



030627
2eje

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

***Aislamiento y Caracterización del complejo bc₁
mitocondrial del alga incolora Polytomella spp.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

BIOL. EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

Dedicatoria:

A mis padres,
Dr. Alfonso Gutiérrez Cirlos,
Mtra. Rosa Ma. Madrid Hernández,
por su apoyo, amor y por la educación hacia el estudio.
por enseñarme a ser constante en mis metas.

A mi hermano, el Dr. Carlos Alfonso Gutiérrez Cirlos
Madrid, por ser el único y por que tu entusiasmo hacia mis
logros ha sido un gran regalo para mí,

A mis abuelitos, en recuerdo a su memoria y en
agradecimiento a su ejemplo.

A todos mis tíos y primos, en especial a Daniel y Ricardo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio y del Instituto.

Agradecimientos:

A los señores sinodales:

Dra. Marietta Tuena Sangri,
Dr. Diego González Halphen,
Dr. Edgardo Escamilla Marván,
Dr. Roberto Coria Ortega,
Dr. Wilhelm Hasnberg,

por su revisión paciente del manuscrito y su ayuda para mejorarlo.

Al Dr. Diego González Halphen, por que después de 6 años sigo aprendiendo muchas cosas, por su apoyo y estímulo.

A mis tutores, Dra. Marietta Tuena y Dr. Jesús Aguirre Linares, por su ayuda durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Carlos Gómez Lojero, por ayudarme con los espectros del complejo.

Al Dr. Roberto Coria por su asesoría en este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Miriam, Anaíd, Rita, Adrián . . . Por su amistad y los buenos ratos en el lab. Por su ayuda.

A todos mis amigos del Instituto: Bertha, Tere, Edgar, Marcela, Eugenia, Ernie, Irma, Celis, Gerardo, Alejandro, Silvia, Isabel, Oscar, José, Roberto, Jorge, Laura, Alma, Verónica, Lourdes, Simón, Rosalinda, Maura, Olivia, etc., etc. por que ha sido muy divertido convivir con todos.

A Gaby y Graciela.

A los Florentinos.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Diego González Halphen en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

Durante la realización de esta tesis, recibí el apoyo de una beca de la Dirección de Asuntos del Personal Académico y un complemento de beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro: 83964.

El proyecto de investigación en el cual se inserta el presente trabajo de tesis fue apoyado con el donativo 1371-N9206 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradezco la ayuda técnica de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo en la realización del presente trabajo.

Índice:

Lista de Abreviaturas	I-II
Resumen	III
Introducción:	
- El complejo de citocromos bc_1 :	1
- El género <i>Polytomella</i> :	10
Objetivos:	13
Materiales y Métodos:	14
Resultados:	36
Discusión:	48
Conclusiones:	59
Bibliografía:	60
Apéndice:	68

Abreviaturas utilizadas: (las siglas provienen del inglés)

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (sal de p-toluidina); sustrato histoquímico de la fosfatasa alcalina.

CAPS: ácido 3-[Cicloheximilamino]-1-propano-sulfónico; amortiguador de pKa 10.4 a 25 °C (amortigua entre un pH de 9.5 a 11).

DBH: decilubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona); análogo de quinona.

DCPIP: diclorofenol indofenol; colorante que cambia de color al reducirse.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dNTP: deoxinucleótidos de trifosfato.

DEAE Biogel A: resina de intercambio aniónico con un grupo dietilaminoetil (carga positiva).

DTT: ditioneitol; reductor de grupos -SH (reduce disulfuros).

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético ó ácido [etilenodinitrilo] tetraacético.

EGPA-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

EPR: resonancia paramagnética del electrón.

kDa: kilodaltones.

kb: kilobases.

LM: lauril maltósido (detergente no iónico)

NBT: nitroazul de tetrazolio ó 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-dienil-3,3'-[3,3'-dimetoxi-4,4'-difenileno]-cloruro de ditetrazolio; sustrato que da color al oxidante.

PMSF: fenilmetanosulfonyl fluoruro, inhibidor de proteasas.

pb: pares de bases.

RNA: ácido ribonucleico.

SDS: detergente dodecil sulfato de sodio.

TBE: amortiguador compuesto de Tris-Borato-EDTA.

TBS: amortiguador compuesto de 20 mM Tris HCl, pH 7.5 y 0.5 M de NaCl.

TEMED: N, N, N,N'-tetrametil etilendiamina.

TLCK: Na-p-tosil-L-lisina-cloro-metilcetona ó 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2heptanona.

TBBS: amortiguador con 20 mM Tris.HCl, pH 7.5; 0.5 M NaCl y 0.05% de Tween-20

TE: amortiguador compuesto de 0.01M Tris-HCl, pH 7.5; 0.01M de EDTA (sal trisódica).

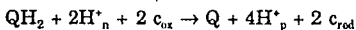
Resumen:

El complejo de citocromos bc₁ (ubiquinol-citocromo oxidorreductasa, EC 1.10.2.2) es una proteína oligomérica que tiene tres componentes oxidorreductores: un citocromo b hémico, un citocromo tipo c₁ y un centro hierro-azufre. Este complejo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en organismos procariontes como eucariontes. De particular interés para nuestro trabajo es el hecho de que hasta la fecha no ha sido posible aislar el complejo bc₁ del alga unicelular *Chlamydomonas*, género que ofrece grandes ventajas para estudios genéticos y de crecimiento. Debido a esto, hemos buscado un organismo perteneciente a la misma familia pero que naturalmente carece de cloroplastos y de pared celular. El género *Polytomella* pertenece al grupo de fitoflagelados cuya fuente principal de carbono es el acetato. Hemos purificado al complejo bc₁ de *Polytomella spp*, por medio de la solubilización de las mitocondrias con el detergente no iónico lauril maltósido y por cromatografía de intercambio iónico. El complejo presenta diez subunidades que se resuelven en un gel de poliacrilamida-SDS. Además, presenta un recambio de 300 s⁻¹, cercano al valor que se obtiene para el complejo bc₁ de corazón de bovino, esta actividad es sensible a antimicina y mixotiazol. La masa molecular del complejo de *Polytomella spp* fue de 256.3 kDa, obtenida por filtración en gel, este valor indica que el complejo se comporta como un monómero. Para conocer la secuencia de la región de unión del hemo al citocromo tipo c₁, se utilizó la técnica de amplificación de un fragmento del gene de esta proteína por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este fin se diseñaron dos desoxiligonucleótidos: uno de ellos con la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia directa del citocromo c₁ de *Polytomella spp*. El segundo desoxiligonucleótido se diseñó con una región altamente conservada de estos citocromos. El fragmento amplificado del gene del citocromo c₁ de *Polytomella spp* mostró una secuencia tipo CXXCH, denominada consenso y semejante a la que tienen organismos como el bovino y la levadura. *Polytomella spp* difiere de los organismos pertenecientes al grupo de los Euglenoides y los Kinetoplastidos, los cuales tienen una región de unión al hemo con una sola unión covalente a la proteína.

Introducción:

El complejo de citocromos bc₁:

El complejo de citocromos bc₁ se encuentra en el sitio II de la cadena de transporte de electrones (ver *figura 1*). En este sitio la transferencia de electrones, desde una molécula de quinona (de bajo potencial oxidorreductor) hasta un citocromo tipo c, ocurre con un desprendimiento de energía de 9.9 kcal, energía libre suficiente para llevar a cabo síntesis de ATP. Acoplado a este fenómeno se depositan cuatro protones en el lado electropositivo de la membrana cada vez que un par de electrones reduce a un citocromo c. El gradiente de protones es aprovechado por la ATP sintasa. La ecuación general que describe la acción de este complejo es la siguiente:



Donde n y p definen al lado negativo y positivo de la membrana y ox y red al citocromo c oxidado y reducido

Este complejo posee dos actividades: la de transferir electrones por medio de grupos oxidorreductores que se encuentran asociados a algunas de sus subunidades y la de crear una fuerza protónmotriz que se utiliza para generar ATP.

El complejo bc₁ se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha aislado de bacterias gram positivas y negativas y de aquellas que utilizan oxígeno, azufre o nitrógeno como aceptores finales de electrones. Así mismo, se ha aislado de bacterias fotosintéticas oxigénicas y anoxigénicas y de eucariotes, tanto fotosintéticos como heterótrofos unicelulares y pluricelulares (para una revisión ver Trumpower, 1990).

El complejo bacteriano está ubicado hacia el lado periplásmico (electropositivo) de la membrana y los protones se translocan hacia el espacio extracitoplásmico. En el caso del complejo mitocondrial, los protones se acumulan en el espacio intermembranal, como se muestra en la *figura 2*, y para los cloroplastos en el espacio tilacoidal.

Una característica interesante del complejo bc₁ es la variabilidad en el número de subunidades que se presentan a lo largo de la escala filogenética. El complejo más sencillo consta de tres subunidades y pertenece a la bacteria denitrificante *Paracoccus denitrificans* (Yang y Trumpower, 1986) el otro extremo lo ocupa el complejo bc₁ mitocondrial de corazón de bovino que contiene 11 subunidades (Shägger y col., 1986).

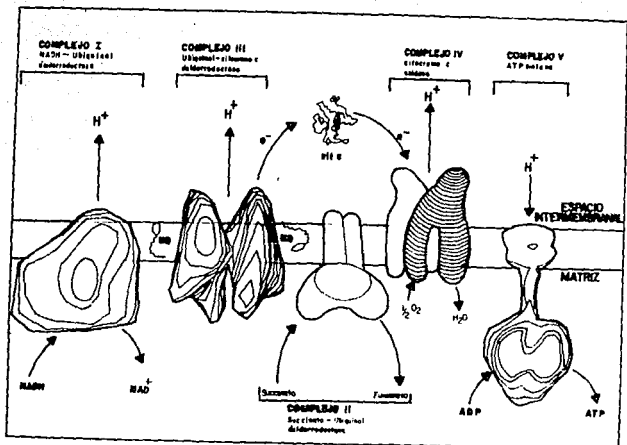


Figura 1: Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial que muestra los cinco complejos oligoméricos que contienen grupos oxidoreductores, así como la secuencia de transferencia de electrones entre ellos. Se incluye también a las moléculas móviles como el citocromo c soluble que se encuentra en el espacio intermembranal y la molécula de quinona, dentro de la membrana interna. Tomado de González-Halphen, 1990.

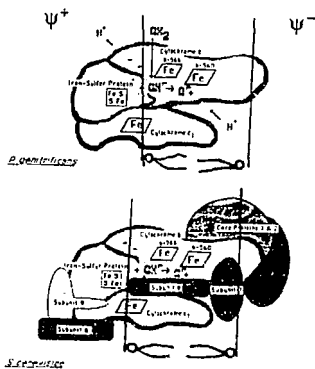


Figura 2: Los complejos bc₁ en bacterias y en eucariontes. Se presenta el bc₁ de *Paracoccus denitrificans* y de *Saccharomyces cerevisiae*. El esquema muestra la orientación de cada uno de ellos en relación a la membrana que los contiene, así como la situación de las subunidades más importantes en cada caso. Tomado de Trumpower (1990).

En la *tabla I* se muestra el contenido de subunidades, así como la actividad expresada en número de recambio, de los complejos aislados de diferentes organismos.

Tabla I: Contenido de subunidades y la actividad (en número de recambio) de los complejos bc₁ aislados de diferentes organismos.

Organismo	No. de subunidades	Recambio (s ⁻¹)*	Referencia
<i>Paracoccus denitrificans</i>	3	500/700	Yang, 1986
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	4	64/70	Ljungdahl y col., 1987
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	4	128/180	Ljungdahl y col., 1987
<i>Spinachea olacea</i> †	4	20-35	Black y col., 1987
<i>Solanum tuberosum</i>	10	220	Berry y col., 1991
<i>Neurospora crassa</i>	9	20	Teintze, 1982
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	220/305	Ljungdahl y col., 1987
<i>Bos primigenius taurus</i>	11	350/1312	Kubota, 1992 Ljungdahl y col., 1987.

* En algunos casos se incluyen dos datos: el número expresado antes de la diagonal, representa el número de recambio obtenido sin el uso del detergente lauril maltósido y el que se encuentra después de la diagonal es el número de recambio obtenido solubilizando las membranas con lauril maltósido.

† En este caso, se incluye el complejo b₆f de cloroplasto.

Para el caso de *Paracoccus denitrificans*, las tres subunidades que conforman al bc₁ son aquellas que contienen a los grupos oxidorreductores: un citocromo b bihémico, un citocromo tipo c₁ y un centro 2Fe-2S, los cuales se describirán a continuación. Sólomente se conoce la función de algunas de las subunidades supernumerarias.

Subunidades que contienen grupos oxidorreductores:

Citocromo b:

Es una proteína con aproximadamente 400 aminoácidos (Saraste, 1984; Widger y col., 1984), la mayoría de carácter hidrofóbico (Weiss y col., 1986) que se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial o en su equivalente en las bacterias (ver la figura 2) y el cloroplasto. En los organismos que contienen un complejo tipo bc₁, el peso molecular varía desde 38 a 43.7 kDa (Ljungdahl y col., 1987; Weiss y Leonard, 1987; González-Halphen, 1990). Cabe destacar que, en el caso de los organismos con cloroplastos, el citocromo b₆ está dividido en dos subunidades (codificadas por dos genes), por lo que su masa molecular es de 23 kDa.

De acuerdo con los perfiles de hidropatía, Cramer y col. (1987) propusieron la existencia de 9 hélices α , 8 de las cuales poseen una longitud tal que les permite cruzar la membrana formando el corazón hidrofóbico del complejo. Este citocromo b posee como grupos oxidorreductores dos hemo unidos por enlaces de coordinación con cuatro histidinas muy conservadas en las hélices B y D, en el citocromo bf, que corresponden a las hélices 2 y 5 en el citocromo b (ver la figura 3a). Los hemo pueden distinguirse espectrofotométricamente si se utilizan sustratos que reducen preferencialmente a uno de los hemo del citocromo b ó del c₁. De este modo, se puede distinguir al hemo b_{MSO}, de alto potencial redox, del hemo b_{MSB} de bajo potencial. El primero de los hemo se piensa que se encuentra unido a las histidinas 96 y 197 y el segundo a la histidinas 82 y 183 del citocromo b de *Sacharomyces cerevisiae*, como se muestra en la figura 3a (para una revisión ver Trumppower, 1990). Más adelante, se explicará el papel de cada hemo en la actividad del transporte de electrones que realiza el complejo bc₁.

Citocromo c₁:

Esta subunidad posee un pequeño segmento hidrofóbico en la región carboxilo terminal, mientras que el resto de la proteína es hidrofílico. Su masa molecular es variable, ya que en *Paracoccus denitrificans* es de 62 kDa y en bovino de 27 kDa. Consta aproximadamente de 240 residuos de aminoácidos. El hemo de este citocromo está unido covalentemente a la proteína a través de dos cisteínas (ver figura 3b). Se ha propuesto la siguiente secuencia consenso para la unión de este grupo hemo:

C X X C H

Esta secuencia está muy conservada a lo largo de la escala filogenética (Petigrew, 1979; Mukai y col., 1989). Un grupo de protozoarios, entre los que se encuentra *Euglena gracilis*, *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani* y *Bodo caudatus*, no comparten esta característica. La unión al grupo hemo en estos organismos se realiza a través de un

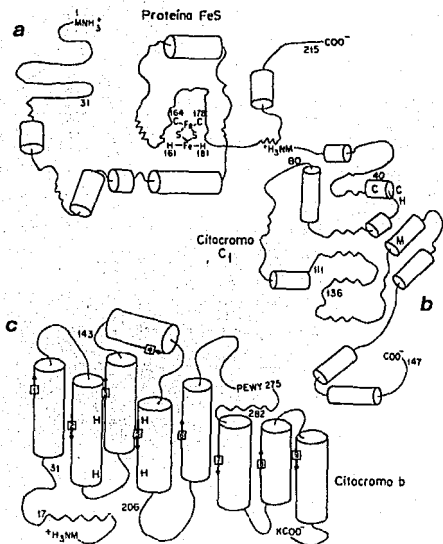


Figura 3: Esquema que muestra la estructura secundaria de las subunidades que poseen grupos oxidorreductores en el complejo bc_1 de *Saccharomyces cerevisiae*. En cada caso se señalan los aminoácidos involucrados en la unión con el grupo oxidorreductor. a.- citocromo b, las cuatro histidinas que unen a los grupos hemo se muestran en un cuadro negro; b.- citocromo c_1 , los aminoácidos involucrados en la unión del hemo están encerrados en un cuadrado; c.- proteína hierro-azufre, el centro $2Fe-2S$ se muestra unido a la proteína. Tomado de Trumpower, 1990.

solo enlace covalente a un aminoácido cisteína (Mukai y col., 1989; Priest y Hajduk, 1992). Esta unión puede evidenciarse por un corrimiento hacia el rojo de 5 a 8 nm en el espectro de absorción del citocromo c_1 (Priest y Hajduk, 1992). Otra manera de saber que el grupo hemo está unido sólo por un enlace covalente consiste en saturar todos los grupos vinilo con hidrato de hidracina y extraer el hemo con ácido; el espectro de la hemina obtenida cuando existe una sola unión a proteína es diferente del que tiene dos uniones (Petigrew y col., 1975).

El citocromo c soluble, situado en el espacio intermembranal, también tiene una sola unión covalente en estos organismos (Petigrew y col., 1975; para una revisión ver Petigrew, 1979). Existe un corrimiento hacia el rojo en el espectro de absorción y la secuencia de unión al grupo hemo es similar como se muestra en la *tabla II*:

En la *tabla II* puede apreciarse que existe una prolina conservada en todas las secuencias de protozoarios (*) y que en las secuencias de otros organismos corresponde a serina, treonina ó alanina. La presencia de esta prolina puede establecer un cambio estructural en la cadena de aminoácidos para la unión del grupo hemo (Priest y Hajduk, 1992).

Tabla II: Secuencia de la región de unión al grupo hemo del citocromo tipo c_1 de diferentes organismos. Comparación entre secuencias con una y dos cisteínas.

ORGANISMO	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Crithidia fasciculata</i> *	EVFAPCHSLGR	Priest y Hajduk, 1992
<i>Leishmania tarentolae</i> *	EVFAPCHSLGR	Priest y Hajduk, 1992
<i>Trypanosoma brucei</i> *	EVFAPCHPLGR	Priest y Hajduk, 1992
<i>Bodo caudatus</i> *	EVFAPCHPLGK	Priest y Hajduk, 1992
<i>Euglena gracilis</i> *	QVFAPCHSLSF	Mukai y col., 1989
<i>Neurospora crassa</i>	EVCASCHSLSR	Romisch y col., 1987
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EVCAACHSLDR	Sadler y col., 1984
<i>Bos primigenius taurus</i>	QVCSSCHSMDY	Wakabayashi, 1982
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	EVCSTCHGMK	Gabellini y Sebald, 1986
<i>Paracoccus denitrificans</i>	EVCSACHGMR	Kurowski y Ludwig, 1987

(*) protozoarios (reino Protocista, Margulis y col, 1990).

Secuencias del citocromo c soluble

ORGANISMO	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Rhodospirillum rubrum</i> *	QCKICHQV	Ambler y col., 1976.
<i>Tetrahymena pyriformis</i> *	QCSACHAI	Tarr y Fitch, 1976.
<i>Crithidia fasciculata</i> *	RAAQCHTA	Hill y Petigrew, 1975.
<i>Crithidia oncopelti</i> *	RAAQCHTG	Petigrew y col., 1975.
<i>Euglena gracilis</i> *	RAAQCHSA	Petigrew, 1973.
<i>Neurospora crassa</i>	RCAQCHTL	Lederer y Simon, 1974.
<i>Triticum sativum</i>	KCAQCHTV	Stevens y col., 1967.
<i>Equus caballus</i>	KCAQCHTV	Margoliash y col., 1961.

(*) protozoarios (reino Protoctista, Margulis y col., 1990).

Proteína fierro-azufre:

También conocida como proteína de Rieske debido a su descubridor, J.S. Rieske, quien en 1964 descubrió esta subunidad por su espectro de resonancia paramagnética del electrón (EPR) encontrando un valor de $g = 1.9$. Esta subunidad posee la particularidad de disociarse fácilmente del resto del complejo en una gran variedad de condiciones, por ejemplo, utilizando 3M de clorhidrato de guanidina, sales biliares o sales de amonio (Rieske, 1979). Es posible aislar esta subunidad y reconstituir la actividad de un complejo b_c sin proteína fierro-azufre (Engel y col., 1983).

Esta subunidad contiene dos segmentos hidrofóbicos, uno cerca del amino terminal y el otro cerca de las cisteínas e histidinas que unen al centro 2Fe-2S (ver figura 3c). Cuando se lleva a cabo una proteólisis limitada con tripsina, se obtiene un fragmento denominado V' (González-Halphen y col., 1988), el cual a pesar de contener el centro 2Fe-2S, no reconstituye la actividad del complejo. Sin embargo, si se utiliza un péptido sintético de 20 aminoácidos con la secuencia entre Lys³³ y Lys⁶² de la proteína, éste compete con la subunidad V (proteína fierro-azufre del complejo mitocondrial) en experimentos de reconstitución (González-Halphen y col., 1991). Lo anterior sugiere que la proteína se une al complejo por medio de interacciones proteína-proteína con el citocromo b y que el segmento de 20 aa es en gran medida responsable de esta unión.

Subunidades que carecen de grupos oxidorreductores:

En la naturaleza existen organismos que contienen sólo las tres subunidades con grupos oxidorreductores del complejo bc₁. Sin embargo, a lo largo de la escala filogenética, los organismos han adquirido más subunidades, denominadas supernumerarias cuya función se ignora en muchos casos. En la siguiente tabla, se muestra una comparación del número de subunidades en diferentes organismos. Los nombres de las subunidades son asignados al complejo bc₁ de corazón de bovino, cuyo modelo topológico se muestra en la figura 4. En algunos casos se ha supuesto, basándose en la homología de sus secuencias, que las subunidades poseen una función, análoga a la de las subunidades del complejo bc₁ de corazón de bovino.

En los organismos eucariotes existen dos subunidades de alta masa molecular, denominadas "core" o estructurales (ver tabla III). Ambas tienen un carácter preponderantemente hidrofílico y se orientan hacia la matriz mitocondrial. En el modelo del complejo aislado de *Neurospora crassa*, estas subunidades constituyen la mayor parte del complejo y si se eliminan del mismo, es necesario agregarlas en forma de dímeros para reconstituir la actividad (Linke y Weiss, 1986). Los complejos tipo bf de cloroplastos, que carecen de ambas subunidades, así como todas las células procariotas (Weiss y Leonard, 1987).

Existen complejos bc₁ que contienen tres subunidades "core" o estructurales, como por ejemplo, en el protozooario *Crithidia fasciculata*, en donde la secuencia de aminoácidos de la subunidad I y III es muy semejante, sugiriendo que sean isoformas. Este organismo posee un citocromo c₁ atípico, con una sola unión al grupo hemo (Priest y Hajduk, 1992). En las mitocondrias de los tubérculos de papa, el complejo también tiene tres subunidades estructurales evidenciables en geles de Laemmli (1970), aunque contiene un hemo c₁ típico (Berry y col., 1991).

Las subunidades estructurales intervienen en la biogénesis del complejo, ya que en *S. cerevisiae*, al eliminar el gen de la subunidad I, el hemo no se inserta en el apocitocromo b y el complejo no madura (Tzagoloff y col., 1986). Cuando se elimina el gen de la subunidad II, la proporción del complejo bc₁ ensamblado es muy baja. La secuencia de aminoácidos de la subunidad II de *Neurospora crassa* es idéntica al de un activador de una proteasa que se encarga de procesar a las proteínas durante su biogénesis en la mitocondria (Schulte y col., 1989). Esta característica ha hecho que hayan sido asignadas a una familia denominada "proteínas procesadoras mitocondriales". Recientemente, también la subunidad I del complejo bc₁ de corazón de bovino, se ha integrado a esta familia (Gencic y col., 1991).

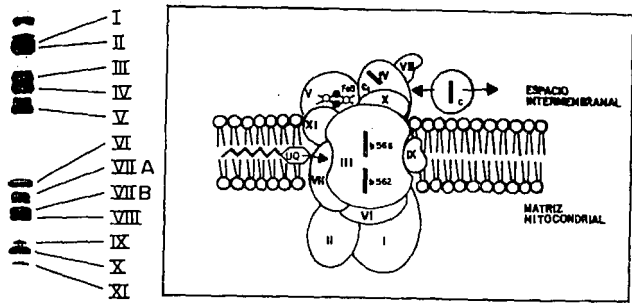


Figura 4: Esquema que muestra la topología de las diferentes subunidades que componen al complejo bc₁ de mitocondrias aisladas de corazón de bovino. Las subunidades supernumerarias de las cuales se conoce su función tienen un nombre especial, el cual se especifica en la tabla III. En este esquema se incluye al citocromo c soluble y a la molécula de quinona para mostrar la relación que existe entre estas moléculas y el complejo bc₁. Tomado de González-Halphen, 1990.

Tabla III: Composición polipeptídica del complejo de citocromos aislado de diferentes organismos equiparando las subunidades de los diferentes organismos con las del complejo de corazón de bovino.

SUBUNIDAD	Bacterias			Cloroplastos	Mitochondrias		
	<i>P. denitrificans</i>	<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rb. capsulatus</i>	<i>Spinococcus oloaceus</i> *	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Bos taurus primigenius</i>
I (core)					50	50	50
II (core)					45	46	46
III (alt b) (b_6)	30	42.8	42.1	33	42	42	42.6
IV (alt c_1) (c_1)	62	32.7	31.3	33	42	29	27.3
V FeS	20	20	22.5	20	25	22	21.4
VI		13	19.8	17	14.5	14	13.4
VII (una Q)				5	14.4	12	9.5
VIII (unión)					12.3	11	9.2
IX (una DCCD)					7.3	8	7.9
X					8.5		7.2
XI							6.4

Los datos para *Rhodobacter capsulatus* y *Rb. sphaeroides* fueron tomados de Ljungdahl y col., 1987; para *Neurospora crassa* y espinaca, de Weiss y Leonard, 1987; (*) para espinaca, los datos son del complejo b_6f de cloroplastos. Para *Paracoccus denitrificans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus primigenius*, de González-Halphen, 1990. La masa molecular reportada se obtuvo en todos los casos en gels de poliacrilamida-SDS. La décima subunidad de *S. cerevisiae* fue encontrada recientemente por un nuevo método de purificación (Geier y col., 1992).

Además de las subunidades "estructurales" en la *tabla III*, se muestran otras subunidades de baja masa molecular, de las cuales en algunos casos sí se conoce su función. Tal es el caso de la subunidad VII de corazón de bovino, la cuál es capaz de unir a la molécula de quinona y por tanto puede estar involucrada en el transporte de electrones (Yu y col., 1990).

La subunidad VIII de corazón de bovino tiene la particularidad de carecer de los aminoácidos tirosina y triptofano, por lo que su absorbencia a 280 nm es pobre. Denominada proteína de unión, si piensa que favorece la unión del citocromo c del espacio intermembranal con el citocromo c_1 del complejo, causando un cambio conformacional en este último (Kim y King, 1983; Kim y col., 1989). La subunidad VI del complejo de *S. cerevisiae* tiene la misma función que la subunidad VIII, favoreciendo la unión del citocromo c al dímero del complejo. Sin embargo, su secuencia no es igual a la de bovino (para una revisión, ver Trumppower, 1990).

Cuando se elimina el gen de la subunidad VI de esta levadura, la actividad del complejo disminuye al 50% del normal. Se ha sugerido que esta subunidad regula la interacción monómero-monómero en el complejo (Schmitt y Trumpower, 1990).

La subunidad IX aislada del complejo de corazón de bovino, es capaz de unir DCCD. Tiene una secuencia de 78 aminoácidos que forman una α -hélice hidrofóbica, la cual es idéntica a la presecuencia de la proteína hierro-azufre, necesaria para que ésta última sea importada a la mitocondria (Brandt, 1993). Aparentemente, esta "presecuencia" permanece en el complejo como una subunidad (la IX) después de ser procesada post-transcripcionalmente (Brandt y col., 1993). Se ha observado que al eliminar el gen QCR9 que codifica para la subunidad IX de *S. cerevisiae*, la proteína hierro-azufre no se inserta en el complejo, a pesar de que se procesa correctamente a su forma madura. El espectro de absorción del citocromo b es semejante al que se obtiene cuando se realiza una mutación que causa la pérdida de la proteína hierro-azufre (Phillips y col., 1993). La subunidad IX es semejante en masa molecular a la subunidad X de corazón de bovino. Existe una onceava subunidad en el complejo aislado de las mitocondrias del corazón de bovino, de humano y de otros mamíferos, a la cual no se le ha asignado función. Se ha observado que esta subunidad se elimina junto con la proteína hierro-azufre, durante el fraccionamiento del complejo bc₁ (Shägger y col., 1986). Recientemente se ha encontrado la décima subunidad del complejo aislado de *S. cerevisiae* por un método nuevo de aislamiento del complejo, (Geier y col., 1992). Sin embargo no se ha determinado su función.

Estructura del complejo bc₁:

La figura 2b muestra la estructura del complejo bc₁ de *S. cerevisiae* y de *P. denitrificans* y la figura 4 la topología de las 11 subunidades del complejo de corazón de bovino. El citocromo b se encuentra embebido en la membrana (mitocondrial ó plasmática) formando el corazón del complejo. La proteína hierro-azufre y el citocromo c₁ se encuentran cerca del espacio intermembranal, en el lado electropositivo de la membrana. Estas tres subunidades constituyen la unidad funcional mínima del complejo. En el caso de los complejos con más de tres subunidades, éstas pueden agruparse por su carácter hidrofóbico ó hidrofílico. Las subunidades estructurales se encuentran hacia el espacio de la matriz mitocondrial, así como la subunidad VI. Las subunidades VII, IX y XI están parcialmente embebidas en la membrana interna mitocondrial y la X y VIII interactuando con los citocromos b y c₁ (González-Halphen y col., 1988).

Mecanismo de acción del complejo bc₁ mitocondrial:

En la *figura 5* se muestra el ciclo Q protón-motriz del complejo bc₁. En la poza de quinonas existe una molécula de ubiquinol -QH₂- (quinona reducida). Esta dona uno de sus electrones al centro hierro-azufre aunado a la liberación de cuatro protones al medio, del lado electropositivo de la membrana, quedando en forma de anión ubisemiquinona. A continuación, el citocromo c₁ es reducido por la proteína hierro-azufre. Un citocromo c, que se encuentra en el espacio intermembranaral recibe el electrón del citocromo c₁. El anión ubisemiquinona reduce con su electrón al hemo b₆₆₆ y éste a su vez al hemo b₆₆₀, ambos del citocromo b del complejo bc₁. El ciclo se cierra cuando una molécula de quinona (completamente oxidada) es reducida por el electrón donado por el citocromo b, generando un anión ubisemiquinona. Para regenerar la molécula de ubiquinol es necesario tomar dos protones del lado electronegativo de la membrana, lo cual hace que el ciclo se repita para que se expulsen 4H⁺ del lado electropositivo de la membrana y se tomen 2H⁺ del lado electronegativo.

El mecanismo de acción del complejo bc₁ se pudo discernir gracias a la existencia de inhibidores selectivos para ciertas partes de la reacción. Von Jagow y col., en 1986, realizaron una clasificación de los mismos de acuerdo a si su acción se localizaba en la región positiva ó negativa de la membrana.

