1343–52. doi: [10.1007/s11274-015-1877-3](https://doi.org/10.1007/s11274-015-1877-3) PMID: [26135515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26135515/)
91. Ruy F, Vercesi AE, Kowaltowski AJ. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr.* 2006; 38(2):129–35. doi: [10.1007/s10863-006-9012-7](https://doi.org/10.1007/s10863-006-9012-7) PMID: [17053999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17053999/)
92. Avila-Adame C, Koller W. Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002; 15(5):493–500. doi: [10.1094/MPMI.2002.15.5.493](https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.5.493) PMID: [12036280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12036280/)
93. Avila-Adame C, Koller W. Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. *Pest Manag Sci.* 2003; 59(3):303–9. doi: [10.1002/ps.638](https://doi.org/10.1002/ps.638) PMID: [12639047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12639047/)
94. Dahal K, Vanlerberghe GC. Alternative oxidase respiration maintains both mitochondrial and chloroplast function during drought. *New Phytol.* 2016.

Research Article

New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*

M. G. Matus-Ortega¹, C. A. Cárdenas-Monroy¹, O. Flores-Herrera¹, G. Mendoza-Hernández¹, M. Miranda², B. González-Pedrajo³, H. Vázquez-Meza¹ and J. P. Pardo^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

²Department of Biological Sciences, University of Texas, El Paso, TX, USA

³Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D. F., México

*Correspondence to:

J. P. Pardo, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México.
E-mail: pardov@bq.unam.mx

Abstract

Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* lack the respiratory complex I, but contain three rotenone-insensitive NADH dehydrogenases distributed on both the external (Nde1 and Nde2) and internal (Ndi1) surfaces of the inner mitochondrial membrane. These enzymes catalyse the transfer of electrons from NADH to ubiquinone without the translocation of protons across the membrane. Due to the high resolution of the Blue Native PAGE (BN-PAGE) technique combined with digitonin solubilization, several bands with NADH dehydrogenase activity were observed on the gel. The use of specific *S. cerevisiae* single and double mutants of the external alternative elements (*ANDE1*, *ANDE2*, *ANDE1/ANDE2*) showed that the high and low molecular weight complexes contained the Ndi1. Some of the Ndi1 associations took place with complexes III and IV, suggesting the formation of respirasome-like structures. Complex II interacted with other proteins to form a high molecular weight supercomplex with a molecular mass around 600 kDa. We also found that the majority of the Ndi1 was in a dimeric form, which is in agreement with the recently reported three-dimensional structure of the protein. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 11 May 2015
Accepted: 27 June 2015

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; respiratory supercomplexes; alternative NADH dehydrogenase; Ndi1; succinate dehydrogenase

Introduction

In recent years it has been described that the respiratory enzymes in mitochondria from several sources are assembled into supercomplexes (Vonck and Schafer, 2009) and some were named 'respirosomes' because they contained complexes I, III and IV (Schagger and Pfeiffer, 2000), suggesting the possibility of electron channelling from NADH to oxygen (Genova *et al.*, 2008; Vonck and Schafer, 2009).

Supercomplexes with different stoichiometries are found in mitochondria from mammals, plants, fungi and bacteria. Bovine heart mitochondria contain supercomplexes I₁III₂IV₁, I₁III₂ and III₂IV₁ (Schagger, 2001). Different proportions of respiratory complexes I, III and IV are found in supercomplexes from the ascomycete *Neurospora crassa* (Marques *et al.*, 2007). The most abundant supercomplex in potato (*Solanum tuberosum*), bean (*Phaseolus vulgaris*), barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis thaliana* is I₁III₂ (Berry and Trumpower,

1985; Dudkina *et al.*, 2006; Eubel *et al.*, 2004; Eubel *et al.*, 2003). Two supercomplexes were found in the bacterium *Paracoccus denitrificans*, one containing complexes III and IV (Berry and Trumpower, 1985) and the other composed of complexes I, III and IV (Stroh *et al.*, 2004).

In contrast to the majority of the organisms, mitochondria in *S. cerevisiae* lack complex I, a multi-subunit complex that is sensitive to rotenone, amital and piericidin b (Lenaz *et al.*, 2006). Instead, this yeast contains three rotenone-insensitive NADH dehydrogenases distributed on both the external (Nde1 and Nde2) and internal (Ndi1) surfaces of the inner mitochondrial membrane (de Vries and Marres, 1987; Overkamp *et al.*, 2000). These enzymes catalyse the transfer of electrons from NADH to ubiquinone without the translocation of protons across the membrane, but promote the activity of complexes III and IV and thus allow the synthesis of ATP by complex V (de Vries and Marres, 1987; Overkamp *et al.*, 2000). The three alternative dehydrogenases in *S. cerevisiae* are enzymes of low molecular weight (around 50 kDa) and structurally simpler than the typical complex I (Overkamp *et al.*, 2000). Regarding the presence of respiratory supercomplexes in all organisms studied, *S. cerevisiae* is not the exception. The presence of supercomplexes containing the dimer of complex III (III₂) and either one (III₂IV₁) or two (III₂IV₂) complex IV monomers (Schagger and Pfeiffer, 2000; Stuart, 2008) has been reported.

Kinetic studies also support the presence of supercomplexes in *S. cerevisiae* mitochondria. In an outstanding paper, Boumans *et al.* (1998) showed that the respiratory chain of *S. cerevisiae* mitochondria behaves as a single functional unit, implying the absence of a homogeneous pool of ubiquinone. On the other hand, the presence in *S. cerevisiae* mitochondria of a large supercomplex containing the external and internal alternative NADH dehydrogenases, along with the succinate dehydrogenase, was described based on the separation of Triton X-100-solubilized mitochondrial proteins by the clear native PAGE technique (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001).

In the last 20 years, the alternative respiratory elements of mitochondria from different sources have been the aim of several investigations (Dudkina *et al.*, 2006; Eschemann *et al.*, 2005;

Melo *et al.*, 1999; Pascal *et al.*, 1990; Schmid and Gerloff, 2004; de Vries and Grivell, 1988; Velazquez and Pardo, 2001; Yamashita *et al.*, 2007). In particular, the internal NADH dehydrogenase from yeast cells has been the target of many studies, due to its important medical applications related to defects in mitochondrial function. It has been shown that transfection of mammalian cells with the *NDI1* gene can restore the mitochondrial electrochemical potential in cells with defects in complex I (DeCorby *et al.*, 2007; Perales-Clemente *et al.*, 2008), opening the possibility of genetic treatment of Parkinson's and LEBER diseases (Marella *et al.*, 2007, 2008). In addition, cells transfected with the *NDI1* gene decreased the production of oxygen reactive species (DeCorby *et al.*, 2007; Marella *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 1998, 2006), while other cells increased their lifetime, regardless of the dietary restriction (Sanz *et al.*, 2010).

Two independent groups described the three-dimensional (3D) structure of *S. cerevisiae* Ndi1 (Feng *et al.*, 2012; Iwata *et al.*, 2012) and, more recently, the crystallographic structure of the type II NADH dehydrogenase from the bacterium *Caldalkalibacillus thermarum* (Heikal *et al.*, 2014) was solved. The yeast and bacterial enzymes are homodimers with a hydrophobic surface that interacts with the inner mitochondrial membrane. In addition, one of the structures clearly shows different binding sites for NADH⁺ and ubiquinone, suggesting the possibility of simultaneous binding of both substrates (Feng *et al.*, 2012).

In this study we describe new protein–protein interactions of the alternative internal NADH dehydrogenase in *S. cerevisiae* mitochondria. We took advantage of the high resolution of the blue native PAGE (BN–PAGE) technique, combined with digitonin solubilization (a soft detergent) to isolate novel complexes containing Ndi1 in mitochondria of *S. cerevisiae*. Some of these associations took place with complexes III and IV, but we did not find an association with complex II, as reported by Grandier-Vazeille *et al.* (2001). The molecular weights of the *S. cerevisiae* complexes containing Ndi1 were in the range 145 (a molecular weight corresponding to the dimer)–1660 kDa (in which Ndi1 is likely attached to III₂–IV₂ supercomplex, forming a respirasome-like structure).

Materials and methods

Materials

Sorbitol, sucrose, glucose, acrylamide and bis-acrylamide were obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Coomassie blue G-250 was from Serva (Heidelberg, Germany). Zymolyase was obtained from ICN Biomedicals Inc. All other reagents were of analytical grade.

Strains, culture and isolation of yeast mitochondria

Wild-type (CEN.PK113-7D; Mata; ura3; his3; leu2; trp1; mal2-8; suc2) and mutant strains of *S. cerevisiae* (CEN.PK152, CEN.PK162, and CEN.PK167-2B) lacking the external NADH dehydrogenases (Luttik *et al.*, 1998) were kindly provided by Dr Peter Kötter (Institut für Mikrobiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Germany). The *NDE1* gene was deleted in the CEN.PK152 strain (Mata; ura3; his3; leu2; trp1; mal2-8; suc2; nde1::loxP-kanMX4-loxP), *NDE2* in the CEN.PK162 strain (Mata; ura3; his3; leu2; trp1; mal2-8; suc2; nde2::loxP-kanMX4-loxP) and both genes, *NDE1* and *NDE2*, were removed in the CEN.PK167-2B strain (Mata; ura3; his3; leu2; trp1; mal2-8; suc2; nde1::loxP-kanMX4-loxP; nde2::loxP-kanMX4-loxP) (Luttik *et al.*, 1998).

Cells were grown in liquid YPD medium (yeast extract 1%, glucose 1%, bactopectone 0.25%), at 190 rpm, 28°C, for 18 h and harvested at the end of the logarithmic growth phase. The cells were washed twice with 20 mM Tris, pH 7.0, and incubated at 30°C for 60 min in the presence of zymolyase (50 U/g wet weight) to form spheroplasts. The spheroplasts were centrifuged at 4260 × *g* and suspended in buffer A (10 mM MOPS, 0.5 M sorbitol, 0.35 mM EDTA and 17 mM KH₂PO₄, pH 6.8) and homogenized by 10–15 strokes in a Teflon Potter-Elvehjem homogenizer. From this point on, all steps were carried out at 0–4°C. Mitochondria were obtained by differential centrifugation. The crude extract was centrifuged at 4200 × *g* for 8 min and the resultant supernatant at 12 000 × *g* for 12 min. The pellets were suspended with a small volume of buffer A to a final concentration of 15–30 mg protein/ml and stored at –70°C until use. It is worth mentioning that similar results were obtained when cells were

mechanically disrupted by glass beads in a bead beater. The protein concentration was determined according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

Sample preparation for native electrophoresis

The respiratory complexes and supercomplexes of *S. cerevisiae* mitochondria were resolved by blue native PAGE, as described by Schagger and von Jagow (1991), with minor modifications. Briefly, mitochondria (1 mg protein) were suspended in 200 µl buffer (50 mM Bis-Tris and 500 mM 6-aminocaproic acid, pH 7.0) and solubilized by adding 1–10 µl digitonin (50% stock), corresponding to digitonin:protein ratios in the range 0.5–5 (g/g). Detergents were added drop by drop until the final w/w ratio was reached. The mixtures were incubated with gentle stirring for 30 min at 4°C, and centrifuged at 100 000 × *g* for 30 min at 4°C. The supernatants were recovered and supplemented with 10 µl blue native buffer [10% glycerol, 0.2% Coomassie brilliant blue G-250 and 20 mM 6-aminocaproic acid for blue native PAGE (BN-PAGE)] or 2 µl 0.1% Ponceau S-dye for clear native PAGE (CN-PAGE) before application onto linear polyacrylamide gradient gels (5–10% or 3.25–7.5%).

For BN-PAGE, the anode buffer contained 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0, and the cathode buffer 50 mM tricine, 15 mM Bis-Tris, pH 7.0, and Coomassie dye (0.02% or 0.002%). When two-dimensional (2D) BN-PAGE was performed, 0.02% DDM was added to the cathode buffer. Gels were run in the cold (4°C) at 35 V for 10 h and stopped when the sharp line of the dye approached the gel border.

The molecular weights of the respiratory complexes and supercomplexes were determined according to their electrophoretic mobility and in-gel catalytic activity. Since there is a large amount of information on the composition and molecular masses of complexes and supercomplexes from bovine heart mitochondria, they were used as molecular weight markers, as suggested by Wittig *et al.* (2010). Bovine heart mitochondria were solubilized as described in a previous paragraph.

In-gel catalytic activity assays

In-gel activity assays were performed as described by Jung *et al.* (2000). In brief, gel strips loaded

with digitonin extracts (150 µg mitochondrial protein) were assayed for NADH dehydrogenase activity (NADH: methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) oxidoreductase) in a buffer containing 5 mg MTT and 3.75 mg NADH in 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. After about 10–25 min the reaction was stopped using the fixing solution (50% methanol, 10% acetic acid). For the succinate:MTT oxidoreductase activity, the buffer contained 10 mM sodium succinate, 1 mg phenazine methosulphate, 4.5 mM EDTA and 20 mg MTT in 10 ml 50 mM K₂HPO₄, pH 7.4. Approximately 10–30 min of incubation was required for the development of the colour, then the reaction was stopped by adding fixing solution. The assays were performed at 20–25°C and NADH or succinate dehydrogenase activity was correlated with the development of purple precipitates in the gel.

To assay the activity of complex IV, the gel strip was incubated in a solution containing 10 mg diaminobenzidine (DAB) dissolved in 10 ml 50 mM K₂HPO₄, pH 7.2, and 2 mg horse heart cytochrome *c*. The assays were performed at 20–25°C. After 30–40 min of incubation, the activity was observed as a brown precipitate and then the gel was transferred to the fixing solution.

For the ATP hydrolysis assay of complex V, gel strips were incubated at 37°C in assay buffer (50 mM glycine, adjusted to pH 8.0 with triethanolamine, 10 mM MgCl₂, 0.2% Pb(NO₃)₂ and 8 mM ATP) for 1–2 h. ATP hydrolysis correlated with the development of white lead phosphate precipitates. The reaction was stopped using 50% methanol for 30 min, and then the gel was transferred to water and scanned against a dark background.

