

03062
1
Zey



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL
DEL DNA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA
POLYTOMELLA SPP, Estudio de los genes que codifican
para la subunidad I de la citocromo c oxidasa y para el
citocromo b.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A:
ANAID ANTARAMIAN SALAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. DIEGO GONZALEZ HALPHEN

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

A Roberto:

Por su amor, paciencia y compañía

durante estos años.

A Andrés:

Por los momentos tan agradables que

me hace pasar.

Agradecimientos:

A los sinodales: Dra. Blanca Barquera, Dr. Heliodoro Celis, Dr. Mauricio Díaz, Dr. Diego González-Halphen y Dr. Adolfo García Sáinz. Por los acertados comentarios para mejorar esta tesis, así como la rápida revisión de la misma.

Al Dr. Diego González-Halphen por toda la ayuda que me ha brindado a lo largo de mi formación académica, así como por su entusiasmo en este trabajo y por los consejos y regaños que me ha brindado durante estos años, tanto académicos como personales.

A la Dra. Alicia González por su participación en el comité tutorial, porque ha sido parte fundamental de mi formación académica y muy especialmente por la amistad que me brindó desde el comienzo de mi carrera.

Al Dr. J. Manuel León Cázares por darle un enfoque evolutivo al trabajo durante los comités tutoriales y por su disposición incondicional.

Al Dr. Roberto Coria por su incansable ayuda en el desarrollo del proyecto.

Quiero agradecer especialmente a mis papás por su apoyo incondicional a todos mis proyectos, aún los más locos.

A Jorge Ramírez por su amistad y por toda la ayuda que me ha brindado siempre para los experimentos, fotos, etc.etc.

A mis hermanos Verónica, Eduardo y Carlos por su apoyo y compañía.

A Miriam y Ember por los ratos agradables y por su ayuda.

A los miembros del laboratorio 302ote. por soportarme: Alma, Laura, Vero, Carlos. Sol y Lupita.

A todos los que han cuidado amablemente a Andrés cuando la mamá así lo requirió.

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

Durante la realización de esta tesis, recibí el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro: 83966.

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.

Agradezco a la Dra. Laura Ongay por la elaboración de los oligonucleótidos.

Y a Jorge Sepúlveda, de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, por las fotos que amablemente tomó.

INDICE:

	página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	
La cadena respiratoria mitocondrial.	2
Los genomas mitocondriales.	4
El complejo III mitocondrial o complejo bc ₁ .	7
El citocromo b.	9
Complejo IV mitocondrial o citocromo c oxidasa.	11
La subunidad I de la citocromo c oxidasa.	12
El genoma mitocondrial de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	16
 Un modelo alternativo: el alga incolora <i>Polytomella spp.</i>	 18
ANTECEDENTES DIRECTOS	24
OBJETIVOS	26
METODOS	27
RESULTADOS	36
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	69

RESUMEN

El DNA mitocondrial codifica para algunas subunidades hidrófobas de los complejos que participan en la cadena respiratoria, para dos RNAs ribosomales (L y S) y para algunos RNAs de transferencia. En general, los genomas mitocondriales, son moléculas circulares que varían mucho de tamaño según la especie. Los DNA mitocondriales más compactos son los de mamíferos (el de humano mide 16 Kb), pero existen algunos más grandes como el de levadura (que mide 70 Kb) y existen ejemplos de DNAs mitocondriales extremadamente grandes como el de melón (que mide 2000 Kb).

De especial interés para el presente trabajo es el DNA mitocondrial del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, que presenta varias características particulares: es una molécula lineal y compacta de 15.8 Kb, solo codifica para tres RNA de transferencia, sus RNA ribosomales están fragmentados en lo que se han denominado módulos, contiene un gene cuya secuencia predice una proteína similar a la transcriptasa reversa, a diferencia de otras especies no codifica para ninguna de las subunidades de la ATPasa y carece de los genes *cox2* y *cox3* que codifican para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa, respectivamente.

Polytomella spp. es un alga incolora clasificada en la familia Chlamydomonadales. Estudios realizados por Conner y col. (1989) demostraron que además de las semejanzas morfológicas entre *Chlamydomonas* y *Polytomella*, existe una similitud muy alta entre los genes nucleares que codifican para la β -tubulina.

En este trabajo se purificó el DNA mitocondrial de *Polytomella spp.* y se construyeron tres genotecas con DNA mitocondrial digerido con diferentes enzimas de restricción. A partir de estas genotecas empezamos a caracterizar este DNA con diferentes enzimas de restricción, para tratar de construir un mapa físico. Se localizó en la genoteca de *HindIII* al gene que codifica para la *cox1*. Este gene fue secuenciado en su totalidad y se encontró una similitud muy alta con su homólogo de *Chlamydomonas reinhardtii* (88%).

Por otro lado, amplificamos con la reacción en cadena de la polimerasa un fragmento del gene del citocromo b utilizando como molde DNA mitocondrial de *Polytomella*, este producto se clonó y secuenció; la secuencia mostró también una similitud muy grande con el citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii* (78%).

La gran similitud encontrada entre los genes caracterizados en este trabajo apoyan la hipótesis propuesta por Round (1980), de que *Chlamydomonas* y *Polytomella* compartieron el mismo evento endosimbótico que dio origen a la mitocondria actual y que la pérdida de pared celular y de cloroplastos de *Polytomella* fue un proceso relativamente reciente en la evolución.

INTRODUCCION:

La principal función de la mitocondria es la fosforilación oxidativa, fenómeno donde se produce el ATP necesario para el metabolismo celular. La mitocondria tiene dos membranas, la externa y la interna, en medio de las cuales se encuentra lo que se denomina espacio intermembranal. La membrana interna forma las crestas mitocondriales que a su vez delimitan a la matriz mitocondrial. En esta membrana interna se lleva a cabo la fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa se puede dividir en dos partes: la cadena respiratoria, que genera el gradiente electroquímico y que está formada por los complejos I, II, III y IV y la fosforilación que se lleva a cabo en el complejo V, el cual utiliza el gradiente electroquímico generado por la respiración para sintetizar el ATP.

La cadena respiratoria mitocondrial:

Los complejos respiratorios son proteínas oligoméricas formadas por varios polipéptidos integrales de la membrana interna de la mitocondria. Algunos de estos polipéptidos tienen asociados grupos redox (para revisiones, ver Capaldi y col. 1988; Capaldi, 1991). En eucariontes, el complejo I o NADH deshidrogenasa tiene alrededor de 30 subunidades, este complejo usa como sustrato al NADH y transfiere los electrones a la poza de quinonas (Pilkington y col 1993); el complejo II o succinato deshidrogenasa tiene 5 subunidades, utiliza como sustrato succinato y también transfiere sus electrones a la poza de quinonas (Ohnishi, 1987); el complejo bc₁ (o complejo III) está formado por 10 u 11 subunidades (Schägger y col., 1986), y cataliza la oxidación de quinol y la reducción de citocromo c mediada por un ciclo Q protón-motriz (Mitchell, 1975; Trumppower, 1990). Por su parte, la citocromo c oxidasa (o complejo IV) está constituida por 10 o 13 diferentes polipéptidos (Kadenbach, 1983); este complejo transfiere los electrones desde el ferricitocromo c hasta el oxígeno (figura 1).

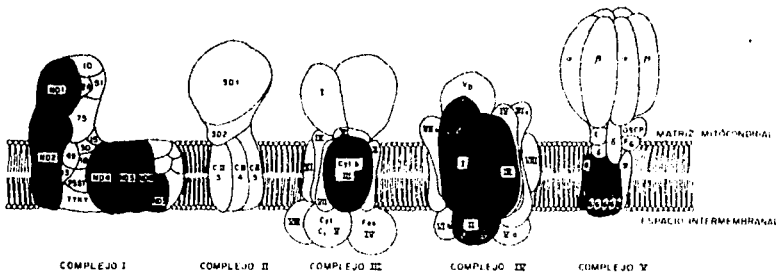


Figura 1: Complejos I, II, III y IV mitocondriales de la cadena respiratoria y el complejo V ATPasa. En sombreado se encuentran aquellas subunidades cuyos genes están codificados en el DNA mitocondrial.

FALLA DE ORIGEN

Los genomas mitocondriales:

La teoría del endosimbionte postula que las mitocondrias se originaron de procariotes parásitos similares a las bacterias aeróbicas o a las bacterias púrpuras fotosintéticas (Margulis, 1970). Se piensa que, conforme pasó el tiempo, las mitocondrias fueron exportando sus genes hacia el núcleo, de tal manera que actualmente más del 90% de las proteínas mitocondriales son de origen citoplasmático.

Resulta de gran interés que los genes que codifican para las proteínas de la cadena respiratoria que son altamente hidrofóbicas (con varios segmentos transmembranales) (figura 1) como el citocromo b (con 8 cruces transmembranales) y las subunidades I y III de la citocromo oxidasa (con 12 y 6 cruces transmembranales, respectivamente); han permanecido en el genoma mitocondrial (von Heijne, 1986) y solo los genes de proteínas con un cruce transmembranal como las subunidades IV, VIa, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII de la citocromo c oxidasa están codificadas en el genoma nuclear (Capaldi, 1991).