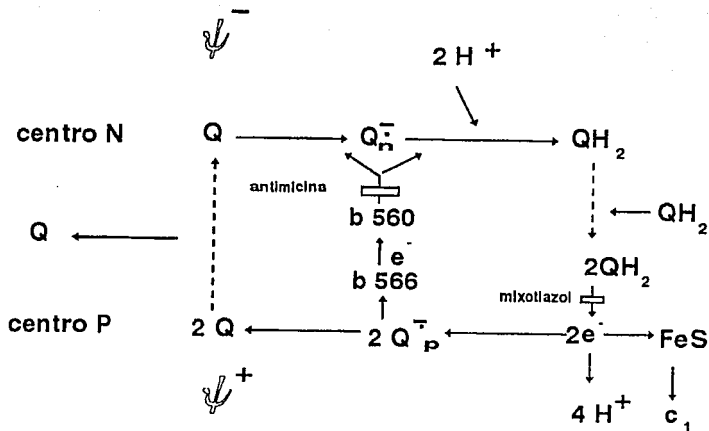


Figura 5: Esquema del flujo de electrones y protones durante la oxidorreducción del complejo bc₁. Las barras que indican el sitio de inhibición de los antibióticos antimicina y mixotiazol. Tomado de Trumpower, 1991.

Q= quinona, Q⁻ = anión semiquinona, QH₂= ubiquinol, n= negativo, p= positivo.

El género *Polytomella*:

Este género, descrito por primera vez por Aragao en 1910, se encuentra dentro del orden Chlamydomonadales (ver la *tabla IV*), el cual agrupa a organismos con dos ó cuatro flagelos, cuya base tiene forma de brazaletes, con o sin pared celular de glucoproteínas. Poseen un solo cloroplasto que contiene un pirenoide en su interior que actúa como centro de formación de almidón y en el cual se ha medido actividad de ribulosa bifosfato carboxilasa. Además poseen una mancha ocular o estigma el cual es una estructura pigmentada y sensible a la luz. La reproducción de estos organismos puede presentar una fase sexual y una asexual; en la primera los organismos pueden reproducirse por isoogamia ó por oogamia. En la segunda, por bipartición.

Tabla IV: Clasificación del género *Polytomella*:

Categoría:	Nombre:
Reino	<i>Protoctista</i>
Phylum	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Chlamydomonadales</i>
Familia	<i>Chlamydomonadaceae</i>
Género	<i>Polytomella</i>

La célula de estos organismos unicelulares mide aproximadamente 17 μm de largo y 11 μm de ancho. Al igual que el género *Chlamydomonas*, los flagelos de *Polytomella* están organizados en un brazaletes, la parte anterior de la célula (Brown y col., 1976a). Además, presentan la particularidad de carecer de cloroplastos y de pared celular, como se muestra en la *figura 6*. La primera característica ha hecho difícil su clasificación, ya que pueden incluirse dentro del grupo de algas incoloras debido a su semejanza en forma con las *Chlamydomonas*, o simplemente como un protozoario flagelado.

Por otra parte, como forma de reserva de energía presentan gránulos de almidón, fácilmente separables por centrifugación isopécnica y teñibles por la técnica de tinción con yodo. Durante el crecimiento de cultivos, se observa que la cantidad de almidón en las células aumenta de forma constante hasta el final de la fase de crecimiento

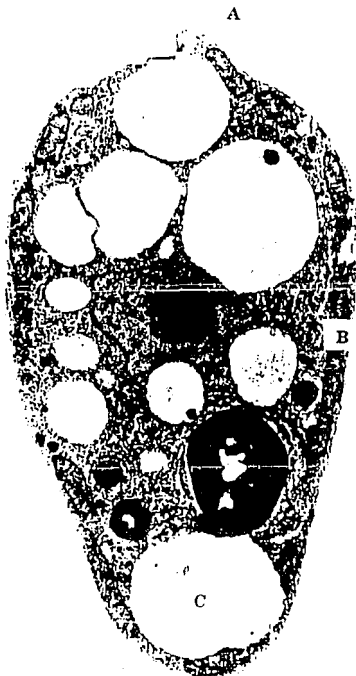


Figura 6: Fotografía de microscopía electrónica de *Polytomella agilis*, mostrando el sitio donde se unen los flagelos, una gran cantidad de gránulos de almidón y mitocondrias de gran tamaño. A: sitio de unión de los flagelos, B: mitocondrias, C: gránulos de almidón. Tomado de Burton y Moore, 1974.

logarítmico (Sheeler y col., 1968).

En 1955, Pringsheim aisló de diferentes localidades, 6 especies de éste género, que difieren en características morfológicas menores (figura 7). En cultivos axénicos, a 25 °C y con pH's cercanos a 7.0, este organismo crece con acetato como única fuente de carbono. También puede utilizar propionato, butirato, valerato, alcohol amílico, alcohol butílico, DL-gliceraldehído y ácido alfa-cetoglutarico (Wise, 1955). Se ha observado que la privación de tiamina (vitamina B₁) y cianocobalamina (vitamina B₁₂), provoca que las células presenten mitocondrias de menor tamaño, de forma ovoide cuyo contenido de citocromos tipo a y b se reduzca en un 80 a 90 % y el de citocromos tipo c en un 40% (Cantor y Burton, 1975).

El ciclo de vida de *Polytomella* presenta dos alternativas de reproducción, una asexual por fisión binaria y otra sexual por isogamia y meiosis (Lewis y col., 1974). La reproducción asexual ocurre durante el crecimiento exponencial en un cultivo axénico. El plano de división de las células es postero-anterior comenzando en la parte contraria a los flagelos como se muestra en la figura 8. Las células hijas poseen dos flagelos durante la división celular y al final de la misma se muestran tetraflageladas.

La reproducción sexual ocurre en la fase exponencial del crecimiento del cultivo, cuando la población es más densa. Los gametos (en este caso, isogametos, pues son indistinguibles morfológicamente) hacen contacto y enrollan sus flagelos como se muestra en la figura 8 y se fusionan por la parte anterior. El cigoto resultante tiene sólo cuatro flagelos. Esta etapa dura 3-3.5 hrs. La división del cigoto forma cuatro células hijas, una de las cuales retiene los cuatro flagelos de la célula madre, mientras que las otras los regeneran rápidamente.

Como parte del ciclo de vida y como una forma de latencia se presenta la formación de quistes. Al llegar a la fase estacionaria del cultivo, la población está compuesta por 80% de células enquistadas. Las células pierden sus flagelos y comienzan a adquirir una forma redondeada en el momento previo al enquistamiento. El quiste maduro contiene 4 capas de pared celular colocadas secuencialmente sobre la membrana plasmática (Brown y col., 1976a). Pringsheim (1955) reporta que éstas no se tiñen con una solución de zinc-cloruro-iodo, lo que indica ausencia de celulosa en la pared del quiste maduro. Los organelos se presentan en poca cantidad y disminuídos en tamaño. Para que ocurra el "exquistamiento" es necesaria la captación de agua (ya que se observa un aumento en el volumen) y la digestión de la pared celular (Brown y col., 1976b).

Las mitocondrias de *Polytomella caeca* se aíslan fácilmente por rompimiento mecánico de las células y centrifugación diferencial (Lloyd y Chance, 1968). El análisis espectroscópico de las mismas (ver figura 9), reveló la presencia de citocromos b, c+c₁, a+a₂ y flavoproteínas, así mismo, el transporte de electrones

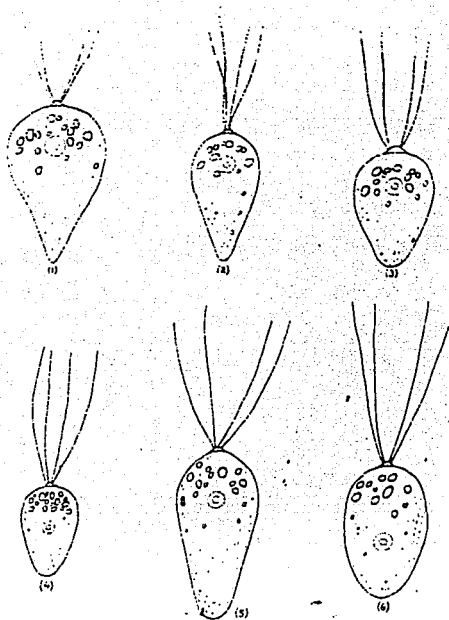


Figura 7: Esquema de las especies del género *Polytomella* más importantes aisladas por Prigsheim en 1955. 1.- *P. caeca*, 2.- *P. caeca* var. *minor*. 3.- *P. papillata*, 4.- *P. parva*. 5.- *P. magna*. 6.- *P. capuana*. Cada una de estas especies fue colectada en distintos sitios.

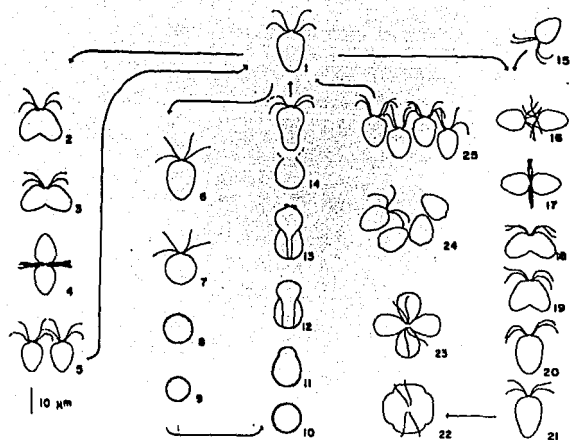


Figura 8: Esquema del ciclo de vida de *Polytomella caeca*. Se representan tanto la fase sexual como la asexual, así como la fase de enquistamiento de la misma. Las fases 1-5 ilustran las primeras horas del crecimiento de un cultivo donde los organismos se reproducen por bipartición. La fase de enquistamiento puede ocurrir durante todo el ciclo de vida y aumenta hacia las 48 hrs de crecimiento del cultivo. La fase sexual se presenta en una fase más adelantada del desarrollo del cultivo. Tomado de Lewis y col., 1974

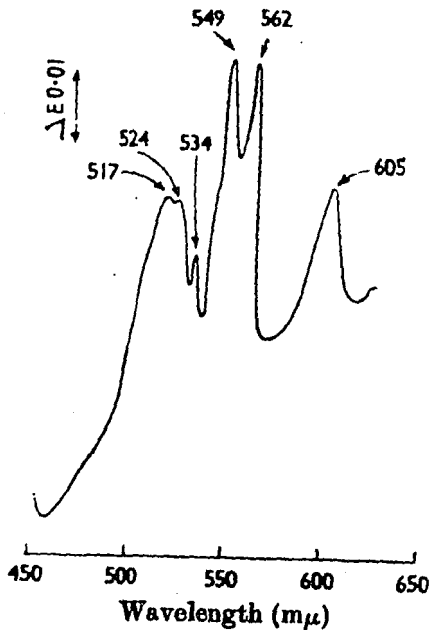


Figura 9: Espectro diferencial de absorción (oxidado-reducido) para caracterizar los citocromos presentes en las mitocondrias de *P. agilis*, tomado del trabajo de Lloyd y Chance, 1968. A 524 nm absorbe el pico β de los citocromos, a 549 nm el α del citocromo c_1 , a 562 nm el α del citocromo b y a 605 nm el α de la citocromo oxidasa aa_3 .

mostró ser sensible a antimicina A, rotenona, piericidina A y cianuro. Lloyd y col., (1969) realizaron estudios sobre el efecto del cloranfenicol en el crecimiento de *Polytomella caeca*, observando que el tiempo de duplicación era mayor en las células que recibían el inhibidor. Así mismo, el contenido de los complejos respiratorios se veía disminuido, al igual que la óxido- reducción de los mismos al agregar succinato durante la transición de aerobiosis-anaerobiosis. El estudio de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias de *Polytomella* sólo llegó a este punto, actualmente se ha retomado con el presente trabajo.

Hacia 1989, Conner y col., realizaron un estudio comparativo de los genes que codifican para los genes de β -tubulina de *P. agilis* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta proteína forma parte de la estructura del flagelo eucarionte. El uso de codones para ambos organismos es muy similar, evitando aquellos tripletes con A en la última posición. La disposición y el tamaño de los intrones en los 3 genes de β -tubulina también es muy semejante en ambas especies. La secuencia de aminoácidos para las tres proteínas es similar en un 98%, así como el tamaño de las mismas. En las dos especies se encuentra una señal de poliadelinación TGTA, la cual se encuentra únicamente en este grupo de algas. Todo lo anterior muestra que estos dos organismos están emparentados no sólo por su morfología, si no que existen características del genoma que ambos comparten. Sin embargo, no es posible dar una idea clara del tiempo de separación entre ellos, debido a que no se presentan cambios frecuentes en las bases de la secuencia de los tres genes, lo que trae consigo la ausencia de reemplazamientos de aminoácidos que indiquen diferencias o separaciones entre ambos géneros.

Sin embargo, según Round (1980) la separación de un grupo de algas del resto de la Clorofitas pudo darse por pérdida del aparato fotosintético y la pared celular, por lo que probablemente, *Polytomella* surgió del grupo de *Chlamydomonas*. La discrepancia de clasificación para *Polytomella*, quedaría resuelta si éste género se considera únicamente como perteneciente al grupo de algas incoloras. Por tanto, es necesario encontrar evidencias bioquímicas (fenotípicas) y genotípicas en proteínas que toleren cambios como puede ser el citocromo c_1 , de la separación de estos dos grupos durante la evolución de los mismos.

Una posibilidad se encuentra en el estudio de los complejos respiratorios de ambos organismos, sin embargo, para el género *Chlamydomonas*, el aislamiento de mitocondrias libres de membranas tilacoidales ha sido imposible (Atteia y col., 1992). *Chlamydomonas* ha sido considerada como la "levadura verde" y ha sido utilizada en estudios a nivel de biología molecular muy completos. En contraparte, el género *Polytomella* presenta la característica de carecer de pared celular y de cloroplastos, lo cual lo hace un excelente organismo de estudio para poder caracterizar los complejos respiratorios ya que es fácil la extracción de sus mitocondrias.

Objetivos:

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, y debido al interés que representa para nosotros el complejo bc₁ mitocondrial, se plantearon los siguientes objetivos para la presente tesis:

1.- Aislar y caracterizar al complejo bc₁ mitocondrial de *Polytomella spp.* Como ya se mencionó, los estudios sobre la cadena de transporte de este organismo, quedaron detenidos en un análisis espectrofotométrico, evidenciando la presencia de citocromos b y c₁ pertenecientes al complejo.

2.- Generar anticuerpos específicos dirigidos contra las subunidades del complejo III mitocondrial de *Polytomella spp* para poder utilizarlos en inmunorréplias tipo Western y buscar similitudes con subunidades del complejo bc₁ de otros organismos.

3.- Obtener la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión del grupo hemo del citocromo c₁ de *Polytomella spp.* Debido a que los organismos pertenecientes al reino Protocista poseen un citocromo c₁ atípico, con una sola unión covalente a la proteína, cabe hacerse la pregunta de si ésta es una característica privativa de este reino ó se restringe a organismos flagelados pertenecientes a la clase Kinetoplastida y Euglenida. El conocer el sitio de unión en un protozooario de otra clase, como lo es *Polytomella*, podrá contribuir a contestar esta pregunta.

Materiales y Métodos:

Cultivo y cosecha de *Polytomella spp*:

Polytomella spp. fue obtenida del cepario Sammlung von Algenkulturen del Pflanzenphysiologisches Institut de la Universidad de Göttingen (SAG) de Alemania y actualmente se encuentra en custodia del Cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del IPN bajo el número: CDBB-951. Se hizo crecer al organismo sin agitación en matraces para cultivo de forma ancha, para favorecer el intercambio de oxígeno, a una temperatura entre 25-30 °C y en el medio de cultivo reportado por Wise (1959) consistente en 0.2% de acetato de sodio; 0.1% de extracto de levadura y 0.1% de bacto triptona. Posteriormente, se utilizó el doble de concentrado, ya que se observó que se adquiría un mejor rendimiento en cantidad de células por litro. Además, se enriqueció con vitaminas B1 (0.01 mg/l) y B12 (0.5 µg/l) esterilizadas por filtración, de acuerdo con Cantor y Burton (1975).

Obtención de la fracción mitocondrial:

Las células se cosecharon a las 48 horas en la fase de crecimiento exponencial tardía por medio de una centrifuga Sharpless (de flujo continuo) o con una centrifuga Sorvall en un rotor GS-3 a 3,500 rpm (6 1,000 xg) por 10 min. Las células se lavaron con un amortiguador de 20 mM de fosfato de potasio, pH 7.0, centrifugando de la misma manera.

Las mitocondrias de *Polytomella spp* se obtuvieron por el método reportado por Lloyd y Chance (1968). Las células, una vez resuspendidas en un amortiguador 0.32 M de sacarosa; 4 mM EDTA de potasio y 20 mM de Tris-HCl (pH 7.4), se rompieron (por homogenización) con un vástago de teflón. El sobrenadante se centrifugó 2 veces a 3,500 rpm (1,000 xg) durante 10 min para eliminar los núcleos y las células no rotas. Posteriormente, con una centrifugación a 12,000 rpm (10,000 xg), por 15 min se obtuvieron las mitocondrias en el precipitado y se lavaron con el mismo amortiguador, centrifugando 10 min a la misma velocidad.

Las mitocondrias se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Purificación del complejo bc₁ mitocondrial de *Polytomella spp*:

Esencialmente se siguió la técnica reportada por Ljungdahl y col., (1987) con algunas modificaciones. Aproximadamente 1-1.5 g de mitocondrias de *Polytomella spp* se solubilizaron con 2 g del detergente lauril maltósido por g de proteína (en la metodología original se utiliza la relación detergente/proteína de 1 g/g de proteína mitocondrial total). A continuación, se llevó a las mitocondrias a una concentración

final de 10 mg/ml con un amortiguador 50 mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM de $MgSO_4$ y 100 mM de NaCl (4 °C). Se dejó incubar durante 30 min a 4 °C en agitación y a continuación se centrifugaron 15 min a 30,000 rpm (80,496 xg), en un rotor 50 Ti. El sobrenadante resultante se dializó contra 10 volúmenes de un amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (4 °C); 1 mM $MgSO_4$ durante una hora a 4 °C. El sobrenadante se cargó a una columna (3.4 cm de diámetro por 23.0 cm de largo) con la resina DEAE-Biogel A (BioRad) equilibrada previamente con un amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (4 °C); 1 mM de $MgSO_4$ y 0.1 mg/ml de lauril maltósido. La columna con el sobrenadante, se dejó lavando toda la noche con 3 volúmenes de columna del mismo amortiguador. El volumen excluido de la columna y el obtenido del lavado, se colectaron en fracciones de 100 gotas por tubo (2.5 ml aproximadamente) en un colector Gilson. Las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro Shimadzu a 280 nm para detectar proteína y a 415 nm para detectar la presencia de los citocromos. A continuación, se lavó la columna, con el mismo amortiguador adicionado con 150 mM de NaCl, 1mM de PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro, siglas en inglés) y 50 µg/ml de TLCK (N α -p-tosil-L-lisina-cloro-metilcetona, siglas en inglés) (concentraciones finales). Después de pasar aproximadamente 5 volúmenes de columna, se añadió amortiguador con 400 mM de NaCl y las mismas concentraciones de inhibidores de proteasas. El volumen que pasó por la columna se colectó en fracciones de 100 gotas ó 2.5 ml por tubo, que se leyeron a 280 nm y 415 nm.

Las fracciones de los picos de absorción a 415 nm y 280 nm se concentraron por ultrafiltración en un Amicón de 50 y/o 10 ml y con una membrana YM100 de 43 mm ó de 25 mm respectivamente.

Otras cromatografías:

A continuación de la primera cromatografía de purificación, se decidió hacer un segundo paso de cromatografía con las fracciones obtenidas en el volumen de exclusión de la columna y en el de 150 mM de NaCl.

En el primer caso, se empacó una columna de 2.3 cm de diámetro por 23 cm de largo con la resina Carboximetil-Biogel A (BioRad) con un volumen de 25 ml, la cual se equilibró con el mismo amortiguador utilizado en la primera cromatografía. La muestra obtenida en el volumen de exclusión de ésta, se concentró y se pasó por la segunda columna. El volumen de exclusión se colectó de la misma manera que en la anterior.

Para realizar la segunda cromatografía de la fracción con 150 mM de NaCl, se optó por utilizar la resina DEAE-Sefarosa CL6B, conforme a lo reportado por Ljungdahl y col., (1987). La columna de 2.3 cm de diámetro por 23 cm de largo, se cargó con la resina la cual se equilibró con el mismo amortiguador de las anteriores cromatografías. En este caso, para poder eliminar a las proteínas contaminantes, se

decidió separarlas con un gradiente de 0 a 300 mM de NaCl, en 10 volúmenes de columna. Tanto los volúmenes de exclusión, como los de lavado de la proteína - elución- (3 volúmenes de columna) se colectaron de la manera antes mencionada. Así mismo se leyó la densidad óptica de cada fracción a 280 nm y 415 nm.

Determinación de proteína:

Método de Lowry:

Este método fue reportado originalmente por Lowry y col., (1951) pero es utilizado en nuestro laboratorio con las modificaciones realizadas por Markwell y col., (1978); requiere de las siguientes soluciones:

A: 2.0% de carbonato de sodio; 0.4% de hidróxido de sodio; 0.16% de tartrato de sodio y 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS).

B: 0.4% de sulfato de cobre.

C: Mezclar 100 volúmenes de A con uno de B.

D: Reactivo de Folin más agua en proporciones de 1:1.

Para la curva patrón de utilizó albúmina de bovino (1 mg/ml) en cantidades de 0 a 100 μ l. Para las muestras problema se tomaron por duplicado alcuotas de 5, 10 y 20 μ l. Los tubos se ajustaron a un volumen de 1 ml con agua bidestilada. Se añadieron 3 ml de solución C a cada uno de los tubos y se dejaron incubar 10 min a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 0.3 ml de solución D a cada tubo dejando incubar 30 min a temperatura ambiente. La densidad óptica se leyó a 540 nm.

Electroforesis nativa azul:

Esta electroforesis se realizó con la técnica descrita por Shägger y von Jagow (1991) en un cámara Hoefer Scientific Instruments la cual tiene un sistema de circulación de agua fría para tener una temperatura de 4 °C.

Tabla V: proporciones utilizadas para el gel de gradiente de bis acrilamida, amortiguador de geles, etc.

Solución:	13% T (ml)	6% T (ml)	Gel de muestra (ml)
Gel de separación			
48 % acrilamida, 1.5 % de bis acrilamida	4.7	2.5	0.6
Glicerol	3.6	----	----
Amortiguador de geles (3X)	6.0	7.0	2.5
Agua	6.7	11.4	4.3
TEMED	6 µl	9 µl	6 µl
Persulfato de Amonio al 10%	60 µl	90 µl	60 µl

T: concentración final de acrilamida en la mezcla.

Amortiguadores utilizados:

De geles (3X): 150 mM de ácido 6-aminocapróico, 150 mM Bistris-HCl (pH 7.0), 4°C.

Catódico ó superior: 50 mM de Tricina, 15 mM de Bistris, 0.02% Azul de Coomassie G de Serva, pH 7.0, 4 °C.

Anódico ó inferior: 50 mM Bistris- HCl, pH 7.0, 4 °C.

Se utilizaron 14.5 ml de cada una de las mezclas de acrilamida al 16% y al 6% y se colocaron por separado en un formador de gradiente y se vaciaron entre las placas de vidrio, previamente selladas, a los lados y en la parte inferior. Una vez

finalizado el gradiente se dejó polimerizar colocando un poco de amortiguador de geles diluido 1:10. A continuación, se añadió la solución del gel concentrador (o de muestra) y el peine separador y se dejó polimerizar.

Preparación de las muestras:

Las mitocondrias de *Polytomella spp* se trataron con 40 µl de 750 mM de ácido 6 aminocaprílico, 50 mM de Bistris-HCl, pH 7.0 y 7.5 µl de 10% de lauril maltósido. Se centrifugaron 10 min a 100,000 xg y al sobrenadante se le agregaron 2.5 µl de una solución/suspensión 5% de azul de Coomassie G de Serva en 500 mM de ácido aminocaprílico. Se utilizaron hasta 10 mg de proteína extraída en un gel de este tipo.

Condiciones de electroforesis:

Los geles se corrieron a 4-7 °C, a 100 V durante una hora y a continuación se subió el voltaje a 200 V y se dejó toda la noche.

Segunda dimensión:

Esta se realizó cortando una banda de 1 cm de ancho del gel anterior que se dejó en una solución de mercaptoetanol al 1% por unos segundos y se colocó en un gel de Tricina-SDS-EGPA como se describirá mas adelante.

Geles de poliacrilamida-SDS:

Se hicieron geles de placa de 1.2 mm de grosor en una cámara BRL (Vertical Gel Electrophoresis System) de acuerdo con la técnica reportada por Shägger y col., (1986):

Tabla VI: proporciones utilizadas de acrilamida, bis-acrilamida, amortiguador, agua y glicerol para un gel de placa de 18 X 20 cm.

Solución	Gel Separador (ml)	Gel de Muestra (ml)
30 % Acrilamida, 0.939% bis	16.0	1.6
Amortiguador de geles	10.0	3.0
0.795% v/v Glicerol	4.0
Agua	-----	7.4
10 % Persulfato de sodio	0.1	0.1
TEMED	0.01	0.01

Amortiguadores utilizados:

De geles: 3M de Tris-HCl, pH 9.0, 0.3% SDS.

Anódico ó inferior: 0.2 M Tris-HCl, pH 8.9.

Catódico ó superior: 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1% SDS.

Preparación de muestras:

Las proteínas para esta electroforesis se diluyeron a una concentración de 1 µg/µl agregando agua hasta obtener la mitad del volumen final añadiendo la otra mitad de una solución digestora (esta solución se utilizó para eliminar puentes disulfuro y poder desnaturalizar a la proteína): 100 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 30 % de glicerol; 0.3% de azul de bromofenol, 4% de mercaptoetanol y 10% de SDS.

Condiciones de la electroforesis:

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, una hora a 30 V y después a 100 V durante toda la noche.

Tinciones específicas:

Azul de Coomassie:

Descrita por Shägger y col., (1986) para teñir las bandas polipeptídicas. Los geles se sometieron a las siguientes soluciones:

Fijadora: 50% metanol, 10% ácido acético. Se dejó el gel durante una hora en agitación constante y a temperatura ambiente.

Teñidora: 0.1% azul de Coomassie G de Serva, 10% ácido acético. El gel se dejó teñiendo durante toda la noche en agitación constante, a temperatura ambiente.

Desteñidora: 10% ácido acético. Se colocó una esponja ó papel absorbente para eliminar el exceso de colorante y poder observar las bandas de proteína.

3,3',5,5'- tetrametilbencidina:

Mediante esta técnica descrita por Thomas y col., (1976) es posible teñir a los grupos hemo unidos covalentemente a la proteína, aprovechando la actividad peroxidásica del grupo hemo.

La solución para teñir se preparó con tres partes de una solución 6.3 mM de tetrametilbencidina en metanol y siete partes de 0.25 M de acetato de sodio, pH 5.0. El gel se sumergió en esta solución por una hora en agitación constante y a 4 °C. A continuación se agregaron 0.1 ml de Perhidrol al 30% (H₂O₂) por cada 100 ml de solución teñidora. Aproximadamente 15 min después aparecieron las bandas teñidas. El gel se lavó con abundante agua bidestilada para detener la reacción. Los geles se fotografiaron inmediatamente, ya que esta tinción no es permanente.

Determinación de las masas moleculares:

Para este fin se utilizó el aparato UltroScan XL de LKB que realiza barridos densitométricos con un haz de láser de helio-neón. Los datos obtenidos fueron

almacenados y evaluados con el paquete de computación GelScan XL de Pharmacia.

Obtención de anticuerpos contra las subunidades de *Polytomella spp.*

Se generaron anticuerpos de conejo dirigidos contra subunidades del complejo bc₁ de *Polytomella spp* mediante la técnica descrita por González-Halphen y col., (1991). Se corrieron electroforesis en geles de acuerdo con la técnica de Shagger y col., (1986) con 50 µg de bc₁ por carril. Después de la corrida, se transfirieron las bandas de gel con proteína a membranas de polivinil difluoruro, siguiendo la técnica de Szewczyk y Summers (1988). Esta consiste en transferir a las proteínas a 20 V durante 12 hrs en presencia de un amortiguador: 25 mM Tris-HCl (pH 8.3) y 192 mM de glicina. La membrana se teñó con 0.2% de amido negro para revelar las bandas de proteína y se cortó con bisturí la banda de la subunidad correspondiente a la identificada en geles teñidos con azul de Coomassie. Para poder extraer la proteína de la membrana, el fragmento se incubó en 500 µl con el siguiente amortiguador: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1 % de Tritón X-100 y 2% de SDS. El extracto se dializó contra 50 volúmenes de 50% de etanol, con tres cambios y finalmente contra agua destilada. La proteína así obtenida se liofilizó y se resuspendió en 0.9% de NaCl. Se inmunizaron conejos mediante una inyección intramuscular con 50 µg de proteína mezcladas con adyuvante completo de Freund, después de tres semanas se reforzó la dosis de antígeno con 50 µg de proteína mezcladas con adyuvante incompleto de Freund; esta operación se repitió dos veces más. A continuación se procedió a sangrar a blanco al conejo. Se obtuvo el suero por centrifugación y se purificaron parcialmente los anticuerpos por precipitaciones secuenciales de sulfato de amonio guardándose la fracción precipitada al 40%. Para determinar la dilución máxima del anticuerpo se siguió un ensayo de inmunorréplica tipo Western.

Inmunorréplicas tipo Western:

Esta técnica está basada en las descritas por Towbin y col., (1979); Hawkes y col., (1982) con las modificaciones descritas por González-Halphen y col., (1988).

Una vez que se ha realizado la electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS, éste se coloca en una rejilla de transferencia de la siguiente manera: de cada lado se ponen dos esponjas y dos papeles filtro mojados en amortiguador para transferir, de un lado se pone el gel y sobre él papel de nitrocelulosa, también mojado en amortiguador para transferencia. Para evitar que haya burbujas entre el gel y el papel, se puede rodar sobre éste un tubo de ensaye para facilitar que salgan las burbujas. Se cierra la rejilla y se coloca de tal modo que el gel quede orientado hacia

el cátodo de la cámara. La transferencia se realiza con amortiguador 25 mM Tris (pH 8.5), 192 mM glicina, 20% metanol, 0.1% SDS durante 4 hrs a 250 mA con agitación magnética constante.

Al terminar la transferencia, se sacaron las tiras de nitrocelulosa y se colocaron en envases de plástico. Cada una se lavó con 20 ml de amortiguador TBS: 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 0.5% NaCl, dos veces durante 15 min con agitación constante. Cada tira se incubó con gelatina al 3% en TBS durante toda la noche. En este paso se satura al papel con proteína para impedir la reacción inespecífica de los anticuerpos con el papel de nitrocelulosa. Al día siguiente se lavó cada tira con 20 ml de amortiguador TTBS (contiene TBS más 0.05% de Tween-20), dos veces durante 15 min, en agitación constante.