Gel activities at different digitonin:protein ratios are highly reproducible for each respiratory complex when preparations of fresh mitochondria were used. However, to gain clarity in this work, we re-used the lanes of the same blot to show the activities of NADH dehydrogenase, complexes II, IV and V, at different digitonin:protein ratios. We carried out five BN-PAGE analyses on the same day. The five gels were loaded with samples of mitochondria solubilized with different concentrations of digitonin, and each gel was treated independently to detect NADH dehydrogenase activity, complex II, complex IV and complex V; the last gel was used for Coomassie staining. From these gels we selected the lanes corresponding to a

digitonin:protein ratio of 2 to construct Figure 2 and the 0.5 ratio for Figure 4.

SDS-2D gel electrophoresis and western blot analyses

Proteins in a gel lane excised from blue native PAGE were separated by 2D SDS-PAGE according to Wittig *et al.* (2007) on a 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions, and stained with either Coomassie brilliant blue R-125 or silver, using a commercial kit (Bio-Rad). Alternatively, the proteins in the 2D SDS-PAGE were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA, USA) in a semidry electroblotting system (Bio-Rad) at 25 V for 50 min at 100 mA in a buffer containing 192 mM glycine, 25 mM Tris and 20% methanol. Membranes were blocked in 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 20 mM Tris base, pH 7.5 (TTBS buffer) containing 5% blotting grade blocker non-fat dried milk (Bio-Rad). An anti-Ndi1 polyclonal antibody (1:150; kindly donated by Dr Yagi from the Scripps Research Institute, Department of Molecular and Experimental Medicine) was used for Ndi1 immunodetection, anti-cox-III subunit antibody (1:2000) for complex IV and anti-Rieske subunit antibody (1:20 000) for complex III (these antibodies were kindly donated by Dr Diego Gonzalez Halphen from Universidad Nacional Autónoma de México). The membranes were incubated for 1 h with the primary antibody in TTBS buffer and washed thoroughly, and the immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence assay (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions, using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce) at a dilution of 1:35 000.

In our experimental design, four lanes of a gel were loaded with mitochondrial proteins solubilized with the digitonin at a detergent:protein ratio of 2 and two lanes were used to carry out a second dimension in a non-denaturing gel in the presence of low concentrations of DDM (Figure 3); the third lane was used to assay NADH dehydrogenase activity and the fourth was used for Coomassie staining. One 2D gel was stained with Coomassie and the other used to detect the spots with NADH dehydrogenase activity.

Tandem mass spectrometry (LC/ESI–MS/MS)

The protein bands were excised from the Coomassie-stained SDS gel, destained, reduced, carbamidomethylated and digested with modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA). Peptide mass spectrometric analysis was carried out using a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a nanoelectrospray ion source (NanoSpray II) and a MicroIonSpray II head (Gonzalez-Zamorano *et al.*, 2009). The instrument was coupled online to a nanoAcquity Ultra Performance LC system supplied by Waters (Milford, MA, USA). Briefly, spectra were acquired in automated mode, using information-dependent acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1, using the enhanced MS mode (EMS) as survey scan. The EMS was followed by an enhanced resolution scan (ER) of the three most intense ions at the low speed of 250 amu/s to determine the ion charge states, and then by an enhanced product ion scan (EPI). The precursor ions were fragmented by collisionally-activated dissociation (CAD) in the Q2 collision cell. The fragment ions generated were captured and mass-analysed in the Q3 linear ion trap.

Database searching and protein identification were performed with the MS/MS spectra datasets using the MASCOT search algorithm (v. 1.6b9, Matrix Science, London, UK; available at: <http://www.matrixscience.com>). Mass tolerances of 0.5 Da for the precursor and 0.3 Da for the fragment ion masses were used. Carbamidomethylcysteine was the fixed modification and one missed cleavage for trypsin was allowed. Searches were conducted using the *S. cerevisiae* subset of the NCBI nr database (<http://www.ncbi.nih.gov>). Protein identifications were accepted when at least two MS/MS spectra matched at 95% confidence level ($p < 0.05$).

Results

Recently, the association of the alternative elements with some respiratory complexes has been described. Such is the case of the external NADH dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*, which unexpectedly interacts with complex IV instead of complex III (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009), and

the alternative oxidase in *Neurospora crassa*, which was associated with complex IV₂ and supercomplex I₁IV₁ in a mutant lacking complex III and overexpressing the AOX (Duarte and Videira, 2009). In addition, it was found that complex II interacts with supercomplexes III–IV and I–III–IV in mammalian cells (Acin-Perez *et al.*, 2008). Thus, it was of interest to look for associations of the *S. cerevisiae* internal alternative NADH dehydrogenases with the main components of the respiratory chain, and with other inner membrane mitochondrial proteins.

Solubilization of mitochondrial proteins with digitonin

To explore the optimal conditions for the solubilization of the *S. cerevisiae* mitochondrial respiratory enzymes, different digitonin:protein ratios were used. Only two bands at the bottom of the gel with NADH dehydrogenase activity were released in the absence of the detergent, even in the mutant lacking the two external NADH dehydrogenases (see supporting information, Figure S1). As expected, solubilization of supercomplexes and complexes depended on the detergent:protein ratio (Figure 1). When *S. cerevisiae* mitochondria from the wild-type strain were solubilized with a digitonin:protein ratio of 2, the activity of NADH dehydrogenase was distributed among several well-defined protein bands (Figure 1, and first column in Figure 2). The presence of some complexes and supercomplexes previously reported in *S. cerevisiae* mitochondria was confirmed (Schagger and Pfeiffer, 2000; Stuart, 2008). These include the monomer (750 kDa) and dimer of complex V (1460 kDa), the monomer of complex IV (350 kDa) and the III₂IV (900 kDa) and III₂IV₂ (1250 kDa) supercomplexes (Figure 2). As reported by Grandier-Vazeille *et al.* (2001), complex II migrated with an apparent molecular weight higher than the expected one (Figure 2, second lane), suggesting its association with other proteins.

The complexes separated by BN–PAGE were further subjected to a second dimension, under native conditions, in the presence of 0.02% DDM. Figure 3A shows the Coomassie-stained 2D BN–PAGE gel and Figure 3B a zymogram of the activity of NADH dehydrogenase. Although the Ndi1 band at the bottom of the Coomassie-stained gel was not observed because of the low abundance of this enzyme in *S. cerevisiae* mitochondria, the

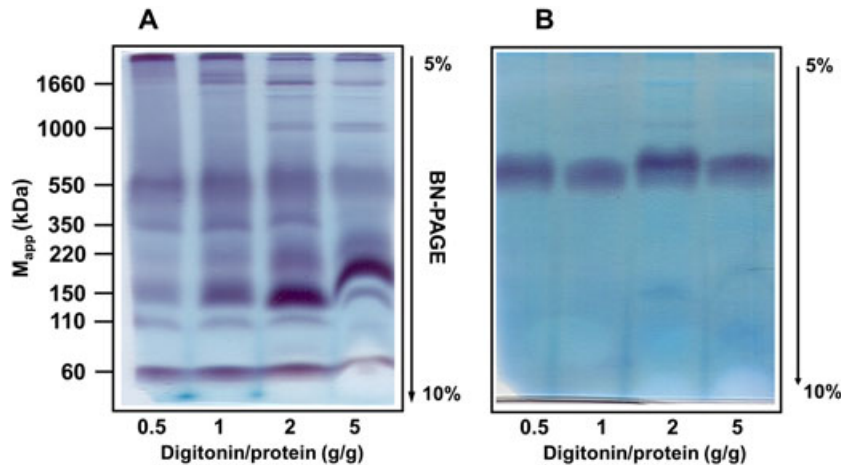


Figure 1. Digitonin solubilization of the alternative NADH dehydrogenase and the succinate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. Mitochondria were solubilized by different digitonin:protein ratios (0.5–5 g/g) and respiratory complexes were separated by 1D BN-PAGE. (A) NADH:MTT and (B) succinate:MTT oxidoreductase activities were assayed in polyacrylamide gel, as described in Materials and methods

bands belonging to complexes III, IV and V were apparent (Figure 3A). However, the more sensitive NADH-MTT oxidoreductase activity showed that Ndi1 migrated close to the bottom of the gel,

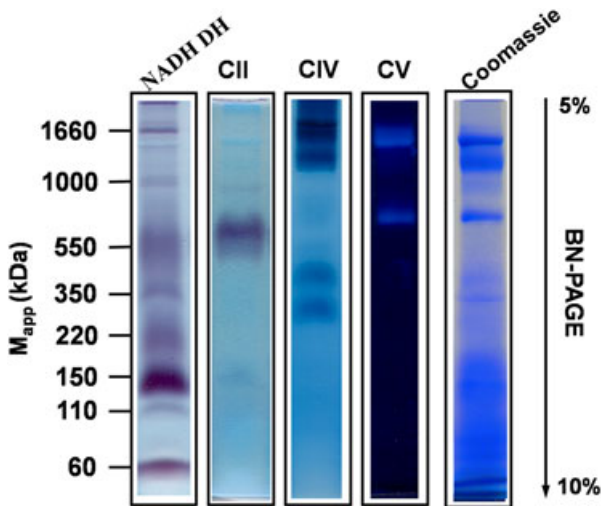


Figure 2. Identification of respiratory complexes containing the alternative NADH dehydrogenase in mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondria were solubilized by 2 g digitonin/g protein and respiratory complexes were separated by 1D BN-PAGE. Right lane shows Coomassie-stained gel strip; NADH DH, CII, CIV and CV correspond to in-gel activity assays for the alternative NADH dehydrogenases and complexes II, IV and V, respectively. Digitonin-solubilized proteins from bovine heart mitochondria were used as molecular weight standards (data not shown)

indicating dissociation of the complexes containing the alternative NADH dehydrogenase by DDM (Figure 3B). In this sense, the bands corresponding to complexes III and IV (Figure 3A) correlated with the NADH dehydrogenase activity at the bottom of the gel (Figure 3B), suggesting the Ndi1-III-IV composition of these supercomplexes. In addition, the presence of a small NADH dehydrogenase activity associated with complex III in the second dimension with DDM points to a direct interaction between Ndi1 and complex III (Figure 3B).

Solubilization of membrane proteins at low concentration of digitonin

To gain more information on the stability, distribution and composition of the high molecular weight complexes in *S. cerevisiae* mitochondria, the organelle was solubilized by different concentrations of digitonin, and extrapolation to zero concentration of detergent was carried out to study the sequential appearance of the complexes. Figure 4 shows that, at low digitonin:protein ratios (0.5 g/g) the whole population of complex IV was engaged in the formation of very high molecular weight complexes, which remained at the top of the gel. Regarding the alternative NADH dehydrogenases, the dependence of the electrophoretic mobility on the detergent protein ratio was different

Mitochondrial complexes containing the alternative NADH dehydrogenase

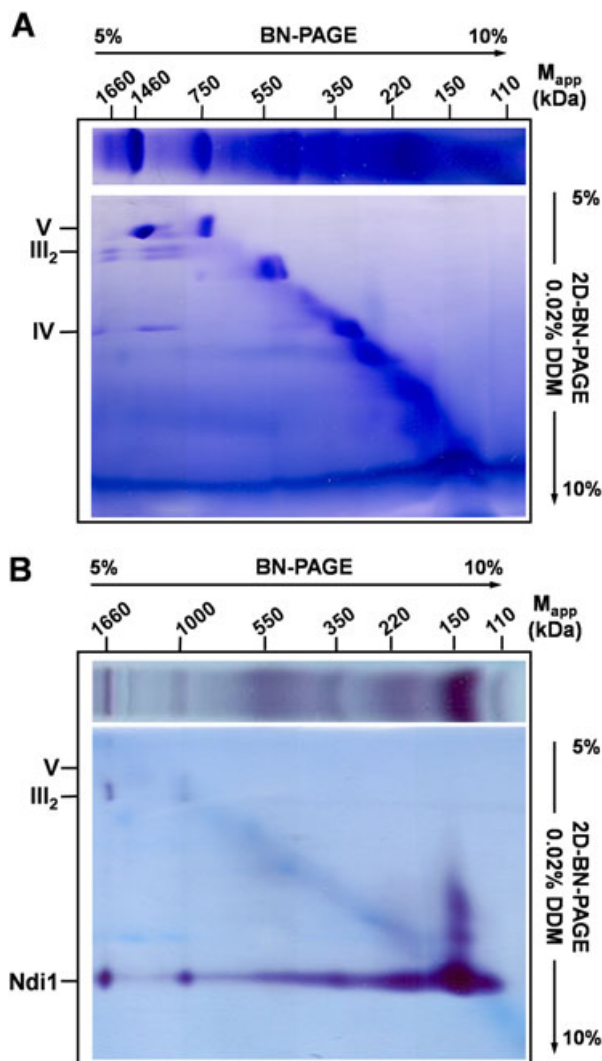


Figure 3. Separation of mitochondrial complexes from *S. cerevisiae* by 2D-DDM-BN-PAGE. Mitochondria were solubilized with 2 g digitonin/g protein and the respiratory complexes separated by 1D BN-PAGE, on a linear polyacrylamide gradient gel of 5–10%. Proteins in the gel strip were further resolved by a second BN-PAGE on a linear polyacrylamide gradient gel of 5–10% and containing 0.02% DDM in the cathode buffer. (A) Coomassie-stained gel. (B) Gel stained for NADH dehydrogenase activity

for the low and high molecular weight complexes. For the bands located below 600 kDa, the same pattern was observed at low or high concentrations of digitonin, although the amount of each band changed with the concentration of the detergent (Figure 1). However, at the lowest concentration of digitonin (0.5 g/g), some of the NADH dehydrogenase activity was concentrated at the top of the gel,

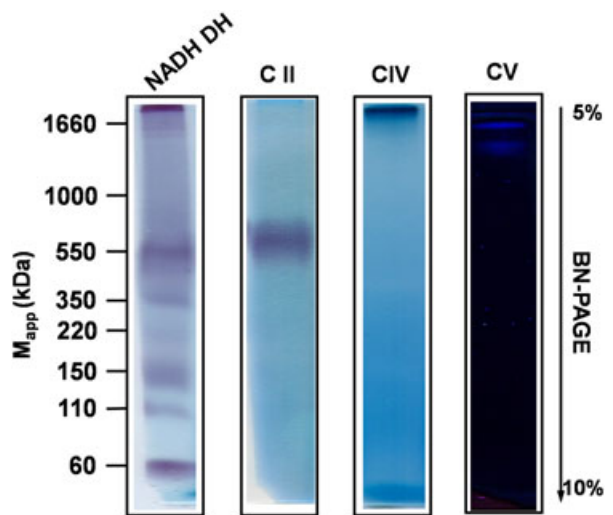


Figure 4. Solubilization of respiratory complexes from *S. cerevisiae* mitochondria at the lower digitonin:protein ratio. Mitochondria were solubilized with 0.5 g digitonin/g protein and respiratory complexes were separated by 1D BN-PAGE. NADH-DH, CII, CIV and CV correspond to in-gel activity assays for the alternative NADH dehydrogenases and complexes II, IV and V

along with complex IV activity (Figures 1 and 4). In contrast with these major changes observed with Ndi1, the migration and intensity of the band containing the succinate dehydrogenase was the same at low or high concentrations of the detergent (Figure 1B).