Todos los DNAs mitocondriales de vertebrados caracterizados a la fecha contienen genes que codifican para varias subunidades de los complejos mitocondriales: siete genes que codifican para polipéptidos del complejo I mitocondrial (NADH-ubiquinona oxidorreductasa), un gene que codifica para el citocromo b del complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa) y tres genes para los polipéptidos (subunidades I, II y III) del complejo IV mitocondrial (citocromo c oxidasa) (figura 2) (Attardi y Schatz, 1988). Por otra parte, otros organismos parecen tener solamente algunos de los genes mitocondriales: tal es el caso de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (figura 2) y *Schizosaccharomyces pombe*, las cuales carecen de los genes correspondientes a las subunidades del complejo I, (careciendo también de la clásica NADH deshidrogenasa sensible a rotenona) (Lang y col., 1983; Grivell, 1987). Algunas especies como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia* y *Chlamydomonas*, así como algunas plantas superiores, entre ellas el maíz, tienen solamente algunos de los genes del complejo I (figura 3) (Benne, 1985; Simpson, 1986; Gray y Boer, 1988; Bland y

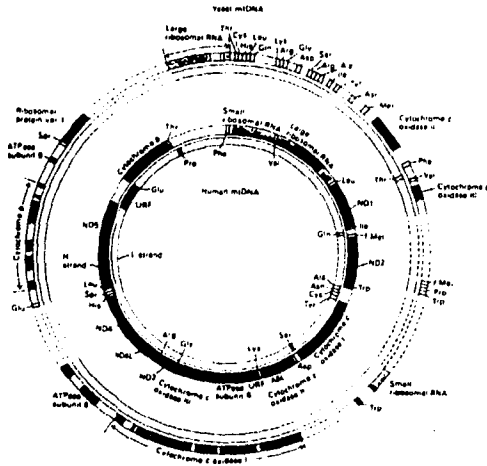


Figura 2: Genomas mitocondriales de *Sacharomyces cerevisiae*s y de humano, tomado de Tyler (1992).

FALLA DE ORIGEN

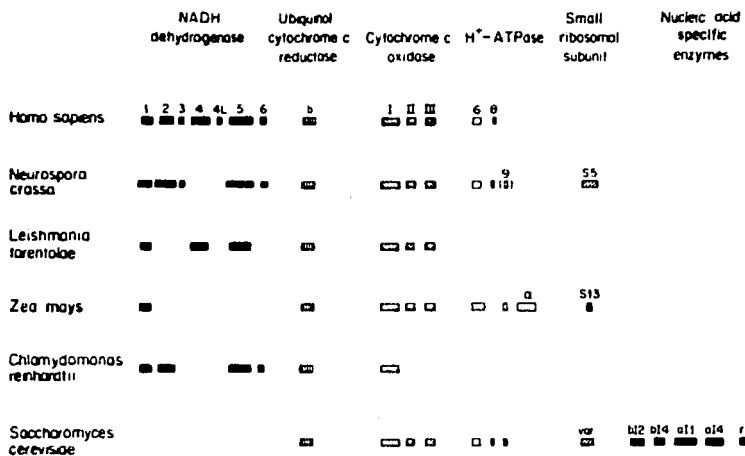


Figura 3: Esquema de los genes mitocondriales de humano. *H. sapiens*, *N. crassa*, *L. tarentolae*, *Z. mays*, *C. reinhardtii* y *S. cerevisiae*, tomado de Attardi y Schatz (1988).

FALLA DE ORIGEN

col., 1986; Stern y col., 1986). Hay ejemplos de organismos que han exportado al núcleo genes que codifican para proteínas hidrofóbicas como la subunidad 9 de la ATPasa, tal es el caso de *Neurospora crassa*, donde se ha descrito una copia de este gene en el núcleo y otra copia en la mitocondria (Pfaner y col., 1987), siendo el gene nuclear el único que se expresa (figura 3). En el caso de la soya se ha visto que a pesar de tener el gene *cox2* en el genoma mitocondrial, éste no se expresa; el gene activo se encuentra en el núcleo, el cual tiene en el extremo amino-terminal una secuencia que se asemeja a los péptidos señal de importación a la mitocondria, que se encuentra separado del gene por un intrón (Covello y Gray 1992). Lo anterior es un ejemplo de la transición en la exportación de genes mitocondriales hacia el núcleo.

El complejo III mitocondrial o complejo bc_1 :

El complejo bc_1 mitocondrial de la cadena respiratoria está compuesto por 11 subunidades, se encuentra como dímero en la membrana y el complejo monomérico tiene una masa molecular de 250 KDa. El complejo bc_1 acepta electrones de la poza de quinonas y los transfiere al citocromo c soluble. Este complejo tiene tres componentes redox: dos grupos hemo denominados de acuerdo a sus máximos de absorción b_{566} y b_{590} que están unidos al apocitocromo b formando un citocromo bihémico (Widger y col. 1984; Sarastre, 1984), un hemo tipo c unido covalentemente a la apoproteína c_1 y la proteína hierro-azufre o proteína de Rieske que contiene un centro Fe_2S_2 . Esta última proteína interviene en la transferencia de electrones del citocromo b_{590} al citocromo c_1 (Rieske y col. 1984) (figura 4). La transferencia de electrones a través del complejo bc_1 está acoplada al transporte neto de protones de un lado al otro de la membrana.

Se ha propuesto que las subunidades sin grupos redox son regulatorias, o que participan en el ensamblaje del complejo como las subunidades I y II. De interés particular en este trabajo es la subunidad III del complejo bc_1 ; el citocromo b.

El citocromo b:

El citocromo b es una proteína de 390 aminoácidos aproximadamente, tiene ocho hélices transmembranales y una novena hélice anfipática extramembranal (Crofts 1987). Las secuencias del citocromo b de 900 especies muestran un alto grado de conservación en su estructura primaria, así como cuatro histidinas invariables que unen a los dos grupos hemo denominados b_{hemo} y b_{hemo} . Estas histidinas se encuentran en la hélice denominada B (His82, His96 en *S. cerevisiae*) y en la hélice denominada D (His183, His197) (Degli Esposti y col. 1993).

La secuencia de oxidorreducción de los dos hemo indican que la His82 y la His183 unen al b_{hemo} en el lado positivo de la membrana, es decir, en el espacio intermembranal, mientras que la His96 y la His197 unen al citocromo b_{hemo} en el lado negativo de la membrana ó matriz mitocondrial (figura 5) (West y col. 1988). Mutaciones puntuales como: Cis133-Tir altera el espectro del hemo b_{hemo} y la mutación: Ser206-Leu afecta al hemo b_{hemo} , lo que confirma la unión de los hemo con las histidinas antes mencionadas (Lemesle-Meunier y col. 1993).

Los inhibidores más conocidos del citocromo b son la antimicina y el mixotiazol; por mutaciones puntuales se ha demostrado que el sitio de unión de la antimicina se encuentra en la asa que une a las hélices D y E del lado negativo de la membrana, así como algunos aminoácidos del extremo amino terminal, este sitio también lo comparten inhibidores como la fúniculosina y el diuron. La antimicina bloquea la transferencia de electrones del b_{hemo} a la ubiquinona en el sitio Q_n (este sitio se refiere al sitio de unión de la quinona en el lado negativo de la membrana). El mixotiazol por su parte bloquea la transferencia de electrones del b_{hemo} a la proteína Rieske en el sitio Q_p (el sitio de unión de la quinona en el lado positivo de la membrana) formado por la hélice extramembranal (denominada CD), el asa entre las hélices E y F y la zona distal de las hélices C y F (para mayor detalle ver Trumppower y Giannis, 1994 y Degli Esposti y col., 1993).

Complejo IV mitocondrial o citocromo c oxidasa:

La citocromo c oxidasa es el complejo terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, acepta electrones del ferrocitocromo c soluble y los transfiere al oxígeno para formar una molécula de agua. Este complejo enzimático ha sido muy estudiado en las últimas dos décadas, en especial el de corazón de bovino, que contiene 13 subunidades, tres de las cuales forman el centro activo: las subunidades I, II y III. La subunidad II que se une al citocromo c, tiene un grupo Cu_A unido a dos moléculas de cisteína y recibe los electrones del citocromo c. La subunidad I tiene dos hemo tipo α y α_3 y otro grupo Cu_B . El hemo α_3 y el Cu_B forman el centro binuclear, donde se une el O_2 para formar el H_2O . Se ha propuesto que la subunidad III es la que está involucrada en la traslocación de protones (Malatesta y Capaldi, 1982; Prochaska y Fink, 1986) (figura 6).

Se han estudiado también algunas citocromo c oxidasas de bacterias, como la de *Paracoccus denitrificans* (Yang y Trumpower 1986) y la de *Rhodobacter sphaeroides* (Gennis 1993) y se ha visto que solo tienen tres subunidades, equivalentes a las subunidades I, II y III de mamífero, por lo que representan un modelo más sencillo para estudiar la bioquímica de este complejo. Estudios más recientes indican que la subunidad III de *Paracoccus* no está involucrada en la traslocación de protones (Haltia y col 1990), ya que en experimentos donde se remueve a la subunidad III, sigue habiendo traslocación de protones. Sin embargo, esta subunidad parece estar involucrada en el ensamblaje de las otras dos subunidades (Haltia y col. 1994).

Como se ha mencionado, en el caso de la citocromo c oxidasa mitocondrial, 3 subunidades (2 de ellas muy hidrofóbicas) están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que las otras subunidades están codificadas en el núcleo y se tienen que importar desde el citoplasma hasta la membrana interna de la mitocondria.