El primer anticuerpo que se añade a las tiras de papel es de conejo y es específico contra cada una de las seis primeras subunidades del complejo III mitocondrial de corazón de bovino. Estos anticuerpos se purificaron en el laboratorio por la QBP Miriam Vázquez Acevedo, de acuerdo con González-Halphen y col., 1988. Para cada tira de nitrocelulosa se puso un anticuerpo en 10 ml de 1% de gelatina en TTBS durante 5 hrs con las siguientes diluciones:

Tabla VII: Dilución utilizada en cada anticuerpo dirigido contra las primeras 6 subunidades y la holoenzima del complejo bc₁ de corazón de bovino.

Anticuerpo antisubunidad	Dilución
I	1:100,000
II	1:2,000
II	1:2,000
IV	1:2,000
V	1:100,000
VI	1:2,000
anticuerpo antisubunidad	dilución
antiholoenzima	1:20,000

Al terminar el tiempo de incubación, se lavó el anticuerpo con 20 ml de amortiguador TTBS, dos veces durante 15 min, con agitación constante. A continuación se agregó un segundo anticuerpo (de cabra contra IgG de conejo

conjugado con fosfatasa alcalina) en dilución 1:3,000 en 20 ml de gelatina al 1% en TTBS. Las tiras de papel se incubaron toda la noche en agitación constante y a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el segundo anticuerpo dos veces durante 5 min, en agitación constante con amortiguador TTBS.

Para revelar los anticuerpos, se agregaron 20 ml de 0.1 M de bicarbonato de sodio y 1 mM de $MgCl_2$ (pH 9.8) a cada tira de nitrocelulosa. Después se agregaron 200 μ l de 17.29 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCPIP) y 18.33 mM de Nitroazul de Tetrazolio (NBT) produciendo una reacción colorida mediante la fosfatasa alcalina. Después de 5 ó 10 min se lavó con agua bidestilada dos veces para eliminar los componentes de la reacción y a continuación se secaron los papeles para detener la reacción.

Espectros de absorción:

Estos espectros se realizaron para determinar la concentración de hemo b y c, del complejo bc_1 , utilizando los coeficientes de extinción molar reportados por Degli Esposti y col., (1984). Para el citocromo c, se utilizó un coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon(553-541) = 17.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtenido para el complejo aislado de corazón de bovino. Se empleó el espectro diferencial reducido con ascorbato menos oxidado para ver el pico de absorción de este citocromo. En el caso del citocromo b, se empleó el espectro diferencial reducido con ditionita menos reducido con ascorbato y se utilizó el coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon(562-575) = 25 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el citocromo b de bovino. Para determinar la cantidad de citocromo aa_3 del complejo IV, se realizó un espectro de absorción de 350 a 650 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon(603-630\text{nm})$ de $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, reportado para *Euglena gracilis* por Brønstrup y Hachtel (1989).

El espectro de absorción del complejo bc_1 presenta un corrimiento hacia el rojo al agregar a los inhibidores antimicina y mixotiazol, los cuales se sabe que se unen al citocromo b (von Jagow y col., 1984 y para una revisión ver von Jagow y Link, 1986), por lo cual se estudió el espectro de absorción del complejo bc_1 de *Polytomella spp.* Para ello, se cuantificaron los inhibidores por su espectro de absorción de 280 a 400 nm en etanol, utilizando los coeficientes de extinción molar a 313 nm, de $10.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para mixotiazol y para antimicina de $4.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 320 nm (von Jagow y Link, 1986). En este caso, los espectros se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu, con luz ultravioleta y visible.

El complejo bc_1 de *Polytomella spp* se diluyó a una concentración de 530 μ g/ml en un mililitro de volumen final, se redujo con ditionita y se repartió en dos cubetas, una de referencia y otra de muestra, de 0.5 ml con 1 cm de paso de luz. La línea base

se obtuvo de la resta de los espectros de estas dos cubetas. A continuación, se puso mixotiazol en la cubeta de muestra (1 μ l de 0.26 mM), se obtuvo el espectro diferencial y luego se añadió la misma cantidad en la cubeta de referencia para obtener una línea base. Finalmente, se colocó antimicina en la cubeta de muestra (1 μ l de 3.2 mM) y se obtuvo el espectro diferencial. Los espectros se realizaron en un SLM Aminco, DW 2,000 y se analizaron con el paquete de computación DW 2,000.

Actividad de ubiquinol citocromo c oxidorreductasa del complejo bc₁ de *Polytomella* spp:

Kubota y col., en 1992 describieron la técnica de medición de la actividad del complejo bc₁ de corazón de bovino que fue empleada en este trabajo y que consiste en primer lugar, en activar al complejo una a dos horas antes del ensayo. Para medir la actividad se emplea DBH ó decilubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona) como donador de electrones y citocromo c de caballo como aceptor.

La concentración inicial del complejo bc₁ de *Polytomella* spp se determinó en función de la cantidad de citocromo c₁, para ello, se realizó el espectro de absorción reducido con ditionita menos oxidado entre 350 y 600 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar para el citocromo c₁ de bovino de 17 mM⁻¹ cm⁻¹ reportado por Degli Esposti y col., (1986). La concentración de citocromo c soluble de caballo se determinó utilizando el $\Delta\epsilon_{560-450nm}$ de 19 mM⁻¹ cm⁻¹ (Degli Esposti y Lenaz, 1991).

Para reducir al DBH ó decilubiquinona, se le solubiliza en etanol de acuerdo con el método reportado por Trumpower y Edwards (1979). Se reduce con ditionita de sodio y borohidruro de sodio, para finalmente extraer con ciclohexano, el solvente se evapora y se disuelve al DBH en dimetilsulfóxido, poniendo 0.1 M de HCl. Se realiza el espectro de absorción de 250 a 300 nm y se cuantifica empleando el coeficiente de extinción $\Delta\epsilon_{300-250}$ de 16 mM⁻¹ cm⁻¹, reportado en el mismo trabajo.

A continuación, se diluyó el bc₁ a una concentración final de 1 μ M con un amortiguador para activar el complejo: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 660 mM sacarosa; 1 mM de L-histidina y 0.01% de Tween-20. Las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro de doble haz Aminco, DW-2C que contiene un procesador y controlador cinético Midan II, durante las tres horas posteriores a la dilución de la enzima, de la siguiente manera:

En la celdilla del espectrofotómetro se colocaron 10 μ l de bc₁, 1 μ M, más cantidades crecientes de citocromo c de caballo (desde 1 a 20 μ M final en la cubeta de medición) y suficiente amortiguador 55 mM Tris HCl (pH 7.4), 2 mM de Na₂S₂O₃, 0.5 mM EDTA de Na, 0.01% de Tween-20 y 20 mM de MgCl₂ para dos ml. La reacción se disparó con DBH, para que quedara a una concentración final de 15 μ M en la cubeta de medición. La reducción del citocromo c de caballo se siguió en el modo dual

del espectrofotómetro de 550-540 nm, en función del tiempo. También se midió la reducción química del citocromo c por el DBH para restarla al valor de la actividad enzimática con diferentes concentraciones de citocromo c de caballo.

La actividad enzimática fue expresada en número de recambio, seg^{-1} (nmolas de citocromo c reducido/nmol de citocromo c, /seg), o bien en actividad específica (μmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína).

Para medir la actividad del bc_1 en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación, se siguió un proceso similar, cada una fue diluída a la concentración en mg/ml equivalente a la obtenida para el bc_1 a $1\mu\text{M}$. Se añadió la cantidad necesaria en μl para cada ensayo y se utilizaron concentraciones de $30\mu\text{M}$ de citocromo c soluble de caballo y $15\mu\text{M}$ de DBH, análogo de quinona, para disparar la reacción. La actividad en este caso, fue expresada en μmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína.

También fue posible caracterizar la inhibición de la actividad del complejo en presencia de algunos inhibidores clásicos de este complejo, como antimicina y mixotiazol (von Jagow y Link, 1986). Para antimicina se utilizó una concentración final de $1\mu\text{M}$ disuelta en etanol y para mixotiazol de $20.5\mu\text{M}$.

Titulación de la actividad del complejo bc_1 , utilizando al inhibidor antimicina A

Para encontrar la cantidad en moles de antimicina capaz de inhibir a una mol del complejo bc_1 de *Polytomella spp*, se midió la actividad del mismo en presencia de cantidades crecientes de antimicina. Se empleó la metodología descrita anteriormente para medir la actividad. A la solución de $1\mu\text{M}$ del complejo bc_1 , se le agregó antimicina y se tomó una alícuota de esta mezcla para medir actividad en cada adición. La antimicina se disolvió en etanol y se realizó un espectro de absorción de 280 a 350 nm, para calcular la concentración se empleó el coeficiente de extinción $\epsilon_{320} 4.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Todas las mediciones se realizaron en presencia de 0.5mM final de cianuro de sodio. La actividad en este caso, se calculó en μmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína. La actividad obtenida sin adicionar antimicina se tomó como el 100% y con base en este dato, se calculó el por ciento de actividad obtenida para cada concentración de antimicina añadida. Con los puntos obtenidos se realizó una gráfica de % de actividad contra mol de antimicina/mol de complejo bc_1 .

Actividad de otros complejos mitocondriales:

Estas mediciones se realizaron con el método descrito por Di Mauro y col., (1987)

en un espectrofotómetro de doble haz Aminco, DW-2C que contiene un procesador y controlador cinético Midan II, con el siguiente protocolo:

Succinato deshidrogenasa: Se midió la reducción de 0.003% de diclorofenolindofenol (DCPIP) a 600 nm en presencia de 1.5 mM de KCN, 16 mM de succinato y 0.05 M de fosfato de potasio (pH 7.0).

NADH deshidrogenasa: Se siguió la oxidación de 0.2 mM de NADH a 340 nm en presencia de ferricianuro de potasio (0.85 mM) y 0.035 mM de fosfato de potasio (pH 7.5).

Citocromo c oxidasa: La actividad de este complejo se midió en presencia de 30 μ M (final) de citocromo c reducido con ditionita en un amortiguador 0.01 M de fosfato de potasio (pH 7.0), la oxidación del citocromo c por la oxidasa se siguió a 550/540 nm y se evaluó en presencia y ausencia de 0.5 mM de KCN.

Determinación de la masa molecular del complejo bc₁.

Por medio de la filtración molecular es posible estimar las masas moleculares de diferentes proteínas. En este caso, se montó una columna (2.6 x 90 cm) con la resina Sefacril S-300 y se equilibró con el amortiguador: 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1 mM de ditioneol y 0.1 mg/ml de lauril maltósido. Para determinar el volumen excluido por la columna, se utilizó azul dextrán 200. Los estándares de masa molecular utilizados fueron los siguientes: tiroglobulina de 669 kDa, apoferritina de 443 kDa, α -amilasa de 200 kDa, alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina de bovino (66 kDa) y anhídrida carbónica (29 kDa). Cada uno de ellos se disolvió en el mismo amortiguador para equilibrar pero agregándole 5% de glicerol. Se midió el volumen de lavado de cada estándar y de las muestras problema, leyendo densidad óptica a 280 nm para detectar proteína y 415 nm para detectar la presencia de citocromos. La masa molecular de las muestras fue determinado por el método de Piez (1968).

Secuencia del citocromo c₁ de *Polytomella spp.*

Secuencia del extremo amino terminal del citocromo c₁:

En este caso, se utilizó la técnica reportada por Matsudaira (1987). Se corrió un gel de acuerdo con Shägger y col., (1986) al 16 % de acrilamida, la transferencia a una membrana de Problot (polivinilidén fluoruro) se realizó en presencia de un amortiguador 10 mM CAPS (pH 11.0), con 10% de metanol durante 4 horas a 250 mA. La membrana fue teñida después de este tiempo con 0.1 % de azul de Coomassie R-250 en 50 % de metanol 5 min y luego desteñida en 50% de metanol, 10% de ácido acético durante 5-10 min. Después se lavó la membrana con agua bidestilada. Las

bandas de interés se cortaron con un bisturí y se secaron para enviarlas a la Fundación Keck de la Universidad de Yale, E.U.A. donde fue secuenciado el extremo amino terminal del citocromo c₁ con un secuenciador automático (Microsecuenciador 470 con un análisis de fenilidantofina de Applied Biosystems).

Diseño de los desoxioligonucleótidos:

Para poder amplificar al gene nuclear del citocromo c₁ fue necesario diseñar dos desoxioligonucleótidos que se utilizaron en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés).

Una vez que se obtuvo la secuencia de los primeros 10 aminoácidos del extremo amino terminal: X E A X D X L H P V S Y P y con el reporte del uso de codones para *Polytomella agilis*, por Conner y col., (1989), se procedió al diseño de un desoxioligonucleótido que contuviera la secuencia de nucleótidos que codifica para esta región. Para el segundo desoxioligonucleótido, se realizó un estudio con las secuencias existentes para citocromo c₁ en diferentes organismos como *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Neurospora crassa*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bos taurus primigenius* (ver tabla VIII). Con el alineamiento de las secuencias se pudo obtener una región altamente similar en el carboxilo terminal E(D) Y E D G T P A S V X X M A . Con el uso de codones para *Polytomella agilis* se procedió al diseño del segundo desoxioligonucleótido.

Ambos desoxioligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular por la Dra. Laura Ongay, en la Unidad de Biología Molecular.

Aislamiento del DNA nuclear de *Polytomella spp*:

Se siguió la técnica descrita por Conner y col., (1989); incubando a las células de *Polytomella spp* en un amortiguador de lisis: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.3 M de NaCl; 5 mM EGTA; 2% de SDS y 40 µg/ml de proteinasa K por ml. Se dejó en agitación lenta a 40°C durante 30 min. A continuación, se agregó NaCl a una concentración final de 1.0 M y se dejó esta mezcla en agitación durante 15 min. Se procedió a desproteinizar el DNA con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 50:48:2 (dos veces) y una vez con 100% de cloroformo. A continuación el DNA se precipitó con 100% de etanol y resuspendido con amortiguador 2X SSC: 0.03 M de ácido cítrico y 0.3 M de cloruro de sodio. Al DNA

obtenido se le agregó una mezcla de RNAsa A (100 µg/ml), T1 RNAsa (50 unidades/ml) y α-amilasa (100 µg/ml) y se incubó a 37 °C por 2 a 3 hrs. Después se limpió el DNA con solventes orgánicos, como en pasos anteriores, se precipitó con etanol y se resuspendió en amortiguador TE: 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.5) y 0.001 M de EDTA disódico.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Para llevar a cabo este paso, se siguió la técnica diseñada por el grupo de Kary Mullis (ver Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona, 1987). En primer lugar se buscaron las concentraciones óptimas de MgCl₂ que amplificaran un fragmento de 500 a 780 pb (de acuerdo con el tamaño del citocromo c₁, entre 597-720 aminoácidos).

Las concentraciones probadas fueron de 1, 2, 4 y 8 mM de MgCl₂. Después de realizar un PCR para escoger la mejor concentración (aquella en la que se observó mayor cantidad del producto amplificado) se realizó el PCR en un aparato TemCycler II modelo 1105 de COY, con las siguientes condiciones:

Tabla IX: condiciones utilizadas para el PCR:

Cantidad (µl)	Reactivo
28.5	agua destilada estéril
5.0	amortiguador 10X de la enzima
4.0	25 mM MgCl ₂
10.0	oligonucleótidos para tener 200 ng final de cada uno
1.0	dNTP's
1.0	DNA nuclear total
0.5	Taq Polimerasa
total: 50µl por ensayo	+ 50 µl de aceite mineral

En este caso, los ciclos que se utilizaron fueron los siguientes:

Tabla X: Ciclos utilizados en el PCR:

tiempo	temperatura	número de ciclos
12 min	94 °C,	1
30 seg	94 °C	50
40 seg	50 °C	
2 min	72 °C	
12 min	72 °C	1

Una alícuota de 5 µl de cada tubo de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE: 178.4 mM Tris (pH 8.0-8.2), 5 mM EDTA disódico y 177.9 mM de ácido bórico. Esta solución contenía 50 µg de bromuro de etidio por cada 100 ml. El gel se corrió en el mismo amortiguador a 100 V durante 1 hora.

NOTA: Todos los geles que se utilizaron para ver el DNA fueron de 1 % de agarosa y bromuro de etidio en amortiguador TBE y corridos a 100 V en presencia del mismo amortiguador. Para poder observar las bandas de DNA en el gel se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta cercana. A partir de este momento sólo se mencionarán casos particulares donde el gel utilizado fue de menor concentración de agarosa, corrido en las mismas condiciones.

El DNA amplificado fue extraído del gel con un bisturí y tratado con el sistema GeneClean II Kit de Bio 101 Inc. para limpiar y separar de otros contaminantes a la banda de DNA de interés. En este caso, se colocó el fragmento de gel de agarosa en un tubo Eppendorf y se midió aproximadamente el volumen que ocuparía. A continuación se añadió medio volumen de amortiguador modificador para geles de agarosa corridos en amortiguador TBE, y 4.5 volúmenes de solución 6 M de NaI; con esta mezcla se dejó incubando durante 5 min a 45 °C. Se añadieron 5 µl de una suspensión con perlas de vidrio que se unen al DNA, y se dejó incubando con ellas durante 5 min en hielo. A continuación se centrifugaron las perlas 5 seg en una centrifuga Eppendorf y se lavaron tres veces con un amortiguador de lavado, centrifugando en cada ocasión. Para separar al DNA de las perlas se incubó durante 3 min a 55 °C con amortiguador TE, se centrifugó y se separó el sobrenadante; las perlas se volvieron a resuspender con amortiguador TE y se repitió el paso de incubación para volver a centrifugar y separar al sobrenadante, el cual contenía al DNA limpio.

Preparación de células competentes:

Para poder llevar a cabo la clonación de un fragmento de DNA es necesario ligarlo a un plásmido que se exprese en un cepa de *E. coli* determinada. Para que este plásmido pueda entrar a una bacteria ésta debe hacerse "competente", esto es, que sea capaz de aceptar la entrada de este plásmido. Lo anterior se realiza permitiendo que la membrana sea permeable al plásmido. A continuación se describe uno de los protocolos para esto:

La cepa de *E. coli* DH5 α se creció en 5 ml de medio LB durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm de agitación. Un ml de este cultivo se transfirió a 100 ml de medio LB y se creció de dos a tres horas más en las mismas condiciones ó hasta tener una densidad óptica a 550 nm de 0.5 a 0.6 unidades.

Las células se centrifugaron a 600 xg durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en un amortiguador (frío) Tfb I: 30 mM de acetato de potasio, 50 mM de cloruro de manganeso, 100 mM de cloruro de rubidio, 10 mM de cloruro de calcio y 12 % e glicerol (es importante que el pH de la solución se lleve poco a poco hasta pH 5.8 con 0.1 M de ácido acético, si se sobrepasa este valor es mejor descartar la solución, pues se forma un precipitado y el amortiguador no funciona). Se deben poner 40 ml del mortiguador tfb I por cada 100 ml de células competentes y se debe hacer suavemente. Se dejaron en hielo durante un tiempo máximo de dos horas. Se repitió el paso de centrifugación y las células se resuspendieron en un amortiguador Tfb II: 10 mM de MOPS pH 7.0, 75 mM de cloruro de calcio, 10 mM de cloruro de rubidio y 12 % de glicerol. Por cada 100 ml de cultivo inicial, se resuspendieron en 4 ml de Tfb II. Las células se dejaron durante una hora en hielo.

Para almacenar las células estas fueron alicuotadas en volúmenes de 200 μ l por tubo Eppendorf y guardadas a -70 °C.

Clonación del fragmento de PCR:

Con una cantidad suficiente del fragmento amplificado, se procedió a clonarlo. Para este fin se empleó un sistema de clonación de fragmentos de PCR de Stratagene el cual contenía al plásmido pTA12. La unión del DNA amplificado se realizó con ligasa T4 en presencia de amortiguador específico para la enzima. Aproximadamente 10 ng del fragmento amplificado se ligaron a 50 ng del vector, la reacción se llevó a cabo a 16 °C toda la noche o al menos durante 5 horas.

El vector con el inserto fué amplificado en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, la

cual tiene el siguiente genotipo: F⁻ ϕ 80*dlacZAM15* Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoRrecA**lndA1* *hsdR17*(*r_K*, *m_K*) *supE44* λ *thi-1* *gyrA96relA1* y que fue donada por el Dr. Roberto Coria. Esta cepa se hace competente con rubidio, como ya se mencionó anteriormente. Las células se descongelaron el mismo día en hielo.

A cada tubo de la reacción de la ligasa se le agregaron 70 μ l de células competentes, se incubaron en hielo 20 min y se les dió un choque térmico a 42 °C, 3 min. A continuación se les agregó 500 μ l de medio LB: 1% de bacto triptona, 1% de NaCl, 0.5% de extracto de levadura (pH 7.0). En este momento, se dejaron crecer durante 30 min a 37 °C. Las células se centrifugaron para quitarles el exceso de medio LB y se resuspendieron en un poco del líquido sobrante. A cada tubo se le agregó 40 μ l de 2% de X-Gal y 10 μ l de 200 nM de IPTG, las células fueron resuspendidas y plaqueadas en cajas de medio LB con 1.5 % de agar y 60 μ g/ml de ampicilina. Alternativamente, se preparó una mezcla de 40 μ l de medio LB, 50 μ l de 2 % de XGal y 10 μ l de IPTG por cada caja de Petri. Esta mezcla se plaqueó antes de colocar las células ya transformadas.

Las colonias de células que llevaran el plásmido con inserto fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina y por la falta de actividad de β -galactosidasa (colonias de color blanco).

Una vez clonadas las células con el plásmido que llevaba el inserto, se procedió a purificar el plásmido para comprobar la presencia del inserto en los mismos, lo anterior se llevó a cabo de la siguiente manera:

Minipreparación de DNA plasmídico:

Se crecieron las clonas en 5 ml de medio LB con 60 μ g/ml de ampicilina durante la noche a 37 °C. (Alternativamente, es posible tomar con un palillo estéril un poco de bacterias y resuspenderlas en 50 μ l de agua destilada estéril).

Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de medio. Se les agregó 300 μ l de un amortiguador TENS: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM de EDTA, 10 mM NaCl y 0.1 N de NaOH y 0.5% de SDS, se agitaron y se les añadieron 150 μ l de 3M de acetato de sodio pH 5.0, también agitando. El plásmido se separó de las membranas y del DNA cromosomal centrifugando dos minutos. Al sobrenadante conteniendo el plásmido se le agregaron 900 μ l de etanol al 100%, se centrifugó 2 min para precipitar el DNA plasmídico y se lavó con etanol al 70 %. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

El plásmido ya purificado fue cortado con la enzima EcoRI en un volumen final de 10 μ l durante una hora ó durante toda la noche, a 37 °C. El DNA resultante se

corrió en un gel de agarosa para observar la presencia del inserto en las clonas blancas seleccionadas.

Una vez confirmada la presencia del inserto, se crecieron las células para hacer una preparación en gran escala del plásmido (maxipreparación) con el fin de utilizarlo en reacciones de secuencia de acuerdo con Sanger (1977).

Midipreparación de DNA plasmídico:

La maxipreparación consiste en crecer 25 ml de la clona deseada en medio LB líquido con ampicilina durante toda la noche a 200 rpm y a 37 °C. Las células se recuperaron centrifugando 10 min a 5,000 rpm en rotor SS34 de Sorvall. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 10 mM de NaCl. Se centrifugó de la misma manera y el precipitado se resuspendió en 0.6 ml de amortiguador de LISIS: 25 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA, 15 % de sacarosa y 2 mg/ml de lisozima. Con este amortiguador se dejaron las células en hielo durante 20 min. Pasado el tiempo, se agregaron 1.2 ml por tubo de 0.2 M de NaOH y 1% de SDS. Se mezcló con cuidado tapando los tubos con parafilm y se dejaron en hielo durante 10 min. A continuación, se añadieron 0.75 ml de 3M de acetato de sodio pH 5.0, se agitó con cuidado tapando los tubos con parafilm y se dejaron en hielo durante 20 min.

Para recuperar el plásmido se centrifugó durante 12 min a 7,500 rpm con un rotor SS34, el sobrenadante conteniendo el plásmido se transfirió a un tubo nuevo y a cada tubo se le añadieron 5 µl de 10 mg/ml de RNAsa pancreática. Esta RNAsa se preparó calentándola durante 10 min y luego congelando a -20 °C. Con la solución de RNAsa se dejaron incubando los tubos durante 30 min a 37 °C. Para eliminar la enzima se realizó una doble extracción con un volumen de fenol/cloroformo. El DNA del plásmido se precipitó con etanol al 100%.

A continuación, se resuspendió el precipitado en agua y se añadieron 32 µl de 5M de NaCl y 200 µl de 13% de PEG-8,000 (polietilenglicol) se mezcló cada tubo con cuidado y se dejó en hielo durante una hora. Para eliminar el PEG se centrifugó cada tubo 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 70% de etanol. El precipitado se secó y resuspendió en 50 µl de amortiguador TE.

Reacción de secuencia del gen nuclear del citocromo c₁:

La secuenciación se realizó de acuerdo con la reacción de Sanger (1977) y con un sistema de USB: Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit, siguiendo el protocolo indicado en el mismo:

Se utilizaron 2-5 µg de DNA del plásmido que contenía el inserto y se llevaron

a 24 μ l con agua bidestilada estéril. Se añadieron 6 μ l de 1 M de NaOH y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregaron 3 μ l de acetato de amonio 2M (pH 4.3) se mezclaron bien y se dejaron a 4 °C. El DNA se precipitó con 70 μ l de etanol al 100% durante 30 min a -70 °C (6 durante toda la noche a -20 °C). Se centrifugó en centrífuga Eppendorf durante 10 min y el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se dejó evaporar para secarlo.

El DNA precipitado se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada estéril y se agregaron 10 ng del oligonucleótido deseado (que permite que la polimerasa se una en sentido 3' ó 5'), 2 μ l de agua y se dejó 30 min a 37 °C.

A continuación se agregaron 5 μ l de la siguiente mezcla:

12.0 μ l de 10 mM de DTT, 9.6 μ l de mezcla de marcaje, 12.0 μ l de ATP α ³⁵S, 3.0 μ l de 13 unidades/ μ l de secuenasa, 1.6 μ l de 14 unidades/ μ l de pirofosfatasa y 24.0 μ l de 10 mM Tris- HCl para diluir a la enzima. Con lo anterior se deja incubando durante 5 min a temperatura ambiente.

Para cada reacción de secuencia (o de transcripción) se colocaron cuatro tubos Eppendorf con 2.5 μ l de cada uno de los nucleótidos (adenina, guanina, citocina y timina). De la mezcla anterior se añadió a cada tubo 3.5 μ l y se dejó 10 min a 37 °C. Pasado este tiempo, a cada tubo se le añadieron 4.0 μ l de solución para detener la reacción de transcripción y se cargaron a un gel de de poliacrilamida realizado de la siguiente manera:

Gel de secuencia:

Previo a la polimerización del gel, se prepararon los vidrios de la siguiente manera: cada uno fue limpiado con agua y jabón y con metanol y acetona, para después poner 700 μ l de silicón (todo esto se realizó con guantes). Cada vidrio medía 20.5 X 60 cm, los separadores fueron de 0.4 mm y se utilizó un peine para poner muestras de 2 μ l de cada nucleótido.

El gel contenía 6.0% de acrilamida, 8 M de urea y TBE 1X (final). Se mezcló muy bien hasta disolver la urea y se pasó através de un filtro Millipore de 0.4 μ m. A continuación se agregaron 50 μ l de TEMED (no diluido) para una solución de 50 ml de acrilamida y 250 μ l de 10% de persulfato de amonio, preparado en el momento. Inmediatamente se vació esta mezcla al gel por medio de una jeringa y aguja.

Una vez polimerizado el gel, se colocó en la cámara modelo SA de BRL con amortiguador TBE en proporción 1X arriba y 1.5X abajo. Se dejó calentar y se cargó la muestra con la secuencia ACGT. El gel se dejó correr durante 4 hrs a 2,000 V y

se volvió a cargar la muestra de secuencia y se dejó correr el gel durante 4 hrs ó hasta que saliera el segundo colorante. Una vez terminada la electroforesis se sacó el gel colocándolo sobre el un rectángulo de papel filtro Whatman 3MM. Se colocó otro rectángulo del mismo tamaño y se puso en un secador de geles conectado a un Speed Vac SC110 Savant para ser secado. Después de esto, se colocó en una caja de exposición con película Kodak X-OMAT AR del tamaño del gel y se guardó en oscuridad toda la noche para revelar al día siguiente. La película fue sometida a solución reveladora durante 4 min, se lavó con agua corriente durante 30 seg y se fijó durante 4 min, para darle un lavado final con agua corriente. La película después de secada se utilizó para leer la secuencia obtenida.

Una vez leída la secuencia se procedió al análisis de la misma, por medio del paquete de computación GCG (sequence analysis Software package) de Genetics Computer Group (Madison WI), para poder reconocer uno de los desoxiligonucleótidos diseñados para el PCR y a partir de él seguir la lectura de la secuencia, alternativamente se buscó un sitio para Eco RI en donde se clonó el fragmento amplificado del gene del citocromo c_1 de *Polytomella spp.*

La secuencia obtenida fue comparada con otras secuencias obtenidas para citocromos c_1 ya reportados para establecer las semejanzas y diferencias que existieran entre éstos y el de *Polytomella spp.*

Tabla VIII: Segmento de las secuencias de aminoácidos del citocromo tipo c_1 de diferentes organismos, para mostrar la región consenso cercana al extremo carboxilo de estas proteínas.

Secuencia Conservada en la Región Carboxilo Terminal:

	171							180										
E:	D	D	M	I	E	Y	E	D	G	T	P	A	S	V	P	Q	M	A
Y:	D	D	M	V	E	Y	E	D	G	T	P	A	T	T	S	Q	M	A
Nc:	D	G	L	V	D	Y	E	D	G	T	P	A	S	T	S	Q	M	A
Pc:	D	D	Q	V	T	Y	E	D	G	T	P	A	T	V	D	Q	M	A
Rc:	D	D	L	V	T	Y	E	D	G	T	P	A	T	V	D	Q	M	G
	*					*	*	*	*	*	*	*				*	*	

*** : aminoácidos idénticos.**

E: Euglena gracilis; Y: Saccharomyces cerevisiae; Nc: Neurospora crassa; Pc: Paracoccus denitrificans; Rc: Rhodobacter capsulatus.

Resultados:

Aislamiento de las mitocondrias de *Polytomella* spp:

Se hizo crecer a la especie *Polytomella* spp en cultivos de 24 l con vitamina B₁ y B₁₂ durante 48 h y a 25-30 °C de temperatura. La figura 10 muestra una célula de *Polytomella* spp, crecida en nuestro laboratorio. Estos cultivos dieron alrededor de 2.1 g de células por litro de cultivo. La extracción de las mitocondrias fue relativamente sencilla, ya que la carencia de pared celular permite el rompimiento de las células con un homogenizador de vidrio y un vástago de teflón. Por cada 24 l de cultivo se obtuvieron aproximadamente 50 mg de proteína mitocondrial.