Ndi1 was associated to high molecular weight supercomplexes

To define whether Ndi1 was included in these high molecular weight complexes, mutants of the external NADH dehydrogenases were used. Two single-deletion mutants deficient in one of the two external NADH dehydrogenases ($\Delta NDE1$ or $\Delta NDE2$), and a double mutant ($\Delta NDE1/\Delta NDE2$) lacking both external dehydrogenases were analysed by BN-PAGE. Figure 5 shows that most of the complexes observed in the wild-type and containing the NADH dehydrogenase activity were also found in mutants lacking any of the external NADH dehydrogenases ($\Delta NDE1$ or $\Delta NDE2$) and in the double mutant ($\Delta NDE1-\Delta NDE2$), although migration of the 550 band was higher in the double mutant than in cells containing one or both of the external NADH dehydrogenases. These results clearly show the association of Ndi1 with

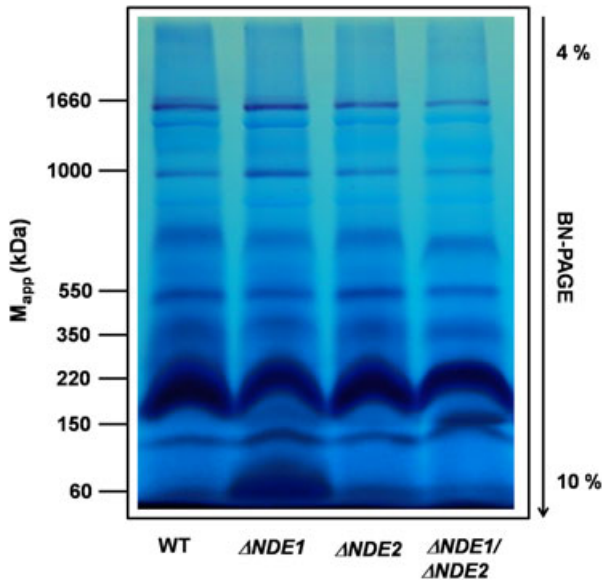


Figure 5. Identification of respiratory complexes with NADH dehydrogenase activity in mutants lacking the external alternative NADH dehydrogenases. Mitochondria from wild-type, and from mutants without the Nde1 external NADH dehydrogenase ($\Delta NDE1$), the Nde2 external NADH dehydrogenase ($\Delta NDE2$) or both external dehydrogenases ($\Delta NDE1/\Delta NDE2$) were solubilized by 2 g digitonin/g protein and the respiratory complex resolved by 1D BN-PAGE on a linear polyacrylamide gradient gel at 4–10%. Then the gel was stained for NADH dehydrogenase activity

other mitochondrial proteins. The interaction between Ndi1 and supercomplex III–IV was confirmed by immunodetection of Ndi1 and subunits of complexes III and IV from a 2D SDS-PAGE. Figure 6 shows that the NADH dehydrogenase activity and immunodetection of Ndi1 was distributed along the whole length of the gel, with the lower molecular weight band corresponding to the homodimer of Ndi1 (145 kDa) and the largest, above complex V dimer, with a molecular weight close to 1660 kDa. Immunodetection of coxIII subunit (complex IV), Rieske protein (complex III) and Ndi1 shows co-migration of complexes III, IV and the internal NADH dehydrogenase, suggesting the association of these proteins in the 1000 and 1660 kDa bands. Mass spectrometry results confirmed the association of these proteins for the 1000 Da band (see below).

Tandem mass spectrometry

Table 1 shows that some of the low molecular weight bands with activity of NADH dehydrogenase also

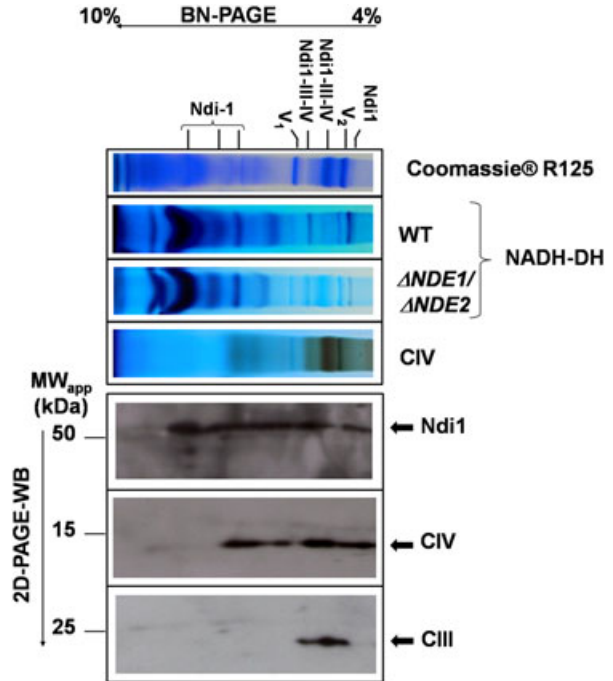


Figure 6. Immunodetection of Ndi1, complex III and complex IV associated with the bands containing the NADH dehydrogenase activity in the blue native electrophoresis. Supercomplexes separated by BN-PAGE were further resolved in a 2D SDS-PAGE, and immunodetection of Ndi1, cox-III and Rieske protein was performed. One representative experiment from three *S. cerevisiae* mitochondria processed is shown

contained malate dehydrogenase, the ADP–ATP carrier and mitochondrial porin, suggesting that these proteins might be a nucleation site that assists in the assembly of the Ndi1 homodimer with other enzymes of tricarboxylic acid cycle in the inner mitochondrial membrane (Figure 7, Table 1). Although mass spectrometry did not identify Ndi1 in the high molecular weight band (1660 kDa), the presence of subunits of complexes III and IV were found by mass spectrometry (Table 1) and Ndi1 was detected by immunoblotting (Figure 6), suggesting the formation of a supercomplex (Figure 7). On the other hand, in agreement with the results of Grandier-Vazeille et al. (2001), the band with the succinate dehydrogenase activity contained the subunits of complex II, Ndi1, a subunit of complex III and several proteins associated with the Krebs cycle (citrate synthase, malate dehydrogenase, fumarate hydratase, isocitrate dehydrogenase), porin, L-lactate dehydrogenase, mitochondrial aldehyde dehydrogenase and HSP60 (Table 1).

Table 1. Identification of mitochondrial proteins associated with dehydrogenase activity bands

NADH dehydrogenase activity band (kDa)	Protein identity (Accession No.)
1660	Cytochrome c oxidase: subunit 1 (COX1_YEAST), subunit 2 (COX2_YEAST), subunit 6 (COX6_YEAST), subunit 6A (COX13_YEAST), subunit 7A (COX9_YEAST), polypeptide VIII (COX8_YEAST)
1000	Cytochrome bc1 complex: subunit 1 (QCRI_YEAST), subunit 2 (QCR2_YEAST), cytochrome c1 haem protein (CY1_YEAST), cytochrome b (CYB_YEAST) Krebs cycle and other enzymes: pyruvate dehydrogenase component E1 (ODPI_ECO57); 2 oxoglutarate dehydrogenase (ODO1_YEAST); malate dehydrogenase (MDHI_YEAST); alcohol dehydrogenase I (ADHI_YEAST); ADP-ATP carrier protein 2 (ADT2_YEAST); Porin 1 (VDAC1_YEAST) Rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase: NDII_YEAST Cytochrome c oxidase: subunit 1 (COX1_YEAST), subunit 2 (COX2_YEAST), subunit 4 (COX4_YEAST), polypeptide 5A (COX5A_YEAST), subunit 6 (COX6_YEAST), subunit 6A (COX13_YEAST), subunit 7 (COX7_YEAST) subunit 7A (COX9_YEAST), polypeptide VIII (COX8_YEAST) Cytochrome bc1 complex: cytochrome b (CYB_YEAST), c1 haem (CY1_YEAST), subunit 1 (QCRI_YEAST), subunit 2 (QCR2_YEAST), Rieske protein (UCR1_YEAST), subunit 8 (QCR8_YEAST), subunit 10 (QCR10_YEAST) Krebs cycle and other enzymes: pyruvate dehydrogenase component E1 (ODPI_ECO57), 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODO1_YEAST); malate dehydrogenase (MDHI_YEAST); ADP-ATP carrier proteins 2 and 3 (ADT2_YEAST, ADT3_YEAST); Porin 1 (VDAC1_YEAST)
750	Rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase: NDII_YEAST
600	Cytochrome c oxidase: subunit 4 (COX4_YEAST), polypeptide 5A, (COX5A_YEAST), subunit 8 (COX8_YEAST), subunit 9 (COX9_YEAST) Cytochrome bc1 complex: subunit 2 (QCR2_YEAST) Krebs cycle enzymes: isocitrate dehydrogenase subunit 1 (IDH1_YEAST), isocitrate dehydrogenase NAD subunit 2 (IDH2_YEAST); ADP-ATP carrier protein 2, (ADT2_YEAST); Porin 1 (VDAC1_YEAST); phosphate carrier (MPCP_YEAST) Rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase: NDII_YEAST Complex II: flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase (SDHI-1); iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase (SDHB_YEAST); succinate dehydrogenase cytochrome b subunit (DHSD_YEAST) Krebs cycle and other enzymes: 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODO1_YEAST); malate dehydrogenase (MDHI_YEAST); fumarase (FUMH_YEAST); major ADP-ATP carrier of the mitochondrial inner membrane (ADT2_YEAST); alcohol dehydrogenase 1 (ADHI_YEAST)
550	Rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase: NDII_YEAST Cytochrome c oxidase: subunit 1 (COX1_YEAST), subunit 2 (COX2_YEAST), subunit 4 (COX4_YEAST), polypeptide 5A (COX5A_YEAST), polypeptide 5B (COX5B_YEAST), subunit 6 (COX6_YEAST), subunit 6A (COX13_YEAST), subunit 7 (COX7_YEAST), subunit 8 (COX8_YEAST), subunit 9 (COX9_YEAST); assembly protein COX15 (COX15_YEAST). Cytochrome bc1 complex: cytochrome b2 (CYB2_YEAST); subunit b2 (QCR2_YEAST, COR2_YEAST) Krebs cycle enzymes: 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODO1_YEAST); isocitrate dehydrogenase (IDH2_YEAST); malate dehydrogenase (MDHI_YEAST); alcohol dehydrogenase 1 (ADHI_YEAST); aldehyde dehydrogenase 2 and 3 (ADT2_YEAST, ADT3_YEAST); fatty aldehyde dehydrogenase HFDI (HFDI_YEAST); ADP-ATP carrier protein (ADT_CHLRE); ADP-ATP carrier protein 2 (ADT2_YEAST); phosphate carrier (MPCP_YEAST); Porin 1 (VDAC1_YEAST) Rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase: NDII_YEAST
350	Putative aldehyde dehydrogenase: MSC7_YEAST ADP-ATP carrier protein 1, 2 and 3: ADT1_YEAST, ADT2_YEAST, ADT3_YEAST Phosphate carriers 1 and 2: MPCP_YEAST, PIC2_YEAST Porin 1: VDAC1_YEAST Glycerol 3 phosphate dehydrogenase mitochondrial: GPDM_YEAST

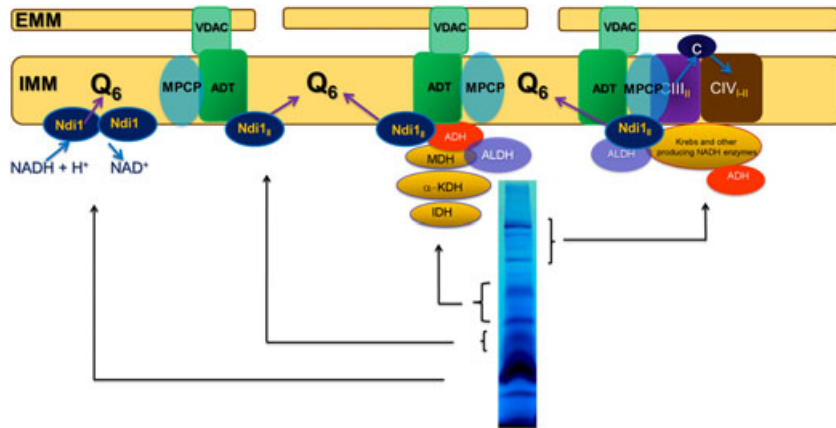


Figure 7. Model showing the different complexes formed by the internal NADH dehydrogenase in *S. cerevisiae* mitochondria. Ndi1, rotenone-insensitive NADH ubiquinone oxidoreductase; ADT, ADP–ATP carrier protein; MPCP, mitochondrial phosphate carrier; VDAC, Porin 1; ADH, alcohol dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; α -KDH: α -ketoglutarate dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; CIII₂, dimer of complex III; CIV, complex IV; CIV₂, dimer of complex IV; c, cytochrome c; IMM, inner mitochondrial membrane; EMM, external mitochondrial membrane; Q6, ubiquinone 6