La subunidad I de la citocromo c oxidasa:

La subunidad I de las citocromo c oxidasas de la familia hemo-Cu es una proteína con aproximadamente 500 aminoácidos, con 12-15 hélices transmembranales dependiendo de la especie (mientras que esta subunidad en la citocromo c oxidasa de *Escherichia coli* tiene 15, las de mamífero tienen 12). Hay alrededor de 80 secuencias reportadas de diferentes organismos, todas ellas presentan una alta similitud y tienen seis histidinas completamente conservadas, que se encuentran en cuatro de las hélices transmembranales: hélice II (His106), hélice VI (His284), hélice VII (His333 e His334) y hélice X (His419 e His421) (esta numeración corresponde a la subunidad I de *E. coli*). La alteración de cualquiera de estas histidinas elimina completamente la actividad de oxidasa (Saraste 1990; Hosler y col 1993; Brown y col. 1993) (figura 7).

Estudios de espectros de UV/visible, de Raman, de resonancia paramagnética y de espectroscopía con transformadas de Fourier, presentan un cuadro consistente del papel de cada una de estas histidinas conservadas (Saraste, 1990; Lemieux y col. 1992; Minagawa y col. 1992; Shapleigh y col. 1992):

- 1.- La His106 en la hélice II y la His421 en la hélice X unen al hemo α hexacoordinado de bajo spin (en las oxidasas tipo bo de bacterias el hemo es el b_{562}).
- 2.- La His333 y la His334 unen al Cu_B .
- 3.- La His419 une al hemo tipo α_3 pentacoordinado de alto spin (que en las oxidasas de bacterias es el hemo α).
- 4.- La His284 une al Cu_B o está en la vecindad inmediata de este Cu.

Con estos mismos estudios se ha podido establecer que el hemo α , el hemo α_3 y el Cu_B están localizados cerca del periplasma bacteriano o del espacio intermembranal de la mitocondria. Esto implica que debe haber una ruta por donde

pasen los protones que vienen de la matriz para la formación del agua en el centro binuclear. Los residuos polares de la hélice VIII podrían estar participando en esta ruta. Los dos hemo están en lados opuestos de la hélice X y el Cu_B no se localiza entre los dos hemo, por lo que el modelo sugiere que la transferencia de electrones del hemo a al intermediario oxigenado en el hemo α_3 no necesita pasar por el Cu_B (Trumpower y Gennis, 1994)

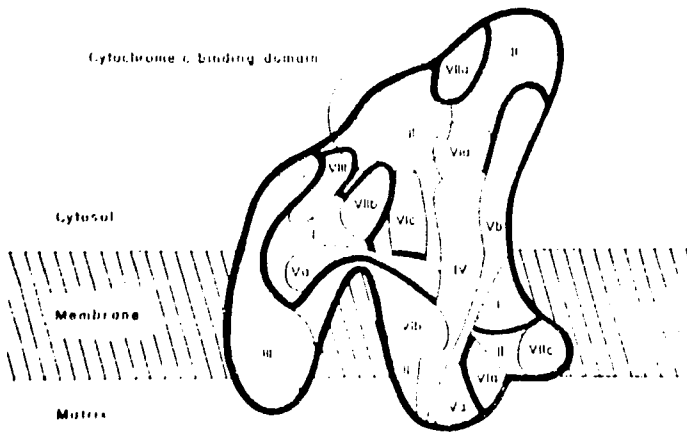


Figura 6: Modelos de las 13 subunidades de la citocromo c oxidasa de mamífero, tomado de Jarush y Kadebach, (1983).

FALLA DE ...

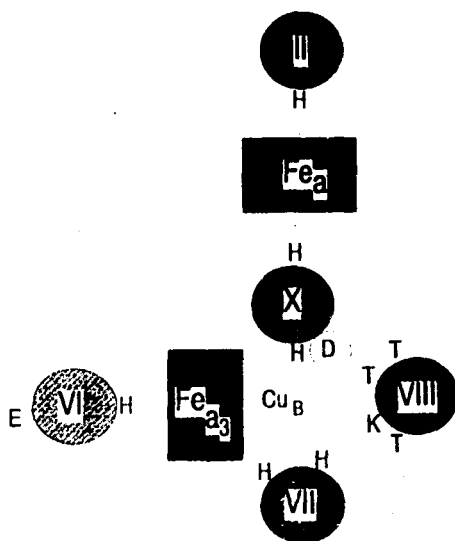


Figura 7: Modelo de las hélices que participan en la unión de los hemos y del Cu_A en la subunidad I de la citocromo c oxidasa, tomado de Babcock y Wikström (1992)

El genoma mitocondrial de Chlamydomonas reinhardtii.

Chlamydomonas reinhardtii, es una alga verde unicelular que pertenece a la familia Chlamydomonadacea, su DNA mitocondrial es una molécula lineal de 15.8 Kb. (Boer y col., 1985) (figura 8), la cual difiere mucho en tamaño de los DNAs mitocondriales de plantas, que varían entre 200 y 2400 Kb. (Pring and Lonsdale, 1985) y se asemeja más al tamaño del DNA mitocondrial de animales.

La gran mayoría de los genomas mitocondriales caracterizados hasta la fecha son circulares, por lo que existía la posibilidad de que el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* fuera un fragmento que se obtenía artificialmente durante la purificación. Sin embargo, recientemente el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido completamente secuenciado y presenta en los extremos regiones repetitivas (Varenholz y col. 1993), lo que confirma la idea de que es un genoma lineal, ya que con estas secuencias repetitivas, pueden postularse mecanismos para su duplicación. Este DNA mitocondrial está organizado de manera compacta como el de animales y codifica para 8 proteínas de la cadena respiratoria, 3 RNAs de transferencia y tiene además la particularidad de que los RNAs ribosomales para la subunidad grande y pequeña están fragmentados en lo que se han denominado módulos, (1S, 2S, 3S y 4S para la subunidad pequeña y 1-8 L para la subunidad grande) (figura 8). Ambas cadenas de DNA codifican genes probablemente organizados en unidades transcripcionales únicas en cada cadena. El DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* presenta otras características especiales, pues están ausentes 8 codones normalmente utilizados en otros organismos, no tiene intrones, no codifica para la subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa, tampoco codifica para ninguna subunidad de la ATPasa y codifica para una proteína semejante a una transcriptasa reversa. Como ya se mencionó, tampoco codifica para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa.

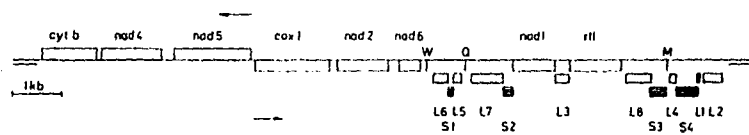


Figura 8: Esquema del genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*, tomado de Varenholz, y col. (1994).

Un modelo alternativo: el alga incolora Polytomella spp.

El flagelado *Polytomella* (figura 9) (Aragão, 1910) puede considerarse como protozoario o como un alga incolora del orden de los Volvocales (Wise, 1959). El género *Polytomella* pertenece a la familia de los tetrablefáridos (que también se les conoce con el nombre genérico de fitoflagelados) y se relaciona con otros protozoarios unicelulares del mismo orden como *Chlamydomonas*, *Carteria*, *Haematococcus* y *Chlorogonium*. Después de los trabajos pioneros de Aragón (1910), Pringsheim aisló y caracterizó 6 especies de *Polytomella* en cultivos puros, provenientes de lugares muy diversos desde el punto de vista ecológico (Pringsheim, 1955). Las especies difieren solamente en características morfológicas menores. En condiciones de crecimiento auxotrófico con acetato como única fuente de carbono (en presencia de tiamina) tiene un crecimiento de 1 gr/l., al igual que en medios que contienen acetato, bacto-triptona y extracto de levadura. *Polytomella* puede utilizar otras fuentes de carbono únicas como: propionato, butirato, valerato, alcohol amílico, alcohol butílico, DL-gliceraldehído y ácido alfa-cetoglutárico (Wise, 1955). Los miembros del género *Polytomella* se reproducen por fisión binaria y por reproducción sexual (figura 10) (Lewis y col., 1974, Moore y Cushing, 1979), con un tiempo de duplicación entre 4 y 5 horas (Brown y col., 1976). En la naturaleza, la distribución de este organismo es relativamente rara, debido a que requiere condiciones especiales para su crecimiento, como son la abundancia de nutrientes orgánicos y un grado relativamente bajo de acidez (Pringsheim, 1955). Su supervivencia se debe también a la capacidad de enquistarse y poder resistir la desecación. El proceso de enquistamiento ocurre durante todo el crecimiento de este flagelado, representando hasta un 80% de la población durante la fase estacionaria (Lewis y col., 1974). A pesar de ser un organismo clasificado entre las algas verdes y relacionarse cercanamente por sus características morfológicas con *Chlamydomonas*, no posee pared celular ni cloroplastos (Bold y Wynne, 1978), sin embargo, almacena carbohidratos en forma de almidón, al igual que las plantas superiores (Sheeler y col., 1968).



Figura 9a: Fotografía de barrido de *Polytomella* spp.