En el pasado, la caracterización de las mitocondrias de *Polytomella* spp sólo llegó a su aislamiento y estudio espectrofotométrico, sin una aproximación a la composición polipeptídica de los complejos respiratorios (Lloyd y Chance, 1968). El espectro obtenido de las mitocondrias aisladas de este organismo se muestra en la figura 11 donde se aprecian los picos máximos de absorción para los citocromos. El citocromo aa₃ presenta un pico α a 608.6 nm, el citocromo b a 566.7 nm y el citocromo c₁ a 553.1 nm. También es posible observar la región Soret de los mismos. Siguiendo la técnica descrita por Shägger y col., en 1986, es posible conocer actualmente de una manera aproximada, la composición polipeptídica de cada uno de los complejos mitocondriales incluyendo a los que contienen citocromos. Cada complejo respiratorio migrará como una banda discreta de acuerdo con su masa molecular total en una primera dimensión. En una segunda dimensión, se corre el gel en condiciones desnaturalizantes con SDS, colocando encima de él, la banda del primero. De esta manera cada complejo se resuelve en las subunidades que lo componen. En la figura 12 se aprecia lo anterior. En este caso, el primer complejo que se puede identificar por su elevada composición de subunidades y en consecuencia por su alta masa molecular, es la NADH deshidrogenasa. A continuación, migra el complejo III mitocondrial y después la ATPasa. Cabe mencionar que en las mitocondrias del corazón de bovino, después de la NADH deshidrogenasa se observa la ATPasa y a continuación el complejo de citocromos bc₁ (Shägger y von Jagow, 1991). En el gel de la segunda dimensión se pueden apreciar al menos 6 subunidades del complejo bc₁, cuyas masas moleculares aparentes están señalados en la figura.

Solubilización y fraccionamiento de las mitocondrias de *Polytomella* spp:

En primer lugar, se titularon las concentraciones del detergente lauril maltósido

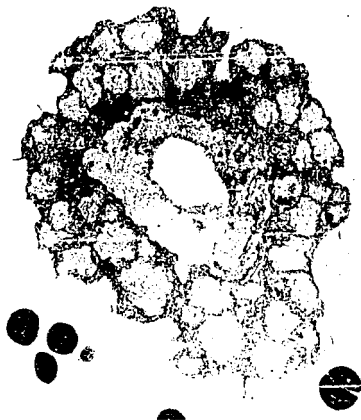


Figura 10a: Fotografía de microscopía electrónica de una célula de *Polytomella spp* crecida en el laboratorio. El corte es transversal, por lo que se pueden apreciar las mitocondrias y los gránulos de almidón que contiene este organismo.

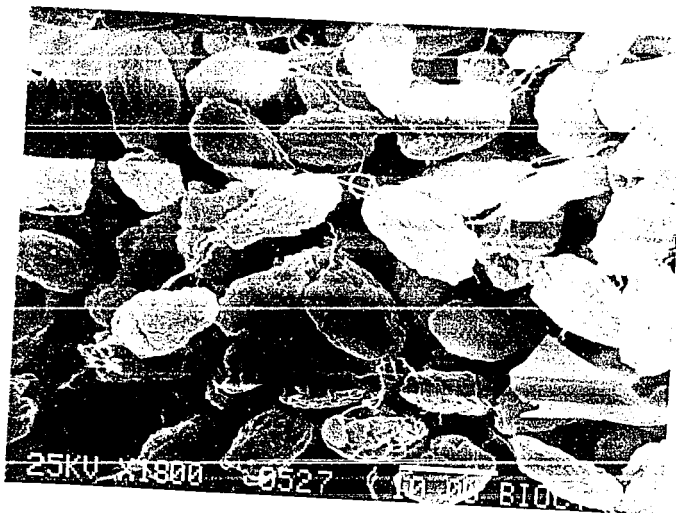


Figura 10b: Fotografía de microscopía electrónica de barrido de un grupo de células de *Polytomella spp* crecidas en el laboratorio para mostrar la forma de las células.

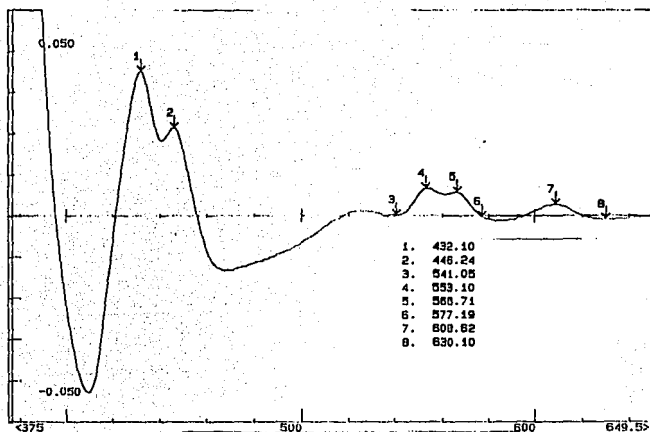


Figura 11: Espectro diferencial (reducido menos oxidado) de la fracción mitocondrial de células de *Polytomella spp.* En este espectro se señalan los máximos de absorción para citocromo aa_3 , b y c_1 :

pico γ de los citocromos b y c_1 : 432.1 nm,

pico γ del citocromo aa_3 : 446.2 nm,

pico α del citocromo c_1 : 553.1 nm,

pico α b del citocromo: 566.7 nm,

pico α aa_3 del citocromo: 608.6 nm.

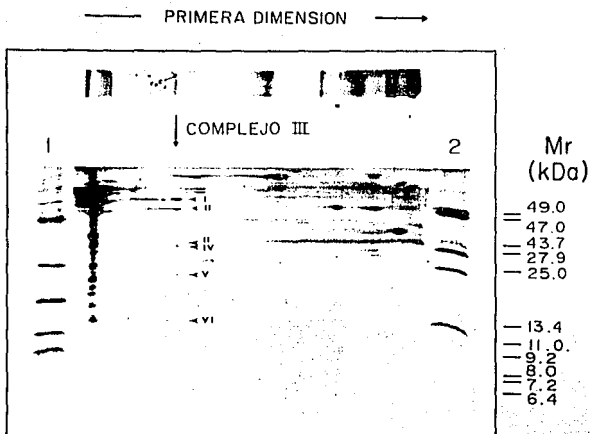


Figura 12: Gel azul de los complejos mitocondriales de *Polytomella spp*, realizado con la técnica reportada por Shägger y von Jagow (1991). En la figura se señala el gel de la primera dimensión, corrido en condiciones nativas (4 °C) para separar los complejos respiratorios de mitocondrias solubilizadas con lauril maltósido y ácido 6-amino capríco y el gel de segunda dimensión, realizado en condiciones desnaturalizantes para separar los diferentes polipéptidos que los componen. Las flechas que indican la migración de las subunidades del complejo bc₁. Las masas moleculares colocadas a la derecha del gel corresponden a las subunidades del complejo bc₁ de mitocondrias de corazón de bovino.

(LM) a las cuales era posible solubilizar al complejo (desde 0.5 hasta 2 g de detergente por gramo de proteína mitocondrial). Sólo al utilizar la relación 2g de LM por g de proteína se obtuvo una buena solubilización. A continuación, este solubilizado se centrifugó y el sobrenadante se dializó y se cargó a una columna de DEAE-Biogel A, siguiendo la técnica descrita por Ljungdahl y col., (1987). La cromatografía realizada produce cuatro fracciones principales, señaladas en el perfil de elución de la *figura 13*:

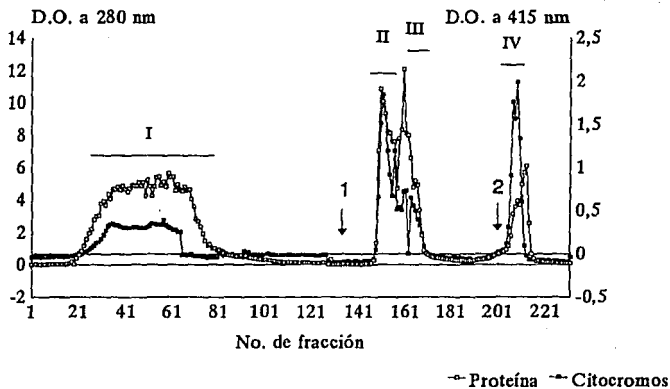
- I.- de color amarillo claro, sale en el volumen de exclusión de la columna.
- II.- de color blanquecino, turbia, que se obtiene al lavar la columna con el amortiguador conteniendo 150 mM de NaCl.
- III.- fracción de color verde, transparente. Aparece después de la fracción turbia y se obtiene con el mismo amortiguador conteniendo 150 mM de NaCl.
- IV.- de color rojo-naranja, se obtiene cuando se aplica el amortiguador de equilibrar conteniendo 400 mM de NaCl.

La primera y la segunda fracciones presentan picos de absorción a 280 nm mientras que la densidad óptica obtenida a 415 nm es nula en la fracción I y muy baja en el caso de la fracción II. Para las otras dos fracciones se presenta una lectura de densidad óptica alta para ambas longitudes de onda, señal de que se habían purificado dos tipos de citocromos. De estas dos fracciones se realizaron espectros de absorción entre 350 y 650 nm los cuales revelaron que la fracción III de la columna de DEAE-Biogel A, correspondía a una citocromo oxidasa y la fracción IV al complejo bc_1 . La *figura 14* muestra los espectros de absorción de las fracciones I (turbia y transparente), II y III, para el complejo bc_1 , el espectro se muestra mas adelante. Las fracciones caracterizables por su espectro fueron la III y la IV, que corresponden a la citocromo oxidasa y al complejo bc_1 , respectivamente.

Los geles de poliacrilamida SDS para estas fracciones se muestran en la *figura 15*. La primera fracción obtenida de la cromatografía reveló la presencia de una banda de masa molecular alta y la fracción II se resolvió en los geles como un conjunto de 22 polipéptidos, todos ellos aparentemente en la misma proporción, cuyas masas moleculares fueron semejantes a los de la ATPasa (F_0F_1) de bovino. La citocromo oxidasa mostró un gran contenido de subunidades, muchos de ellos probables contaminantes. El complejo bc_1 mostró al menos 6 subunidades. Podemos concluir que al solubilizar las mitocondrias con lauril maltósido se obtienen tres fracciones bien caracterizadas: una de ATPasa, otra de citocromo oxidasa tipo aa₃ y finalmente, una del complejo bc_1 (fracciones II, III y IV en el orden establecido).

La fracción I se recromatografió en una columna de carboximetil Biogel A, buscando un citocromo de masa molecular alta. Sólo se obtuvieron dos fracciones, una turbia y a continuación una clara, ambas en el volumen de exclusión de la columna y cuyo perfil se muestra en *figura 16a*. Para la fracción III se utilizó una columna de DEAE-Sefarosa. En el volumen de exclusión se obtuvieron tres picos de proteína, uno

Cromatografía del solubilizado de lauril maltósido de mitocondrias de *Polytomella spp*



(1) 150 mM de NaCl; (2) 400 mM de NaCl

Figura 13: Perfil de la columna de DEAE-Biogel A. Las flecha indican la fracción donde se colocaron los amortiguadores de lavado, y de elución con 150 ó 400 mM de NaCl. a.- fracción del volumen de exclusión, b.- fracción turbia, c.- fracción de la citocromo oxidasa, d.- fracción del complejo bc₁. En todos los casos, se muestra la absorbancia a 280 nm y a 415 nm.

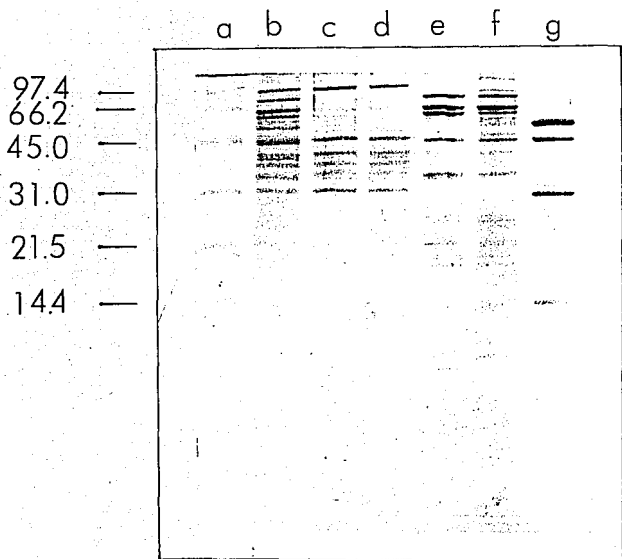


Figura 15: Electroforesis con SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación del complejo bc₁ de *Polytomella* spp, comparadas con los pesos moleculares entre 97,000 a 14,500 daltones. El orden por carriles es el siguiente: a.- 5 μ l de estándares de peso molecular. b.- 20 μ g de sobrenadante del solubilizado, c y d.- 20 μ g de la fracción excluida al cargar el sobrenadante del extracto con lauril maltósido, e.- fracción turbia (20 μ g) obtenida al añadir un amortiguador con 150 mM de NaCl, f.- fracción de oxidasa (20 μ g) y g.- 20 μ g de complejo bc₁.

Perfil de elución de la columna de Carboximetil Biogel A.

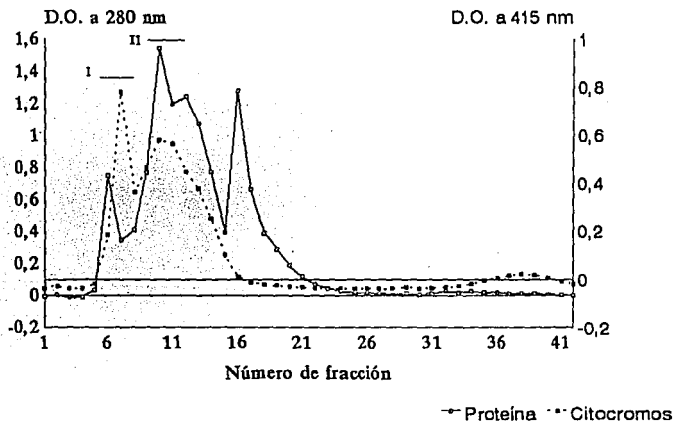
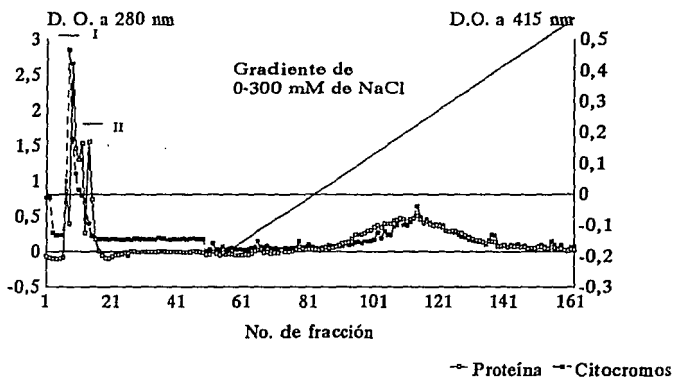


Figura 16a: Perfil de la columna de Carboximetil-Biogel A para mostrar las dos fracciones en las que se obtuvo un valor alto de densidad óptica a 280 y 415 nm. En esta cromatografía las dos fracciones se obtuvieron en el volumen de exclusión.

Cromatografía de la fracción enriquecida del complejo IV de *Polytomella* spp



DEAE-Sefarosa CL6B

Figura 16b: Perfil de la cromatografía de DEAE-Sefarosa CL6B para mostrar los picos de proteína obtenidos en el volumen de exclusión así como el gradiente de 0-300 mM de NaCl realizado para purificar a la citocromo oxidasa de *Polytomella* spp.

de ellos con poca densidad óptica a 415 nm y el resto con ninguna. A continuación se corrió un gradiente de 0 a 300 mM de NaCl y se obtuvo una fracción con valores de densidad óptica alta para citocromos y proteína. En la *figura 16b* se muestra el perfil de elución de la cromatografía, mostrando el volumen de exclusión y la salida de la proteína con el gradiente realizado. Los geles de poliacrilamida-SDS que se presentan en la *figura 17* indicaron el enriquecimiento de una banda de masa molecular alta en la fracción obtenida de la columna de DEAE-Sefarosa, después de correr el gradiente de 0 a 300 mM de NaCl. Las fracciones obtenidas en la cromatografía de Carboximetil-Biogel A no mostraron diferencias.

Los espectros de absorción de 350 a 650 nm no revelaron la identidad de las fracciones obtenidas en la columna de carboximetil Biogel A ni de aquellas excluidas en la cromatografía de DEAE-Sefarosa. Sin embargo, para la fracción obtenida del gradiente se obtuvo el espectro de absorción de la citocromo oxidasa.

Se midió la actividad de citocromo c oxidasa, de succinato deshidrogenasa y de NADH-oxidoreductasa en el sobrenadante del solubilizado con lauril maltósido, sólomente se obtuvo actividad de citocromo oxidasa.

Para la citocromo oxidasa extraída de la columna de DEAE-Biogel A se obtuvo una actividad promedio de 4.18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína la cual es completamente abatible por KCN. La oxidasa purificada después de un gradiente en la columna de DEAE-Sefarosa, obtuvo una actividad promedio de 3.86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. En este caso se obtuvieron 1.17 nmol de hemo $a_{2\gamma}$ /mg de proteína, lo que equivale a un 12 % de pureza. La fracción del complejo bc_1 mostró actividad de citocromo oxidasa (1.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).

El complejo de citocromos bc_1 de *Polytomella* spp:

La *tabla X* muestra el rendimiento obtenido en los pasos de purificación más importantes, tanto en mg de proteína como en actividad específica y contenido de citocromo c. La actividad específica se incrementó 100 veces con respecto a la inicial obtenida en mitocondrias; en número de recambio significó una actividad de 325 seg^{-1} (μmol de citocromo c reducido/ μmol de citocromo c, por segundo) después de pasar por cromatografía al extracto de lauril maltósido. Sin embargo, la recuperación de la proteína del complejo bc_1 fue del 2% (30 mg finales). La actividad fue sensible a los inhibidores clásicos del complejo bc_1 , antimicina y mixotiazol (97.3% con 1 μM y 99.7% con 20.5 μM , respectivamente).

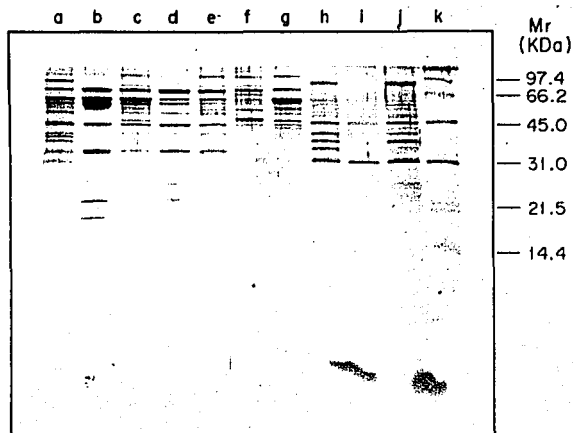


Figura 17: Electroforesis en poliacrilamida-SDS con la técnica de Shägger y col., 1986 para observar las fracciones obtenidas en la cromatografía de DEAE-Sefarosa y de CM- Biogel A. En todos los casos se pusieron 30 μ l de protefna (1mg/ml).

- a.- sobrenadante del solubilizado,
- b.- fracción turbia de la columna de DEAE-Biogel A,
- c.- fracción de oxidasa de la columna de DEAE-Biogel A.
- d-f- fracciones obtenidas en el volumen de exclusión de la columna de DEAE-Sefarosa CL6B.
- g.- fracción concentrada del gradiente de 0-300 mM de NaCl de la columna de DEAE-Sefarosa CL6B.
- h.- volumen de exclusión de la columna de DEAE-Biogel A.
- i.- primera fracción del volumen de exclusión de la columna de CM-Biogel A.
- j.- segunda fracción del volumen de exclusión de la columna de CM-Biogel A.
- k.- estándares de masa molecular.

Tabla X: Purificación del complejo bc₁ de *Polytomella spp*:

Fracción	Proteína mg	Rendimiento %	Actividad Específica unidades/mg	citocromo c ₁ nmol de hemo/ mg de proteína
Mitocondrias	1,500	100.00	0.53	0.12
Extracto de Lauril Maltósido	696	46.40	8.90	1.90
DEAE-Biogel A	30	2.00	62.80	2.70

Titulación de la actividad del complejo bc₁ de *Polytomella spp* en presencia de antimicina A:

Para obtener el valor de actividad del complejo bc₁ con cantidades crecientes de antimicina, fue necesario modificar el diseño experimental ya que al titular con antimicina se obtenía una inhibición casi total al agregar concentraciones pico molares del inhibidor. Esta inhibición se debió a la cantidad de etanol que se estaba añadiendo provocaba la desnaturalización de la proteína y por tanto, la pérdida de la actividad. De acuerdo con los cálculos realizados, la cantidad de inhibidor añadida en este momento era insuficiente para inhibir a todas las moléculas de complejo bc₁ en el volumen con el que se trabajó (1 ml de 1 μ M de bc₁). Por lo anterior, fue necesario buscar la manera de agregar sólo un 2% total de etanol a una solución del complejo bc₁ más diluida. Para cada medición, se activó el complejo bc₁ diluyendo con el amortiguador para activar (Kubota y col., 1992) a 1 μ M, después de una hora, se diluyó 10 veces con el mismo amortiguador para activar y se le agregaron 50 μ l de NaCN, 20 mM. A continuación se agregó la antimicina a la concentración más baja a utilizar y se tomaron 100 μ l de esta mezcla para medir actividad en un volumen final de 2.0 ml, con 30 μ M de citocromo c y 15 μ M de DBH. Para cada concentración de antimicina se realizó lo anterior, tomando en cuenta el volumen de etanol añadido. La *tabla XI* muestra las concentraciones finales de antimicina en 2.0 ml de 0.1 μ M del complejo bc₁ de *Polytomella spp*, y en la *figura 18* se muestra la gráfica obtenida para esta titulación, así como la extrapolación a 0 % de actividad.

Tabla XI: Actividad del complejo bc₁ de *Polytomella spp* y la concentración final de antimicina añadida al complejo (0.1 µM, en 2.0 ml). La actividad es el promedio de tres experimentos diferentes.

[anti] / [bc ₁] mM	mol anti/ mol bc ₁	Actividad µmol/min/mg prot			Promedio de Actividad	% de Actividad
0/100	0	397.2 (100)	596.0 (100)	537.51 (100)	510.2	100.00
10.5/99.9	0.11	280.2*	514.12 (86)	514.12 (96)	436.1	91.0
16.0/99.8	0.16	357.0 (90)	476.15 (80)	512.00 (95)	448.4	88.0
21/99.8	0.22	357.0 (90)	392.73*	440.4 (82)	396.7	86.0
28.1/99.7	0.42	309.32 (78)	452.32 (76)	428.5 (80)	396.7	78.0
41.4/99.6	0.42	261.65 (66)	357.00 (60)	357.00 (66)	325.2	64.0
55.7/99.4	0.56	249.73 (63)	273.57 (46)	214.00 (40)	245.8	50.0
94.2/99.2	0.95	35.24 (9)	28.68 (5)	12.00 (2)	25.3	5.0
135.8/ 98.8	1.37	14.38 (4)	16.77 (3)	11.40 (2)	14.2	3.0
181.3/ 98.4	1.84	16.77 (4)	11.40 (2)	11.40 (2)	13.2	2.6
281.3/ 98.3	2.86	15.00 (4)	16.77 (3)	9.42 (2)	13.7	3.0
503.3/ 98.0	5.13	---	8.42 (1.5)	9.42 (2)	8.9	2.0
1,128.3/ 97.5	11.58	15.30 (4)	8.59 (1.5)	-----	11.9	2.0

[] = concentración.

* estos valores no se tomaron en cuenta para el promedio.

Los valores entre paréntesis son el por ciento de actividad para cada ensayo.

Titulación de la actividad del complejo bc₁ de *Polytomella spp*

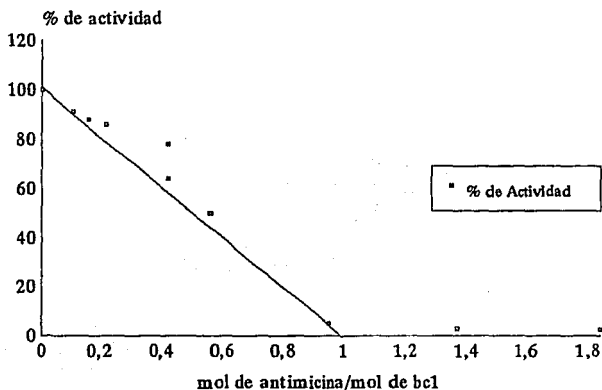


Figura 18: Titulación de la actividad del complejo bc₁ de *Polytomella spp* en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor antimiticina.

Spectros de absorción del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*

En la *tabla XII* se presentan los picos de absorción que se obtienen con el espectro reducido con diferentes sustratos y además los espectros diferenciales. Se pueden comparar estos datos con los espectros de absorción del complejo oxidado y reducido con diferentes sustratos:

Tabla XII: Longitudes de onda (en nm) en las que se encontraron los máximos de absorción para los picos γ , β , y α del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*

pico:	Asc vs. oxidado	DBH vs oxidado	Ditio vs oxidado	DBH vs Asc.	Ditio vs Asc.	Ditio vs DBH
γ	422.1	431.6	431.0	432.6	432.6	432.6
β	524.3	523.8	527.3		539.0	
α_c	553.6	553.6	553.9		553.1	553.6
α_b					558.9*	558.9*
α_L		568.3	568.1	568.3	567.8	567.2

Asc: ascorbato 1mM; DBH: decil ubiquinona; Ditio: Ditionita,

*= hombro.

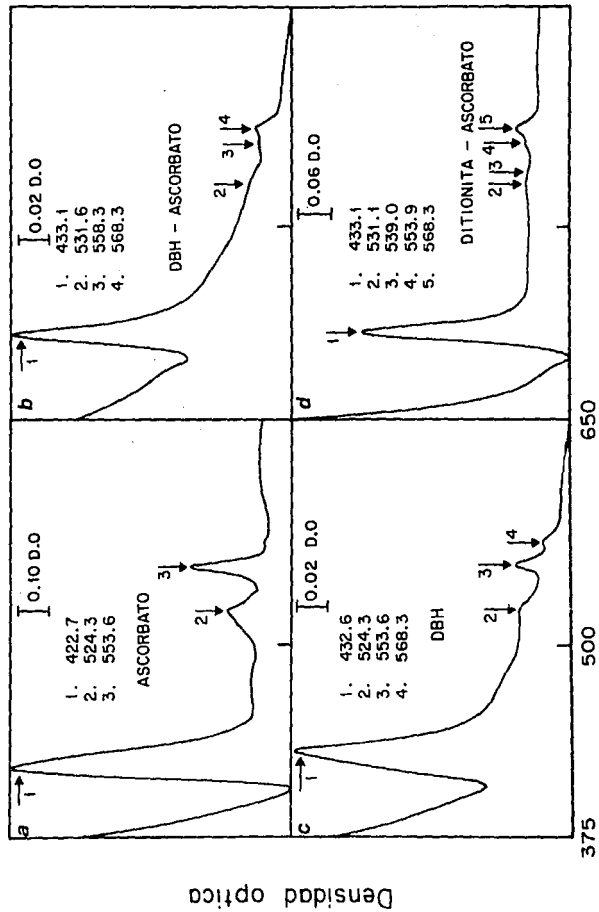
El espectro de absorción del complejo bc₁ en su forma oxidada presenta un pico máximo a 415.5-416.9 nm, en la región denominada Soret (pico γ). Cuando se reduce al complejo con ditionita, este pico se corre a 431.6 nm y aparecen los picos α de los citocromos b a 567.8- 568 nm y c₁ a 553.6-553.9 nm (ver *figura 19a*), los cuales se muestran en el recuadro, así como un pico de absorción a 525.33 nm, de la región de picos β de los citocromos b y c₁. En algunas preparaciones se pudo observar un pequeño hombro a 600 nm, evidenciando la presencia del citocromo aa₃, que se pudo eliminar en posteriores preparaciones. Cuando se redujo preferentemente al citocromo c₁ con ascorbato y se le restó el espectro oxidado, se obtuvo el pico α de este citocromo a 553 nm aproximadamente. Cabe señalar que no se observó un corrimiento en el espectro del mismo, como en el caso del citocromo c₁ aislado de mitocondrias de *Euglena gracilis* y de *Crithidia fasciculata* (ver *figura 19b*).

El pico α del citocromo b puede evidenciarse al realizar un espectro diferencial, reduciendo al complejo bc₁ con 1mM de ascorbato en la cubeta de referencia y con ditionita en la de muestra, como se enseña en la *figura 19c*. En este caso, se obtuvo un pico α de absorción a 566.5- 567.8 nm, diferente del que se obtiene en el complejo

Figura 19: Espectros de absorción del complejo bc₁ de *Polytomella spp* utilizando diferentes agentes reductores:

- a.- Espectro diferencial, reducido con ascorbato contra oxidado,
- b.- Espectro diferencial, reducido con DBH menos ascorbato.
- c.- Espectro diferencial, reducido con DBH menos oxidado.
- d.- Espectro diferencial, reducido con ditionita menos reducido con ascorbato.

Espectros diferenciales del bc₁ de Polytomella spp.



aislado de corazón de bovino, el cual absorbe a 562 nm. Sin embargo, en el mismo espectro se puede observar un hombro a 558.9 nm, que se encuentra en la región de absorción del pico α del citocromo b. Esto puede observarse también en el espectro diferencial reducido con ditionita menos reducido con DBH, que se presenta en la *figura 19d*, donde se muestra el pico de absorción a 567.2 nm y un hombro a 558.9 nm. El pico de absorción, se ha identificado como el hemo de bajo potencial, mientras que el hombro pertenece al hemo b de alto potencial.

Otra de las características interesantes del espectro de absorción del complejo de citocromos bc₁ es el corrimiento característico hacia el rojo que se obtiene al añadir a los inhibidores antimicina y mixotiazol. El efecto fue estudiado por von Jagow y col., (1984) (para una revisión ver von Jagow y Link, 1986). Estos antibióticos son capaces de bloquear el paso de electrones en el complejo bc₁ y tienen una constante de afinidad muy alta por el complejo y se sabe que su unión es en el citocromo b. La *tabla XIII* muestra los picos de absorción obtenidos al agregar mixotiazol ó antimicina al complejo bc₁ reducido con ditionita, así como el efecto de ambos inhibidores. Debido a que el mixotiazol produce una deriva en la absorción, el efecto del inhibidor no fue tan claro en espectros directos, por lo que en este caso, se presenta una comparación de los espectros directos y diferenciales para obtener el efecto del mixotiazol.

El espectro de absorción para el complejo inhibido con antimicina (*figura 20a*) muestra la existencia de un desplazamiento hacia el azul en el pico de absorción a 566 nm, ya que precede a un valle a 577 nm. Esto puede observarse también en el espectro de absorción que se obtiene al agregar ambos inhibidores (ver *figura 20c* y comparar los datos en la *tabla XIII*), existe un pico a 561.3 nm evidenciando este corrimiento hacia el azul.

Tabla XIII: Efecto del mixotiazol y la antimicina sobre el espectro de absorción del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*, se muestran los valores de las longitudes de onda (en nm) en los que se observó un máximo de absorción (en algunos casos se señalan los mínimos de absorción importantes para la discusión).

pico	Ditio+Anti-Ditio	Ditio+Anti+Mixo-Mixo	Mixo - l.b.	Mixo + Anti
γ	438.0	437.0	437.3	439.9
α b	p:568.0*	p:568.1*	v:563.4	p:561.3
	v:577.0	v:577.0	p:578.8	v:568.1
				p:574.9

Ditio: ditionita; mixo: mixotiazol, l.b.: línea base, realizada restando la cubeta de muestra menos la de referencia ambas con el complejo bc₁ reducido con ditionita.