Discussion

The paradigm of mitochondrial respiration involves the interaction of three classic protein complexes: NADH–ubiquinone oxidoreductase (complex I); ubiquinol–cytochrome *c* oxidoreductase (complex III); and cytochrome *c* oxidase (complex IV). Electron transfer between these complexes involves the participation of ubiquinone (coenzyme Q), a hydrophobic mobile electron carrier within the inner membrane, and cytochrome *c*, a small protein located in the mitochondrial inter membrane space. Two models for the operation of the respiratory chain have been proposed: (a) the random collision model, in which the components of the respiratory chain freely diffuse in the inner mitochondrial membrane and electron transfer is coupled to the random collisions between respiratory complexes (Hackenbrock *et al.*, 1986; Lenaz and Genova, 2007); and (b) the solid-state model, characterized by the assembly of respiratory proteins into large supercomplexes (Lenaz and Genova, 2007). The last model incorporates the preferential interaction among complexes I, III and IV, resulting in large respirasomes (Lenaz and Genova, 2007; Schagger and Pfeiffer, 2000). Some roles proposed for the respiratory supercomplexes are: the decrease in the production of reactive oxygen species; channelling of electrons among the elements of the supercomplex; and the increase in stability of the individual OXPHOS complexes (Lenaz and

Genova, 2007). *S. cerevisiae* is remarkable because mitochondria in this organism lack complex I and contain three alternative dehydrogenases (de Vries and Marres, 1987; Overkamp *et al.*, 2000). Here, we describe the association of Ndi1 with other mitochondrial proteins.

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis of protein complexes after digitonin solubilization of *S. cerevisiae* mitochondria showed similar patterns for the wild-type strain and the mutant lacking the two external NADH dehydrogenases (*ANDE1*–*ANDE2*) with the activity of NADH dehydrogenase distributed among well defined protein bands, in the range 145–1660 kDa (Figure 5). Since the double mutant lacks both external dehydrogenases, NADH dehydrogenase activity on these bands can be assigned to the internal isoform. Interestingly, the 1000 and 1660 kDa bands also contained complexes III and IV, as shown by specific immunodetection for both complexes (Figure 6), the activity of complex IV (Figure 2) and complexes III and IV recognized in the second dimension under native conditions in the presence of 0.02% DDM, indicating the association of the internal NADH dehydrogenase with at least one of the cytochrome *bc1* and cytochrome *c* oxidase supercomplexes. The bands with molecular weights above the 140 kDa point to the formation of different homo- and/or hetero-oligomers of the internal NADH dehydrogenase with other

Mitochondrial complexes containing the alternative NADH dehydrogenase

mitochondrial proteins, including complexes III and IV (Figure 2, Table 1). Interestingly, many of the low molecular weight bands with NADH dehydrogenase activity also contained malate dehydrogenase, ADP–ATP carrier, mitochondrial porin and phosphate carrier, suggesting that the last three proteins might be the point of nucleation of some Krebs cycle enzymes and the internal NADH dehydrogenase (Figure 7, Table 1). The interaction of the internal NADH dehydrogenase with Krebs cycle enzymes and with respiratory supercomplexes might have a physiological meaning, in the sense that this organization would allow coupling between the NADH producers (some of the Krebs cycle enzymes) and consumers (internal NADH dehydrogenase), resulting in functional channelling that directs the reducing equivalents from NADH into the ubiquinone pool (Figure 7).

Also remarkable is the high stability of protein complexes containing internal NADH dehydrogenase in *S. cerevisiae*, which resisted the solubilization of mitochondrial proteins with high concentrations of digitonin (up to 5 mg detergent/mg protein) and the BN–PAGE step (Figure 1). This high stability compares with the weak interaction between the external NADH dehydrogenase and complex IV in *Y. lipolytica* (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009). In this case, the complex was disrupted by the mild conditions used during BN–PAGE, but it was stable under clear native electrophoresis. Similarly, the interactions between the AOX and complex IV in *N. crassa* were observed only in the mutant lacking complex III, a condition characterized by overexpression of the alternative oxidase. However, this interaction was not found in the wild-type (Umbach and Siedow, 2000). Therefore, our results show for the first time a strong association of an alternative element, internal NADH dehydrogenase, with other proteins in the inner mitochondrial membrane of *S. cerevisiae*, including complexes III and IV.

The dependence of the electrophoretic pattern of the NADH dehydrogenase activity on the detergent:protein ratio was different for the low- and high-molecular weight complexes (Figures 1 and 4). For the bands located below 600 kDa, the same pattern was observed at low or high concentrations of digitonin, although the amount of each band changed with the concentration of detergent (Figures 1 and 4). However, at the lowest

concentration of digitonin (0.5 g/g), a large proportion of the NADH dehydrogenase activity was concentrated at the top of the gel, along with complex IV, further suggesting the interaction of Ndi1 with complex IV. This result is consistent with the recent proposal of the assembly of supercomplexes into large respiratory strings (Dudkina *et al.*, 2006; Wittig *et al.*, 2007). If this is the case, then higher concentrations of the detergent (2 g/g) are required to release complex IV and some fraction of Ndi1 from these high-molecular weight supercomplexes (Figure 1). Interestingly, association of Ndi1 with these large respiratory strings is in agreement with the careful kinetic analysis carried out by Boumans *et al.* (1998) several years ago, in which it was suggested that the internal NADH dehydrogenase of *S. cerevisiae* mitochondria forms independent units containing complex III and IV.

Grandier-Vazeille *et al.* (2001) proposed a supercomplex containing at least five dehydrogenases (succinate dehydrogenase, the internal and external NADH dehydrogenases Ndi1 and Nde1 and the L- and D-lactate dehydrogenases), HSP60, other mitochondrial membrane proteins and several enzymes of the Krebs cycle. In agreement with this result, complex II migrated with a molecular weight around 600 kDa (Figure 2, second lane), pointing to the association of complex II with other mitochondrial proteins (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001). However, we did not see a full overlapping of complex II and the alternative NADH dehydrogenase (550 kDa for Ndi1 and 600 kDa for complex II), suggesting the lack of interaction between the two proteins (Figures 1 and 2).

The results of the present study show various interesting points. (a) When mitochondria of *S. cerevisiae* were solubilized with digitonin (a mild detergent) and the proteins separated by BN–PAGE, several bands with NADH dehydrogenase activity were observed on the gel. (b) The more conspicuous NADH dehydrogenase activity corresponds to an entity with a molecular weight close to the homodimer recently reported (Feng *et al.*, 2012; Iwata *et al.*, 2012). We believe that the new complexes described in this work were not seen before because the stronger detergents DDM and Triton X-100 used in previous studies disturbed these protein–protein interactions. (c) Two of the largest supercomplexes with NADH dehydrogenase activity (1000 and 1660 kDa) also showed cytochrome *c* oxidase activity and

contained complex III, suggesting the formation of a respirasome-like supercomplex. (d) At the lowest concentration of digitonin used (0.5 g/g protein), cytochrome *c* oxidase activity and most of the NADH dehydrogenase were associated into a very high supercomplex at the top of the gel, suggesting the presence of respiratory strings containing both elements in *S. cerevisiae* mitochondria. (e) The supercomplex containing the succinate dehydrogenase activity had a similar migration and intensity in the gel at low and high concentrations of digitonin, which suggests the absence of this complex in the respiratory strings (Figure 1B). (f) Experiments carried out with the double mutant (*ANDE1-ANDE2*) indicate that Ndi1 interacts with other mitochondrial proteins to form complexes with NADH dehydrogenase activity.

Finally, in this work we described new complexes in the mitochondria of *S. cerevisiae* that bring about a new structural and physiological view for the interaction of Ndi1 with some enzymes of the Krebs cycle and with complexes of the respiratory chain (Figure 7). However, further work is necessary to identify the individual proteins involved in the formation of each complex.

Acknowledgements

We dedicate this work to Dr Guillermo Mendoza-Hernández, an exceptional friend and colleague, who passed away suddenly on July 13, 2012. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant No. CONACyT 59855) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (Grant Nos PAPIIT IN209614 and IN214914). The experiments described in this work are part of the PhD degree of M.G.M.O. in the Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and he was supported by a PhD fellowship from CONACyT. G.M.H. thanks Alfredo Wydler from Waters (México) for providing the nanoUPLC for this work.

References

Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, et al. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* **32**: 529–539.

Berry EA, Trumpower BL. 1985. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bcl* and cytochrome *c-aa3* complexes. *J Biol Chem* **260**: 2458–2467.

Boumans H, Grivell LA, Berden JA. 1998. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem* **273**: 4872–4877.

de Vries S, Grivell LA. 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **176**: 377–384.

de Vries S, Marres CA. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta* **895**: 205–239.

DeCorby A, Gaskova D, Sayles LC, Lemire BD. 2007. Expression of Ndi1p, an alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase, increases mitochondrial membrane potential in a *C. elegans* model of mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 1157–1163.

Duarte M, Videira A. 2009. Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **72**: 246–258.

Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, et al. 2006. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* **11**: 232–240.

Eschemann A, Galkin A, Oettmeier W, et al. 2005. HDQ [1-hydroxy-2-dodecyl-4 (1H) quinolone], a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* **280**: 3138–3142.

Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP. 2004. Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* **134**: 1450–1459.

Eubel H, Jansch L, Braun HP. 2003. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**: 274–286.

Feng Y, Li W, Li J, et al. 2012. Structural insight into the type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. *Nature* **491**: 478–482.

Genova ML, Baracca A, Biondi A, et al. 2008. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta* **1777**: 740–746.

Gonzalez-Zamorano M, Mendoza-Hernandez G, Xolalpa W, et al. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannoseylated proteins. *J Proteome Res* **8**: 721–733.

Grandier-Vazeille X, Bathany K, Chaignepain S, et al. 2001. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* **40**: 9758–9769.

Guerrero-Castillo S, Vazquez-Acevedo M, Gonzalez-Halphen D, et al. 2009. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 75–85.

Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* **18**: 331–368.

Heikal A, Nakatani Y, Dunn E, et al. 2014. Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: a monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. *Mol Microbiol* **91**: 950–964.

Iwata M, Lee Y, Yamashita T, et al. 2012. The structure of the yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) reveals overlapping binding sites for water- and lipid-soluble substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 15247–15252.

Mitochondrial complexes containing the alternative NADH dehydrogenase

- Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2000. Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **286**: 214–223.
- Lenaz G, Fato R, Genova ML, et al. 2006. Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1406–1420.
- Lenaz G, Genova ML. 2007. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C1221–1239.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.
- Luttik MA, Overkamp KM, Kotter P, et al. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**: 24529–24534.
- Marella M, Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T. 2007. Mechanism of cell death caused by complex I defects in a rat dopaminergic cell line. *J Biol Chem* **282**: 24146–24156.
- Marella M, Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, et al. 2008. Protection by the *ND11* gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* **3**: e1433.
- Marques I, Dencher NA, Videira A, Krause F. 2007. Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot Cell* **6**: 2391–2405.
- Melo AM, Duarte M, Videira A. 1999. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1412**: 282–287.
- Overkamp KM, Bakker BM, Kotter P, et al. 2000. *In vivo* analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bacteriol* **182**: 2823–2830.
- Pascal N, Dumas R, Douce R. 1990. Comparison of the kinetic behavior toward pyridine nucleotides of NAD-linked dehydrogenases from plant mitochondria. *Plant Physiol* **94**: 189–193.
- Perales-Clemente E, Bayona-Bafaluy MP, Perez-Martos A, et al. 2008. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18735–18739.
- Sanz A, Soikkeli M, Portero-Otin M, et al. 2010. Expression of the yeast NADH dehydrogenase *Ndi1* in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9105–9110.
- Schagger H. 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**: 119–128.
- Schagger H, Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* **19**: 1777–1783.
- Schagger H, von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223–231.
- Schmid R, Gerloff DL. 2004. Functional properties of the alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling. *FEBS Lett* **578**: 163–168.
- Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EK, et al. 1998. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9167–9171.
- Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. 2006. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett* **580**: 6105–6108.
- Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, et al. 2004. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **279**: 5000–5007.
- Stuart RA. 2008. Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 411–417.
- Umbach AL, Siedow JN. 2000. The cyanide-resistant alternative oxidases of the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochem Biophys* **378**: 234–245.
- Velazquez I, Pardo JP. 2001. Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **389**: 7–14.
- Vonck J, Schafer E. 2009. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 117–124.
- Wittig I, Beckhaus T, Wumaier Z, et al. 2010. Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints. *Mol Cell Proteomics* **9**: 2149–2161.
- Wittig I, Karas M, Schagger H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1215–1225.
- Yamashita T, Nakamaru-Ogiso E, Miyoshi H, et al. 2007. Roles of bound quinone in the single subunit NADH-quinone oxidoreductase (*Ndi1*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**: 6012–6020.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Figure S1. BN-PAGE of mitochondria lacking the two external dehydrogenases ($\Delta NDE1\Delta NDE2$) treated with (A) or without (B) 2 g digitonin/g protein. Mitochondria were solubilized with or without digitonin (digitonin:protein ratio of 2) and respiratory complexes were separated by 1D BN-PAGE. NADH:MTT oxidoreductase activity was assayed in the polyacrylamide gel, as described in Materials and methods



Memoria del 44^o Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Las NADH deshidrogenasas alternas en hongos, nuevos roles metabólicos y su historia evolutiva

The alternative NADH dehydrogenases in fungi, new metabolic roles and its evolutionary history

Matus-Ortega, M. Genaro^{1*}; Cárdenas-Monroy, Christian A.²; Araiza-Villanueva, Minerva³; Vázquez-Carrada, Melissa³; Vázquez-Meza, Héctor²; Matuz-Mares, Deyamira²; Guerra-Sánchez, Guadalupe³; Peña-Díaz, Antonio¹ y Pardo-Vázquez Juan Pablo²

1. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

2. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

3. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

*Correspondencia. Instituto de Fisiología Celular, Circuito Interior s/n Col. Ciudad Universitaria, CU Coyoacán, Ciudad de México. CP 04510. Tel: +52(55)56225633, genaromatus@bq.unam.mx

Resumen

Las NADH deshidrogenasas alternas (ND-2) son proteínas cuya masa molecular oscila alrededor de los 50 kDa. Son proteínas monotópicas que se encuentran en ambas caras de la membrana mitocondrial interna o en la cara interna de la membrana plasmática de las bacterias y se acoplan al funcionamiento de la cadena de transporte de electrones. La función más relevante de estas proteínas consiste en restaurar, parcialmente, el gradiente electroquímico de protones en la membrana interna mitocondrial, función por demás relevante para rescatar de mitocondriopatías por deficiencia del complejo I. Las ND-2 oxidan al NADH o NADPH, canalizando los electrones hacia la quinona, permitiendo que ocurra el bombeo de los protones en los complejos III y IV. En el presente trabajo realizamos una breve actualización del campo de estudio de las ND-2 y desarrollamos una breve descripción de las principales funciones de las NADH deshidrogenasas alternas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*, dos organismos ampliamente utilizados como modelos para la investigación.