FALLA DE CUIDEN

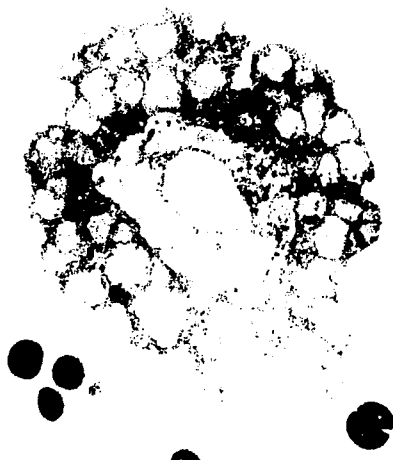


Figura 9b: Microscopia electrónica de un corte de *Polytomella spp.* Las fotografías fueron obtenidas por Jorge Sepúlveda, en la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

FALLA DE ORIGEN

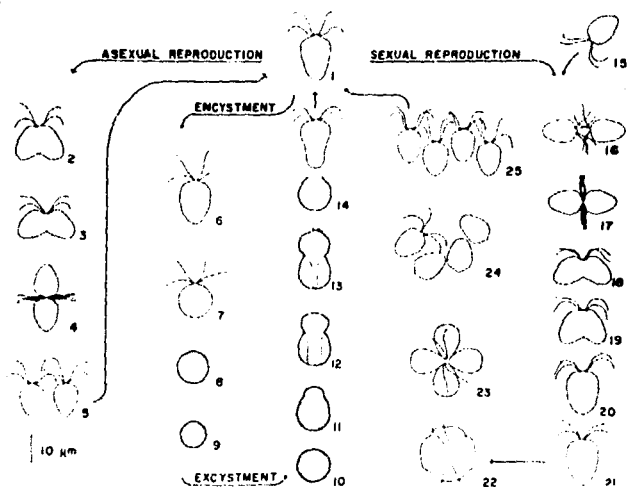


Figura 10: Ciclo de vida de *Polytomella*, tomado de Lewis y col. (1974)

FALLA DE ORIGEN

Al crecer aeróbicamente en un medio con tiamina y sales, utilizando acetato como única fuente de carbono, *Polytomella* presenta mitocondrias organizadas, que se pueden aislar después de romper las membranas plasmáticas con un método mecánico, como la homogenización con un vástago de teflón (Evans y Lloyd, 1966). Se han aislado mitocondrias de *Polytomella caeca* que presentan control respiratorio, demostrando que la membrana interna está íntegra (Lloyd y col., 1968). Lloyd y Chance (1968), encontraron las siguientes características en las mitocondrias aisladas de *Polytomella caeca*: la presencia de citocromos **b**, **c**, **c₁**, **a** y **a₃** y de varias flavoproteínas. El transporte de electrones en estas mitocondrias se inhibió con antimicina A, rotenona, piericidina A y cianuro [1mM]. Los datos espectrofotométricos indicaron que la antimicina A inhibió también la reoxidación del citocromo b reducido. Los datos anteriores sugieren que el sistema respiratorio de *Polytomella* es muy semejante al de otros sistemas mitocondriales como el de levadura o el de mamíferos superiores, sin embargo, dicho organismo presenta algunas características particulares, que lo hacen un sujeto de estudio de gran interés desde el punto de vista biológico y bioquímico:

- a) La condición de poder almacenar a este organismo en su forma enquistada durante largos periodos (Reed y col., 1976).
- b) La facilidad con que crece en medios de cultivo relativamente sencillos y económicos, utilizando acetato como fuente de carbono. Además, el tiempo corto de su ciclo de vida, permite obtener cantidades razonables de material biológico en menos de 48 horas.
- c) La ausencia de pared celular en este microorganismo permite romper las células con gran facilidad, por lo que se pueden obtener organelos relativamente intactos y mitocondrias con buenos controles respiratorios.
- d) Dado que el género *Polytomella* no cuenta con cloroplastos como otras algas,

resulta mucho más sencillo purificar los componentes mitocondriales sin la interferencia de los pigmentos fotosintéticos o contaminaciones de proteínas de cloroplasto.

e) La posibilidad de estudiar a dicho organismo en diferentes estados de diferenciación, como es la forma enquistada y la de crecimiento logarítmico.

f) La posibilidad de trabajar con mutantes resistentes a inhibidores de la cadena mitocondrial y caracterizar a los componentes con técnicas de biología molecular.

g) La posibilidad de estudiar el mecanismo de fusión de las mitocondrias para formar mitocondrias gigantes como las que han sido descritas en los estudios de microscopía electrónica realizados por Burton y Moore (1974).

ANTECEDENTES DIRECTOS:

A la fecha, todas las preparaciones de complejos mitocondriales de *Chlamydomonas* presentan una gran cantidad de contaminantes (Atteia, 1994), esto es de suma importancia para nosotros, ya que pensamos que con *Polytomella* se puede hacer un estudio integral de los complejos mitocondriales de los Chlamydomonadales a nivel molecular y a nivel bioquímico. Al ser *Polytomella* un alga incolora, tiene la ventaja sobre *Chlamydomonas* de que los complejos mitocondriales no se obtienen contaminados con proteínas de cloroplasto. En el trabajo realizado por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994) podemos ver que se puede obtener al complejo bc_1 de *Polytomella* spp. activo y puro. Este complejo tiene 11 polipéptidos y es sensible a antimicima y mixotiazol. Este es el primer reporte de un complejo bc_1 de un protoctista con actividad de ubiquinol-citocromo c reductasa sensible a inhibidores. Es interesante que este complejo presenta un corrimiento de 8 nm hacia el rojo en el pico α del citocromo b.

En la primera columna de intercambio iónico que utilizamos en el laboratorio para purificar los complejos mitocondriales de *Polytomella* se pudieron separar los complejos I, III y IV, así como el complejo V, de esta manera se tiene una purificación parcial de la citocromo c oxidasa que tiene actividad y que es sensible a cianuro [1mM], quedando una actividad residual que sugiere la existencia de una oxidasa alterna (comunicación personal: Gutiérrez-Cirlos).

Por otro lado en el trabajo realizado por Conner y col.(1989) se presenta evidencia de que *Polytomella* y *Chlamydomonas* están estrechamente relacionadas, pues los genes que codifican para la β -tubulina tienen el mismo número y localización de intrones, ambos organismos tienen el mismo uso de codones y al hacer un análisis comparativo de estos genes se observa que la similitud en la secuencia primaria es de 98%. Estos datos, junto con las características morfológicas que comparten *Chlamydomonas* y *Polytomella* spp., nos alientan a pensar que ambos organismos están estrechamente relacionados y que por lo tanto es muy probable que hayan compartido el endosimbionte que dió lugar a sus mitocondrias actuales, por lo

que también deben compartir grandes similitudes en sus genomas mitocondriales. Pensamos que a diferencia de *Chlamydomonas*, con *Polytomella* vamos a poder llevar a cabo un estudio integral de los complejos mitocondriales.

En el presente proyecto pensamos hacer una caracterización física y genética del DNA mitocondrial de *Polytomella spp.*, clonando y secuenciando los genes mitocondriales del citocromo b y de la citocromo c oxidasa para definir si estos están relacionados o no con los de *Chlamydomonas*. Así mismo se pretende estudiar las características generales del DNA mitocondrial de *Polytomella spp.* y ver si comparte las características tan peculiares del genoma mitocondrial de *Chlamydomonas* como son la ausencia de los genes que codifican para la ATPasa, la ausencia de intrones, el uso de codones, la presencia de solamente tres RNAs de transferencia y la fragmentación en módulos de los RNA ribosomales.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Construir tres genotecas de DNA mitocondrial de *Polytomella*, para tener una mayor probabilidad de tener representados todos los genes mitocondriales. Decidimos utilizar las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III para la construcción de estas genotecas, pues son enzimas que dan fragmentos relativamente grandes en la mayoría de los DNAs.
- 2) Caracterizar físicamente el DNA mitocondrial, determinando su tamaño y construyendo un mapa de restricción. Localizar en este mapa los genes que codifican al citocromo b y a la(s) subunidad(es) de la citocromo c oxidasa.
- 3) Clonar, subclonar y secuenciar el citocromo b y la subunidad I de la citocromo oxidasa, porque son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución. Estas proteínas son altamente hidrofóbicas y en todos los organismos descritos hasta la fecha los genes que codifican para estas proteínas han permanecido en el genoma mitocondrial.
- 4) Hacer un análisis comparativo de las secuencias y tratar de establecer la relación filogenética entre *Polytomella* y *Chlamydomonas*.
- 5) Establecer el uso de codones mitocondrial en *Polytomella* y hacer un análisis comparativo con el uso de codones de *C. reinhardtii*, reportado por Michaelis y col.(1990).

METODOS:

Una muestra de *Polytomella spp.* se adquirió de la colección de algas de la Universidad de Gotinga, República Federal Alemana (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen) y ahora forma parte de la colección microbiológica del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del I.P.N.

Purificación de las mitocondrias:

Se resuspendieron 20g de células de *Polytomella spp.* (peso húmedo) en un amortiguador con sacarosa 320 mM, EDTA 4 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) y se rompieron con homogenizador de motor. se centrifugó a 2500g y se recuperaron las mitocondrias en el sobrenadante. Con una centrifugación de alta velocidad se recuperaron las mitocondrias y se lavaron con el mismo amortiguador de acuerdo al protocolo descrito por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994). Estas mitocondrias se trataron 20 minutos a temperatura ambiente con DNasa II, con el fin de degradar el DNA nuclear.