* promedio de varios espectros. v: valle; p: pico

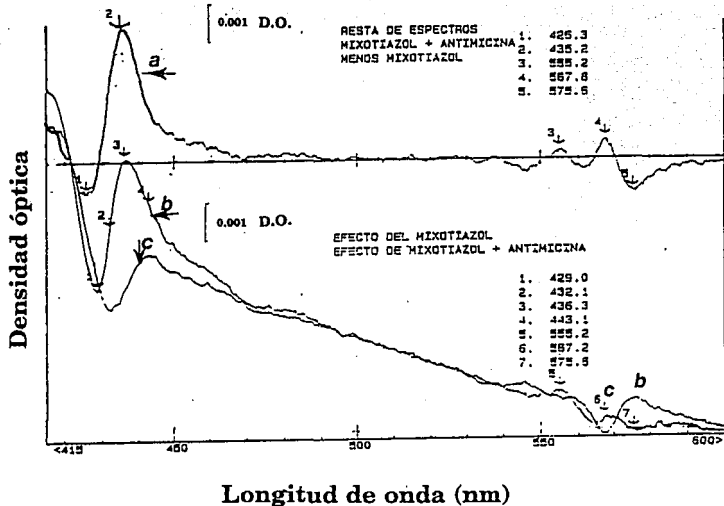


Figura 20: Espectros diferenciales del complejo bc₁ de *Polytomella spp* reducido con ditionita en la cubeta de muestra y referencia para obtener el efecto de los inhibidores mixotiazol y antimicina:

a.- Espectro diferencial para ver el efecto de la antimicina: antimicina+mixotiazol menos mixotiazol.

b.- Espectro diferencial mostrando el efecto del mixotiazol: mixotiazol menos reducido con ditionita.

c.- Espectro diferencial con el efecto del mixotiazol y la antimicina juntos: antimicina + mixotiazol menos reducido con ditionita.

En la *tabla XIII* se puede apreciar que el pico y de los citocromos está desplazado 5 nm aproximadamente hacia el rojo con mixotiazol. Así mismo, los espectros con mixotiazol (ver *figura 20b*), tanto directos como diferenciales, muestran un valle entre 563 y 567 nm precediendo a un pico de absorción entre 575 y 580 nm, lo que refleja un corrimiento hacia el rojo. Sin embargo, de manera comparativa se puede observar que, donde existe un valle en los espectros de absorción con mixotiazol, aparece un pico para el espectro con antimicina (566-568 nm). Este pico de absorción precede a un valle de absorción a 573-575 nm; lo que muestra un corrimiento hacia el azul en el espectro. El efecto de ambos inhibidores no se anula cuando se añaden ambos (ver *figura 20c* y *tabla XIII*), ya que se obtiene un pico de absorción a 561 nm, un valle a 568 nm y otro pico a 575 nm, lo cual indica un corrimiento hacia el azul y otro hacia el rojo. Esto es diferente de lo que se observa en el complejo aislado de corazón de bovino, donde ambos inhibidores producen un corrimiento hacia el rojo.

Polipéptidos del complejo bc_1 de *Polytomella spp*

El complejo bc_1 está compuesto por 10 subunidades distinguibles mediante un barrido densitométrico del gel de poliacrilamida-SDS que se muestra en la *figura 21*. Comparativamente, *Euglena gracilis* contiene 10 subunidades, al igual que *Sacharomyces cerevisiae*. En cambio, el de corazón de bovino posee 11 subunidades, como se muestra en el mismo gel. Por las masas moleculares aparentes obtenidos por el análisis del barrido densitométrico, es posible identificar a las subunidades I y II (6 subunidades estructurales), a la subunidad III ó citocromo b, a la subunidad IV ó citocromo c_1 y la subunidad V ó proteína hierro-azufre. El resto de las subunidades son semejantes en masa molecular aparente a las del complejo aislado de mitocondrias de corazón de bovino. La *tabla XIV* muestra las masas moleculares aparentes obtenidas.

Masa molecular del complejo:

La masa molecular del complejo bc_1 de *Polytomella spp*, obtenido por EGPA-SDS fue de 252.6 kDa (sumando las masas de las distintas subunidades), cercano a la del complejo aislado de corazón de bovino, que es de 247.8 kDa. Para conocer la masa molecular hidrodinámica decidimos utilizar una columna de filtración molecular de Sefacril S-300. La curva de calibración, utilizando un rango de masa molecular entre 29 y 669 kDa, se muestra en la *figura 22*. El valor obtenido para el complejo bc_1 de mitocondrias de corazón de bovino y de *Polytomella spp* fué de 537.6 kDa para el primero y de 256.3 kDa para el segundo, indicando que el complejo de bovino es dímérico mientras que el de *Polytomella spp* se comporta como un monómero.

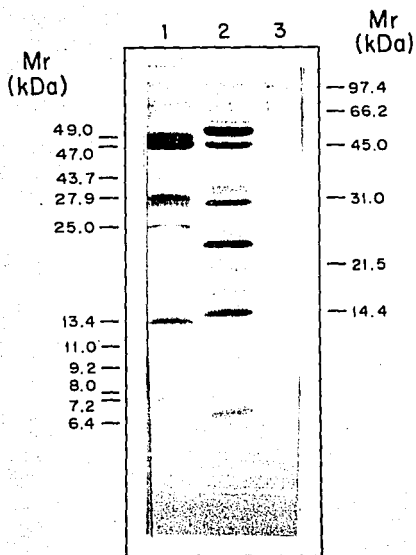


Figura 21: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Shägger y col., 1986) para comparar el complejo bc₁ de mitocondrias aisladas de corazón de bovino con el de *Polytomella* spp. Carril 1.- complejo bc₁ de corazón de bovino, 2.- complejo bc₁ de *Polytomella* spp y 3.- estándares de masa molecular en el rango de 97400-14400 Da.

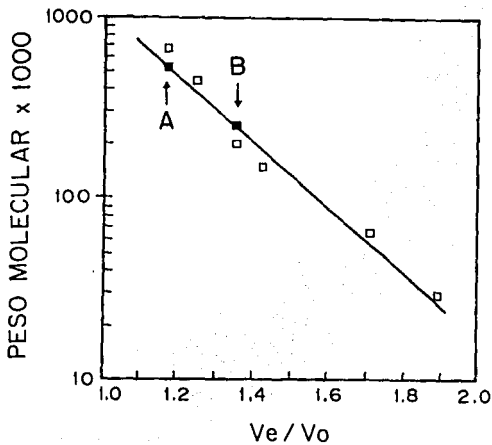


Figura 22: Curva de calibración obtenida por filtración molecular en una columna de Sefacril S-300 con estándares de masa molecular en un rango de 669 - 29 kDa. El complejo bc₁ de corazón de bovino es el punto A y el de *Polytomella spp* el punto B.

Tabla XIV: Composición polipeptídica de las subunidades del complejo bc₁ de *Polytomella spp* comparados con la obtenida en corazón de bovino y con datos obtenidos de la literatura para levadura (para una revisión ver Trumpower, 1990).

SUBUNIDAD	M a s s a m o l e c u l a r a p a r e n t e (kDa) e n <i>P o l y t o m e l l a</i> <i>s p p</i> :	M a s s a m o l e c u l a r r e l a t i v a (kDa) d e l e v a d u r a:	M a s s a m o l e c u l a r a p a r e n t e (kDa) e n b o v i n o:
I	50.1	50	49
II	46.2	45	47
III	35.5	42	43.7
IV	32.5	42	27.9
V	25.5	25	25
VI	16.1	14.5	13.4
VII	12.6	14.4	11
VIII	12.2	12.3	9.2
IX	11.0	7.3	8.0
X	10.9	8.5	7.2
XI	---	---	6.4

Detección y análisis de algunas de las subunidades del complejo de citocromos bc₁ de *Polytomella spp*:

En organismos fotosintéticos como *Solanum tuberosum* (papa) o en protistas como *Crithidia fasciculata*, se aislaron complejos bc, en los cuales existía una tercera subunidad estructural (Berry y col., 1991, Priest y Hajduk, 1992). Siendo el género *Polytomella* cercano a *C. fasciculata*, cabría la posibilidad de que también el bc₁ tuviera tres subunidades estructurales. En el caso del complejo de papa, es posible detectar las tres subunidades estructurales por electroforesis con el método de Laemmli (1970) pero no en el sistema Shägger y col., 1986, donde se observan sólo dos subunidades. Por lo tanto, se corrieron geles con el primer sistema para el bc₁ de *Polytomella spp*. En la figura 23A, se observa que el patrón polipeptídico de 10 subunidades y dos subunidades estructurales se conserva. Con el mismo sistema de electroforesis, se presentan tres subunidades para el complejo aislado de

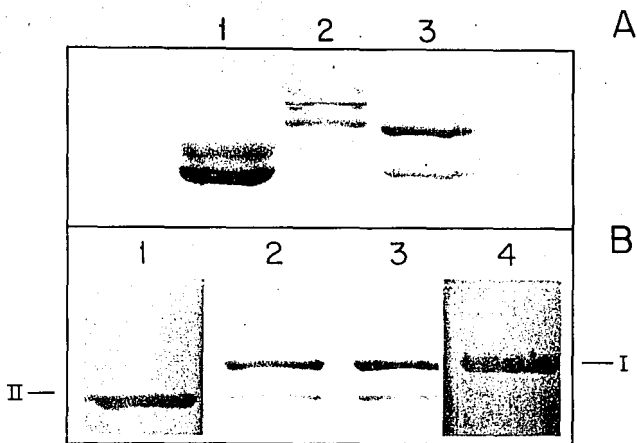


Figura 23 A.- Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS siguiendo el método de Laemmli para comparar la composición polipeptídica de las subunidades estructurales. En 1: corazón de bovino, 2: *Solanumtuberosum* (papa) y 3: *Polytomella spp.* **B.-** Gel de EGPA-SDS e inmunorréplica tipo Western para las subunidades estructurales del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*, líneas 1 y 4: anticuerpos específicos para la subunidad I y II, respectivamente, mostrados en inmunorréplica; líneas 2 y 3: gel que muestra a estas subunidades teñidas con azul de Coomassie.

mitocondrias de papa y dos para el complejo obtenido a partir de mitocondrias de corazón de bovino, confirmando la existencia de dos subunidades estructurales en *Polytomella spp.*

También se generaron y se purificaron anticuerpos contra las subunidades I y II del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*, que se muestran el panel B de la figura 23. Estos anticuerpos son específicos para cada una de las subunidades y no reconocieron a sus homólogas en el bc₁ de corazón de bovino, en una inmunorréplica tipo Western. Para poder determinar si existían similitudes entre las subunidades I y II de *Polytomella spp.*, con las subunidades I y II de otros organismos, se procedió a secuenciar los primeros aminoácidos del extremo amino terminal de ambas proteínas, como se muestra en la tabla XV:

Tabla XV: Análisis de la secuencia del extremo amino terminal de las subunidades I y II del complejo bc₁ de *Polytomella spp.*

	Ciclo																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B. I	X	Ile	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu					
B. II	X	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	X	Tyr	Ala	Pro	Phe	Phe	Pro	Ala	Ala

B: Subunidad, X: aminoácido no identificado

Los anticuerpos generados contra las subunidades de un complejo bc₁ pueden mostrar reacción cruzada con las subunidades de complejos bc₁ aislados de diferentes organismos. Esto indica regiones ó epítopos semejantes en las diferentes proteínas. Nosotros tratamos de encontrar una reacción cruzada con los anticuerpos generados contra diferentes subunidades del complejo bc₁ de corazón de bovino y del complejo bc₁ de *Polytomella spp.* Probamos anticuerpos dirigidos contra las seis primeras subunidades del complejo de corazón de bovino. En la figura 24 aparece la inmunorréplica con las subunidades con las que sí se obtuvo la reacción cruzada. Estas fueron: subunidad IV ó citocromo c₁, subunidad V ó proteína hierro-azufre y subunidad VI. En el caso de la proteína hierro-azufre, se obtuvo una señal de dos bandas, lo que manifiesta la proteólisis parcial de esta subunidad. Al aplicar inhibidores de proteasas a los amortiguadores de la columna de DEAE-Biogel A, se pudo evitar esta degradación.

Una de las reacciones que cataliza el hemo de los citocromos es la de peroxidasa, con la cual es posible teñir el hemo unido covalentemente a la proteína con tetrametilbencidina, dando un color verde-azul en geles desnaturalizantes de EGPA-SDS. El citocromo c₁ de *Polytomella spp.* pudo reconocerse de esta manera, confirmando la reacción cruzada obtenida con los anticuerpos específicos. El gel teñido

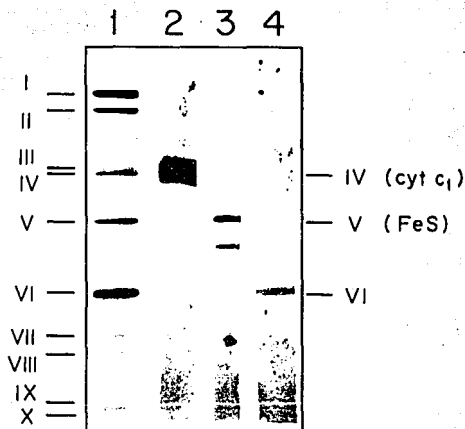


Figura 24: Inmunorréplica tipo Western del complejo bc₁ de *Polytomella spp* decorado con anticuerpos dirigidos contra las subunidades del complejo bc₁ de corazón de bovino. Línea 1: gel de EGPA-SDS para mostrar las subunidades del complejo de *Polytomella spp*, línea 2: inmunotinción con el anticuerpo contra citocromo c₁ de corazón de bovino, línea 3: anticuerpo contra la subunidad V y línea 4: anticuerpo contra la subunidad VI.

con tetrametilbencidina se muestra en la *figura 25* en comparación con un gel corrido en las mismas condiciones y teñido con azul de Coomassie.

La reacción en presencia de tetrametilbencidina confirmó que el citocromo c_1 contenía un hemo covalentemente unido a la proteína. Sin embargo, esta tinción no establece si la unión es a través de uno o dos enlaces con cisteínas. El espectro de absorberencia muestra la ausencia de un corrimiento hacia el rojo al reducir a este citocromo con 1 mM de ascorbato. Lo anterior dirigía el estudio a conocer la secuencia de aminoácidos de la región de unión del grupo hemo para poder compararla a las mismas regiones en citocromos tipo c_1 de diferentes especies.

La secuencia de aminoácidos se obtuvo de manera indirecta por medio de la obtención y purificación del gene nuclear que codifica para este citocromo. Debido a que la obtención de ADN nuclear de *P. agilis* ya había sido reportada (Conner y col., 1989) fue posible purificar el gene del citocromo tipo c_1 por medio de la amplificación del mismo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Para la obtención del gen amplificado fue necesario el diseño de dos desoxioligonucleótidos. Del análisis de las secuencias de las regiones carboxilo-terminal (*tabla VIII*) se obtuvo una secuencia altamente conservada con la que se diseñó un desoxioligonucleótido para la región homóloga en el gen y la secuencia de los primeros 13 aminoácidos de la región amino-terminal del citocromo c_1 de *Polytomella spp* sirvió para construir el desoxioligonucleótido de esta región. La *figura 26* resume el análisis realizado para la elaboración de los dos desoxioligonucleótidos.

La amplificación el gene nuclear del citocromo c_1 de *Polytomella spp* dió lugar a un fragmento de 0.8 kb (kilobases) (ver *figura 27a*) de tamaño mayor a lo esperado (0.5 Kb). Considerando que los citocromos tienen 187 aminoácidos, lo que daría un tamaño de 560 bases traducido a ADN, el mayor tamaño era un indicador de que el gene del citocromo c_1 de *Polytomella spp*, contiene intrones.

Para poder secuenciar el fragmento del gene nuclear del citocromo c_1 fue necesario obtener mayor cantidad del mismo. Por lo que se clonó el fragmento en un vector de expresión para productos de PCR, que se expresó en la bacteria *Escherichia coli*. Esta estrategia permitió seleccionar aquellas colonias que crecieran en un medio con ampicilina, pues el plásmido lleva el gene que confiere la resistencia a este antibiótico y que no puedan degradar β -galactósido, por estar interrumpido el gene que codifica para la enzima β -galactosidasa con el fragmento de PCR insertado. Las colonias fueron de color blanco, las colonias en las que no se insertó el amplificado de PCR, fueron de color azul. En la *figura 27b* se muestra el fragmento de PCR clonado en el vector de expresión, con un tamaño de 4.9 kb y el fragmento de PCR de 0.8 kb.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos obtenida hasta el momento, se muestra en la *figura 28*. Hemos encontrado dos regiones de intrones en la secuencia

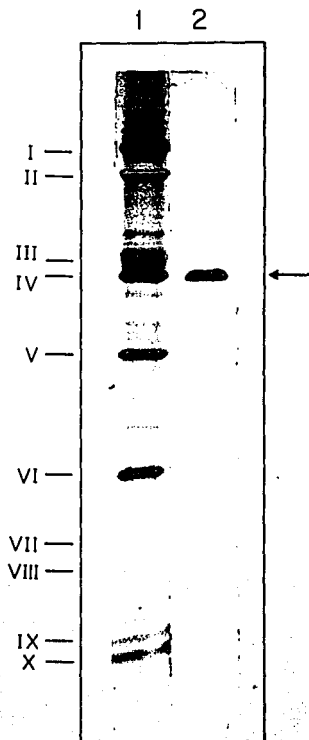


Figura 25: Tinción con tetrametilbencidina del hemo del citocromo tipo c_1 de *Polytomella spp.* Línea 1: gel teñido con azul de Coomassie para ver la posición de este citocromo con respecto al resto de las subunidades del complejo; línea 2: gel teñido con tetrametilbencidina.

ANALISIS DE LA SECUENCIA AMINO TERMINAL:

X E A X D X L H P V S Y P

desoxioligonucleótido diseñado:

**5' GGAG-GGA-TCC-GAU(C)-GGU(C)-CUU(C)-
CAU(C)-CCC-GUU(C)-UCU(C)-UAC-CCC 3'**

ANALISIS DE LA SECUENCIA CARBOXILO TERMINAL:

E(D) Y E D G T P A S V X X M A

desoxioligonucleótido diseñado:

**5 C-CAT-TCC-G(A)AG-G(A)GT(A)-G(A)GC-GGG-
G(A)GT-G(A)CC-GTC-CTC-GTA-C(A)TC 3'**

Figura 26: Análisis de las secuencias amino y carboxilo terminal del citocromo tipo c_1 para el diseño de los dos desoxioligonucleótidos utilizados para la amplificación del gene nuclear del citocromo c_1 de *Polytomella spp.*

a

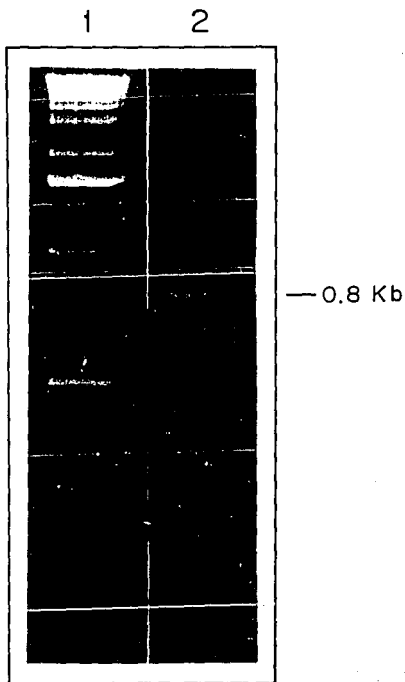


Figura 27 a: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Línea 1: pesos moleculares (kb ladder) con un valor de 12,216 bases a 506 bases; línea 2: producto obtenido de PCR cuyo peso molecular es de 0.8 Kb.

b

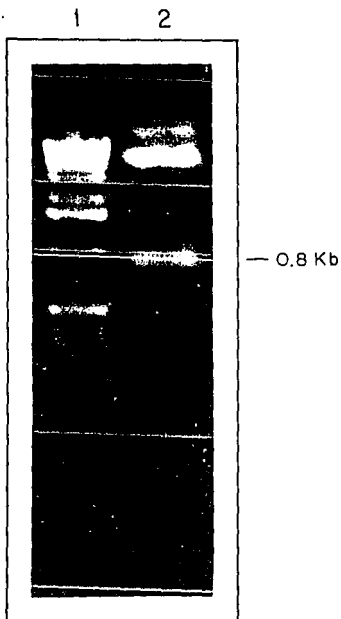


Figura 27 b: Gel de agarosa al 1% que muestra en la línea 1 estándares de peso molecular (12126- 500 pares de bases) y en la línea 2 el producto de ligación y clonación. La banda de mayor peso molecular es el plásmido de 2.9 Kb y la siguiente, de 0.8 Kb, representa el fragmento del gene nuclear del citocromo c_1 de *Polytomella spp.*

desoxioligonucleótido 5':

TTG	GAG	GGA	TCC	GAT	GGT	CTT	CAT	CCC	GTT	TCT	TAT	CCC
L	E	G	S	D	G	L	H	P	V	S	Y	P
TGG	TCC	CAG	GCG	GGC	ATT	GGC	AGC	TCC	TTT	GAC	GAG	TCT
W	S	H	E	G	I	G	S	S	F	D	H	S
GCC	ATT	CGC	CGT	GGT	CAC	CAG	GTT	TAT	ATT	TAA	TTT	TAT
A	I	R	R	G	H	Q	V	YINTRÓN.....			
CTA	AAT	ATT	GAT	AAT	GTT	TAG	ATG	GAG	TTT	AAT	AAG	GTT
.....INTRÓN.....												
GGA	TTG	ATT	TTT	TTC	CTT	ATT	TGC	TTT	TGT	AGG	TGT	GAG
.....INTRÓN.....												Q
CAG	GTT	TGC	GCT	GCT	TGC	CAC	TCC	ATG	AAC	TAC	ACC	CAT
Q	V	C	A	A	C	H	S	M	N	Y	T	H
TGG	CGT	CCA	GTT	GTC	GGT	ATT	TGC	TAC	ACT	GAG	GAT	GAG
W	R	P	V	V	G	I	C	Y	T	E	D	E
GCC	AAG	GCT	CTT	GCT	GCT	GAG	ACT	GSG	GTG	TGC	TAG	ATT
D	E	A	K	A	L	A	A	E	T	E	V	C
TTT	TTT	TTA	TTT	TAT	TAT	TGTINTRÓN.....					

Figura 28: Secuencia parcial del citocromo tipo c, de *Polytomella spp* en la que se muestra la región de unión del hemo a la protefna. En este caso, se presenta tanto la secuencia de aminoácidos como la de nucleótidos y se indican los sitios en los que se encontraron los intrones. La región de unión del hemo a la protefna se muestra con una línea continua.

de nucleótidos, lo que va de acuerdo con el resultado de un mayor número de bases con respecto a lo esperado. Al inicio de la secuencia se muestra uno de los desoxioligonucleótidos diseñados para la reacción de PCR y que también se utilizó en la reacción de secuencia. Cabe señalar que, para poder llegar a la secuencia de unión para el grupo hemo, se necesitó diseñar otro desoxioligonucleótido con la secuencia del intrón cercano a ella. Este desoxioligonucleótido sólo se utilizó en la reacción de secuenciación.

Por otro lado, cabe destacar que la secuencia de aminoácidos, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, para la región de unión al grupo hemo fue C A A C H del tipo C X X C H, secuencia consenso para este tipo de citocromos (ver *figura 29*). Esto va de acuerdo con la falta de un corrimiento hacia el rojo en el espectro de absorción del citocromo c_1 , reducido con ascorbato.

Al analizar la secuencia del producto de PCR del citocromo c_1 , encontramos que existe un intrón justo antes del sitio de unión del grupo hemo. Es interesante que éste se presenta antes del sitio C X X C H y que por tanto, puede tener alguna relevancia en el procesamiento del RNA.

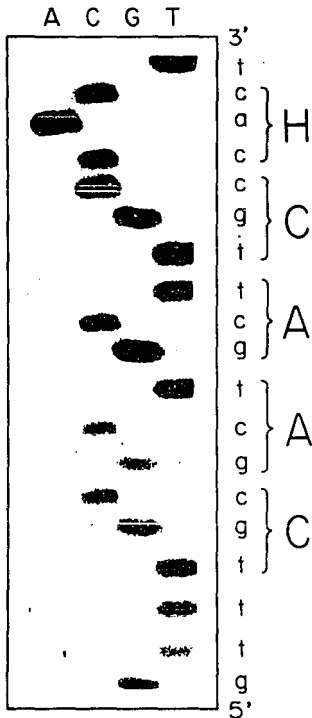


Figura 29: Fragmento del gel de la secuencia de nucleótidos que representa la región de unión del hemo al citocromo c_1 de *Polytomella spp.*, a la derecha se muestra la traducción de la secuencia a aminoácidos.

Discusión:

El complejo bc_1 de *Polytomella spp*:

Purificación:

En el presente trabajo, hemos logrado la purificación del complejo bc_1 de *Polytomella spp*, un alga incolora de la familia de las Chlamydomonadaceas. En esta familia también se clasifican las algas unicelulares fotosintéticas, cuyo representante *Chlamydomonas*, es el que le da nombre a la familia. Para caracterizar a las mitocondrias de *Polytomella spp*, se hizo un estudio espectrofotométrico. En los cuales se observaron los picos α de absorción de los citocromos que se encuentran en la mitocondria: a 553 nm el citocromo tipo c_1 , a 566.7 nm el del citocromo b y a 608.6 nm el del citocromo aa_3 (figura 11). Este espectro de absorción es igual al que obtuvieron Lloyd y Chance (1968) con mitocondrias de *Polytomella caeca*. Llama la atención la separación tan clara que se obtiene entre los picos α de los citocromos c_1 y b , la cual es difícil de observar en las mitocondrias de otros organismos. Este comportamiento se debe a un corrimiento en la banda de absorción de los hemos del citocromo b . A continuación, se decidió realizar una electroforesis nativa de acuerdo a Shägger y von Jagow (1991), para poder observar la composición polipeptídica de los diferentes complejos respiratorios en un gel. La solubilización de las mitocondrias en presencia de los detergentes ϵ -amino caproico y lauril maltósido permitieron resolver en un primer gel cada uno de los complejos respiratorios separados por su masa molecular global. Esta electroforesis se realiza en condiciones nativas a 40°C y con azul de Coomassie para proporcionarle carga a los complejos. La composición polipeptídica de cada uno se obtuvo con una segunda electroforesis, colocando una banda del primer gel sobre otro, el cual se corre en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS).

Para identificar a los complejos resueltos en el segundo gel, se emplearon los criterios de número total de subunidades y de subunidades características, reconocibles por su semejanza en el valor de la masa molecular con otros complejos respiratorios. El complejo de mayor masa molecular fue la NADH-deshidrogenasa con más de 20 subunidades, a continuación el complejo bc_1 y después las subunidades α y β de la ATPasa. Este patrón electroforético contrasta con el que se obtiene para las mitocondrias de corazón de bovino (Shägger y von Jagow, 1991), en el cual el complejo bc_1 migra después de la ATPasa, indicando que la masa molecular aparente del primero es menor al de la ATPasa. El segundo gel además muestra que el complejo bc_1 de *Polytomella spp* contiene al menos 6 subunidades identificables por su masa molecular aparente. La masa molecular aparente en kDa de estas subunidades se muestra en la figura 12, en la también se observa que su valor es semejante al de las mismas subunidades en el complejo de corazón de bovino.

Para poder solubilizar al complejo, se llegó a una relación de 2 g de lauril maltósido/g de proteína mitocondrial después de titular la cantidad de lauril maltósido (LM) desde 0.8 g hasta 2 g del detergente por g de proteína mitocondrial. La relación g de LM/g de proteína mitocondrial utilizada debe ser un factor importante para este resultado, debido a que para poder obtener al complejo bc, de levadura se empleó la relación 0.8 g de LM/g de proteína y para corazón de bovino de 1 g de LM/g de proteína. En ambos casos sólo se obtiene a la citocromo oxidasa (complejo IV) y al complejo bc₁ (complejo III) en este trabajo, además de las fracciones conteniendo a los complejos III y IV, obtuvimos otras dos fracciones. Una de ellas se obtuvo en el volúmen de exclusión de la cromatografía y corresponde a un citocromo. Al utilizar una fuerza iónica baja (150 mM de NaCl) se obtiene la fracción de la ATPasa y de la citocromo oxidasa y con una mayor fuerza iónica (400 mM de NaCl) purificamos al complejo bc₁, en ambos casos, no se utilizó un gradiente de fuerza iónica. Sin embargo, la fracción del complejo bc, posee actividad de citocromo oxidasa (1.7 μmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína). Esto es sorprendente debido a que el gel de la purificación del complejo bc₁ contiene pocas bandas contaminantes, que se tiñen levemente y que, al realizar el barrido densitométrico no se detectan bandas contaminantes en la misma proporción que las bandas que componen al complejo (ver *figura 15*). Además, los espectros visibles no muestran contaminación por citocromos aa, (*figura 14*). Probablemente, sea necesario realizar un gradiente que eliminara esta fracción contaminante.

Actividad del complejo bc₁:

La preparación obtenida mostró un enriquecimiento en su actividad específica, como se muestra en la *tabla X*. El porcentaje de recuperación de proteína con respecto al total es muy bajo, sin embargo, la actividad específica se incrementó en la fracción obtenida de la cromatografía en DEAE-Biogel A. El complejo bc₁ de *Polytomella spp*, tiene una actividad específica cercana a la que se obtiene en purificaciones de corazón de bovino (300 s⁻¹) la cual fue de 52.8 μmol de citocromo c reducido/min/mg de proteína equivalente a un número de recambio de 325 s⁻¹. En comparación, los complejos bc, purificados a partir de las mitocondrias de otros protozoarios presentan una actividad muy baja: 2.6 s⁻¹ para *Euglena gracilis* y 1.9 s⁻¹ para *Crithidia fasciculata*. La técnica empleada por nosotros en la purificación del complejo bc, puede ser la responsable del enriquecimiento en la actividad, ya que Ljungdahl y col., (1987) señalan que el lauril maltósido puede generar el rompimiento de vesículas selladas de lauril maltósido y la membrana mitocondrial, por lo que la acequibilidad de sustratos puede ser mayor. Este detergente mantiene las interacciones que se establecen en la estructura cuaternaria del complejo, lo cual no se observa con el detergente Tritón X-100, el cual puede estar disociando a la proteína hierro azufre de *E. gracilis*. El detergente CHAPS utilizado durante la purificación del complejo bc₁ de *C. fasciculata* puede provocar la pérdida de la actividad por un efecto similar. Por lo tanto, la técnica descrita por Ljungdahl y col., (1987) utilizando lauril maltósido como agente solubilizador asegura una preparación de complejo bc₁ activo.

Al igual que otros complejos bc₁, el de *Polytomella spp* es altamente sensible a la unión de antimicina. Lo anterior se pudo apreciar en el experimento de titulación de la actividad del complejo bc₁ en presencia del inhibidor (figura 18). Cuando se realiza la extrapolación para obtener el 0% de actividad, se encuentra que la relación de mol de antimicina/mol de bc₁ es de 1:1.

Considerando lo anterior podemos afirmar que tenemos el primer complejo bc₁ purificado de un protozoo que presenta incremento en su actividad específica durante la purificación y que está enriquecido en su contenido de subunidades.

Composición polipeptídica del complejo bc₁ de *Polytomella spp*:

La fracción enriquecida del complejo bc₁ tiene 10 subunidades analizadas en un gel de poliacrilamida SDS por medio de un barrido densitométrico. Las masas moleculares aparentes se muestran en la tabla XIV. Otros organismos unicelulares como *E. gracilis* y *S. cerevisiae* poseen 10 subunidades al igual que *Polytomella spp*, y a diferencia del complejo obtenido de mitocondrias de corazón de bovino, que posee 11 polipéptidos. El tener un número elevado de subunidades que carecen de grupos oxidorreductores parece ser una característica privativa de los organismos eucariontes (ver tabla III).