Palabras clave: NADH deshidrogenasa alterna, ndi1, *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae*, supercomplejos respiratorios, elementos alternos de

Abstract

Alternative NADH dehydrogenases (ND-2) are proteins with a molecular weight close to 50 kDa. They are monotopic proteins found on both sides of the internal mitochondrial membrane or in the inner side of the bacterial plasma membrane, and they are coupled to the functioning of the electron transport chain. The most relevant function of these proteins is to partially restore the electrochemical gradient of protons in the internal mitochondrial membrane, a relevant function that can rescue mitochondrial diseases due to complex I deficiency. ND-2 oxidizes NADH or NADPH, channeling the electrons to the quinone, and enabling the pumping of protons by complexes III and IV. In the present work, we make a brief update of the field of ND-2, and we develop a short description of the main functions of the NADH dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis*, two organisms widely used as models for research.

Keyword: alternative NADH dehydrogenase, ndi1, *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae*, respiratory supercomplexes, alternative elements in

la cadena de transporte de electrones.

the electron transport chain.

¿Qué son las NADH deshidrogenasas alternas?

Las NADH deshidrogenasas del tipo 2 (ND-2), son proteínas mitocondriales que funcionan como elementos respiratorios alternos y permiten a las células responder de manera flexible ante diferentes condiciones ambientales que impactan en su estado energético. Normalmente, estas proteínas se describen como insensibles a la inhibición por la rotenona, pero sensibles a la flavona y catalizan la transferencia de electrones del NADH o NADPH a un aceptor artificial como el DCPIP o fisiológico como la quinona [1,2].

La estructura tridimensional de las NADH deshidrogenasas alternas

Originalmente fueron descritas como polipéptidos con una masa molecular cercana a los 50 kDa, que se encuentran adosados periféricamente en ambas caras de la membrana mitocondrial interna de plantas, hongos y algunos protozoarios [3]. Posteriormente se describió su presencia en la cara interna de la membrana plasmática de eubacterias y archeobacterias [2,4]. La masa molecular de estas proteínas es apenas mayor a los 40 kDa [5].

En los inicios se pensaba que la estructura de estos elementos alternos correspondía a flavoproteínas monoméricas que no tenían interacción alguna para formar oligómeros [1]; tampoco se especulaba su participación como parte de los supercomplejos respiratorios.

Al ser las ND-2 proteínas adosadas a las membranas, su purificación resultaba un proceso complicado que requería no sólo de la utilización de alta fuerza iónica (400-600 mM), sino también la utilización de detergentes como Tritón X-100® o n-dodecil- β -D-maltósido (DDM), para así separarlas de manera eficiente de las membranas y mantenerlas activas [1].

También resultó complicado incrementar la concentración de las proteínas purificadas a valores cercanos a los 10 mg/mL, para la posterior resolución de su estructura terciaria por el método de difracción con rayos X, o por NMR [6,7]. El aumento en la concentración de la proteína pura resultaba muy laborioso por la presencia de los detergentes que, al pasar de la concentración

micelar crítica (CMC), forman capas que no sólo impiden el proceso de cristalogénesis, sino también desnaturalizan a las proteínas.

Ante la imposibilidad de tener información sobre la estructura terciaria de las ND-2, se realizaron alineamientos múltiples para inferir los motivos presentes en la estructura primaria de estas enzimas. También se buscaron métodos de modelado tridimensional para realizar inferencias sobre la catálisis y los mecanismos de regulación cinética de este tipo de enzimas.

Los primeros modelos se referían a estas proteínas como polipéptidos globulares en los que era característica la presencia de dos pliegues de Rossmann, estructuras supersecundarias comunes a todas las NADH deshidrogenasas [8]. En la figura 1A se coloca la estructura globular inferida para las NADH deshidrogenasas alternas en la década de los años 90. La figura 1B muestra uno de los modelos teóricos generados por Gerloff y Schmid en el año 2004 [9], en el que generaron una predicción de la estructura terciaria de la ND-2 de *Escherichia coli*. Estos investigadores seleccionaron la ND-2 de *E. coli* por ser de las más pequeñas, y realizaron su predicción utilizando la técnica de modelado por homología, tomando como referencia la estructura de la NADPH peroxidasa de *Enterococcus faecalis* [9], cuya estructura ya se conocía. Cabe mencionar que el modelo empleado distaba mucho de ser el idóneo, pues la identidad entre las secuencias es inferior al 21%, además de que el molde correspondía a una proteína soluble, mientras que la ND-2 de *E. coli* se ubica adosada a la membrana plasmática de la bacteria. Es conveniente aclarar que ambas enzimas muestran una alta semejanza en los motivos de unión a los dinucleótidos, por lo que la validez de las coordenadas del modelo generado fue aceptada.

Se obtuvieron otras estructuras básicamente similares al construir modelos con base en homología, utilizando esta vez como molde a la estructura terciaria de la lipoamida deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* que, aunque también correspondía a una proteína soluble, los modelos que se generaron permitían obtener buenas predicciones sobre los sitios de unión de los sustratos en las ND-2, respaldadas, adicionalmente, por los análisis de cinética enzimática que se desarrollaban simultáneamente

[10]. Sin embargo, en esta década los modelos tridimensionales dejaban mucho que desear debido a los bajos valores en la identidad global de los alineamientos, que dejaban zonas con alta incertidumbre, sobre todo en las regiones con escasa similitud entre las secuencias de los moldes utilizados y las secuencias de las ND-2 (Kersher, 2007). Esta limitación era importante, pues posteriormente se conocería que el dominio carboxilo terminal, que es muy variable, está implicado en funciones de gran relevancia, como la dimerización de las ND-2 [6,7].

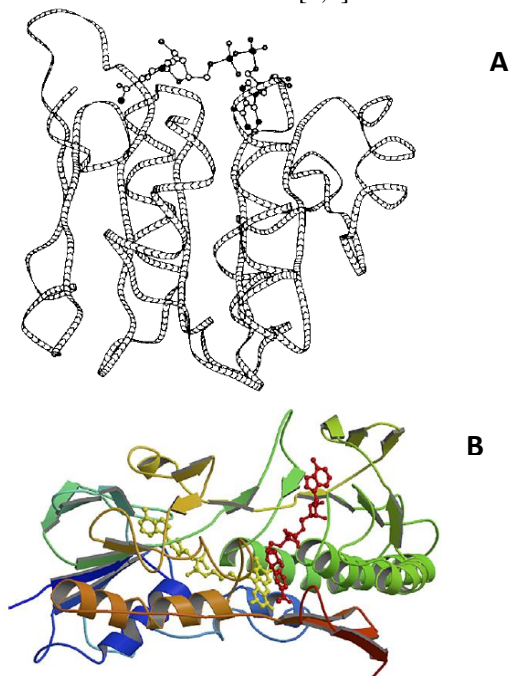


Figura 1. Modelos generados para las NADH deshidrogenasas alternas. En el panel A, se muestra una predicción teórica que toma el consenso estructural de las proteínas solubles con dominios de unión a nucleótidos de adenina como molde conocido hasta la fecha. En el panel B se coloca el modelo de la ND-2 de *E. coli* realizado con base en homología tomando como modelo a la NADPH peroxidasa de *E. faecalis*. [8] y [9]

Desde los primeros análisis de los alineamientos de las ND-2 resultó evidente la conservación de varios motivos necesarios para la unión del anillo de isoaloxacina del FAD, así como los residuos de aminoácidos involucrados en la unión y en la catálisis del NADH y las quinonas. En la figura 2, se muestra un alineamiento con 8 secuencias de ND-2. En él se incluye la ND-2 de *Yarrowia lipolytica*, las tres ND-2 de *S. cerevisiae*, dos secuencias de la papa común *Solanum tuberosum*, una secuencia de

Neurospora crassa y una secuencia de *E. coli*. [4]. Estas dos zonas de conservación corresponden a los dominios de unión al FAD (primera zona consenso) y al NADH (segunda zona consenso), que se predecían como “huellas de plegamiento” comunes a todas las estructuras con pliegues de Rossman.

Ante la ausencia de información sobre la estructura tridimensional de las ND-2, se avanzó en dos áreas: 1) la caracterización cinética de las NADH deshidrogenasas alternas en mitocondrias de plantas y hongos, y 2) con las herramientas de lectura abiertos de ND-2 en muchos genomas de plantas, hongos y diversos microorganismos [2,11-16], con lo que se pudo proponer la presencia de estas enzimas en organismos como *Arabidopsis thaliana*, *S. tuberosum*, *N. crassa*, *K. lactis*, *Cucumis melo*. No fue hasta el segundo tercio del año 2012 cuando la estructura tridimensional de la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* (scNd1) se resolvió con la técnica de difracción de rayos X, utilizando herramientas de dispersión múltiple anómala (MAD) y remplazo isomórfico singular anómalo (SIRAS), generando una estructura con una resolución de 2.7 Angstroms (Figura 3). La estructura resuelta por el grupo de Takao Yagi reveló la presencia de un homodímero en la celda unitaria [6].

A partir de esta estructura se pudo concluir que hay una interacción con simetría invertida (cabeza con cola) de los dos monómeros, y que se forma una interfase con carga negativa flanqueada por dos bordes con carga positiva que permiten la unión del dímero a las cabezas de fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial (figuras 3D y 3E) [6].

El trabajo de co-cristalización con diferentes ligandos de la scNDI1 arrojó resultados que confirmaban las predicciones sobre la unión de los ligandos arriba descritas. El NAD⁺ se encontró unido al segundo pliegue de Rossman de cada monómero, en una posición favorecida para el intercambio de electrones con el FAD, localizado en el primer pliegue de Rossman. Una de las interrogantes de este trabajo fue el sobrelape del NAD⁺ y la quinona 2, lo cual resultaba por demás opuesto a la formación de un complejo ternario en cada monómero [6].