Purificación del DNA mitocondrial:

Se resuspendieron las mitocondrias en un amortiguador que contenía Tris-HCl 10mM (pH 8.2), EDTA 10mM, NaCl 10 mM y Sarkosil 2% y se incubaron 12 horas a 4°C para lisar las mitocondrias de acuerdo al método descrito por Hudspeth y col. (1980). Se extrajo dos veces con fenol saturado con Tris-HCl 2M (pH 8.0), una vez con fenol-cloroformo y 1 vez con cloroformo. Se precipitó con acetato de Na 3M y con 3 volúmenes de etanol al 100% a -20°C durante 2 horas. Se centrifugó, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua a una concentración final de 1 µg/µl (figura 11).

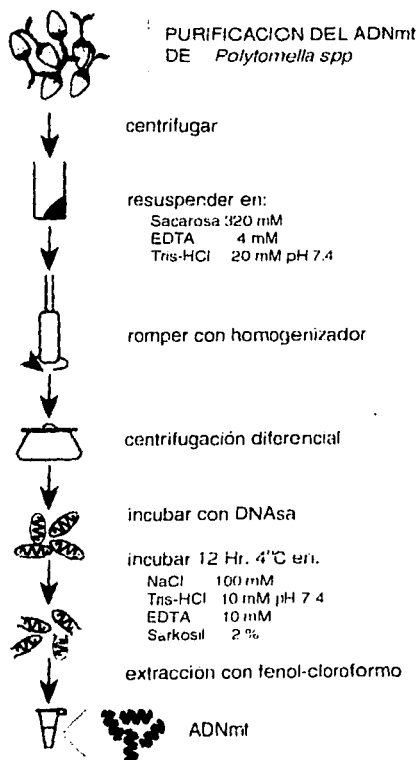


Figura 11: Esquema de la purificación del DNA mitocondrial de *Polytomella spp.*

Purificación y biotilación del gene *cox1*:

Se purificó el plásmido p85 que contiene un fragmento del DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* incluyendo el gene *cox1*, en columnas de **Quiagen**. Este plásmido nos lo proporcionó amablemente la Dra. Elizabeth Harris (Universidad de Duke, E.E.U.U.) Se digirió este plásmido con *EcoRI* y *SalI* (de acuerdo al mapa de restricción) para obtener el fragmento que contiene el gene *cox1* y se purificó con el sistema "GeneClean" de **Bio 101**. El fragmento se marcó con un derivado biotilado por "Nick-translation" usando el sistema de **Bio-nick (BRL)**.

CONSTRUCCION DE TRES BANCOS GENOMICOS MITOCONDRIALES:***Digestión del DNA mitocondrial:***

Se hicieron tres digestiones totales del DNA mitocondrial en las siguientes condiciones:

10µg DNA mitocondrial

5µl amortiguador 10X para la enzima de restricción de **Boehringer**

3µl de *BamHI*, *EcoRI* o *HindIII* (10 u/µl) de **Boehringer**

Xµl H₂O

50µl finales. Se incubó 12 horas a 37 C

Se precipitó el DNA con 5µl de acetato de Na 3M y tres volúmenes de etanol al 100%, se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 10µl finales.

Preparación del vector para clonar los fragmentos del DNA mitocondrial:

10µg de PTZ18R purificado con columnas de **Quiagen**

5µl de amortiguador 10X para la enzima de restricción de **Boehringer**

2µl de *BamHI*, *EcoRI* o *HindIII* (10 u/µl) de **Boehringer**

Xµl H₂O

50µl finales. Se incubó 12 horas a 37 C.

Se incubó 1 hora a 37°C con 6µl del amortiguador 10X de la fosfatasa alcalina y con 1µl de la fosfatasa alcalina, ambos de *Boehringer*.

La muestra se corrió en un gel de agarosa 1%, se cortó la banda correspondiente al plásmido y se limpió con el sistema de "GeneClean" de *Bio 101*. Se resuspendió en TE a una concentración final de 50 ng/µl.

Ligación, transformación y selección de las clonas positivas:

Ligación para cada DNA mitocondrial cortado con *Bam*HI, *Eco*RI o *Hind*III:

10µl del DNA mitocondrial cortado

1µl del vector cortado con la enzima correspondiente y defosforilado

1µl de amortiguador de Ligasa 10X de *Boehringer*.

1µl de T4 ligasa (1u/µl) de *Boehringer*.

Xµl H₂O

15µl Finales. Se incubó a 16°C toda la noche.

Transformación:

15µl de la mezcla anterior de ligación

60µl de células competentes DH5α preparadas de acuerdo a una modificación al método de Hannahan (1983). Se incubaron 60 min en hielo, se dió un choque calórico a 42°C 2 min, se agregaron 450µl de LB, se incubó 30 min a 37°C, se centrifugó 1 seg, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 40µl de 2% X-Gal y 10µl de 800mM IPTG, se sembraron en cajas de LB ampicilina 100µg/ml y se incubaron toda la noche a 37°C (figura 12).

Se seleccionaron las colonias blancas, se crecieron y se purificó el plásmido mediante la técnica de mini-preparación (Chen Zhou y col 1990), una vez identificadas las colonias positivas, se guardaron en glicerol y se purificó el plásmido en columnas de *Qiagen*.

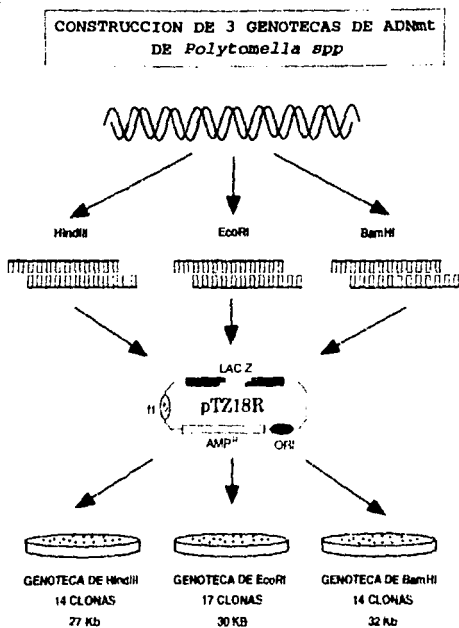


Figura 12: Construcción de las genotecas del DNA mitocondrial *Polytomella spp.* con tres enzimas de restricción: *HindIII*, *BamHI* y *EcoRI*.

FALLA DE ORIGEN

Se desnaturalizó el DNA	12 min a 94°C	} 50 ciclos
	30 seg a 94°C	
	45 seg a 55°C	
	1 min a 72°C	
Extensión final	12 min a 72°C	

Análisis tipo Southern del producto de PCR del gene *cox1*:

El producto de PCR se transfirió a una membrana de nylon de acuerdo al método de Southern (1979). Se prehibridó el nylon 2 horas a 45°C, posteriormente se hibridó a 45°C con el fragmento biotinilado de aproximadamente 1Kb que codifica para el gene *cox1* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Se lavó el nylon 2 veces con una solución 5X SCC con 0.5% de SDS y dos veces con una solución 1X SCC con 1 % SDS (todos los lavados se hicieron a temperatura ambiente). Después se prosiguió a tratar el nylon de acuerdo al protocolo del sistema "Photogene" de *BRL*. Se expuso el nylon con una película X OMAT AR de *Kodak* durante 2 horas y se reveló.

Diseño de desoxioligonucleótidos para amplificar el citocromo b:

Para el diseño del desoxioligonucleótido de avance (forward) consideramos la región conservada del aminoácido 87 al 95 del citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii*:

```

      S   L   F   F   I   V   V   Y   L   H
5' AGT TTG TTC TTC ATT GTA GTA TAC TIC CAC 3'
      C       T   T       C   C   T   C   A   T

```

El oligonucleótido reverso se diseñó con la secuencia complementaria e invertida de la secuencia de aminoácidos de una región extremadamente conservada: H I V P E W Y F L W V Y del citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii* que va del aminoácido 267 al 278.

```

5' TA AAC CCA CAA AAA AIA CCA CTC TGG TAC AAT ADE 3'
      T       G   G       A   A   C   G

```

Amplificación por PCR del gene del citocromo b:

Con el DNA mitocondrial, hicimos una amplificación por PCR con los desoxioliigonucleótidos para el gene del citocromo b, en las siguientes condiciones:

- 1 µg DNA mitocondrial
- 200 ng de cada desoxioliigonucleótido
- 1 mM final de dNTPs de *Boehringer*.
- 8 µl de una solución concentrada de 50mM MgCl₂ de *Boehringer* (8mM final).
- 0.5 µl Taq Polimerasa (5 u/µl) de *Boehringer*.
- 5 µl amortiguador 10X.
- X µl H₂O
- 50 µl finales.

Se desnaturalizó el DNA	12 min a 94°C	} 50 ciclos
	30 seg a 94°C	
	45 seg a 50°C	
	1 min a 72°C	
Extensión final	12 min a 72°C	

Clonación del producto de PCR del gene citocromo b:

- 20 ng del producto de PCR purificado con GeneClean (*Bio-101*)
- 1 µl de amortiguador 10X de *In Vitrogen*.
- 1 µl del vector pCRTMH (aprox 1ng) (*In Vitrogen*)
- 1 µl de ligasa T4 concentrada de (4u/µl) *In Vitrogen*.
- X µl H₂O
- 10 µl finales. Se incubó toda la noche a 16°C.