Otros complejos bc₁ como el de *Solanum tuberosum* (papa) y de *C. fasciculata* poseen tres subunidades estructurales (6 subunidades de alta masa molecular) las cuales son distinguibles en un gel con la técnica de electroforesis establecida por Laemmli (1970) en cambio, con el sistema de electroforesis de Shägger y col., (1986) sólo se resuelven en dos, por lo cual se pensó que en *Polytomella spp* podría estar ocurriendo lo mismo, así que se corrió un gel con las muestras del complejo bc₁ de papa, de corazón de bovino (que sólo posee dos subunidades estructurales) y de *Polytomella spp* en el sistema de electroforesis de Laemmli. El gel mostró que existen dos subunidades estructurales para el complejo bc₁ de *Polytomella spp* y que estas dos subunidades presentan una mayor diferencia de masa molecular aparente entre ellas que la que existe entre las subunidades I y II de corazón de bovino (ver figura 23A). En contraste, en el complejo bc₁ de papa se pueden observar claramente las tres subunidades estructurales.

En el caso de los anticuerpos generados contra las subunidades I y II del complejo bc₁ de *Polytomella spp*, ninguno de los anticuerpos reaccionó con las subunidades I y II del complejo de corazón de bovino. Las subunidades estructurales presentan un aspecto interesante, ya que se sabe que la subunidad I de *Neurospora crassa* tiene una secuencia semejante o casi igual a la de la proteína PEP (protein enhancing protein o proteína que facilita la internalización de las proteínas que provienen del citoplasma hacia la mitocondria). En corazón de bovino y levadura, la subunidad I del complejo tiene casi la misma secuencia, por lo que estas proteínas

han sido agrupadas en una familia de proteínas procesadoras. En *Polytomella spp* la secuencia de los primeros 12 aminoácidos de la subunidad II es muy parecida a una parte de la secuencia de aminoácidos de la subunidad I del complejo bc₁ de *N. crassa*. Sin embargo, para la subunidad I, son pocos los aminoácidos que pueden identificarse como iguales a los de otras subunidades I (bovino, *N. crassa*, levadura), solo la secuencia Ala-Val-Ala de los primeros aminoácidos (ver tabla XV), se encuentra en bovino y *N. crassa*. Probablemente se necesite secuenciar una región que contenga menos variaciones para encontrar homologías entre las subunidades I de estos complejos.

Por otro lado, utilizando anticuerpos dirigidos contra las primeras seis subunidades del complejo bc, de corazón de bovino, se pudo obtener reacción cruzada con las subunidades IV, V y VI de *Polytomella spp*, que equivalen al citocromo c₁, a la proteína hierro-azufre y la subunidad VI de corazón de bovino (figura 24). Lo anterior contrasta con la ausencia de reacción cruzada para las subunidades estructurales I y II de *Polytomella spp*.

Otra de las técnicas para identificar al citocromo c₁ de *Polytomella spp* fue la tinción con tetrametilbencidina, aprovechando que el hemo de los citocromos es capaz de actuar como peroxidasa. En este caso, la tinción se realizó en geles desnaturalizantes con SDS y se obtuvo una banda verde-azul (figura 25), que corresponde a la masa molecular aparente del citocromo c₁, determinado en geles teñidos con azul de Coomassie. Al citocromo b no es posible observarlo con estos geles, ya que el hemo se encuentra unido sólo por enlaces de coordinación a 4 histidinas de la proteína, por lo que al utilizar SDS en los geles, este hemo se pierde.

El análisis aquí realizado nos permite concluir que el complejo bc₁ de *Polytomella spp* consta de 10 subunidades a juzgar por los geles de poli(acrilamida) SDS teñidos con azul de Coomassie utilizando el método de Shägger y col., (1986). Posee sólo dos subunidades estructurales (I y II), dos citocromos uno tipo b, identificado por su masa molecular aparente (35.5 kDa) cercana a la del citocromo b de corazón de bovino (43.7 kDa) y otro tipo c₁, identificado por la reacción cruzada con el anticuerpo dirigido contra la misma subunidad en corazón de bovino y por la tinción con tetrametilbencidina. La subunidad V es la proteína hierro-azufre identificada por la reacción cruzada con el anticuerpo dirigido contra la subunidad V de corazón de bovino y por su masa molecular aparente de 25.5 kDa, semejante a la de la subunidad V de corazón de bovino de 25 kDa. La subunidad VI también es semejante en masa molecular a su correspondiente en corazón de bovino, 16.1 kDa para *Polytomella spp* y 13.4 kDa en corazón de bovino y muestra reacción cruzada con el anticuerpo contra la misma subunidad en corazón de bovino. El resto de las subunidades tienen una masa molecular aparente parecida a las mismas subunidades del corazón de bovino. Se necesitaría buscar la secuencia de los primeros aminoácidos de cada proteína para encontrar su equivalencia con las subunidades pequeñas del complejo bc₁ de levadura y de corazón de bovino.

Masa molecular del complejo bc₁ de *Polytomella spp*:

La masa molecular del complejo bc₁ de *Polytomella spp* fue de 252.6 kDa en geles de PAGE-SDS (Shägger y col., 1986) y para el de bovino fue de 247.8 kDa. Hay que tomar en cuenta que la masa molecular de la subunidad I de *Polytomella spp* es mayor que la de la misma subunidad de corazón de bovino, lo cual puede explicar las diferencias observadas.

Para poder establecer la masa molecular hidrodinámica del complejo bc₁ íntegro de *Polytomella spp* se utilizó una cromatografía de filtración en gel. También se cromatografió una muestra del complejo aislado de corazón de bovino, obtenido por solubilización de las mitocondrias con lauril maltósido y por cromatografía de intercambio iónico, para ver si se obtenía la misma masa molecular que en geles de poliacrilamida SDS. La masa molecular para el complejo bc₁ de corazón de bovino fue de 537.6 kDa y de 256.3 kDa para *Polytomella spp* (figura 22). Este resultado señalaba que el complejo bc₁ de *Polytomella spp* era un monómero a diferencia del complejo aislado de corazón de bovino.

La existencia de un complejo bc₁ dimérico aislado de mitocondrias de corazón de bovino, se puede comprobar con los diferentes métodos de purificación. Por ejemplo, al utilizar Tritón X-100 como agente solubilizador (Perkins y Weiss, 1983). El complejo puede monomerizarse cuando se diluye la cantidad de detergente (Orii y Miki, 1983) o cuando la cantidad de sales es baja en presencia de lauril maltósido (Nalecz y Azzi, 1985), si se eleva el pH (Georgevich y col., 1983) o si se diluye la mezcla detergente-proteína (Bolli y col., 1986). También el bc₁ de *Neurospora crassa* puede extraerse como dímero al utilizar Tritón X-100 al preparar cristales bidimensionales (Weiss y col., 1986). El modelo del complejo bc₁ de *N. crassa* realizado a partir de los datos de microscopía electrónica se muestra en la figura 30. El complejo se obtiene como un dímero embebido en las bicapas lipídicas que se forman al reemplazar el detergente por lípidos. Lo anterior muestra que el bc₁ de bovino puede extraerse de la membrana como dímero y que probablemente, este sea el estado "nativo" (ó funcional) del complejo.

Otras pruebas de la existencia de un bc₁ dimérico son el coeficiente de sedimentación, el volumen parcial específico y la constante de difusión, con los cuales se obtuvo una masa molecular de 430,000 corregido para el complejo bc₁ de corazón de bovino. Además, al analizar la señal de EPR de la proteína fierro-azufre, no es posible realizar la simulación para un centro fierro-azufre, sino que esta solo se ajusta para dos (de Vries, 1985). Cuando se reduce a la proteína fierro-azufre con fumarato/succinato, en el complejo bc₁ puro se obtienen dos componentes en el espectro de EPR, un pico muy agudo (centro uno) y otro más ancho (centro dos). Cuando ocurre la reducción de la quinona, en el ciclo de transferencia de electrones (ver figura 30) el centro 1 se hace más ancho y se superpone al centro 2, lo cual se

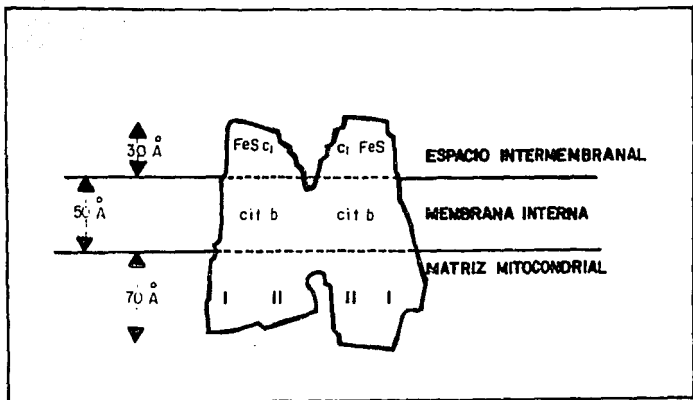


Figura 30: Esquema del complejo bc₁ de *Neurospora crassa*. Se muestra el número de las subunidades principales del complejo. En este esquema se muestra el complejo embebido en la membrana mitocondrial como se obtuvo por microscopía electrónica.

interpretó como la existencia de dos centros fierro-azufre y por tanto un complejo bc₁ dímérico.

Cabe la posibilidad de que al solubilizar las mitocondrias de *Polytomella spp* con una relación 2 g de LM/ g de proteína, se pierdan las interacciones que mantienen un posible dímero en la membrana interna mitocondrial y que por lo tanto se solubilice un monómero. Cuando se purifica el complejo bc₁ de corazón de bovino la relación detergente/proteína es menor y se mantiene el dímero. Como ya se mencionó, al diluir la cantidad del detergente, se puede monomerizar el complejo (sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva ya que de Vries en 1985 señaló que estos datos son irreproducibles). Al realizar la cromatografía de intercambio iónico para obtener la fracción pura del complejo bc₁ y la de la citocromo oxidasa, se utilizan amortiguadores con una concentración de 0.1 mg/ml de lauril maltósido, lo cual diluye la cantidad del detergente unido a la proteína; por tanto, esperaríamos que al disminuir la cantidad de detergente unido a la proteína el complejo se monomerice. La dilución del detergente preserva al dímero ya extraído de la membrana interna mitocondrial de corazón de bovino. Para el caso de *Polytomella spp*, se puede pensar que existe un monómero en la membrana interna mitocondrial ya que, aún aumentando la cantidad de sales (400 mM de NaCl en el amortiguador de elución), no se obtiene un dímero como se esperaría según los datos de Nalecz y Azzi (1985). Así mismo, como no se varía el pH durante la purificación del complejo de *Polytomella spp*, ya que es el mismo que se emplea durante la solubilización de las membranas mitocondriales y también para la extracción del complejo bc₁ de corazón de bovino. Por lo tanto, no esperamos que al mismo pH se obtenga un dímero para el complejo bc₁ de corazón de bovino y un monómero para el de *Polytomella spp*. Un dato contradictorio es el obtenido con los geles azul-nativos (Shägger y con Jagow, 1991) en los que el complejo bc₁ de corazón de bovino, migra después de la ATPasa y en el de *Polytomella spp* sucede al revés. Por otra parte, en estos geles no se ha estudiado con detalle la cantidad de azul de Coomassie que unen estas proteínas, un factor que determina la migración de los complejos por su carga durante la primera electroforesis. Un estudio más fino de la obtención de monómeros y dímeros en este tipo de electroforesis ayudaría a conocer mejor la relación de unión de azul de Coomassie a la proteína. Al respecto, se podría utilizar la técnica descrita por Schägger y col., (1994) para el análisis de los estados oligoméricos en complejos no disociados (después de la electroforesis con azul de Coomassie y en condiciones nativas).

Podemos suponer que el complejo bc₁ de *Polytomella spp* es un monómero en la membrana interna mitocondrial, a diferencia del que se obtiene en organismos como bovino y *N. crassa*. Esto tiene implicaciones importantes ya que el complejo bc₁ de *Polytomella spp*, a pesar de ser monomérico, posee una actividad muy alta en relación con la actividad del complejo obtenido de mitocondrias de *E. gracilis* y *C. fasciculata*.

Por otro lado, el citocromo b_{6/82} de corazón de bovino, se reduce con una cinética trifásica. Esto quiere decir que una fracción del citocromo b_{6/82} se reduce, pasa un

tiempo de espera y a continuación se reduce el resto. Se ha propuesto que la única posibilidad para explicar esto es que estén involucrados dos complejos bc_1 , conteniendo cada uno dos tipos de hemo b uno de alto potencial y otro de bajo potencial (de Vries, 1985; Howell y Robertson, 1993). La primera fase de reducción es rápida y corresponde a la de alto potencial, mientras que la segunda es más lenta y corresponde al hemo b de bajo potencial. La existencia de dos centros hierro-azufre detectados por EPR es un indicio de la existencia de un complejo dimérico. Además se ha observado que bajo ciertas condiciones se puede reducir la mitad de los grupos Fe-S y del c_1 , que correspondería a la reducción del centro uno o dos (de Vries y col., 1983). La *figura 31* muestra el modelo propuesto por de Vries (1985) para la cinética del bc_1 dimérico.

Debido a que el complejo bc_1 de *Polytomella spp* es monomérico, es posible que el mecanismo de acción de éste sea como el propuesto por Trumpower (1991), que se muestra en la *figura 5* y que se explica en la introducción. Este ciclo pretende explicar la acción de un complejo bc_1 monomérico, en el cual existe un sólo hemo b de alto potencial y uno de bajo potencial, así como un centro hierro-azufre.

Será necesario realizar el espectro de EPR de la proteína hierro-azufre de *Polytomella spp* para detectar si existe una señal en la banda X y también reduciendo con fumarato/succinato. Si se encuentra una sola señal, esto ayudaría a confirmar que se trata con un monómero. Además, es necesario realizar un análisis por ultracentrifugación para calcular el coeficiente de sedimentación y poder corroborar que se trata de una especie monomérica *in vitro*.

Espectrofotometría del complejo bc_1 de *Polytomella spp*:

El complejo bc_1 de *Polytomella spp* presenta 4 máximos de absorción en el espectro de luz visible al reducir con ditionita: a 430 nm, 527 nm, a 553-554.1 nm y a 566-567.2 nm. Estos máximos se han denominado γ y β los dos primeros y α los dos últimos. En otros organismos, el pico α del citocromo b (562 nm) y del citocromo c_1 (553 nm) se observan casi sobrepuestos al reducir al complejo con ditionita y sin embargo, en el caso de *Polytomella spp*, se puede obtener una diferencia de más de 10 nm de separación para estos citocromos (*figura 19, Tabla XII*).

Al realizar la reducción del complejo bc_1 con diferentes sustratos, es posible observar la existencia de un hombro en el espectro a 558.9 nm cuando se hace el espectro diferencial ditionita menos ascorbato o menos DBH. El pico α del citocromo b se observa a 567-568 nm. Estos datos pueden ser interpretados como que el hemo de alto potencial (b_H) se localiza a 558.9 nm y el de bajo potencial (b_L) a 567-568 nm. Se ha reportado para *Paracoccus denitrificans* que el b_H absorbe a 560 nm y el b_L a 566 nm en un espectro reducido con ditionita menos el reducido con menaquinona (Yang y Trumpower, 1986). En este organismo también se observa que el citocromo b presenta un corrimiento de longitud de onda que absorbe a 566 nm, a diferencia de

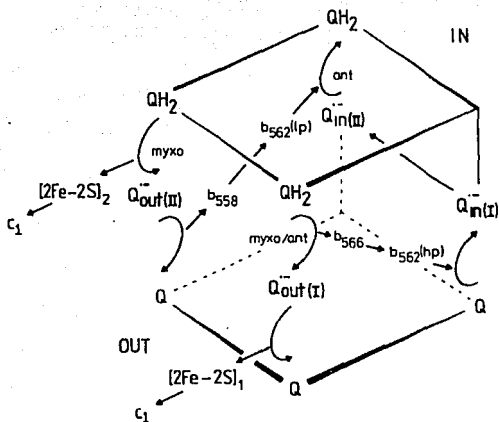


Figura 31: Modelo propuesto por de Vries (1985) para la actividad de un complejo bc₁ dimérico. Las flechas señalan el curso de los electrones. En línea punteada se representa uno de los monómeros y en línea continua el otro. Se muestra además, el sitio donde inhibe el mixotiazol y la antimicina.

lo que se observa en otros organismos, donde la longitud de onda del pico α es a 562 nm. Basados en este dato podríamos especular que el precursor endosimbionte que dió origen a las mitocondrias en las clorofíceas pudo haber sido un organismo semejante a *Paracoccus*.

Al agregar antimicina al complejo bc_1 , reducido se puede observar que el diferencial (reducido con ditionina + antimicina menos reducido con ditionita) muestra que existe un corrimiento hacia el azul en el espectro de absorción. Este efecto también se encuentra cuando se compara el espectro obtenido al agregar los dos inhibidores (se observa un pico a 561 nm y un valle a 568 nm) (figura 20). El hemo b_H es el afectado por antimicina (como lo reportaron por von Jagow y Link en 1986 y que ha sido estudiado por Howell y Robertson, 1993 con deconvolución de los espectros) y sin embargo, estos trabajos reportan un efecto contrario al nuestro, ya que se observó un corrimiento al rojo. En el caso del inhibidor mixotiazol que afecta al hemo b_L , el espectro diferencial muestra que existe un corrimiento hacia el rojo, evidenciado por un valle a 568 nm y un pico a 574.9 nm. Aunque este hemo absorbe a una longitud de onda mayor a la que se conoce para otros citocromos b, no es lo único que contribuye al fenómeno global, ya que el hemo b_H también participa en este comportamiento anormal presentando un corrimiento hacia el azul.

Cuando se realiza un espectro diferencial reduciendo al complejo con ascorbato y restándole el espectro del complejo oxidado, el pico α del citocromo tipo c_1 de *Polytomella spp* se encuentra a 553 nm de longitud de onda, al igual que en el citocromo c_1 de corazón de bovino. El espectro diferencial reducido con ditionita menos el reducido con ascorbato muestra que el pico de absorción del citocromo b se encuentra a los 566.5 nm de longitud de onda, a diferencia del complejo de corazón de bovino, que se encuentra a 562 nm.

El espectro diferencial reducido con ascorbato menos el oxidado con ferricianuro muestra un pico de absorción a 561 nm para *E. gracilis* y *C. fasciculata*. El espectro de absorción del complejo bc_1 reducido con ditionita, muestra un pico α a 562 nm debido a que el pico α del citocromo b (a 563 nm) se superpone al del citocromo c_1 , por un corrimiento de 7 a 8 nm en el pico de absorción del c_1 . Este corrimiento se debe a que *E. gracilis* y *C. fasciculata* poseen citocromos c y c_1 atípicos, con una sola unión covalente del hemo a la proteína.

El espectro diferencial (ascorbato menos oxidado) del complejo bc_1 de *Polytomella spp* muestra la longitud de onda donde la absorción de este citocromo es máxima y conserva la posición de 553 nm. Por lo anterior, se puede decir *a priori* que este citocromo tiene una región de unión del hemo con una secuencia de aminoácidos similar a la considerada consenso. Sin embargo, esto sólo podía asegurarse hasta conocer la secuencia de aminoácidos de esta región.

Secuencia de aminoácidos del citocromo tipo c_1 de *Polytomella spp.*

El citocromo c_1 de protozoarios, pertenecientes al grupo de los kinetoplástidos y de los euglenoides, ha sido estudiado por varios grupos debido a que el hemo de este citocromo posee una sola unión covalente a la proteína. Sólo estos organismos unicelulares eucariontes contienen un citocromo c_1 atípico. Cabe la posibilidad de que esta característica fuera privativa de los protozoarios o de un grupo reducido de éstos. Al estudiar el espectro de absorción del complejo bc_1 de *Polytomella spp.*, no se observó un corrimiento hacia el rojo de la longitud de onda de máxima absorción del citocromo c_1 . La tinción con tetrametilbencidina indicó que el hemo de este citocromo está unido covalentemente a la proteína. La reacción cruzada con el anticuerpo dirigido contra la subunidad IV de corazón de bovino puede ser un indicio de que existe similitud entre ambos citocromos. Ambas pruebas no indican si la unión covalente se realiza a través de uno o de dos enlaces con cisteína. El espectro de absorción ya sugería que el citocromo c_1 de *Polytomella spp.* no es diferente de los que tienen el hemo unido por dos enlaces covalentes a la proteína.

Por lo anterior, fue necesario secuenciar la región de unión del hemo al citocromo c_1 de *Polytomella spp.*, por medio de la estrategia descrita en la metodología.

Comparando la secuencia obtenida del citocromo c_1 de *Polytomella spp.*, con secuencias de otros organismos, ésta es muy parecida aunque no fue posible amplificar la región anterior a la metionina de inicio, por lo que no es posible conocer todavía la presecuencia del citocromo c_1 .

Para obtener la secuencia de la región de unión del hemo a la proteína se tuvo que utilizar otro desoxiligonucleótido que se uniera a la región del intrón hasta el que se llegó en la secuenciación. Este desoxiligonucleótido sólo se utilizó en la reacción de Sanger para secuenciar. En este paso, se pudo obtener la secuencia hasta el aminoácido 73 de la proteína y se encontró que el gene de este citocromo está interrumpido por dos intrones, y que en el segundo exón de la proteína está la región de unión del hemo (figura 29). Esta región es del tipo C X X C H, que es la secuencia consenso para la unión del hemo a la proteína. En este caso, se puede observar que es igual a la que se obtiene para el citocromo c_1 de levadura. Esta secuencia es consistente con los datos espectrofotométricos obtenidos, en los que no se obtiene un corrimiento en la longitud de onda donde es máxima la absorción del citocromo c_1 (pico α) la cual es la típica a 553 nm).

Comparando la secuencia de la región de unión del hemo para *Polytomella spp.* con otras secuencias como las de bovino, levadura, *N. crassa*, *E. gracilis*, y otros kinetoplástidos (ver figura 32), se puede observar que *Polytomella spp.* se encuentra entre dos grupos de organismos, aquellos que poseen una sola unión al grupo hemo y el que tiene dos uniones covalentes a la proteína. Los cinco representantes del

	F	A	P	C	H						
	↓			↓	↓						
<i>Crithidia fasciculata</i>	E	V	F	A	P	C	H	S	L	G	R
<i>Leishmania tarentolae</i>	E	V	F	A	P	C	H	S	L	G	R
<i>Trypanosoma brucei</i>	E	V	F	A	P	C	H	P	L	G	R
<i>Bodo caudatus</i>	E	V	F	A	P	C	H	P	L	G	K
<i>Euglena gracilis</i>	Q	V	F	A	P	C	H	S	L	S	F
<i>Polytomella spp.</i>	Q	V	C	A	A	C	H	S	M	N	Y
<i>Neurospora crassa</i>	E	V	C	A	S	C	H	S	L	S	R
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E	V	C	A	A	C	H	S	L	D	R
<i>Bos primigenius taurus</i>	Q	V	C	S	S	C	H	S	M	D	Y
				↑		↑	↑				
				C	X	X	C	H			

Figura 32: Comparación de secuencias de la región de unión del grupo hemo al citocromo c_1 de protozoarios como *Euglena gracilis* y representantes de kinetoplástidos, así como organismos como *Bos primigeniu taurus* (bovino) y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura). La línea punteada enmarca al grupo de protozoarios cercanos a *Polytomella spp* y como comparación se presentan las secuencias de otros organismos en línea continua.

primer grupo tienen una prolina en la secuencia de unión del hemo, que probablemente tenga que ver con que la proteína se pliegue sobre el hemo, cosa que no ocurre en el segundo grupo, por la existencia de dos uniones covalentes.

Round en 1980, propuso que existían dentro del mismo grupo de algas fotosintéticas algunos géneros semejantes en forma a su contraparte fotosintética, pero que no podían incluirse dentro del grupo de "algas incoloras" debido a que no conservan la misma forma de reserva de energía que los géneros fotosintéticos. Durante el Precámbrico, cuando ocurrió el evento endosimbiótico, algunas células pudieron adquirir organismos que posteriormente formarían sus cloroplastos. Sin embargo, no todas las células del mismo tipo sufrieron el evento endosimbiótico, quedando como organismos heterótrofos. Aunque sean semejantes en su forma externa a su contraparte fotosintética, deben ser agrupados como protozoarios. Sólo aquellos organismos que, en el transcurso de la evolución perdieron el aparato fotosintético pero conservaron los plastos como un organelo de reserva, se pueden considerar como algas incoloras. Schwartz y Dayhoff (1978) sostienen que primero se formaron individuos fotosintéticos (eucariontes) que después adquirieron al endosimbionte protomitocondrial. Después del Cámbrico las actuales algas incoloras perdieron el aparato fotosintético, volviéndose heterótrofas. Esto puede verse en el caso de *Polytomella* y *Chlamydomonas*, ya que ambas necesitan de acetato como fuente de carbono. El acetato puede ser utilizado por un heterótrofo vía acetil coenzima A sintetasa, para formar acetil coenzima A. Con lo anterior podemos decir que *Polytomella* es una verdadera alga incolora y que probablemente sea la contraparte heterótrofa de *Chlamydomonas*.

Los árboles filogenéticos realizados con las secuencias de los genes *rbcL* y *rbcS* (las subunidades grande y pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa), que se presenta en la figura 33 y el gene *psbA* (proteína D1 del fotosistema II) indican que Euglenoides y Chlamydomonadales son órdenes muy cercanos. Sin embargo, si se hace el estudio del citocromo c soluble de estas especies, comparandolas con el de las plantas (Amati y col., 1988), se obtiene que la separación de estos grupos es muy grande: *Euglena* se encuentra cercano a la base del árbol, mientras que *Chlamydomonas* está más alejado. La separación entre *Chlamydomonas reinhardtii* y plantas ocurrió hace 700 a 750 millones de años; *Euglena* se encuentra más lejos de esta separación. Al comparar las posibles líneas de evolución de los diferentes grupos de algas, se puede apreciar que después del evento endosimbiótico, los Euglenoides no tuvieron ramificaciones (ver figura 34). Las Chlorophytas (phylum al que pertenecen *Chlamydomonas* y *Polytomella*) presentan varias ramificaciones casi inmediatamente después de la endosimbiosis. Si estos dos grupos están emparentados, probablemente compartan características del endosimbionte de cloroplastos. El árbol filogenético obtenido con las secuencias del citocromo c soluble indicaría que a nivel de mitocondrias existe una diferencia mayor. Los estudios de Petigrew (1979) señalan que el poseer un citocromo c atípico no es una característica privativa de los protozoarios, confirmando lo anterior.

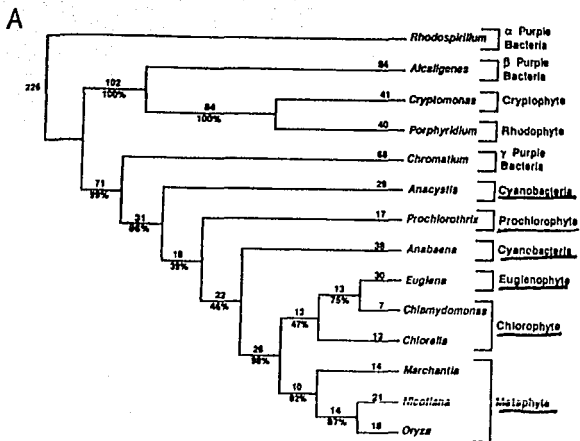


Figura 33: Arbol filogenético de organismos fotosintéticos construido con la comparación de secuencias de la proteína Rubisco (ribulosa bifosfato carboxilasa).

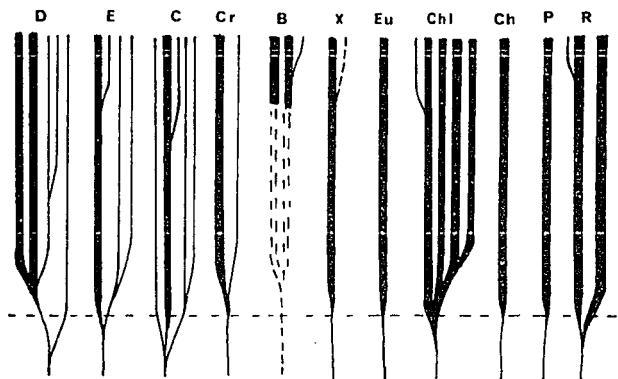


Figura 34: Líneas de evolución en los diferentes grupos de algas, la línea punteada muestra el punto en el tiempo en el que supuestamente ocurrió el evento de endosimbiosis. Las líneas gruesas representan organismos fotosintéticos, y las líneas delgadas, organismos que perdieron el aparato fotosintético. Tomado de Round (1980).

D: Dinoflagelados; E: Euglenoides; C: Chrysophyta; Cr: Cryptophyta;
 B: Bacillariophyta; X: Xanthophyta; Eu: Eustigmatophyta; Chl: Chlorophyta;
 P: Prasinophyta; R: Rhodophyta.

Ya que los géneros *Chlamydomonas* y *Polytomella* pueden considerarse cercanos en su parentesco, es posible especular que el *Chlamydomonas* tenga un citocromo tipo c_1 típico. Esto hace más probable la separación de estos organismos del grupo de los Euglenoides, más cercanos a la base del árbol filogenético. Lo anterior no nos dice cuándo fue la separación entre *Chlamydomonas* y *Polytomella*, o entre algas incoloras verdaderas y su contraparte fotosintética. Las diferencias entre las secuencias de proteínas mitocondriales pueden dar una evidencia de esta separación. En particular, aquellas proteínas mitocondriales, cuyos genes estén ahora codificados en el núcleo pueden dar la clave. Tal es el caso del citocromo tipo c_1 . Así mismo, la comparación de estas secuencias puede aclarar, sin lugar a dudas, cuales son las algas incoloras "verdaderas".

Conclusiones:

1.- Hemos purificado al primer complejo bc₁ de un protozoario con actividad de ubiquinol citocromo c oxidorreductasa cercana a los valores que se obtienen para el mismo complejo en corazón de bovino.

2.- El complejo posee 10 subunidades entre las que se indentificaron los citocromo b y c₁ y la proteína hierro azufre. Las dos últimas presentaron reacción cruzada con los anticuerpos dirigidos contras las mismas subunidades en corazón de bovino. El citocromo c₁ fue identificado por la tinción específica para grupos hemo unidos covalentemente a la proteína.

3.- El complejo posee dos subunidades estructurales (core I y II), diferenciables en un gel con el sistema de Laemmli, donde se pueden observar las tres subunidades del complejo purificado en mitocondrias de papa. Se elaboraron anticuerpos contra las subunidades I y II de *Polytomella spp*. En un ensayo de inmunorréplica tipo Western solo se obtuvo reacción cruzada con la subunidad III de papa.

4.- El citocromo b posee un corrimiento en la longitud de onda donde se observa el pico α del mismo. Probablemente los hemos de este citocromo tengan ambientes muy diferentes, debido a que el espectro del complejo reducido con ditionita y con antimicina, reveló un corrimiento del hemo b_H hacia el azul, mientras que el b_L hacia el rojo.

5.- El citocromo tipo c₁ no muestra un corrimiento hacia el rojo como en el caso de los citocromos de *Euglena gracilis* y al estudiar la secuencia del gene nuclear de esta proteína hemos confirmado la evidencia espectroscópica, ya que la región de unión del hemo a la proteína es del tipo consenso, lo cual acerca al género *Polytomella* a los eucarionte "más evolucionados".