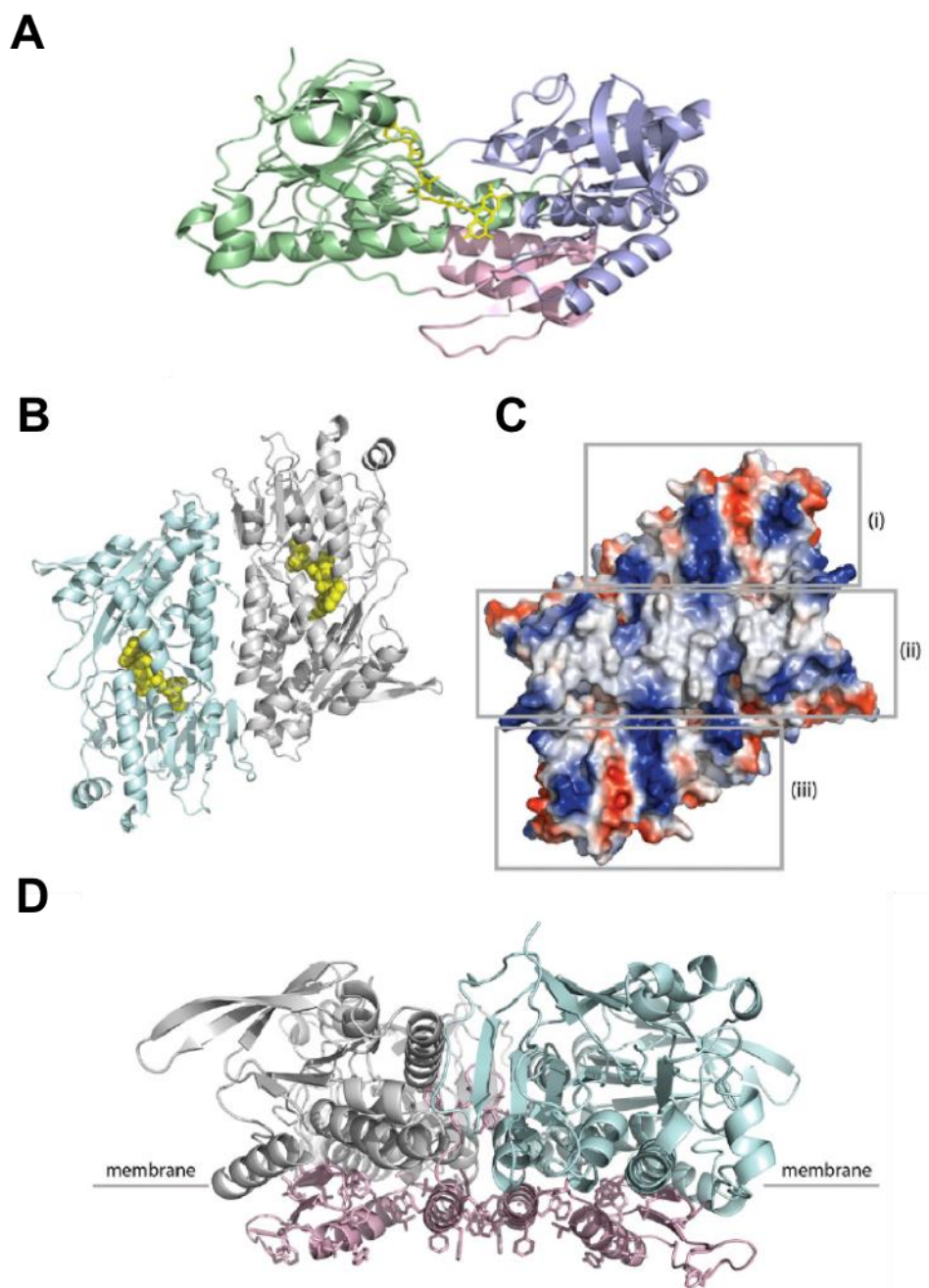


Figura 3. Estructura tridimensional de la scNDII obtenida por Yagi y colaboradores en 2012. En el panel A se observa el homodímero de la proteína encontrado en la celda unitaria del cristal. En amarillo se resalta el FAD de cada monómero. En el panel B se muestra en listones y en una representación globular (panel C) la parte inferior del homodímero en el que se forma la interfase de unión a las membranas. Con la letra i y iii se resalta la posición de los extremos amino de cada monómero. Con las letras ii se marca el canal hidrofóbico (en blanco) bordeado por dos flancos positivos (azul) que permiten el adosamiento del homodímero a las membranas. En el panel D se muestra la interacción predicha para el homodímero con las membranas [imágenes tomadas de Iwata, M. et al. 2012 [6]].

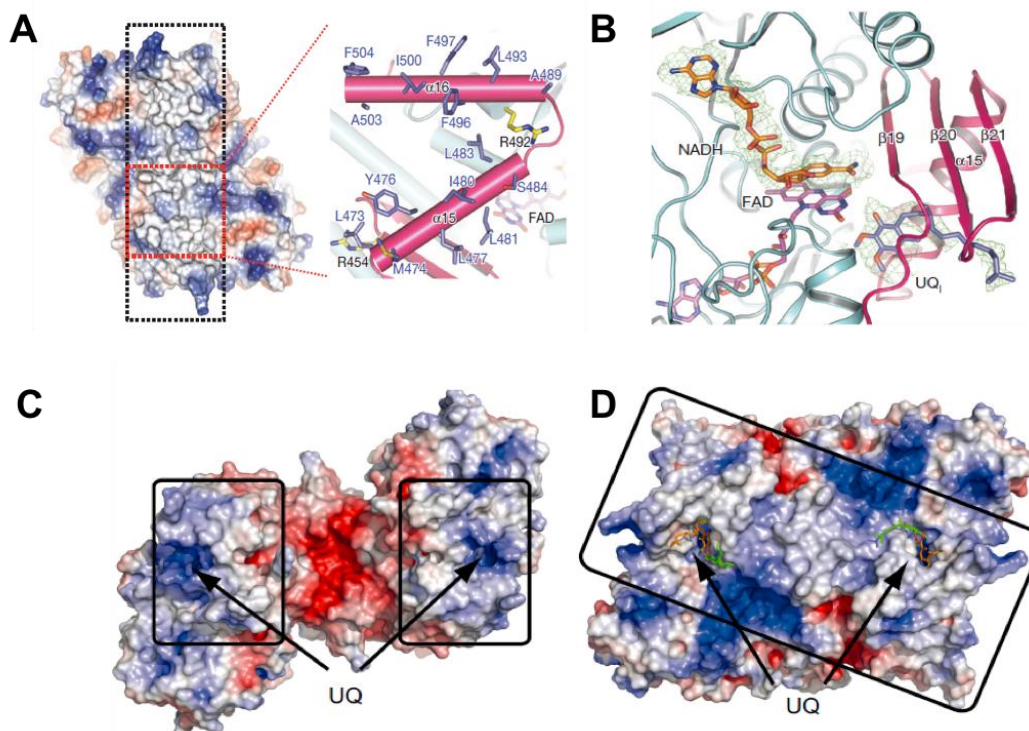


Figura 4. Estructura tridimensional de la scNDI1 resuelta por Feng en 2012 (paneles A, B y D) estructura tridimensional para la ND-2 de *C. thermarum* (panel C). En el panel A se muestra la cara membranal del heterodímero, en el que las hélices 15 y 16 de cada monómero resultan fundamentales para la dimerización. En el panel B se muestra la presencia del NADH situado en la cara cis del FAD, mientras la quinona queda en la cara trans del anillo de isoaloxacina. En el panel C y D se muestra el plano membranal de los homodímeros de las ND-2 de *C. thermarum* y *S. cerevisiae* en el que se resalta con flechas el canal de las quinonas. [7,17]

Las NADH deshidrogenasa alternas forman parte de supercomplejos respiratorios

En nuestro grupo de trabajo seleccionamos a la levadura *S. cerevisiae* con el fin de evaluar la presencia de las ND-2 en la formación de supercomplejos respiratorios. Este modelo de estudio se escogió por su amplio uso artesanal e industrial, porque se conoce su genoma completo, y es uno de los modelos de estudio eucarionte mejor conocido. En 1998, dos grupos de investigación encabezados por Jack Pronk y McAlister-Henn llegaron, de manera independiente y casi simultánea, a la conclusión de que las mitocondrias de *S. cerevisiae* contaban con 3 genes que codifican para 3 NADH deshidrogenasas alternas [18,19]. Es decir, además de la interna (scNDI1), se describió la presencia de dos elementos alternos externos que contaban con un marco de lectura abierta. Estas dos secuencias se nombraron scNDE1 y scNDE2 [18,19]. Sin embargo, parecía que, bajo las condiciones de los ensayos realizados por ambos

grupos de trabajo, únicamente la scNDE1 era relevante. Es decir, la mutante de la scNDE2 era indistinguible fenotípicamente de la cepa silvestre, mientras que la mutante que carecía de la scNDE1 perdía la capacidad de oxidar al NADH citosólico (Figura 5).

Al no existir en la levadura un complejo I clásico, la scNDI1 toma su lugar, no sólo en la reoxidación del NADH, sino también en la formación de supercomplejos respiratorios. Aunque esta propuesta parecía ser bastante obvia y razonable, había que demostrarla experimentalmente.

A través de la selección de mutantes sencillas y dobles, nuestro equipo de trabajo pudo llegar a resultados concluyentes en los que reportamos que únicamente la scNDI1 forma parte de los supercomplejos respiratorios, mientras los otros dos elementos alternos no forman supercomplejos respiratorios en nuestras condiciones de trabajo [20].

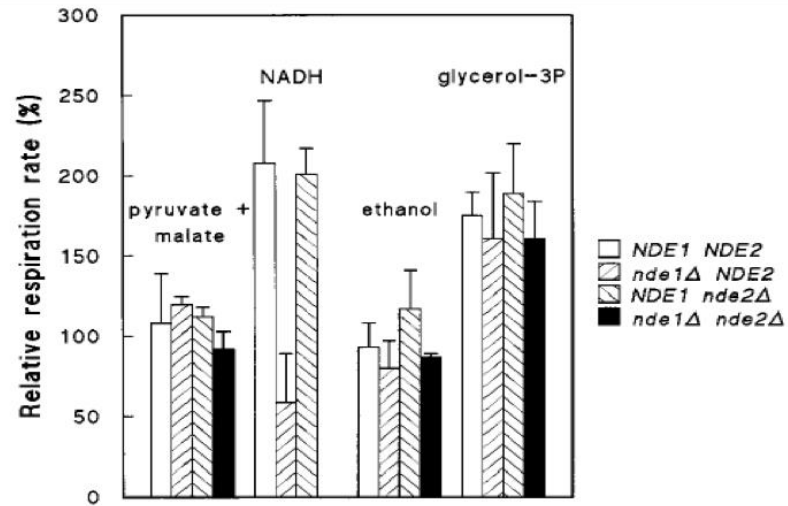
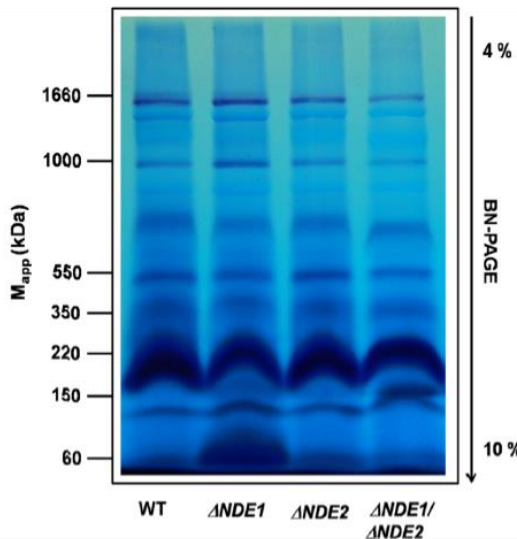
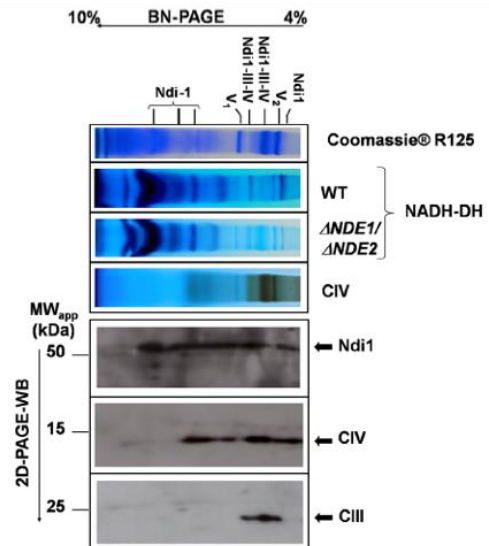
A**B****C**

Figura 5. Las NADH deshidrogenasas alternas de *S. cerevisiae*. En el panel A se muestran las velocidades de respiración de la cepa WT y tres mutantes. La primera carece del gen codificante para la scNDE1 (*nde1Δ NDE2*), la segunda carece del gen de la scNDE2 (*NDE1 nde2Δ*), la tercera carece de las dos NDEs y sólo muestra la interna (*nde1Δ nde2Δ*). En el panel B se muestran un zimograma revelado con actividad de NADH deshidrogenasa en el que se evalúa a las 4 mutantes previamente descritas. En el panel C se coloca 7 carriles en los que se confirma con anticuerpos la composición de los supercomplejos respiratorios encontrados en la cepa WT y en la doble mutante que carece de las NDEs [20].

Sin embargo, también se ha mostrado la formación de supercomplejos respiratorios con NADH deshidrogenasas alternas externas en organismos como *Y. lipolytica* [21], por lo que no descartamos que bajo algunas condiciones de cultivo, las scNDEs también puedan formar parte de supercomplejos respiratorios.

La formación de supercomplejos respiratorios permite la canalización de los electrones entre una proteína y otra, disminuyendo la probabilidad de formación de radicales libres de oxígeno, al mismo tiempo que aumenta la velocidad de flujo de los electrones entre los componentes. También se ha descrito la formación de estas estructuras para la catálisis en serie y para la estabilización de las proteínas [22].

La historia evolutiva de las NADH deshidrogenasas alternas

Normalmente las NADH deshidrogenasas se describían como proteínas ausentes en los cordados [3,4,23]; sin embargo, investigando sobre la historia evolutiva de estos elementos alternos, nuestro equipo de trabajo detectó en el 2011 la presencia de transcritos codificantes para ND-2 en al menos cinco especies de animales (figura 6) [24].

Estos animales compartían como elemento común estar limitados a una vida acuática y tener un movimiento ligeramente restringido. Entre los animales con transcritos para ND-2 localizados, se encuentran:

La placa marina *Trichoplax adhaerens* (phylum Placozoa), el gusano de mar *Nematostella vectensis*, la hidra marina *Hydrumagni papillata* (phylum Cnidaria), el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (phylum Echinodermata), y el organismo filtrador de los urocordados *Ciona intestinalis* (phylum Chordata).