La transformación y la selección de las clonas positivas se hicieron de la misma manera que para la construcción de las genotecas mitocondriales.

Secuenciación:

Todas las secuencias se llevaron a cabo por el método de terminación de cadena descrito por Sanger (1977), utilizando el sistema Sequenase Version 2.0 de **USB**, siguiendo el protocolo que proporciona el proveedor. Todos los apareamientos se llevaron a cabo a 37°C durante 30' con 11 ng del desoxiloligonucleótido correspondiente, previa desnaturalización y precipitación del DNA.

Desnaturalización del DNA:

2-5 µg de DNA del plásmido

6 µl de NaOH 1M

X µl de H₂O

30 µl finales. Se incubó durante 5' a temperatura ambiente.

Precipitación del DNA:

30 µl de la mezcla anterior

3 µl de acetato de amonio 2M.

70 µl de etanol al 100%.

Se mezcló y se incubó 30' a -70°C. Se centrifugó 10' a 15000 rpm en una centrifuga Eppendorf, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar, se resuspendió el precipitado en 5 µl de agua. Se prosiguió con el protocolo del proveedor.

Traducción y análisis comparativos de las secuencias:

Todas las traducciones y los análisis comparativos se hicieron con el programa GCG y con el banco de datos Gene Bank de 1993.

RESULTADOS:

Construcción de las tres genotecas mitocondriales:

Se obtuvieron 45 clonas con un inserto de DNA mitocondrial: 14 clonas en el banco de *Bam*HI, 17 clonas en el banco de *Eco*RI y 14 clonas en el banco de *Hind*III. La suma de los fragmentos dió un total de 30 Kb \pm 3Kb en el banco de *Bam*HI, 27 Kb \pm 2Kb en el banco de *Hind*III y 37 Kb \pm 2Kb en el banco de *Eco*RI. En la figura 13 podemos ver un ejemplo de 1 μ g de plásmido de las clonas 2-14 del banco de *Hind*III, digeridas con la propia *Hind*III.

Mapa físico del genoma mitocondrial.

Hasta ahora hemos hecho digestiones sencillas y dobles de todas las clonas que tenemos de las tres genotecas del DNA mitocondrial con *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Sac*I, *Sal*I, *Pst*I, *Xma*I y *Xho*I (*Boehringer*) y estamos en proceso de construir un mapa físico con estos datos. Este proceso se ha complicado, como se verá más adelante, por la posible contaminación de las genotecas mitocondriales con DNA nuclear.

*Amplificación del gene *cox1* por PCR:*

Realizamos un PCR utilizando los desoxiligonucleótidos diseñados para el gene *cox1* con 1 μ g de DNA mitocondrial de *Polytomella*. El fragmento que se amplificó fue de 1.1 Kb (figura 14A), como se esperaba de acuerdo al diseño de losdesoxiligonucleótidos. Cuando se transfirió este producto de PCR a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda biotinilada del gene *cox1* de *Chlamydomonas reinhardtii*, el producto de PCR de 1.1 Kb dió lugar a una señal específica (figura 14B).



Figura 13: Digestión de 1µg de plasmido de las clonas 2-14 de la genoteca de *HindIII* de DNAm de *Polytomella spp.* digeridos con *HindIII*.

FALLA DE ORIGEN

Al realizar un PCR con todas las clonas reunidas del banco de *HindIII* como molde, también se obtuvo un fragmento de 1.1 Kb. Después repetimos el PCR pero utilizando como molde cada una de las clonas por separado y obtuvimos el fragmento de 1.1 Kb en la clona denominada #1, que tiene un fragmento de DNA mitocondrial de 3 Kb aproximadamente. La secuencia de esta clona mostró similitud en un extremo con el gene de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, mientras que el otro extremo mostró similitud con el gene que codifica para el fragmento 7 de la subunidad grande del RNA ribosomal (*rrn7*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. En medio de la clona encontramos al gene *cox1* completo (figura 15).

Secuenciación del gene cox1

Secuenciamos en su totalidad la clona 1 de la genoteca de *HindIII*. En la figura 16 se muestra la secuencia del gene *cox1*, del nucleótido 1 hasta el nucleótido 1509. Con el programa GCG se obtuvo la secuencia de aminoácidos a partir de esta secuencia de nucleótidos y se comparó con la secuencia de aminoácidos de *Chlamydomonas reinhardtii* (figura 17); estas secuencias mostraron una similitud de 88% y una identidad de 74%.

Con la secuencia de aminoácidos que obtuvimos, hicimos también un perfil de hidropatía según Kyte-Doolittle (1982). Con este perfil construimos un modelo topológico de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (figura 18), donde también se indican las histidinas conservadas en todos los genes *cox1* conocidos hasta ahora, las cuales son los sitios de unión para los hemo de los citocromos a, a₃ y el Cu_p.

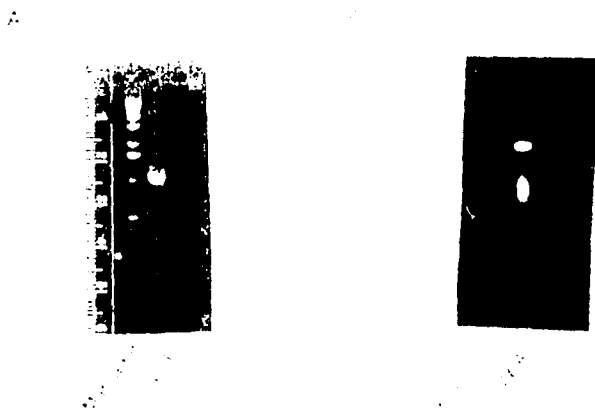


Figura 14: A) Producto de PCR del gene *cox1* utilizando como molde 1 μ g de DNA mitocondrial de *Polytomella spp.* B) Replica tipo Southern del producto de PCR hibridado con la sonda *cox1* biotinilada de *Chlamydomonas reinhardtii*.

FALLA DE ENTRENAMIENTO

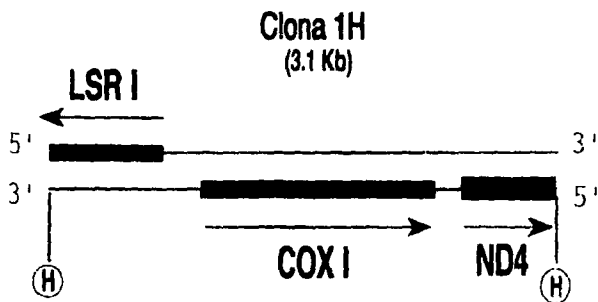


Figura 15: Esquema de la clona 1 de la genoteca de *Hind*III del DNAm de *Polytomella* spp.

También analizamos el uso de codones para el gene *cox1* de *Polytomella spp.* y lo comparamos con el uso de codones del gene *cox1* de *Chlamydomonas reinhardtii* (tomado de Michaelis y col 1994). Como podemos ver en la tabla 1, el uso de codones es muy similar en ambas especies, pero presenta algunas diferencias interesantes que analizaremos con más detalle en la discusión.

Basado en la secuencia de aminoácidos que se deduce del gene *cox1* de *Polytomella spp.* y las secuencias de 45 especies, se construyó un árbol filogenético (en colaboración con el Dr. David Spencer en la Universidad de Dalhousie, Halifax, Canadá) (figura 19). Este árbol filogenético sugiere fuertemente que *Polytomella spp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlamydomonas eugametos* están estrechamente relacionadas entre si.

1 atgcgttggc tgtatfcgac caalculaaa qafatllqaa tglafaccl
 51 tafattllgce tlllllcccg qlctagtcgg aactggtctt agtglgttaa
 101 ttegtcttca attagccaca actggaactg gaatlltaca aaacaalggg
 151 caatlattla atqtaattul cacltgcacat qatqtattra tgttgccttt
 201 calqglaatg ccagcattlt tggagqatl ccgaaactat cltcttcccc
 251 taatgatagg taclctat qat atgqcttctc ctcc'clhaaa caatattage
 301 tlllggctca acccatllgg atccctcttg etlltggctt ctactlltgg
 351 agagcagggg gctggaactg gttggaactc ttatccactc ttgagcgttc
 401 aaggaagtgg aagcagcatt gatctagctc tlllqagitt cqaatttgaat
 451 qgattgagca qtatllltag tagtattaat qtatltggtta ctgcataaag
 501 telgcgtgce ccaggtatqt ctclltatca qaticeclctc tllatllat
 551 ctatggtatt racagctatt ctltgaacltct tclctgtacc agtlltggca
 601 qclgcctaa ttatgctllt gacagatcgt tcccltaaca caacctact
 651 tqtltgllcr qqagattltt latltatca qactllatlc taqtlrttg
 701 gcaatcaga qutctatatt ttaattcttc caqctlltgg tcl'attage
 751 agatllatta gttlltccg taacaacca gctlltggcg tcaaaqant
 801 qalltgcga atgggtacta tcaatlltqt cqaillctta gttgqgctc
 851 accatata cgttctcgat atgaccltgc caactgttgc ttatttact
 901 aatgctctc tgaatlattc lat'ccaacl qat'atgaag lat'caqctg
 951 qarqctact gcttatqctc qtaaaqcta ct'at'at'at' cctat'ct'ct'
 1001 atgctlltgg atlltggct tlltccaca ttat'at'at' at'ccaaqta
 1051 qtl'laqca accl'at'at' aat'accl'at' qtl'at'ca cl'at'at'at'
 1101 tcl'ct'ct'ac tll'at'at'at' qtl'aaqca lat'at'at'at' tll'ct'at'at'
 1151 t'ct'ct'at' q'at'ct'ct'at' aqaat'at'at' lat'at'at'at' qat'at'at'
 1201 gaaaacaag g'at'ct'ct'ca at'ct'ct'ct' ct'ct'ct'at' g'at'at'at'
 1251 qaetllctc ccl'caqclt tcl'qatllt qct'qat'at' ccl'ct'ct'at'
 1301 tgl'ct'at'at' c'ct'g'at'at' t'caat'at'at' aat'at'at'at' g'ct'ct'ct'at'
 1351 qut'ct'ct'at' t'at'at'at'at' t'ct'ct'ct'at' lat'at'at'at' ca'ct'ct'ct'at'
 1401 cct'ct'ct'ca q'at'ct'ct'ac aqaac'ct'ca ca'ct'ct'at'at' ct'g'at'at'
 1451 t'ct'ct'ct'at' t'ct'ct'ct'at' t'ct'ct'at'at' t'ct'ct'at'at' t'ct'at'at'
 1501 c'ct'at'at' taa.