6.- El estudio de proteínas mitocondriales de un organismo tan cercano a *Chlamydomonas* puede llevar a conocer el tipo de proteínas respiratorias que presenta esta alga verde, que hasta ahora no han sido fácil de conocer.

REFERENCIAS:

- Amati, B.B., Goldschmidt-Clermont, M., Wallace, C.J.A., y Rochaix, J.D. (1988) cDNA and Deduced Amino Acid Sequences of Cytochrome c from *Chlamydomonas reinhardtii*: Unexpected Functional and Phylogenetic Implications. **J.Mol.Biol.** 28, 151-160.
- Ambler, R.P., Meyer, T.E. y Kamen, M.D. (1976) Primary Structure Determination of Two Cytochromes c₂: Close Similarity to Functionally Unrelated Mitochondrial Cytochrome c. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 73(2), 472-475.
- Aragao, H. (1910). **Mem.Inst. Oswald Cruz.** 2, 42-57.
- Atteia, A., de Vitri, C. Pierre, P. y Popot, J-P. (1992) Identification of Mitochondrial Proteins in Membrane Preparations from *Chlamydomonas reinhardtii*. **J.Biol.Chem.** 267(5), 226-243.
- Atteia, A. (1994) Identification of Mitochondrial Respiratory Proteins from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Life Sciences.** 317, 11-19.
- Berry, E.B., Huang, L. y DeRose, V.J. (1991) Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase of Higher Plants. Isolation and Characterization of the bc₁ complex from Potato Tuber Mitochondria. **J. Biol. Chem.** 266(15), 9064-9077.
- Black, T.M., Widger, W.R. y Cramer, W.A. (1987) Large-Scale Purification of Active Cytochrome b₆/f Complex from Spinach Chloroplasts. **Arch.Biochem.Byophys.** 252 (2), 655-661.
- Bolli, R., Nalecz, K.A. y Azzi, A. (1985) **A. Biochem. Biophys. Acta.** 240, 102-116.
- Brandt, U. (1993) The Mitochondrial Targeting Presequence of the Rieske Iron-Sulfur Protein is Identical to Subunit 9 of the Bovine Heart Cytochrome bc₁ Complex, Indicating that it is Processed in Single Step and Retained as a Subunit in the Complex. **FASEB.** 7, A1106.
- Brandt, U., Yu, L., Yu, C-A., y Trumppower, B.L. (1993) The Mitochondrial Targeting Presequence of the Rieske Iron-Sulfur Protein is Processed in a Single Step after Insertion into the Cytochrome bc₁ Complex in Mammals and Retained as a Subunit in the Complex. **J.Biol.Chem.** 268(12): 8387-8390.
- Brönstrup, U. y Hachtel, W. (1989) Cytochrome c Oxidase of *Euglena gracilis*: Purification, Characterization and Identification of Mitochondrially Synthesized Subunits. **J.Bioenerg.Biomem.** 21(3), 359-373.

- Brown, D.L., Massalski, A., Patenaude, R. (1976a) Organization of the Flagellar Apparatus and Associated Cytoplasmic Microtubules in the Quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. **J. Cell. Biol.** 69, 106-125.
- Brown, D.L., Leppard, G.G. y Massalski, M. (1976b) Fine Structure of Encystment of the Quadriflagellate Alga, *Polytomella agilis*. **Protoplasma.** 90, 139-154.
- Brown, D.L., Massalski, M. y Leppard, G.G. (1976c) Fine Structure of Encystment of the Quadriflagellate Alga *Polytomella agilis*. **Protoplasma.** 90, 155-171.
- Burton, M.D. y Moore, J. (1974) The Mitochondria of the Flagellate *Polytomella agilis*. **J. Ultratru. Res.** 48: 414-419.
- Cantor, M.H. y Burton, M.D. (1975) Effects of Thiamine Deprivation and Replacement on the Mitochondrion of *Polytomella agilis*. **J. Protozool.** 22(1), 135-139.
- Conner, T.W., Thompson, M.D. y Silflow, C.D. (1989) Structure of the Three β -tubulin-encoding genes of the unicellular alga, *Polytomella agilis*. **Genes.** 84, 345-358.
- Degli Esposti, M., Rotilio, y Lenaz, G. (1984) Effects of Dibromothymoquinone on the Structure and Functions of the Mitochondrial bc₁ Complex. **Biochim. Biophys. Acta.** 767, 10-20.
- Degli Esposti, M., Tsai, A-L., Palmer, G. y Lenaz, G. (1986) On the Oxidation Pathways of the Mitochondrial bc₁ Complex from Beef Heart. Effect of Various Inhibitors. **Eur. J. Biochem.** 160, 547-555.
- Degli Esposti, M. y Lenaz, G. (1991) The Kinetic Mechanism of Ubiquinol: Cytochrome c Reductase at Steady State. **Arch. Biochem. Biophys.** 280(2), 303-312.
- De Vries, S., Albracht, S.P.J., Berden, J.A. Marres, C.A.m. y Slater, E.C. (1983) The Effect of pH, Ubiquinone Depletion and Mixothiazol on the Reduction Kinetics of the Prosthetic Groups of Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase. **Biochim. Biophys. Acta.** 723, 91-103.
- De Vries, S. (1985) The Pathway of Electron Transfer in the Dimeric QH₂:Cytochrome c Oxidoreductase. **J. Bioenerg. Biomem.** 18(3). 195-223.
- Di Mauro, S., Servidei, S. y Zeviani, M. (1987) **Ann. Neurol.** 22, 498-506.
- Engel, W.D., Michalski, C. y Von Jagow, G. (1983) Reconstitution of the Ubiquinol: Cytochrome c Reductase from bc₁ subcomplex and the "Rieske" Iron-Sulfur Protein Isolated by a New Method. **Eur. J. Biochem.** 132, 395-402.

Geier, B.M. (1992) Point Mutation in Cytochrome b of the Yeast Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase Causing Myxothiazol Resistance and Facilitated Dissociation of the Iron-Sulfur Subunit. **Eur. J. Biochem.** 208, 375-380.

Gencic, S. Shagger, H. y Von Jagow, G. (1991). Core I Protein of Bovine Ubiquinol-Cytochrome C Reductase; an additional Member of the Mitochondrial-Protein-Processing Family. Cloning of Bovine core I and Core II cDNAs and Primary Structure of the Proteins. **Eur.J.Biochem.** 199(1), 19958-19964.

Georgevich, G., Darley-Usmar, V.M., Malatesta, F. y Capaldi, R.A. (1983) Electron Transfer in Monomeric Forms of Beef and Shark Heart Cytochrome c Oxidase. **Biochem.** 22(6), 1317-1322.

Gonzalez-Halphen, D., Lindorfer, A. y Capaldi, R.A. (1988) Subunit Arrangement in Beef Heart Complex III. **Biochem** 27, 7021-7031.

Gonzalez-Halphen, D. (1990) El complejo bc₁ de la cadena respiratoria mitocondrial. **Ciencia.** 41, 133-152.

Gonzalez-Halphen, D., Vaquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. (1991) On the Interaction of Mitochondrial Complex III with the Rieske Iron-Sulfur Protein (Subunit V) **J.Biol. Chem.** 266(6), 3870-3876.

Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockau, W. (1983) Comparative Aspects of the Quinol-Cytochrome c/Plastocyanin Oxidoreductases. **Biochem. Biophys. Acta.** 726, 97-133.

Hawkes, R., Niday, E. y Gordon, J. (1982) A Dot-Immunoblotting Assay for Monoclonal and Other Antibodies. **Anal Biochem** 119, 142-147.

Hill, G.C. y Petigrew, G.W. (1975) **Eur. J. Biochem.** 57, 265-271.

Howell, N. y Robertson, D.E. (1993) Electrochemical and Spectral Analysis of the Long-Range Interactions between the Q_o and Q_i Sites and the Heme Prosthetic Groups in Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase. **Biochem.** 32, 11162-11172.

Kim, Ch.H y King, T.E. (1983) A Mitochondrial Protein Essential for the Formation of the Cytochrome c₁-c Complex. **J. Biol. Chem.** 258, 13543-13551.

Kim, Ch.H., Yencha, A.J., Bunker, G., Zhang, G. Chance, B. y King, T.E. (1989) Effect of the Hinge Protein on the Heme Iron site of cytochrome c₁. **Biochem.** 28, 1439-1441.

Kubota, T., Yoshikawa, S. y Matsubara, H. (1992) Kinetic Mechanism of Beef Heart Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase. **J. Biochem.** 111, 91-98.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T-4. **Nature.** 227, 680-685.

Lederer, F., y Simon, A.M. (1974) **Biochim. Biophys. Res. Commun.** 56, 317-323.

Lewis, E., Munger, G., Watson, R. y Wise, D. (1974) Life Cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, Polyblepharidae). **J. Protozool.** 21(5), 647-649.

Lloyd, D. y Chance, B. (1968) Electron Transport in Mitochondria Isolated from the Flagellate *Polytomella caeca*. **Biochem. J.** 107, 829-837.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr.A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275.

Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumpower, B.L. (1987) Purification of Highly Active Cytochrome bc₁ Complexes from Phylogenetically Diverse Species by a Single Chromatographic Procedure. **Biochim. Biophys. Acta.** 891, 227-241.

Margoliash, E., Smith, E.L., Kreil, G. y Tuppy, H. (1961) **Nature.** 192, 1121-1127.

Melkonian, M. (1990) Phylum Chlorophyta, Class Chlorophyceae. en: Handbook of Protoctista. Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. y Chapman, D.J. (Eds). Jones and Bartlett Pub. E.U.A. p.p. 608-616.

Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., y Chapman, D.J. (1990) Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Pub. E.U.A.

Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978) A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. **Anal. Biochem.** 87, 206-210.

Matsudaira, P. (1987). Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblooded onto Polyvinylidene Difluoride Membranes. **J. Biol. Chem.** 262(21), 10035-10038.

Mukai, K. Yoshida, M., Toyosaki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S. y Matsubara, H. (1989) An Atypical Heme-Binding Structure of Cytochrome c₁ of *Euglena gracilis* Mitochondrial Complex III. **Eur. J. Biochem.** 178, 649-656.

Mullis, K.B. y Faloona, F.A. (1987) . Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol.** 155, 335-350.

Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Hirn, G. y Erlich, H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 51, 263-273.

Nalecz, M.J., Bolli, R. y Azzi, A. (1985) Molecular Conversion between Monomeric and Dimeric States of the Mitochondrial Cytochrome b-c₁ Complex: Isolation of Active Monomers. **Arch.Biochem.Biophys.** 236(2), 619-628.

Perkins, J.S. y Weiss, H. (1983) Low Resolution Structural Studies of Mitochondrial Ubiquinol: Cytochrome c Reductase in Detergent Solutions by Neutron Scattering. **J. Mol. Biol.** 168, 847-866.

Petigrew, G.W. (1973) **Nature.** 241, 531-533.

Petigrew, G.W., Leaver, J.L. Meyer, T.E. y Ryle, A.P. (1975) Purification, Properties and Amino Acid Sequence of Atypical Cytochrome c of two Protozoa, *Euglena gracilis* and *Crithidia oncopelti*. **Biochem. J.** 147, 291-302.

Petigrew, G.W. (1979). Structural Features of Protozoan Cytochromes. En: *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Vol 1). Levandowsky, M y Hutner, S.H. (Eds.) **Acad. Press.** Nva York. p.p. 59-90.

Phillips, J.D., Graham, L.A., Trumppower, B.L. (1993) Subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc₁ complex is required for insertion of EPR-Detectable Iron-Sulfur Cluster into the Rieske Iron-Sulfur Protein. **J. Biol. Chem.** 268(16), 11727-11736.

Piez, K.A. (1968) Molecular Weight Determination of Random Coil Polypeptides from Collagen by Molecular Sieve Chromatography. **Anal. Biochem.** 26, 305-312.

Priest, J.W. y Hajduk, S.L. (1992) Cytochrome c Reductase Purified from *Crithidia fasciculata* Contains an Atypical Cytochrome c₁. **J. Biol. Chem.** 267(28), 20188-20195.

Pringsheim, E.G. (1955) The Genus *Polytomella*. **J. Protozool.** 2, 137-145.

Rieske, J.S., Hansen, R.E. y Zaugg, W.S. (1964) Studies on the Electron Transfer System LVII. Properties of a New Oxidation-Reduction Component of the Respiratory Chain as Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. **J. Biol. Chem.** 239(9), 3017-3021.

Rieske, J.S. (1979) Composition, Structure and Function of Complex III of the Respiratory Chain. **Biochim. Biophys. Acta.** 456, 195-247.

Romisch, J., Tropschug, M., Sebald, W. y Weiss, H. (1987) The Primary Structure of Cytochrome c_1 from *Neurospora crassa*. **Eur. J. Biochem.** 164, 111-115.

Round, F.E. (1980) The Evolution of the Pigmented and Unpigmented Unicells: a Consideration of the Protista. **Biosystems.** 12, 61-69.

Sadler, I., Suda, K., Schatz, G., Kaudewitz, F. y Haid, A. (1984) **EMBO J.** 3, 2137-2143.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 74(12), 5463-5467.

Saraste, M. (1984) Location of Haem-Binding Sites in the Mitochondrial Cytochrome b. **FEBS Lett.** 166(2), 367-372.

Shägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. (1986) Isolation of the Eleven Protein Subunits of the bc_1 Complex from Beef Heart. **Methods Enzymol** 126, 224-237.

Shägger, H. y von Jagow, G. (1991) Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. **Anal. Biochem.** 199, 223-231.

Sheeler, P., Moore, J., Cantor, M. y Granik, R. (1968) The Stored Polysaccharide of *Polytomella agilis*. **Life Sciences.** 7(II), 1045-1051.

Shulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W. y Weiss, H. (1989) A family of Mitochondrial Proteins Involved in Bioenergetics and Biogenesis. **Nature** . 339, 147-149.

Schmitt, M.E. y Trumpower, B.L. (1990) Subunit 6 Regulates Half-of-the-Sites Reactivity of the Dimeric Cytochrome bc_1 Complex in *Saccharomyces cerevisiae* J. **Biol. Chem.** 265(28), 17005-17011.

Schwartz, R.M. y Dayhoff, M. (1978) Origins of Prokaryotes, Eukaryotes, Mitochondria and Chloroplasts. **Science.** 199, 395-403.

Stevens, F.C., Glazer, A.N., y Smith, E.L. (1967) The Amino Acid Sequence of Wheat Germ Cytochrome c. **J. Biol. Chem.** 242(11), 2764-2779.

Tarr, G. y Fitch, W.M. (1976) **Biochem. J.** 159, 193-199.

Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H. y Neupert, W. (1982) Biogenesis of mitochondrial ubiquinol:cytochrome c reductase (cytochrome bc₁ complex). **J. Biol. Chem.** 257, 10364-10371.

Thomas, P.E., Ryan, D. y Levin, W. (1976) An Improved Staining Procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of the Cytochrome P-450 on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gels. **Anal. Biochem.** 75, 168-176.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electroforetic Transfer of Proteins from Polyacrilamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 (9), 4350-4354.

Trumpower, B.L. y Edwards (1979) Purification of a Reconstitutively Active Iron-Sulfur Protein (Oxidation Factor) from Succinate-Cytochrome c Reductase Complex of Bovine Heart Mitochondria. **J. Biol. Chem.** 254 (17), 8697-8706.

Trumpower, B.L. (1991) The Three-Subunit Cytochrome bc₁ Complex of *Paracoccus denitrificans*. Its Physiological Function, Structure and Mechanism of Electron Transfer and Energy Transduction. **J. Bioenerg. Biomem.** 23(2), 241-255.

Trumpower, B.L. (1990) Cytocrome bc₁ Complexes of Microorganisms. **Microbiological Reviews** 54(2), 101-129.

Tzagolof, A., Wu, M. y Crivellone, M. (1986) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of COR1, the Structural Gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. **J. Biol. Chem.** 261, 17163-17169.

Von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1984) An Inhibitor of Mitochondrial Respiration Which Binds to Cytochrome b and Displaces Quinone from the Iron-Sulfur Protein of the Cytochrome bc₁ Complex. **J. Biol. Chem.** 259(10), 6318-6326.

Von Jagow, G. y Link, T.A. (1986) Use of Specific Inhibitors on the Mitochondrial bc₁ Complex. **Methods Enzymol.** 126, 253-271.

Wakabayashi, S., Matsubara, H., Kim, C.H. y King, T.E. (1982) Structural Studies of Bovine Heart Cytochrome c₁. **J. Biol. Chem.** 257, 9335-9344.

Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. y Trebsi, A. (1984) Sequence Homology and Structural Similarity Between Cytochrome b of Mitochondrial Complex III and the Chloroplast b₆/f Complex: Position of the Cytochrome b Hemes in the Membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 81, 674-678.

- Wise, D.L. (1955) Carbon Sources for *Polytomella caeca*. **J. Protozool.** 2: 156-158
- Wise, D. L. (1959) **J. Protozool.** 6, 19.
- Weiss, H., Hovmöller, S. y Leonard, K. (1986) Preparation of Membrane Crystals of Ubiquinol-Cytochrome-c Reductase from *Neurospora* Mitochondria and Structure Analysis by Electron Microscopy. **Methods Enzymol.** 126, 191-211.
- Weiss, H. y Leonard, K. (1987) Structure and Function of Mitochondrial Ubiquinol: Cytochrome c Reductase and NADH: Ubiquinone Reductase. **Chemica Scripta** 27B, 73-81.
- Yang, X. y Trumpower, B.L. (1986) Purification of a three-subunit Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase Complex from *Paracoccus denitrificans*. **J. Biol. Chem.** 261(26), 12282-12289.

A Highly Active Ubiquinol-Cytochrome *c* Reductase (*bc*₁ Complex) from the Colorless Alga *Polytomella* spp., a Close Relative of *Chlamydomonas*

CHARACTERIZATION OF THE HEME BINDING SITE OF CYTOCHROME *c*₁*

(Received for publication, November 15, 1993, and in revised form, December 17, 1993)

Emma-Berta Gutiérrez-Cirlos, Anald Anturamiani, Miriam Vázquez-Acevedo, Roberto Coriás, and Diego González-Halphen†

From the †Departamento de Bioenergética and the §Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, México 04510, Distrito Federal

The alga *Polytomella* spp. offers extraordinary advantages in the preparation of mitochondria since it lacks chloroplasts and a cell wall. In this work the mitochondrial *bc*₁ complex from *Polytomella* spp. was solubilized and purified by ion exchange chromatography. The complex was found to be composed of 10 polypeptides and exhibited high rates of ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity (>1000 $\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$) sensitive to antimycin and myxothiazol. The molecular mass of the *bc*₁ complex from *Polytomella* spp. was assayed by gel filtration and estimated to be of 256,300 Da. Therefore, this complex exhibits the unique property of behaving as a monomer. Amino-terminal sequencing of cytochrome *c*₁ identified 7 residues, from which a deoxyoligonucleotide was designed. A second deoxyoligonucleotide was constructed based on a highly conserved region of the *c*₁ type cytochromes. With these probes, a fragment of the cytochrome *c*₁ gene was amplified by polymerase chain reaction and sequenced. The deduced sequence of the apoprotein exhibited a consensus binding site CXXCH. The data suggest that the cytochrome *c*₁ from *Polytomella* spp. differs from other protists like *Critidia* and *Euglena*, i.e. it exhibits a heme binding domain structurally related to the bovine, yeast, and *Neurospora* *c*₁ type cytochromes.

The quadriflagellate *Polytomella* (Aragao, 1910; Pringsheim, 1955) may be considered either a protist or a colorless alga of the order Chlamydomonadales (Wise, 1959; Melkonian, 1990). It belongs to the family of Chlamydomonadaceae and it is morphologically related to other unicellular photosynthetic and morphosynthetic protists of the genus *Chlamydomonas*, *Carteria*, *Haematococcus*, *Phacotus*, *Chlorogonium*, and *Polytoma*. It reproduces by binary fission and sexual reproduction (Levis *et al.*, 1974). *Polytomella* spp. has the unusual features of lacking chloroplasts and a cell wall; however it has colorless plastids that contain all of the cell starch (leukoplasts) and large and highly organized mitochondria when grown in a medium containing salts, thiamine, and acetate as a sole carbon source (Evans and Lloyd, 1966; Burton and Moore, 1974).

* This work was supported by Grant 1371-N9206 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† This work is dedicated to the memory of Dr. Aurora Brunetti, who always encouraged us in this project.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel: 525-622-6620. Fax: 011-55-622-5611 or 011-525-546-0397.

Mitochondria from *Polytomella caeca* possess cytochromes (types *b*, *c*, *c*₁, *a*, and *a*₁) and several flavoproteins. These mitochondria exhibit respiratory control, and it is known that their electron transport chain is blocked by the respiratory inhibitors antimycin A, rotenone, piericidin A, and cyanide (Lloyd *et al.*, 1966; Lloyd and Chance, 1968).

The mitochondrial *bc*₁ complex (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase; EC 1.10.2.2) is an oligomeric membrane protein complex that has three redox components: a hemic cytochrome *b*, a cytochrome *c*₁, and a Rieske type iron-sulfur protein (for a review of this complex in microorganisms, see Trumpower, 1990). The *bc*₁ complex has been isolated from a large variety of organisms, including Gram-negative and Gram-positive bacteria, oxygenic and anoxygenic photosynthetic bacteria, and mitochondria from different sources. A homologous complex, referred to as *bc*₁ complex, is also present in algae, cyanobacteria, and higher plant chloroplasts (Haukauf *et al.*, 1983). Of relevance to the present work is that the *bc*₁ complex has been isolated from *Euglena gracilis* (Mukai *et al.*, 1989a); it consists of 10 subunits and exhibits an atypical difference absorption spectrum for cytochrome *c*₁. This purified complex displays a low and antimycin-insensitive ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity. Interestingly, the deduced amino acid sequence of cytochrome *c*₁ showed an unusual heme binding site that had a single cysteine residue (Mukai *et al.*, 1989b). The heme group of some protozoan *c*₁ type cytochromes is characterized by forming a single thioether bond to the protein at position 4 and retention of a vinyl side chain at position 2 (Pettigrew, 1979). This unique structure was reported previously for the soluble *c*₁ type cytochromes from *Critidia oncopelti* and *E. gracilis* (Pettigrew *et al.*, 1975). More recently, Priest and Hajduk (1992) reported the purification and characterization of the *bc*₁ complex from the trypanosomatid *Critidia fasciculata* and demonstrated that the heme prosthetic group is also bound to its apocytochrome through a single thioether bond. Gene amplification and sequencing of the heme binding sites from kinetoplastid species (*Critidia*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Bodo*) suggested that this may be a general feature of trypanosomatids and euglenoids (Priest and Hajduk, 1992).

Since the cytochromes from protist sources exhibit peculiar properties, we thought it was of interest to characterize the mitochondrial *bc*₁ complex from *Polytomella* spp., a colorless alga included in the class Chlorophyta. These organisms naturally lack a cell wall and a photosynthetic apparatus. These features facilitated the purification of the mitochondrial respiratory proteins, which have been difficult to characterize in *Chlamydomonas* because of the abundance of chloroplast proteins (Harris, 1959; Attein *et al.*, 1992). In this work, we report

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

the purification and characterization of a fully active antimycin and myxothiazol-sensitive mitochondrial *bc*₁ complex from *Polytomella* spp. We have also characterized spectroscopically and by gene amplification and sequencing the heme binding site of cytochrome *c*₁ and compared it with that of trypanosomatid and *Escherichia* species.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Polytomella spp. (19838, E. G. Pringsheim) was obtained from the algae collection at the University of Göttingen, Germany (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen) and is currently maintained at the Microbiological Collection of the Department of Biotechnology (CINVESTAV del I.P.N., Mexico) under the register number GDH3-951.

The microorganisms were grown in 2.5-liter wide bottom culture flasks using the medium described by Wae (1959), at pH 6.9 and without shaking, or alternatively in 10-liter fermenters with rotary agitation at 50 rpm and air bubbling at a rate of 1.0 liter/min. The cells were harvested in a Sharples centrifuge (type T1) at the late exponential phase of growth (48 h after culture inoculation) as described by Lloyd and Chance (1968). The cells were washed and resuspended in 20 mM potassium phosphate (pH 7.0). These and all subsequent steps were carried out at 4°C.

Purification of the *bc*₁ Complex—The *bc*₁ complex was obtained by a modification of the method reported by Ljungdahl *et al.* (1989). The cells were resuspended in 4 volumes of 0.2 M sucrose, 4 mM potassium EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) and broken in a glass homogenizer with a Teflon pestle (Lloyd and Chance, 1968). The resulting crude homogenate was centrifuged twice at 1,000 *g* for 8 min. The supernatant was centrifuged at 10,000 *g* for 15 min to obtain the mitochondrial fraction, which was resuspended in the same buffer and centrifuged at 10,000 *g* for 10 min. Mitochondria were solubilized in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgSO₄, and 100 mM NaCl in the presence of lauryl maltoside (2 mg/mg of protein) at a protein concentration of 10 mg/ml. After incubation for 30 min with gentle stirring, the mixture was centrifuged at 80,000 *g*, and the supernatant was dialyzed against 10 trifold volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM MgSO₄. The sample was applied to a DEAE Bio-Gel A column equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM MgSO₄ and 0.1 mg/ml lauryl maltoside. The column was washed with 3 column volumes of the same buffer. A cytochrome oxidase-enriched fraction was eluted with the same equilibration buffer in the presence of 150 mM NaCl, and the fraction containing the purified *bc*₁ complex was eluted with 100 mM NaCl. The absorbance of the fractions was determined at 280 and 415 nm. The samples were concentrated by ultrafiltration on an Amicon YM-100 filter and stored at -70°C until use.

Purification of Other Membrane Complexes—Bovine heart mitochondrial *bc*₁ complex was obtained as described by Ljungdahl *et al.* (1989) and kept at -70°C. Bovine heart cytochrome *c* oxidase was purified according to the method of Capaldi and Hayashi (1972) and stored in small aliquots at -70°C until use. Putative *bc*₂ complex was isolated as described by Berry *et al.* (1991) and was a kind gift from Dr. Edward A. Berry (University of California at Berkeley).

Activity and Reconstitution Measurements—Cytochrome *b*, cytochrome *c*₁, and bovine heart cytochrome *c* were determined spectrophotometrically as in González-Halphen *et al.* (1991). Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity was measured as described before (Vázquez-Acevedo *et al.*, 1993).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis—Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described by Schägger *et al.* (1986), using 1.2-mm-thick slab gels (16% acrylamide) or alternatively by the method of Laemmli (1970) at 14% acrylamide. Gels were fixed and stained as described in these works. Blue Native electrophoresis for the identification of membrane protein complexes was run as described by Schägger and von Jagow (1991).

Gel Filtration Chromatography—A column (2.6 × 90 cm) of Sephacryl S-300 was equilibrated with 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, and 0.1 mg/ml lauryl maltoside. The void volume was determined by exclusion of blue dextran 2000. The column was calibrated using the following proteins of known molecular weight (Sigma): thyroglobulin (669,000), apoferritin (443,000), β -amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), bovine albumin (66,000), and carbonic anhydrase (29,000), dissolved in the same buffer, which, in addition, contained 5% glycerol. The elution volumes of the standards and samples were determined by measurement of the absorbance at 280 nm and 415 nm in the case of the *bc*₁

complex. The molecular weight of the samples was calculated as described by Pies (1968).

Amino-terminal Sequence Analysis of Subunits—When polypeptides were isolated for amino-terminal sequence analysis, gels were run as described by Schägger *et al.* (1986), and the peptides were transferred onto a ProBlott membrane at 400 mA for 2.5 h (4°C) in the presence of 10 mM CAPS¹ (pH 11.0) and 10% methanol following the procedure of Matsudaira (1987). The membranes were stained, destained, and air dried as described by the same author. Hydrolysis and amino acid analysis of an aliquot of each sample were carried out to estimate the amount of protein destined for sequencing. Amino-terminal sequence analysis was carried out on a model 470 Microsequencer with on-line phenylthiohydantoin analysis (Applied Biosystems) at the W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Yale University.

Antibodies and Western Blots—Antibodies against the beef heart *bc*₁ complex subunits were raised and partially purified by ammonium sulfate precipitation as described before (González-Halphen *et al.*, 1991). Immunoblotting was carried out as described by Towbin *et al.* (1979) with the modifications described by González-Halphen *et al.* (1988).

PCR Amplification and Partial Sequence of the Cytochrome *c*₁—Two degenerate deoxyoligonucleotides were synthesized on an Applied Biosystems model 381A DNA synthesizer in the Molecular Biology Facilities at the Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Mexico) by Dr. Laura Ongay. The forward deoxyoligonucleotide 5'-C CAT GGA TCC (G+ATAC (G+AGT(TA) (G+AGC GGG (G+AGT (G+ACC (G+ATC (TC) GTA (C+ATC-3' was designed based on the amino-terminal sequence analysis of cytochrome *c*₁ from *Polytomella* spp. (AEAXDGLHLYSYD) and the codon usage for *Polytomella agilis* proposed by Conner *et al.* (1989). The backward deoxyoligonucleotide 5'-G GAG GGA TCC GATU(C) GGU(C) CUU(C) CAU(C) C(C) GGU(C) UCU(C) UAC CCG-3' was designed based on the highly conserved sequence (E-D)YEDGTPAISTV common to the mitochondrial cytochromes *c*₁ from bovine, yeast, *Neurospora crassa*, *Paramecium dentifilicis*, *E. gracilis*, and *C. fascicularis* (Haukaas *et al.*, 1988; Mukai *et al.*, 1988; Priest and Haplok, 1992).

Total DNA from *Polytomella* spp. was used as template for amplification by PCR. In this procedure, reaction mixtures were denatured at 94°C for 12 min followed by 50 cycles of 30 s denaturation at 94°C, 40 s annealing at 55°C, and 2 min extension at 72°C. The PCR product was gel purified and ligated into the pGEM1⁺ plasmid (Invitrogen). Transformed *Escherichia coli* DH5α cells were plated on ampicillin LB plates, and recombinant plasmids were selected by loss of β -galactosidase activity. Subclones obtained from two separate amplification reactions were sequenced by primer extension using the dideoxy chain termination method of Bangor *et al.* (1977).

Other Methods—Protein concentrations were determined according to Lowry *et al.* (1951) with the modifications of Markwell *et al.* (1978). Total DNA from *Polytomella* spp. was obtained as described by Conner *et al.* (1989) for *P. agilis*. Standard recombinant DNA techniques were carried out essentially as described by Sambrook *et al.* (1989).