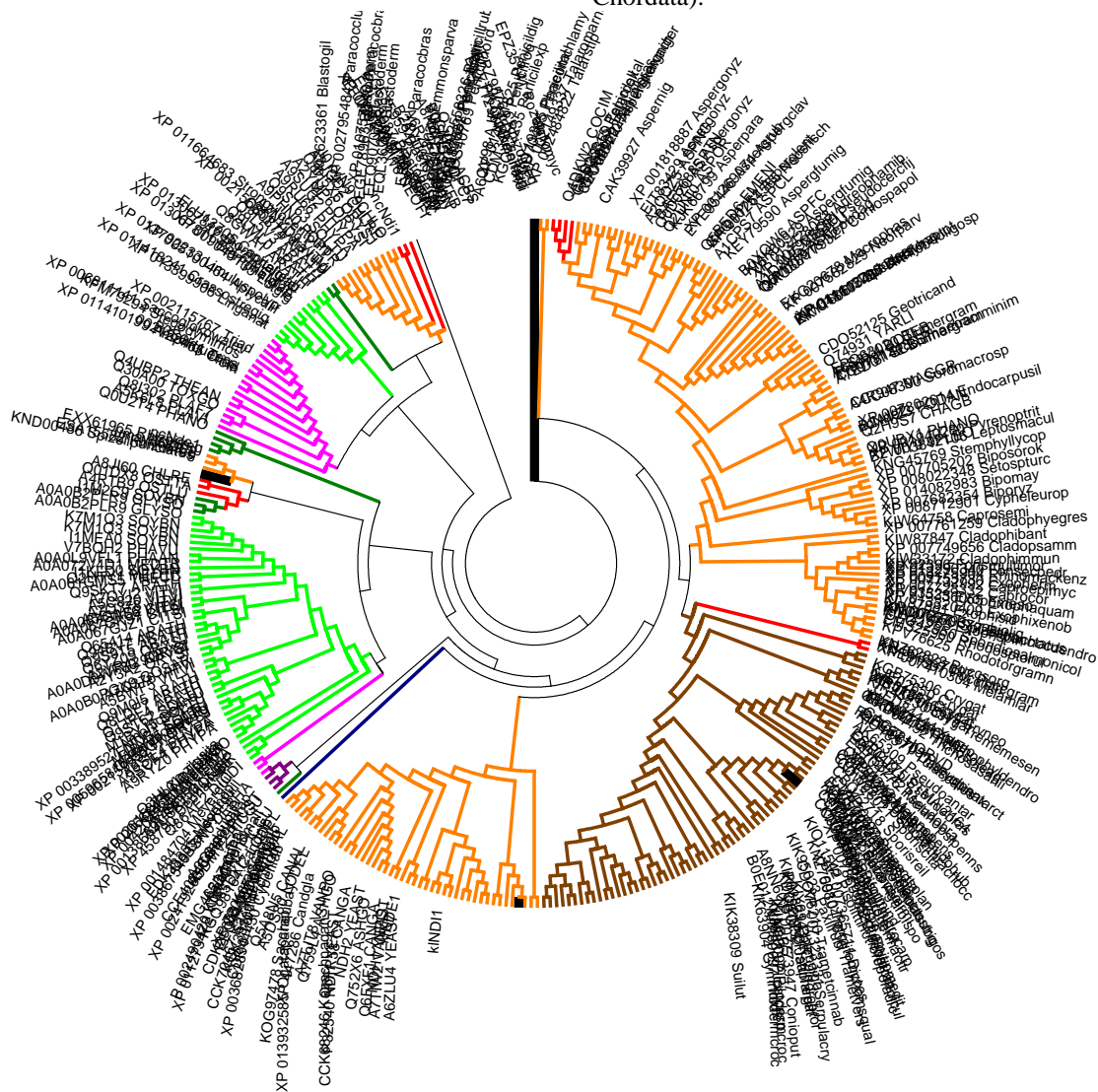


Figura 6. Árbol filogenético de las ND2 en diferentes grupos. En verde oscuro se muestran las secuencias de plantas vasculares, en verde claro secuencias de eubacterias, en naranja secuencias de ascomycetos, en morado se muestran protozoarios, en rojo se colocan las 4 secuencias de animales reportadas por nuestro grupo de investigación. En líneas gruesas se resalta la ubicación de las 3 secuencias de *U. maydis* y la scND11.

Inicialmente la presencia de las NADH deshidrogenasas en estas cinco secuencias de animales fue rechazada, pero con el pasar de los años y la aparición de más secuencias genómicas de animales, logramos encontrar al menos 20 más, de grupos como artrópodos, poliquetos, moluscos, bivalvos, quelicerados. A continuación colocamos 12 especies representativas: *Amphimedon queenslandica*, esponja de la gran barrera de arrecife de coral; *Strongylocentrotus purpuratus*, un erizo de mar; *Lottia gigantea*, la ostra búho solitaria; *Crassostrea gigas*, el ostión u ostra japonesa; *Lingula anatina*, la almeja o mejillón de cola considerado “un fósil viviente” por su amplia representación en el registro fósil; *Capitella teleta*, un tipo de gusano poliqueto; *Saccoglossus kowalevskii*, un gusano deuterostomado; *Limulus polyphemus* ó cangrejo herradura también conocido como “cazuelita de mar”; *Aplysia californica*, el primer molusco en ser secuenciado; *Biomphalaria glabrata*, caracoles de la familia Planorbidae y *Stegodyphus mimosarum*, arañas de la familia Eresidae.

De esta manera, ante esta amplia representación de las ND-2, creemos que el escenario evolutivo más plausible y parsimonioso, es en el que el ancestro común a los tres grandes phyla del árbol de la vida (Archea, Bacteria y Eucaria), debió poseer al menos una copia de una ND-2, y esta secuencia fue heredada a todos los grupos actuales, pero se perdió únicamente en los animales superiores como los mamíferos y grupos cercanos. Inicialmente nuestra apuesta para explicar la ausencia de las ND-2 en los mamíferos se basaba en argumentos bioenergéticos, y propusimos que el funcionamiento de las ND-2 eran inviábiles ante un estilo de vida de gran movilidad. Es decir, al no bombear protones, las NADH deshidrogenasas alternas representarían una fuga de energía que no podía ser tolerado en los animales con gran movimiento.

La participación de las NADH deshidrogenasas alternas en el metabolismo

Las ND-2 son proteínas monotópicas adosadas lateralmente a las membranas biológicas, como hemos mencionado anteriormente, y aún dimerizadas, su tamaño es muy pequeño en comparación con el complejo I clásico, por lo que no bombean protones y no participan directamente en la generación del gradiente electroquímico [5,25], pero permiten la reducción de la quinona [10,26], con lo que los complejos III y IV pueden bombear protones y formar el gradiente

electroquímico necesario para el funcionamiento de la fosforilación oxidativa. Además de reducir a las quinonas, las ND-2 permiten la reoxidación del NADH y del NADPH, lo que es una función por demás importante, pues agilizan la dinámica del metabolismo intermediario.

En el caso de hongos como *S. cerevisiae*, que posee tres elementos alternos que oxidan NADH pero no posee complejo I, la scNDII cumple con la función de oxidar al NADH generado en la matriz mitocondrial [27], mientras que a las otras dos NADH deshidrogenasas alternas externas se les asocia la función de oxidar el NADH generado en el espacio citosólico [28]. Hasta el pasado noviembre del 2016, no hay registro alguno de alguna NADPH deshidrogenasa funcional en las mitocondrias de *S. cerevisiae*. Sin embargo, hemos conseguido clonar, sobreexpresar y purificar a las 3 NADH deshidrogenasas alternas de *S. cerevisiae* y con las enzimas puras hemos constatado que la scNDE2 tiene una función bivalente como NADH y NADPH deshidrogenasa, con una afinidad mayor por el segundo sustrato, pero con una V_{max} menor para el NADPH (tabla 1).

	K_m NADH (μ M)	$K_{0.5}$ DCPIP (μ M)	V_m NADH (μ mol /min mg)
scNDE1	15.5 \pm 2.6	44.82 \pm 3	1,108.6 \pm 54.7
scNDE2	3.7 \pm 0.5	51.6 \pm 3.1	1,441 \pm 50.3
	K_m NADPH	$K_{0.5}$ DCPIP	V_m NADPH (μ mol /min mg)
sc NDE1	----	----	----
scNDE2	6.83 \pm 1.6	31.4 \pm 0.08	852.8 \pm 1.6

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las 2 NDE de *S. cerevisiae*

En otros hongos ascomicetos como *K. lactis* y *N. crassa*, es común encontrar al menos cinco genes codificantes para ND-2, en los que al menos uno de los productos codificados tiene la función de canalizar a los electrones del NADPH cuando la sobreproducción de este transportador de electrones es elevada (Figura 7) [12,15]. También existen ascomicetos, como *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*, en los que sólo se presenta una secuencia que codifica para una NADH deshidrogenasa alterna externa [21,29].

Para el caso de hongos basidiomicetos como *U. maydis*, nuestro grupo de trabajo ha encontrado la presencia de tres marcos de lectura abierta que codifican para tres transcritos de ND-2 que parecen ser constitutivos (paneles A y B de la figura 8), ya que se expresan durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, sin importar la fuente de carbono. Una de las secuencias posee un dominio de unión a calcio (datos no mostrados), y al menos uno de los tres

genes de ND-2 en el genoma de este basidiomiceto codifica para una proteína con actividad de NADPH deshidrogenasa que es

insensible a la activación por calcio (paneles C y D de la Figura 8).

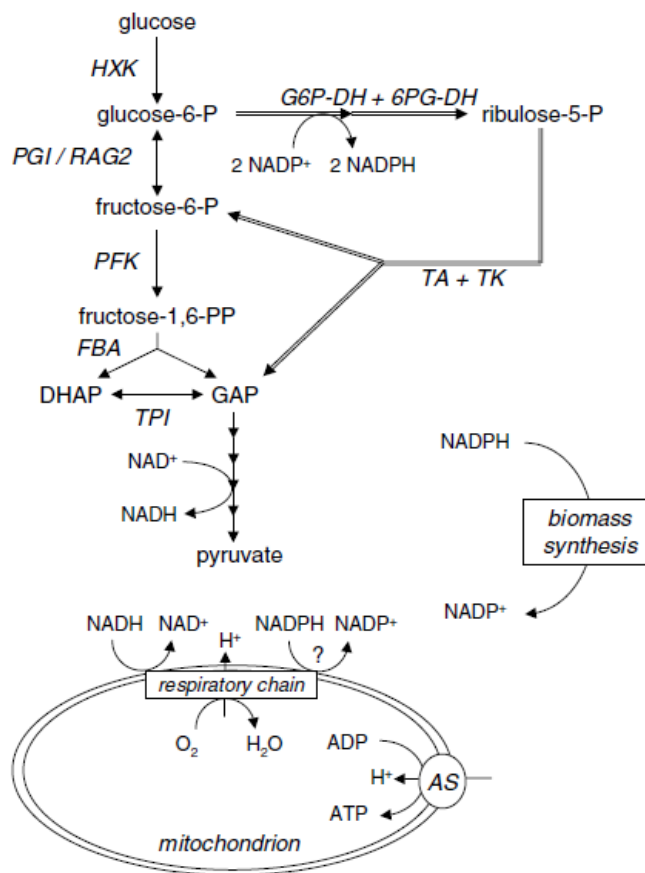


Figura 7. Flujo de carbono en mutantes PGI/RAG2 de *K. lactis*. Las células de esta cepa al tener disminuida la conversión de Glc6P a Frc6P aumentan el flujo de la vía de las pentosas fosfato, con lo que la sobreproducción de NADPH conduce a la sobre expresión de una NADPH deshidrogenasa mitocondrial que permite la reoxidación del metabolito y la canalización de los electrones hacia la cadena respiratoria [15].

A partir de los modelos teóricos realizados por nuestro grupo de trabajo, podemos inferir que el dominio de unión a calcio presente en la secuencia um3669 está localizado fuera de la interfase de unión de los monómeros, tomando una distribución lateral respecto a la posición del posible dímero de esta proteína (Figura 9, paneles A y B), lo que es muy interesante, puesto que podrían formar parte del mecanismo de regulación de la enzima.

La cinética enzimática de las NADH deshidrogenasas alternas

Con el fin de conocer el mecanismo de reacción de estos elementos alternos, se realizaron trabajos cinéticos en los que los autores describían inicialmente a las ND-2 con una cinética del tipo Ping-Pong (figura 10 panel A) [10]. La mayoría

de estos análisis se hicieron con la NADH deshidrogenasa alterna interna de *S. cerevisiae* (scNDI1) y se consideró a este mecanismo de reacción como el consenso para todas las ND-2 que iban siendo descritas. Sin embargo, con el uso de quinonas hidrofóbicas se encontraron rectas intersectantes en el gráfico de Lineweaver-Burk, lo que permitía inferir la presencia de un complejo ternario entre las ND-2 y sus dos sustratos (Figura 10 panel B). También con el uso de experimentos de transferencia de carga utilizando quinonas hidrofóbicas se concluía que ambos sustratos podían coexistir unidos simultáneamente a la scNDI1, pero fueron las estructuras terciarias resueltas por cristalografía las que confirmaron la presencia de un complejo ternario en las dos ND-2 descritas (Figura 10 panel C).

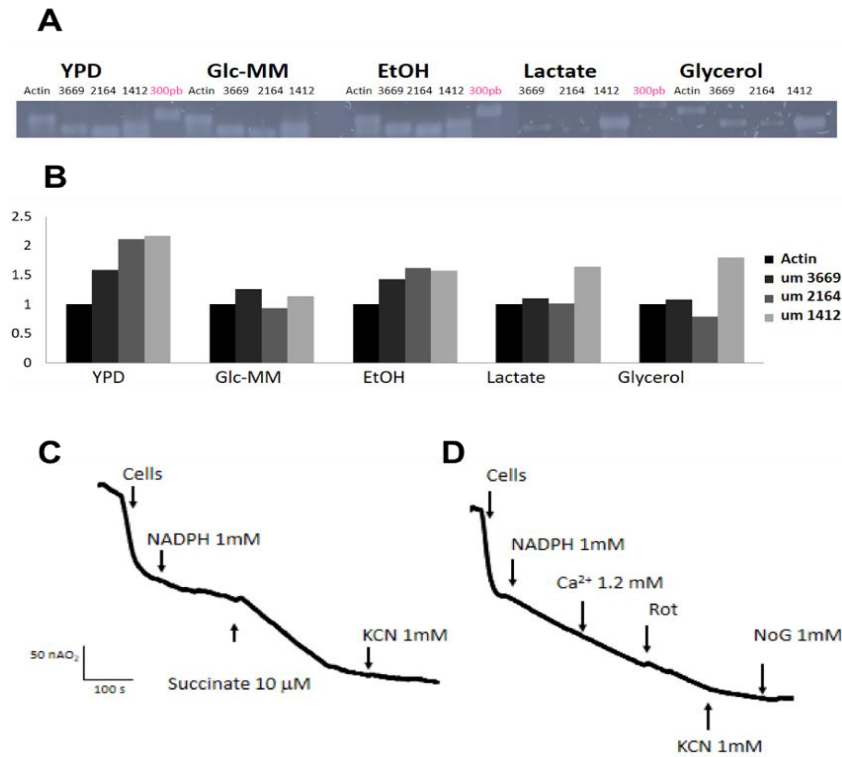


Figura 8. Expresión de las ND-2 de *U. maydis*. En el panel A y B se muestran los resultados del RT-PCR de las tres secuencias predichas en el genoma de este basidiomiceto que son expresadas en diferentes condiciones de cultivo. Como gen constitutivo de referencia se tomó a la actina. En el panel C se muestra un trazo respiratorio representativo en el que se observa el consumo de oxígeno cuando las células permeabilizadas son alimentadas con NADPH y posteriormente con succinato. En el panel D se observa el efecto del calcio sobre la respiración cuando las células son alimentadas con NADPH.