Figura 16: Secuencia del gene *cox1* de *Polytomella spp* desde el codón de inicio atg (nucleótidos 1-3) hasta el codón de término taa (nucleótidos 1510-1512).

FALLA DE COPIADO


```

1 MRWLYSTNHKDI GMLYLIFAFFGGIANGTGLSVLIRLQLATTCTGTI.ONKC 50
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
1 MRWLYSTSHKDI GLLYLVAFFGGLLGTSLSMILRYELALPGRGLLDGRG 50

51 QLFNVIVTGHCVIIMLLFMVMPALFPGGFGNYLLPLMIGAPDMAFPRLNNS 100
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
51 QLYNVIITGHGIIIMLLFMVMPALFPGGFGKWLIPIMIGAPDMAFPRLNNS 100

101 FWLNPFQGLLILVSTIVEQCAGTGTIYPPLSVQCSCSSIDLATLSFDLN 150
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
101 FWLNPPALALLLSLVEQGGTGTWYAYPPLSVQHSSTVVDLALLSLHLN 150

151 GLSSI LGSINVLVTAKCLRHPGMSLIQIPLFVYSMVETAIIWILSVPVLA 200
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
151 GLSSTLGAVNMLVTAGLRAPGMKLLRMPLEWYALALTAVLVILAVPVLA 200

201 AALIMLITDRSLNTAYFVDSGDLLLYQHLEWFFGHPEVYIILPAPGLIS 250
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
201 AALVMIITDRNINTAYFCESGDLLYQHLEWFFGHPEVYIILPAPGVTS 250

251 SIISEFSSNKPVFGVTGMI CAMGAI GLVCFI VWAHHMYVVGMDLDTVAYPT 300
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
251 QVVSFFSOKPVFGLTGMICAMGAI SLLGFVWAHHMFTVGLDLDTVAYPT 300

301 SASMI IAIPTGMKVPKSMATAYAGVYFVVPMLYAFGFIALFTIGGVTV 350
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
301 SATMI IAVPTGMKIFSWMATIYSGPVWFTTPMKFAVGFICLFTIGGVTV 350

351 VLANAGVPTAVHETIYVVVAHFHYVISTGAVFAIFAGMYFYSNIMFNIGYD 400
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
351 VLANAGVDMIVHDTIYVVVAHFHYVISMCAVFGTFAGVYFVWGNLITGLGYH 400

400 ENKGTVOQLLFFLCVNI TFFPQHF LGLAGMPRRMFDYRDAFTGLNLSSTY 449
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
401 EGRAMVHPKLLIFGVNITFFPQHF LGLAGMPRRMFDYADCFAGWNAVSSF 450

450 GALVSPFTSLLYAGTVFTPAPALYQNRISFLEWLLPATPAHTFSEVPPVL 499
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
451 GASISFISVIYFATTFQEAVRVYPTATTTLEKVLIAIPAHHALSOVPPVL 499

500 RVA* 503
  |||
500 RTAS 503

```

Figura 17: Comparación de las secuencias de aminoácidos de los genes *cox1* de *Polytomella spp.* y *Chlamydomonas reinhardtii*. , aminoácidos idénticos; ;, aminoácidos conservados; ., aminoácidos semiconservados. Las secuencias exhibieron 87.5% de similitud y 73.2% de identidad.

FALLA DE CARGA

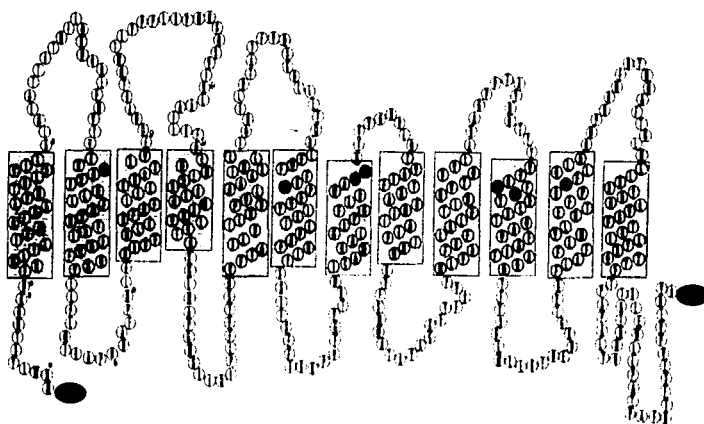


Figura 18: Modelo con 12 cruces transmembranales del gene COX1 de *Polytomella* spp. En negro están marcadas las siete histidinas conservadas.

		2nd								
		U	C	A	G					
1st	U	Phe	24 12	Ser	8 8	Tyr	12 5	Cys	0 1	U
		Phe	21 28	Ser	2 0	Tyr	11 10	Cys	1 4	C
		Leu	16 0	Ser	0 0	Stop	1 1	Stop	0 0	A
		Leu	25 49	Ser	0 0	Stop	0 0	Trp	2 14	G
	C	Leu	20 1	Pro	8 3	His	8 2	Arg	8 10	U
		Leu	5 0	Pro	1 1	His	3 16	Arg	2 3	C
		Leu	5 18	Pro	13 19	Gln	5 8	Arg	0 0	A
		Leu	3 4	Pro	0 0	Gln	5 1	Arg	0 0	G
	A	Ile	24 24	Thr	21 23	Asn	8 0	Ser	13 9	U
		Ile	3 8	Thr	5 10	Asn	10 14	Ser	10 12	C
		Ile	2 0	Thr	7 0	Lys	6 4	Arg	0 0	A
		Met	22 22	Thr	0 0	Lys	0 0	Arg	0 0	G
G	Val	18 9	Ala	30 31	Asp	10 6	Gly	28 45	U	
	Val	9 13	Ala	7 15	Asp	4 6	Gly	2 4	C	
	Val	12 25	Ala	5 0	Glu	2 0	Gly	18 0	A	
	Val	5 0	Ala	0 0	Glu	3 7	Gly	2 0	G	

TABLA I: Uso de codones del gene *cox1* de *Polytomella* spp. en números oscuros, comparado con el uso de codones del gene *Cox1* de *Chlamydomonas reinhardtii* con números normales (tomado de Michaelis y col. 1994). En los cuadros están las diferencias más sobresalientes entre ambas especies.

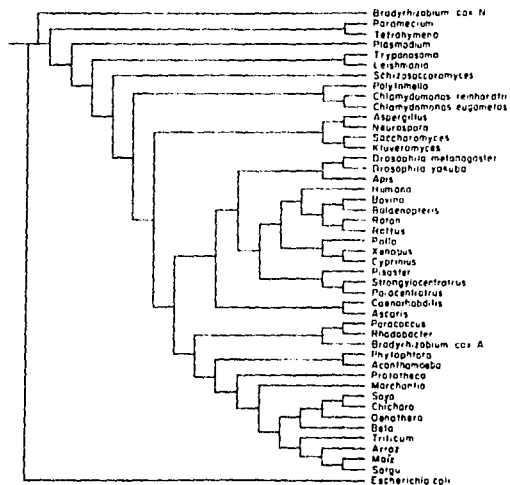


Figura 19: Arbol filogenético del gene *cox1*, incluyendo el gene *cox1* de *Polytomella* spp. (obtenido en colaboración con el Dr. David Spencer)

FALLA DE ORIGEN

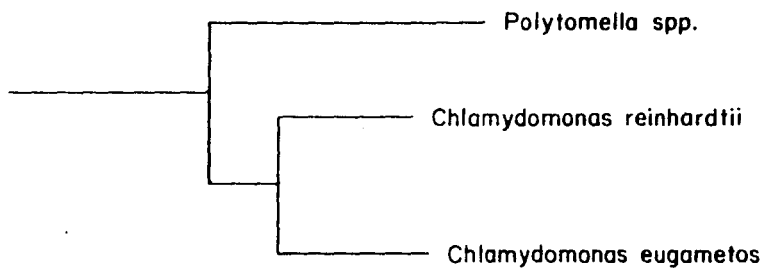


Figura 19a: Un acercamiento del árbol filogenético de *Polytomella spp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlamydomonas eugametos*.