RESULTS

Purification of the *bc*₁ from *Polytomella* spp.—Mitochondria were obtained from the *Polytomella* spp. cells by disruption in a Teflon pestle homogenizer and differential centrifugation. The mitochondrial fraction was solubilized in the presence of lauryl maltoside containing *n*-nonyl caproic acid and subjected to a Blue Native electrophoresis as described by Schägger and von Jagow (1991). In this system, the respiratory complexes tend to migrate as discrete bands. The pattern of migration of the respiratory complexes differed from the one described by Schägger and von Jagow (1991) for the bovine heart mitochondria. In the case of *Polytomella* spp., complex III migrated before complex V, and complexes II and IV were not clearly resolved. The composition of the complexes was analyzed by second dimensional electrophoresis (Fig. 1). Complex III (*bc*₁ complex), identified by its position in the first dimensional native blue gel, was found to be composed of at least six major subunits when resolved in the second dimension, with appar-

¹ The abbreviations used are: CAPS, 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; PCR, polymerase chain reaction; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

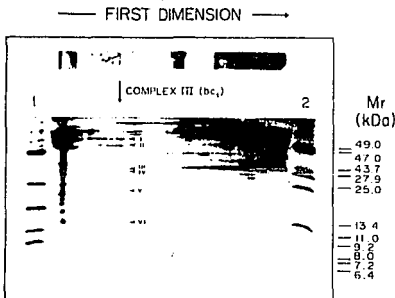


Fig. 1. Two-dimensional gel of the mitochondrial complexes from *Polytomella* spp. using Blue Native electrophoresis in the first dimension (300 μ g of protein) and a Schagger *et al.* (1986) gel system (16% acrylamide) in the vertical dimension. The band identified as bc₁ complex in the Blue Native electrophoresis is indicated as complex III. The major polypeptide components of the bc₁ complex in the second dimension are numbered 1 to VI. Controls (run only in the vertical dimension) were added in the lateral lanes of the second dimension SDS-PAGE (30 μ g of protein): lane 1, beef heart cytochrome oxidase; lane 2, beef heart bc₁ complex.

TABLE I
Purification of the bc₁ complex from *Polytomella* spp.

Fraction	Protein mg	Yield %	Specific activity	
			units/mg	Cytochrome c, nmol/hem/mg protein
Mitochondria	1,500	100	0.53	0.12
Lauryl maltoside extract	696	46.4	8.9	1.90
DEAE-Bio-Gel A	30	2.0	52.8	2.70

ent molecular masses (in kDa) of 50.0 (subunit I), 46.2 (subunit II), 35.5 (subunit III), 32.5 (subunit IV), 25.5 (subunit V), and 16.1 (subunit VI).

Table I summarizes the recovery of protein, heme b, and ubiquinol cytochrome c reductase activity during the purification of the bc₁ complex from *Polytomella* spp. The complex was purified to apparent homogeneity from the dodecyl maltoside extract of the mitochondrial fraction in a single ion exchange column. The solubilized extract was applied to a DEAE-Bio-Gel A column and washed, and a cytochrome oxidase-enriched fraction was obtained after elution with 150 mM NaCl. This fraction was saved for further purification. The bc₁ complex was recovered in a single peak when the column was eluted in the presence of 400 mM NaCl (elution profile not shown). A single ion exchange chromatographic step allowed the purification of the bc₁ complex, and a clear separation between the fraction enriched in cytochrome c oxidase and the bc₁ complex was attained. The purified bc₁ complex catalyzed electron transfer from the ubiquinol analog DBH to horse-heart cytochrome c. This activity was sensitive to the classical bc₁ complex inhibitors antimycin (97.3% inhibition at 1 μ M) and myxothiazol (99.7% inhibition at 10 μ g/ml).

With respect to the activity in mitochondria, DEAE-Bio-Gel A chromatography of the lauryl maltoside extract increased the specific activity of cytochrome c reductase 100-fold from the one measured in mitochondria. The enrichment was also evident in the content of specific protein subunits of the complex as judged by polyacrylamide gel electrophoresis. Whereas the detergent

extract had essentially the same heterogeneous composition as the starting mitochondrial fraction (data not shown), the fraction recovered from the DEAE-Bio-Gel A column exhibited 10 polypeptides, which appear to constitute the cytochrome bc₁ complex (Fig. 2).

Cytochrome Content of *Polytomella* spp. bc₁ Complex.—In Fig. 3 are absorption spectra showing differential reduction of the cytochromes. The intact complex displayed a major absorbance peak in the Soret region at 415.5 nm. Upon reduction with dithionite, this γ -peak increased in intensity and shifted its maximum to 430 nm, while absorption bands appeared in the α - and β -region of the cytochromes (Fig. 3). A double peak spectrum was evident in the α -band, with absorption maxima of 553 nm for cytochrome c₁ and of 566 nm for cytochrome b (Fig. 3, inset). Reduction of the complex with ascorbate elicits a differential spectrum typical for cytochrome c₁, with a maximum at 552 nm (Fig. 4A). Reduction with dithionite results in the appearance of a pronounced absorption peak at 566.5 nm, attributable to the reduction of cytochrome b (Fig. 4B). From the difference spectra of the ascorbate-reduced and dithionite-reduced complex, we calculated (based on the extinction coefficients for the beef heart enzyme) that the *Polytomella* spp. bc₁ complex contained 4.2 nmol of cytochrome b and 2.7 nmol of cytochrome c₁/mg of protein, with a bc₁ stoichiometry of 1.53.

The spectra of cytochrome c₁ and of cytochrome b in the α -band resolved in two well defined peaks at room temperature, as observed previously in the spectra of whole mitochondria from *P. carra* (Lloyd and Chance, 1968). The red shift in

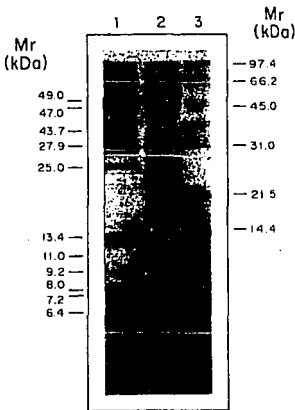


Fig. 2. Comparative SDS-PAGE (Schägger *et al.*, 1986) of purified mitochondrial *bc₁* complex from *Polytomella* spp. (lane 2) and from beef heart mitochondria (lane 3) (50 µg of protein/lane) as compared with SDS-PAGE standards (phosphorylase b, 97,400; bovine serum albumin, 66,200; ovalbumin, 45,000; carbonic anhydrase, 31,000; soybean trypsin inhibitor, 21,500; and lysozyme, 14,400) (lane 1).

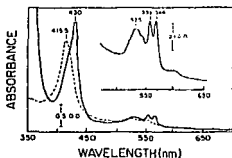


Fig. 3. Visible spectra of the *bc₁* complex from *Polytomella* spp. The *bc₁* complex was diluted in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 24 µM EDTA and 0.1 mg/ml lauryl maltoside. *Broken lines*, oxidized sample, as obtained. *Continuous line*, *bc₁* complex fully reduced in the presence of a small amount of dithionite. *Inset*, amplification of the *u*- and *b*-absorption bands of the fully reduced sample.

the α -absorption peak of cytochrome *c₁* was not observed as in the case of the *bc₁* complexes isolated from other protozoan sources, such as *E. gracilis* and *C. fasciculata* (Mukai *et al.*, 1989a; Priest and Hajduk, 1992). Therefore, these spectroscopic characteristics predicted the existence of a classical heme binding site in *Polytomella* spp., in which the heme group is covalently bound to the cytochrome *c₁* apoprotein via 2 different cysteine residues in the consensus region CXCH.

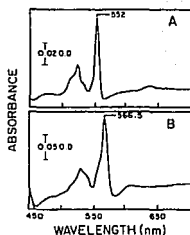


Fig. 4. Difference spectra of the cytochromes of the *bc₁* complex from *Polytomella* spp. *Panel A*, ascorbate-reduced minus ferricyanide spectrum (cytochrome *c₁*). *Panel B*, dithionite-reduced minus ascorbate-reduced spectrum (cytochrome *b*).

Subunit Composition and Immunochemical Properties of *Polytomella* spp. *bc₁* Complex—The apparent molecular mass of the subunits was determined by comparison with a set of molecular weight markers and with the subunits of the beef heart mitochondrial *bc₁* complex, according to the data reported by Schägger *et al.* (1986) (Fig. 2). The subunit structure of the *Polytomella* spp. *bc₁* complex was similar to that from other eukaryotic sources, with more subunits than its prokaryotic counterparts. The calculated apparent molecular masses (in kDa) of the 10 polypeptides on the electrophoretic system used were: I, 50.0; II, 46.2; III, 35.5; IV, 32.5; V, 25.5; VI, 16.1; VII, 12.6; VIII, 12.2; IX, 11.0 and X, 10.9. The observed composition is in agreement with the six high molecular weight polypeptides identified with the Blue Native electrophoresis (see above, Fig. 1). The small molecular weight subunits VII, VIII, and IX did not stain readily with Coomassie Brilliant Blue but were revealed by laser scanning densitometry (data not shown). The homology of these subunits with their beef and yeast counterparts remains to be ascertained.

Subunit IV was identified as cytochrome *c₁*, since it was the only band that stains for heme in the presence of tetramethylbenzidine, and it is the only component expected to contain covalently bound heme (Fig. 5A). Three polypeptides of the *Polytomella* spp. *bc₁* mitochondrial complex exhibited cross-reactivity with antibodies raised against subunit IV (cytochrome *c₁*), subunit V (Rieske type iron-sulfur protein), and subunit VI of the beef heart mitochondrial *bc₁* complex, when assayed in Western blots (Fig. 5B). In some preparations, the antibodies against subunit V decorated two bands in the transferred *Polytomella* spp. electrophoretic pattern, indicating the presence of a mild proteolysis of the Rieske type iron-sulfur protein, which is known to be susceptible to proteolytic cleavage (Baum *et al.*, 1967; Ball *et al.*, 1977; Li *et al.*, 1981; González-Halphen *et al.*, 1991). When the purification procedure was carried out in the presence of protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 50 µg/ml of *N*^ε- μ -tosyl-L-lysine chromomethyl ketone in all the buffers), a single band of 25.5 kDa was found to cross-react with the antibody. Antibodies directed against subunits I, II (core proteins), and III (cytochrome *b*) of the beef heart enzyme gave no cross-reaction with the polypeptides of the *bc₁* complex from *Polytomella* spp.

The presence of three high molecular weight polypeptides (core proteins) has been reported in the case of the *bc₁* com-

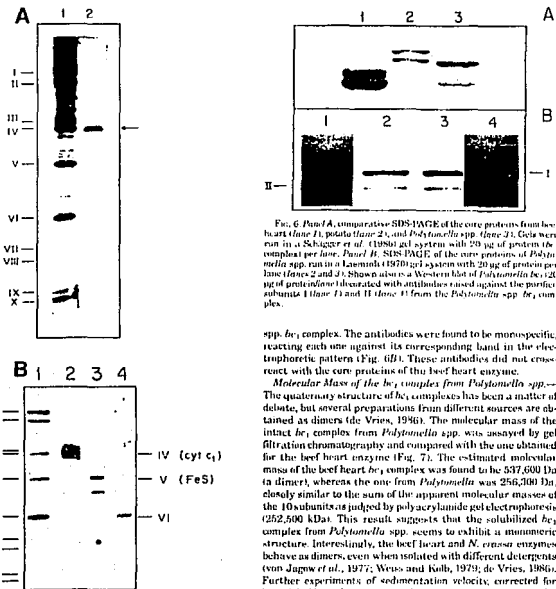


Fig. 5. Panel A, tetramethylbenzidine staining of covalently attached heme groups. Lane 1, Coomassie Blue-stained gel of *Polytomella* spp. bc_1 complex; lane 2, tetramethylbenzidine-stained gel of the same sample. Panel B, lane 1, Coomassie Blue-stained gel of *Polytomella* spp. bc_1 complex (20 μ g of protein). Shown also is a Western blot of *Polytomella* bc_1 (20 μ g of protein/lane) immunostained with antibodies raised against the purified subunits IV (lane 2), V (lane 3), and VI (lane 4) from the bovine heart bc_1 complex.

plexes from higher plants such as potato (Berry *et al.*, 1991; Braun and Schmitz, 1992) and from the protozoan *C. fasciculata* (Priest and Hajduk, 1992). The bc_1 complex from *Polytomella* spp. exhibited only two high molecular weight subunits when run in two different electrophoretic systems: Laemmli (1970) (Fig. 6A) and Schagger *et al.* (1986) (Fig. 6B). Fig. 6A also compares the core proteins from three different bc_1 complexes: beef heart, potato, and *Polytomella* spp. Although three polypeptides are clearly seen in the potato bc_1 complex, only two distinct bands were present in the beef heart and in the *Polytomella* enzymes. Conventional antibodies were raised against the core proteins (subunits I and II) of the *Polytomella*

Fig. 6. Panel A, comparative SDS-PAGE of the core proteins from beef heart (lane 1), potato (lane 2), and *Polytomella* spp. (lane 3). Gels were run in a Schagger *et al.* (1986) gel system with 20 μ g of protein (bc_1 complex) per lane. Panel B, SDS-PAGE of the core proteins of *Polytomella* spp. run in a Laemmli (1970) gel system with 20 μ g of protein per lane (lanes 2 and 3). Shown also is a Western blot of *Polytomella* bc_1 (20 μ g of protein/lane) decorated with antibodies raised against the purified subunits IV (lane 1) and II (lane 4) from the *Polytomella* spp. bc_1 complex.

spp. bc_1 complex. The antibodies were found to be monospecific, reacting each one against its corresponding band in the electrophoretic pattern (Fig. 6B). These antibodies did not cross-react with the core proteins of the beef heart enzyme.

Molecular Mass of the bc_1 complex from *Polytomella* spp.—The quaternary structure of bc_1 complexes has been a matter of debate, but several preparations from different sources are obtained as dimers (de Vries, 1996). The molecular mass of the intact bc_1 complex from *Polytomella* spp. was assayed by gel filtration chromatography and compared with the one obtained for the beef heart enzyme (Fig. 7). The estimated molecular mass of the beef heart bc_1 complex was found to be 537,600 Da (a dimer), whereas the one from *Polytomella* was 256,700 Da, closely similar to the sum of the apparent molecular masses of the 10 subunits as judged by polyacrylamide gel electrophoresis (252,500 kDa). This result suggests that the solubilized bc_1 complex from *Polytomella* spp. seems to exhibit a monomeric structure. Interestingly, the beef heart and *N. crassa* enzymes behave as dimers, even when isolated with different detergents (von Jagow *et al.*, 1977; Weiss and Kolb, 1979; de Vries, 1986). Further experiments of sedimentation velocity, corrected for bound lipids and detergent, will be necessary to assess the quaternary structure of the bc_1 complex from *Polytomella* spp.

Amino-terminal Sequence Analysis of the Subunits from the bc_1 Complex—Purified subunits II (core protein II) and IV (cytochrome c_1) were subjected to amino acid analysis and to amino-terminal sequencing after transfer to a ProBlot membrane. The identified residues are shown in Table II. Interestingly, the amino-terminal sequence of subunit II showed sequence similarity with residues 246–254 (LPATAVVSS) of core protein I of the bc_1 complex from *N. crassa* (Schulte *et al.*, 1989). Further sequencing of subunit II from the bc_1 complex from *Polytomella* spp. will be required to assess the possible homology between these polypeptides.

Direct Sequence Analysis of the Heme Binding Site of Cytochrome c_1 from *Polytomella* spp.—The amino-terminal sequence of cytochrome c_1 allowed the design of one deoxyoligonucleotide, with the codon usage for *P. agilis* proposed by Conner *et al.* (1989). A second deoxyoligonucleotide was designed based on the highly conserved sequence of c_1 type cytochromes toward the carboxyl terminus of the protein: (E or

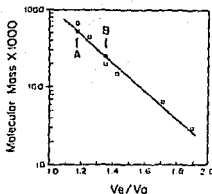


FIG. 7. Curve used for the estimation of the molecular mass of the lauryl maltoside-solubilized bc_2 complexes from beef heart (A) and from *Polytomella* spp. (B) by gel filtration chromatography on Sepharose 6B-300. Molecular mass standards were the ones described under "Experimental Procedure."

DIYEDGTPA/S or T) (Hauka et al., 1988). Using these deoxyoligonucleotides, total DNA from *Polytomella* spp. was subjected to amplification by PCR. The primers were expected to amplify a 350-base pair fragment of the cytochrome c_1 gene, but instead a 800-base pair fragment was obtained (data supplied to reviewers but not shown), suggesting the presence of introns in the cytochrome c_1 gene. This was confirmed by direct sequencing of the PCR amplification products. (The sequence of the full-length open reading frame is currently in progress and will be the subject of a future paper). Nucleotides were translated using the codon usage for *Polytomella* proposed by Conner et al. (1989). The deduced amino acid sequence for the putative heme binding site of the apocytochrome c_1 is shown in Fig. 8. A classical consensus binding site for c type cytochromes, CXXCH was obtained for the apocytochrome c_1 of *Polytomella* spp.

DISCUSSION

We have purified for the first time a bc_2 complex from *Polytomella* spp., a Chlorophyte of the order Chlamydomonadales and the family Chlamydomonadaceae (Melkonian, 1990). This colorless quadriflagellate seems to be closely related to the genus *Chlamydomonas* (Matta and Stewart, 1984), sharing common morphological and functional features, i.e. the flagellar apparatus ultrastructure (Brown et al., 1976), the location of the major cell organelles, the presence of a special intramembrane array (the huaclet) at the flagellar base, and the pattern of mitosis and cell division.² Thus it is believed that the genus *Polytomella* may have evolved from a *Chlamydomonas*-like precursor by losing the cell wall and the photosynthetic apparatus (Round, 1980; Conner et al., 1989). Molecular evidence supporting the close relationship between these two protocists includes intron number and placement of the β -tubulin-encoding genes, the homology of the deduced amino acid sequences from these genes (more than 98% sequence similarity), and the codon usage bias (Conner et al., 1989). Comparison of the 18 S rDNA sequences also indicates that *Chlamydomonas* and *Polytomella* are presumably monophyletic to the exclusion of taxa such as *Spermatopsis*, *Dunaliella*, and *Asteromonas*.²

The biochemical characterization of the mitochondrial respiratory complex has been difficult to achieve in *Chlamydomonas* because of the large contamination by chloroplast proteins during the purification procedures (Harris, 1989). Nevertheless, some mitochondrial proteins that copurify with thylakoid membranes have been recently identified, including cyto-

chrome c , cytochrome b , and the β -subunit of the ATPase (Attein et al., 1992). As noted, two distinct features of the genus *Polytomella* allowed the solubilization and purification of the cytochrome bc_2 complex: the lack of the glycoprotein type cell wall (naked cells) and the lack of photosynthetic pigments (colorless cells). The method for the purification of the complex is relatively simple and highly reproducible, involving only the solubilization of mitochondria followed by a simple chromatographic step (Ljungdahl et al., 1989). The value of this technique, which has been used in the isolation of bc_2 complexes from different sources including bovine, yeast, and photosynthetic bacteria, has been extended in this work to the purification of this respiratory complex from protocists.

To our knowledge, this is the first mitochondrial bc_2 complex isolated from a protocist source which exhibits high rates of ubiquinol-cytochrome c reductase activity (turnover number of 325 s^{-1}), sensitive to the classic electron transport inhibitors, antimycin and myxothiazol. From the previously reported data, turnover numbers of 2.6 s^{-1} for the *E. gracilis* bc_2 complex (Mukai et al., 1989a) and of 1.9 s^{-1} for the *C. fasciculata* bc_2 complex (Priest and Hajduk, 1992) may be estimated. These differences in the activity rates may be because of the detergents used in the solubilization and purification of the complex. The *E. gracilis* complex was solubilized in the presence of Triton X-100, a non-ionic detergent that is known to dissociate partially the Rieske type iron-sulfur protein from the rest of the bc_2 complex at relatively high concentrations (Egdel et al., 1983). The use of the zwitterionic detergent CHAPS for the solubilization of the bc_2 complex from *Critidia* may also have a deleterious effect on the activity of the complex. In this work, the solubilization of mitochondria was carried out with the non-ionic detergent lauryl maltoside, which has proved to be a suitable agent in the isolation of highly active bc_2 complexes from diverse biological sources (Ljungdahl et al., 1989; Andrews et al., 1990). High concentrations of this detergent were required to solubilize the mitochondria of *Polytomella* spp. (2 mg of detergent/mg of protein), nevertheless, no loss of ubiquinol-cytochrome c reductase activity was observed in this step. On the contrary, the detergent seems to activate the bc_2 complex.

The size and number of protein subunits in the isolated complex are closely similar to other previously reported mitochondrial bc_2 complexes. Of special interest is the presence of only two high molecular weight subunits known as core proteins I and II, which have been considered *bona fide* subunits of the bc_2 complex. They are absent in the preparations of prokaryotic bc_2 complexes but present in all of the bc_2 complexes from mitochondrial sources (Hauka et al., 1983; Trumppower, 1991). Although they do not seem to function directly in the catalytic activity, they are thought to participate during the biogenesis of the complex (Schultz et al., 1989; Braun et al., 1992; Schmitt and Trumppower, 1991; Genie et al., 1991). In the case of higher plant bc_2 complexes, as in potato, the existence of three different core subunits has been observed (Berry et al., 1991; Braun and Schmitz, 1992). Interestingly, the bc_2 complex isolated from *Critidia* showed also three high molecular weight subunits, which have been described as core proteins (Priest and Hajduk, 1992). In addition, the bc_2 complexes from the kinetoplast species *Leishmania* and *Trypanosoma* have also three core proteins.³ The bc_2 complex of *Polytomella* spp. exhibited only two high molecular weight subunits even when run in two different electrophoretic systems (Luomaniemi, 1970; Schagger et al., 1976). When Western blots were decorated with an antibody raised against a mixture of subunits I and II from the beef heart bc_2 complex, cross-reactivity was observed against subunit II of *Polytomella* spp. (data not shown). Amino-terminal

² M. Melkonian, personal communication.

³ E. A. Berry, personal communication.

TABLE II
Amino-terminal sequence analysis of subunits II and IV of *Polytomella* spp. bc₁ complex

	Cycle												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Subunit II	X	Ile	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	
Subunit IV	Ala	Glu	Ala	X	Asp	Gly	Leu	Ile	Pro	Val	Ser	Tyr	Pro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		F	A	P	C	H							
<i>Citridia fasciata</i>	E	V	F	A	P	C	H	S	L	G	R		
<i>Leshmania tarantulae</i>	E	V	F	A	P	C	H	S	L	G	H		
<i>Trypanosoma brucei</i>	L	V	F	A	P	C	H	P	L	G	H		
<i>Bodo costalis</i>	E	V	F	A	P	C	H	P	L	G	K		
<i>Euglena gracilis</i>	Q	V	F	A	P	C	H	S	L	S	F		
<i>Polytomella</i> spp.	Q	V	C	A	A	C	H	S	M	V	T		
<i>Neurospora crassa</i>	E	V	C	A	C	H	S	L	S	R			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E	V	C	A	A	C	H	S	L	D	R		
<i>Bos primigenius taurus</i>	Q	V	C	S	S	C	H	S	M	D	T		
		C	X	X	C	H							

FIG. 8. Comparative table of the home binding sites in cytochrome *c*₁ sequences from different species. Sequenced data were taken from Hanaoka *et al.* (1988), Mukai *et al.* (1989b), and Priest and Hajduk (1992). This sequence for the home binding site for the cytochrome *c*₁ from *Polytomella* spp. is the one obtained in this work. The protecting species are boxed with a dashed line and the canonical home binding sites with a continuous line.

sequence analysis of subunit II from *Polytomella* spp. showed sequence similarity with subunit I of the bc₁ complex from *N. crassa*, which has been identified as a protease-enhancing protein (Schulte *et al.*, 1989). In addition, monospecific conventional antibodies were raised against subunits I and II from the bc₁ complex of *Polytomella* spp., which reacted with their respective high molecular weight subunits when assayed in Western blots but did not cross-react with the core proteins from the beef heart bc₁ complex. This indicates that although subunits IV (cytochrome *c*₁), V (heme type iron-sulfur protein), and VI share common conserved antigenic epitopes with the beef heart enzyme, the core proteins (subunits I and II) show less structural similarity as judged by their immunochromatological behavior in Western blots.

The partial sequence of the gene that codes for the mitochondrial cytochrome *c*₁ in *Polytomella* spp. was found to be CAACH, identical to the heme binding site found in *Saccharomyces cerevisiae*. The atypical characteristics of *c*₁ type cytochromes (*c*₁ and *c*₂) described for some protozoan species, mainly an asymmetrical α -peak shifted to the red, and the heme group attachment to the apocytochrome through a single thioether bond (Pettigrew *et al.*, 1975), may be ascribed only to the trypanosomatid and euglenoid species. Interestingly, the Euglenoids and Chlorophydonadates appear as closely related species in a phylogenetic analysis based on the inferred amino acid sequences from the genes *psbA* (photosystem II reaction center protein D1), *rbcL*, and *rbcS* (the large and small subunits of the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase holozyme), which participate in the photosynthetic process (Morden *et al.*, 1992). In this work, based on the spectroscopic characteristics and the partial sequence of the gene, we show that the heme binding site of cytochrome *c*₁ of the colorless flagellate *Polytomella* spp. contains the classical consensus sequence CXXCH and that it therefore appears to be more closely related to the one found in animals and fungi and clearly distinct from the phyla Zoomastigina (which includes the class Kinetoplastida)

and Euglenida (Fig. 8). As discussed by Pettigrew (1979), based on the comparison of several soluble *c*₁ type cytochromes, the single thioether bond is not a general feature of protozoan cytochromes, and the loss of one of the cysteines on the heme binding site seems to have occurred only once in the line leading to the kinetoplastid species and to the Euglenida. The data obtained in the present work for a membrane-bound *c*₁ type cytochrome from a different protozoan source strongly support this conclusion.

Acknowledgments—We are grateful to Soay Samandar, Kathy Stone, and Ken Williams from the W.M. Keck Foundation Biotechnology Research Laboratory for carrying out the amino-terminal sequence analysis and to Drs. Marietta Tuena and Jesús Aguirre for helpful suggestions to this work. We are grateful to Dr. Michael Melkonian (Universidad de Köln) for sharing unpublished observations and to Dr. Edward Berry (University of California at Berkeley) for the kind gift of the potato bc₁ complex. We are indebted to Dr. Jovita Martins from the Departamento de Biociencia, CINVESTAV del IPN, who kindly agreed to receive and maintain the *Polytomella* spp. strain in her culture collection. We thank Ing. Abel Blancas (Planta de Eseratamiento, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for technical assistance in growing the microorganism in fermenters. We acknowledge the excellent technical expertise of Dr. Laura Ongay in the construction of the decacylgonucleotides and the help of M. G. Lourdes Valenzuela with the gel filtration experiments. We are grateful to Arturo Franco and Mario Durán for drawing and photographic work, to G. Ramírez for typing the final version of the article, and to Drs. M. Ovilanes, A. Gómez-Puyou, C. Gómez-Lojero, and D. W. Krogmann for helpful discussions and critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Angus, H. (1910). *How. Inst. United States*, 2, 42-52.
- Andrews, K. M., Crofts, A. R., and Conroy, R. B. (1990). *Biochemistry* 29, 2645-2651.
- Atkins, A. de Veyr, C., Pierré, Y., and Popot, J. L. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 226-234.
- Bali, M. B., Hill, R. L., and Caspary, R. A. (1977). *FEBS Lett.* 83, 99-102.
- Bassi, H., Schuster, D. J., Hecht, G., and Lipman, S. H. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 4970-4977.
- Berry, E. A., Huang, L., and DeRose, V. J. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 9064-9077.
- Brown, H. P., and Schmidt, U. K. (1992). *Eur. J. Biochem.* 200, 761-767.
- Brown, H. P., Eisenmatten, M., Koch, V., and Schmidt, U. K. (1992). *EMBO J.* 11, 3218-3227.
- Brown, D. L., Maccallini, A., and Palomares, R. (1976). *J. Cell Biol.* 49, 109-123.
- Burton, M. D., and Moore, J. (1974). *J. Ultrastruct. Res.* 48, 414-419.
- Caspary, R. A., and Haverath, H. (1972). *FEBS Lett.* 20, 201-203.
- Conner, T. W., Thompson, M. J., and Sillcox, C. (1989). *Gene (Amst.)* 184, 335-354.
- de Vries, S. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 195-224.
- Knecht, W. D., Mitchell, G., and van Zanten, G. (1983). *Eur. J. Biochem.* 132, 495-497.
- Evans, D. A., and Lloyd, D. (1967). *Protocoll.* 13, 119.
- Genot, N., Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). *Eur. J. Biochem.* 198, 123-131.
- González-Halphen, D., Lindstedt, M. A., and Caspary, R. A. (1989). *Biochemistry* 28, 2221-2225.
- González-Halphen, D., Vázquez Acevedo, M., and García-Ponce, B. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 1870-1876.
- Hanaoka, F., Hori, E., Gabelein, S., and Lecksa, W. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 728, 97-111.
- Hanaoka, F., Nishikubo, W., and Hermann, R. G. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131, 211-220.
- Loewen, U. K. (1970). *Nature* 227, 600-605.
- Lewis, E., Munger, G., Watson, H., and Wise, D. (1971). *J. Protozool.* 18, 647-649.
- Lu, Y., de Vries, S., Leonard, K., and Weiss, H. (1991). *FEBS Lett.* 283, 277-280.
- Lundquist, D. O., Beckmann, J. D., and Trumpower, B. L. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 3743-3751.
- Lloyd, D., and Chacek, H. (1964). *Biochem. J.* 107, 829-837.
- Lloyd, D., Evans, D. A., and Venables, S. E. (1968). *Biochem. J.* 109, 897-907.
- Loewen, U. K., Honebrough, N. J., Parr, A. L., and Handall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978). *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
- Matsumura, P. (1957). *J. Biol. Chem.* 252, 10035-10038.
- Martin, K. H., and Sloniewski, K. D. (1981). In *Systematics of the Green Algae (Division, D. E. G.)*, and Johns, D. M., eds. (pp. 29-32, Academic Press, London.

- Melkonian, N. (1990) in *Handbook of Protozoists* (Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J., eds) pp. 608-616. Johns and Bartlett, Boston.
- Moores, C. W., Deloache, C. F., Kuhad, M., and Palmer, J. D. (1992) *BioSystems* **28**, 75-90.
- Mukai, K., Yoshida, M., Toyozaki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S., and Matsubara, H. (1989) *Eur. J. Biochem.* **178**, 649-656.
- Mukai, K., Wakabayashi, S., and Matsubara, H. (1995) *J. Biochem.* **116**, 479-482.
- Pettigrew, G. W. (1979) in *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Levanon-Sky, M., and Hulner, S. H., eds) Vol. 1, pp. 59-90. Academic Press, New York.
- Pettigrew, G. W., Leaver, J. L., Meyer, T. E., and Pyle, A. P. (1975) *Biochem. J.* **147**, 281-312.
- Pier, K. A. (1968) *Anal. Biochem.* **28**, 305-312.
- Priest, J. W., and Hagdick, S. L. (1991) *J. Mol. Chem.* **287**, 20188-20195.
- Pronchstein, E. G. (1955) *J. Protozool.* **2**, 137-145.
- Rand, F. F. (1960) *BioSystems* **1**, 61-69.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schagger, H., Lisk, T. A., Engel, W. H., and von Jagow, G. (1996) *Methods Enzymol.* **136**, 224-237.
- Schmitt, M. E., and Trumppower, B. L. (1991) *J. Mol. Chem.* **266**, 14958-14963.
- Schultz, U., Arntz, M., Schneider, H., Tröschel, M., Wächter, E., Neupert, W., and Weiss, H. (1988) *Nature* **339**, 147-149.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Trumppower, B. L. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 101-129.
- Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N., and González-Halphen, J. (1993) *J. Neurocyt. Biomech.* **23**, 401-410.
- von Jagow, G., Schagger, H., Rocio, P., Klingenberg, M., and Kuhl, H. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 549-559.
- Weiss, H., and Kuhl, H. J. (1979) *Eur. J. Biochem.* **99**, 139-149.
- Wise, D. L. (1959) *J. Protozool.* **6**, 19-23.