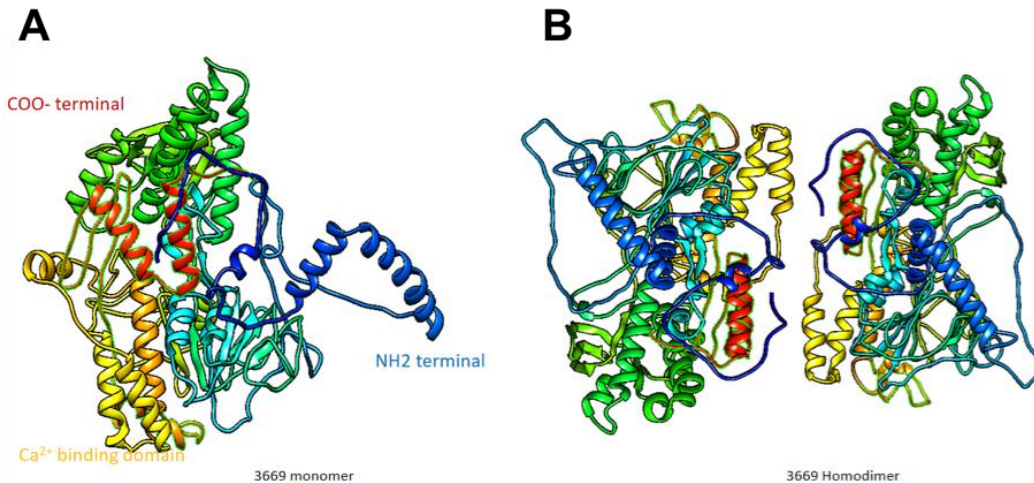


Figura 9. Predicción basada en homología de la secuencia 3669 de *U. maydis*. En el panel A se muestra la representación del monómero, señalando en diferentes colores los dominios más relevantes, incluyendo el dominio putativo de unión a calcio. En el panel B se muestra el homodímero inferido en el que se observa que los dominios de unión al calcio quedan ubicados lateralmente en la estructura. Para la elaboración de este modelo se tomó como molde a la estructura de la scNDII, la validación de los modelos se realizó utilizando herramientas del portal PROCHECK.

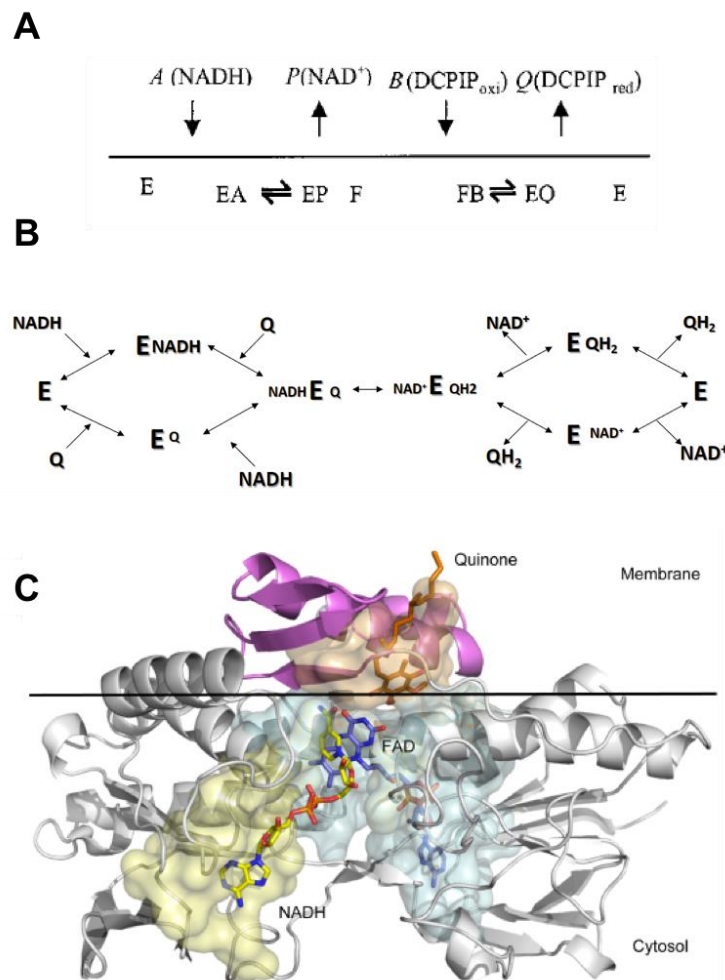


Figura 10. Los modelos cinéticos para las ND-2. En el panel A se muestra el modelo de Ping-Pong, en el que se plantea la entrada del NADH como primer sustrato. Al ser oxidado y reducir el anillo de isoaloxacina se disocia de la enzima, que recibe al DCPIP oxidado y éste se disocia de la enzima al ser reducido. En el panel B se muestra el modelo de azar que implica la formación de un complejo ternario en el que el orden de entrada y salida de los ligandos no es relevante. En el panel C se muestra la estructura tridimensional de la ND-2 reportada por Heikal en 2014 para *C. tamarum* [17].

Organism	Group	E_m°	K_m (μM)	Mm (kDa)	Flavin	OBS
<i>E. coli</i>	A	ND ^d	50	45	FAD	IB
<i>A. vinelandii</i>	A	ND	13	ND	FAD	IB
<i>Synechocystis</i>	A	ND	ND	49 ^e	FAD	IB
<i>A. ambivalens</i>	C	+70	6	47	FMN	IA
<i>S. metallicus</i>	C	+160	2	49	FMN	ND
<i>T. brucei</i>	A	ND	120	2 × 33	FMN	IC
<i>Y. lipolytica</i>	A	ND	15	66 ^e	FAD	IB
<i>S. cerevisiae</i>						
NDI1	A	-370	31, 9 ^a	53	FAD	IA
NDE1	A	ND	ND	62 ^e	FAD	IB
NDE2	A	ND	ND	65 ^e	FAD	IB
<i>N. crassa</i>						
NDI1	A	ND	ND	57	FAD	IB
NDE1	B	ND	11 ^b	64	FAD	IB
NDE2	A	ND	12	65 ^e	FAD	IB
<i>S. tuberosum</i>						
NDA	A	ND	14 ^b	55 ^e	FAD	IA
NDin	ND	ND	14 ^b	ND	FAD	ND
NDB	B	ND	ND	65	FAD	IC
NDex	ND	ND	ND	ND	FAD	ND

Tabla 2. Valores de masa molecular (Mm), Km y potencial redox (E_m) reportados hasta el año 2004. Tomado de [5].

Las ND-2 como blanco farmacológico

El estudio de las ND-2 también es importante desde el punto de vista farmacológico por su posible uso como blanco en parásitos de animales y plantas, que muestran resistencia a antibióticos tradicionales [30-32]. Aunque inicialmente la estrategia consistía en desarrollar estructuras derivadas de las quinonas como la quinolonas y las fenotiazinas [33-35], que inhibieran a concentraciones nanomolares, se han probado decenas de compuestos que no están vinculados estructuralmente con las coenzimas Q pero sí producen una inhibición del tipo no competitiva sobre las enzimas purificadas. Ejemplos de estos compuestos son la polimixina y la gramicidina, [36-38]. El desarrollo de fármacos que inhiban a

las ND-2 es por demás una carrera que se está desarrollando de manera acelerada, pues estas proteínas son un blanco farmacológico ideal por estar ausentes en los mamíferos, pero ampliamente distribuidas en organismos patógenos como micobacterias, estafilococos, plasmodios, apicomplejos, tripanosomátidos, criptosporidios, candidas, entre otros, en donde estas enzimas se han descrito como relevantes o esenciales para al menos una etapa del ciclo vital del patógeno. En la lucha contra enfermedades tropicales desatendidas, como malaria, tripanosomiasis, chagas y enfermedades causadas por helmintos, el desarrollo y uso de fármacos que inhiban a las ND-2 de los patógenos puede generar un buen panorama en el campo de la salud [30,31,39].

Las ND2 también se han propuesto como posibles herramientas de la terapia génica para

rescatar a células que presentan anomalías en el funcionamiento del complejo I respiratorio.

Además, la presencia de estos elementos alternos está vinculada con la longevidad celular, la disminución de la formación de radicales libres de oxígeno, la conducción del ciclo celular hacia la apoptosis [11,38,40-42], entre muchas otras. Por lo cual, su campo y desarrollo de estudio resulta de gran importancia.

Agradecimientos

Este trabajo fue sustentado por una Beca Posdoctoral de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (proyectos PAPIIT IN209614 y 238497) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y por el CONACyT (proyectos 254904 y 238497).

Referencias

1. de Vries, S., and Grivell, L. A. (1988). *European journal of biochemistry* **176**, 377-384
2. Rasmusson, A. G., Geisler, D. A., and Moller, I. M. (2008). *Mitochondrion* **8**, 47-60
3. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., and Wood, P. M. (2001). *Biochimica et biophysica acta* **1504**, 179-195
4. Kerscher, S. J. (2000). *Biochimica et biophysica acta* **1459**, 274-283
5. Melo, A. M., Bandejas, T. M., and Teixeira, M. (2004). *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**, 603-616
6. Iwata, M., Lee, Y., Yamashita, T., Yagi, T., Iwata, S., Cameron, A. D., and Maher, M. J. (2012). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 15247-15252
7. Feng, Y., Li, W., Li, J., Wang, J., Ge, J., Xu, D., Liu, Y., Wu, K., Zeng, Q., Wu, J. W., Tian, C., Zhou, B., and Yang, M. (2012). *Nature* **491**, 478-482
8. Lesk, A. M. (1995). NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current opinion in structural biology* **5**, 775-783
9. Schmid, R., and Gerloff, D. L. (2004). *FEBS letters* **578**, 163-168
10. Velazquez, I., and Pardo, J. P. (2001). *Archives of biochemistry and biophysics* **389**, 7-14
11. Rustin, P., and Jacobs, H. T. (2009). *Physiologia plantarum* **137**, 362-370
12. Tarrío, N., Becerra, M., Cerdan, M. E., and Gonzalez Siso, M. I. (2006). *FEMS yeast research* **6**, 371-380
13. Carneiro, P., Duarte, M., and Videira, A. (2007). *Journal of molecular biology* **368**, 1114-1121
14. Voulgaris, I., O'Donnell, A., Harvey, L. M., and McNeil, B. (2012). *Scientific reports* **2**, 322
15. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (2002). *Yeast* **19**, 813-824
16. Tarrío, N., Cerdan, M. E., and Gonzalez Siso, M. I. (2006). *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 1476-1484
17. Heikal, A., Nakatani, Y., Dunn, E., Weimar, M. R., Day, C. L., Baker, E. N., Lott, J. S., Sazanov, L. A., and Cook, G. M. (2014). *Molecular microbiology* **91**, 950-964
18. Luttkik, M. A., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (1998). *The Journal of biological chemistry* **273**, 24529-24534
19. Small, W. C., and McAlister-Henn, L. (1998). *Journal of bacteriology* **180**, 4051-4055
20. Matus-Ortega, M. G., Cardenas-Monroy, C. A., Flores-Herrera, O., Mendoza-Hernandez, G., Miranda, M., Gonzalez-Pedrajo, B., Vazquez-Meza, H., and Pardo, J. P. (2015). *Yeast* **32**, 629-641
21. Guerrero-Castillo, S., Vazquez-Acevedo, M., Gonzalez-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2009). *Biochimica et biophysica acta* **1787**, 75-85
22. Cui, T. Z., Conte, A., Fox, J. L., Zara, V., and Winge, D. R. (2014). *The Journal of biological chemistry* **289**, 6133-6141
23. Marreiros, B. C., Sena, F. V., Sousa, F. M., Batista, A. P., and Pereira, M. M. (2016). *Environmental microbiology* **18**, 4697-4709
24. Matus-Ortega, M. G., Salmeron-Santiago, K. G., Flores-Herrera, O., Guerra-Sanchez, G., Martinez, F., Rendon, J. L., and Pardo, J. P. (2011). *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* **6**, 256-263
25. Marres, C. A., de Vries, S., and Grivell, L. A. (1991). *European journal of biochemistry* **195**, 857-862
26. Yamashita, T., Nakamaru-Ogiso, E., Miyoshi, H., Matsuno-Yagi, A., and Yagi, T. (2007). *The Journal of biological chemistry* **282**, 6012-6020
27. Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Averet, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., Larsson, C., Pahlman, I. L., Manon, S., and Gustafsson, L. (2004). *Molecular and cellular biochemistry* **256-257**, 73-81
28. Bunoust, O., Devin, A., Averet, N., Camougrand, N., and Rigoulet, M. (2005). *The Journal of biological chemistry* **280**, 3407-3413
29. Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Felix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Pena, A., and Uribe-Carvajal, S. (2014). *Biochimica et biophysica acta* **1837**, 73-84