Amplificación por PCR del gene citocromo b:

Utilizando como molde DNA mitocondrial de *Polytomella spp.*, realizamos un PCR con las siguientes concentraciones de $MgCl_2$: 1, 2, 4 y 8 mM, obteniendo una banda con 8 mM de $MgCl_2$. Como se puede ver en la la figura 20, esta banda tiene un tamaño de alrededor de 800 nucleótidos, en lugar del tamaño esperado de 500 nucleótidos. A pesar de esta discrepancia, decidimos clonar este fragmento, pues era una banda intensa, y pensamos que el gene podría tener un intrón. Una vez clonado el producto de PCR, lo secuenciamos. La secuencia obtenida se muestra en la figura 21.

Fue sorprendente encontrar en ambos extremos del producto de PCR el desoxioligonucleótido reverso (backward), lo que indica que éste desoxioligonucleótido se unió en el extremo 5' de manera inespecífica. Esto explica la diferencia entre el tamaño del producto de PCR obtenido (0.8 Kb) y el tamaño esperado (0.5 Kb), de acuerdo con el diseño de los desoxioligonucleótidos (figura 21).

Con el programa GCG, hicimos la traducción de la secuencia de nucleótidos y la comparamos con la secuencia de aminoácidos del citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii* (figura 22). Las secuencias mostraron una similitud de 78% y una identidad de 62%. En la figura 22 podemos observar el desoxioligonucleótido reverso unido inespecíficamente, de tal manera que el producto de PCR empieza en el aminoácido 9 del gene de *Chlamydomonas*, por lo que creemos que nos faltan muy pocos aminoácidos por secuenciar en el extremo amino terminal. También observamos en la secuencia del citocromo b de *Polytomella spp.* la ausencia de 10 aminoácidos comparado con el citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii* en la región contigua al aminoácido 213. Con estas secuencias pudimos construir los modelos topográficos del citocromo b. En la figura 23, se muestra el modelo del citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii* y en la figura 24 el modelo del citocromo b de *Polytomella spp.*


```

-35 TA TAC CCA CAA AAA ATA CCA CTC AGG TAC GAT ATG
   1 ctacagcttt attaccaaca cattgaagcc taccacaac cttgcaacct
  51 aaaatfactct tggaaacatgg qcaatcttcc cggcttactt ttagctagcc
 101 aaatgacaag aattcttttt gctatgcatt actgcccaqa tacttcaattg
 151 gcattctaca gqtaattca tttacaqtt gatgtactt atgattttgt
 201 aatlegatat tttcaatga atggcgccag ctattcttct glagccgat
 251 tcttgcatt attccgaac ttatattaca acagcggatc qcaaccgce
 301 gqgtactat acattagtgg tgtgtaata cttctattaa tggtaataac
 351 agcattcata ggtacgctt accttqqaq acaaatgag tctgggctg
 401 ctactqaat gaccagttt gtaagtctc tcccaatag tqtaccgat
 451 ctgtttatt attatgggg aggatttag gttagcaac caangttaaa
 501 ccgnatgctc agcttcact atctctacc atttgccta gccggtttaa
 551 gcatcgctca tctagctgc ctccatagct atggaagtaq caaagttcca
 601 tttggtctct actacacat taagaactg ctaggagttc taattattg
 651 agcagctatg atcctgttg cctctctct tcaqaagct ctcaaccatt
 701 ccgacaatta cttcccaaca atctcatca gtaaccagc tcAT ATT
      GTA CCA GAG TGG TAT TTT TTG TGG GTA TA

```

Figura 21: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR del gene del citocromo b de *Polytomella*, en mayúsculas esta indicado el desoxihigonucleótido que se unió tanto como sebador de avance (forward) como reverso (backward).

FALLA DE ORIGEN


```

J      YPQKIOLRYNMIQLYYQHIEAYPTPCNLKYSWNMGSLSGLLLAS 33
      : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1      MRMHMKIQLLSVLNTHLVAYPTPMNLNYSWNGGSLAGMMLAS 42
34 OM.TGILLAMHYCPDTSLAFYSV1HLTVDPVYGFVJRYFHMNGASLFFVA 82
   || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
43 OMLTGILLAMHYVGHVDYAFASVQHLMTDVPSCMILRYAHANGASLFFIV 92
83 VFLHLFRNLVYNSGSGPRELLYISGVVILLMVITAFIGYVYLGEQMSSG 132
   | : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
93 VYLHVLKGMYYGSGAOPREIVWISGVVILLVMIITAFIGYVLPWGMSEFW 142
133 AATVITSLVSAPVIVGTDLVYYLWGGFSVSNPXLNRXFSHYLLPFLVLAG 182
   : ||||| : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
143 GATVITSTATAIPVVGKHIIMYWLWGGFSVDNPLNRFYSFHYTHPLILAG 192
183 LSTAHLAALHSYG.....SSKVPFGSYYIHKDLLGVLIIGAAMIV 222
   || : : : : || || : : : : || : : : : : : : : : : : :
193 LSVFHIAALHQYGSTNPLGVNSQSSLSIFGCSYFCARDLVGALFLALVESI 242
223 LAFFFPEALNHSYNYIPANPYSTPAHIVPEWYFLWVY..... 247
   | : : : : | : : : : ||||| |||||
243 LVFFYPDLIGHPDNLIPANPYSTPQHIVPEWYFLWVYALRSIPNKAMGV 292
393 LAIGLVFASL FAMPFIGLGC CKFRITTEWL YWTFIADVLL LTLWGGNEIT
343 PITSEVGCQC TAYLFFYLLV CQPLVGYLET QFAHGQTQTN*

```

Figura 22: Comparación de la secuencia de aminoácidos del citocromo b de *Chamydomonas reinhardtii* con la secuencia de aminoácidos del producto de PCR del citocromo b de *Polytomella spp.* En negritas están marcados los desoxioligonucleótidos traducidos a aminoácidos; |, aminoácidos idénticos; :, aminoácidos conservados; ., aminoácidos semiconservados. Las secuencias exhibieron 77.73% de similitud y 61.94% de identidad.

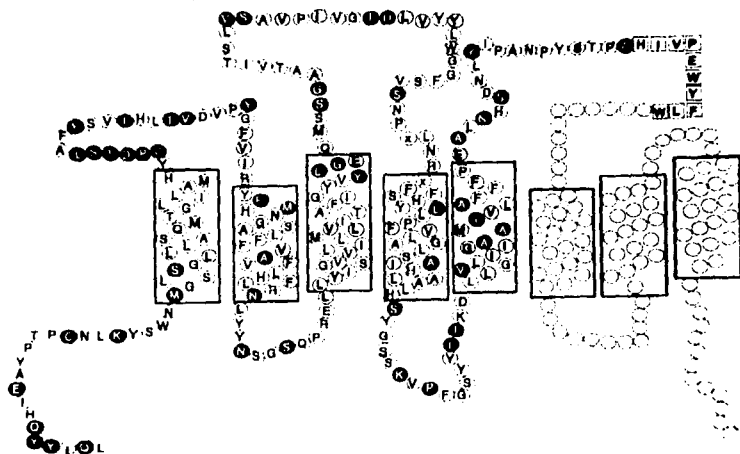


Figura 24: Modelo del fragmento de PCR del citocromo b de *Polytomella* spp. En círculos blancos se muestran los aminoácidos idénticos al citocromo b de *Chlamydomonas reinhardtii*, en círculos grises se muestran los aminoácidos semiconservados, en círculos negros los aminoácidos diferentes y en cuadros están los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el producto de PCR.

DISCUSION:

El género *Polytomella* fue descrito por primera vez por Araújo en 1910. Su clasificación no ha sido fácil, pues es una alga incolora sin pared celular. Su morfología recuerda al género *Chlamydomonas*, aunque *Polytomella* tiene cuatro flagelos y *Chlamydomonas* solo dos, en ambas especies están organizados en un brazaletes en la parte anterior de la célula (Brown y col. 1976). *Polytomella* no es fotosintética y carece de cloroplastos, sin embargo, almacena energía en gránulos de almidón (Sheeler y col. 1968) (figura 9b). Estos gránulos podrían ser reminiscencias de cloroplastos, aunque hasta ahora no se ha reportado la presencia de DNA en estos plástidos. Sin embargo, *Astasia longa*, que es un protista no fotosintético relacionado con *Euglena gracilis* (protista fotosintético), contiene DNA de 73 Kb en sus plástidos. Este DNA presenta componentes del aparato de traducción del cloroplasto con una organización similar al de *Euglena*, pero no codifica para ninguna proteína del aparato fotosintético (Gockel y col 1994). Por lo anterior, no sería difícil pensar que *Polytomella* tenga algún tipo de DNA en sus amiloplastos que presente similitud con el DNA de los cloroplastos de *Chlamydomonas*.

Recientemente Melkonian y col. (1990) han clasificado a *Polytomella* en el filum Clorofita, clase Cloroficiac, orden Chlamydomonadales y familia Chlamydomonadacea. Esta clasificación va de acuerdo con los resultados encontrados por Conner y col. (1989), quienes reportaron que los genes para la β -tubulina de *Polytomella agilis* presentan 98% de similitud con los genes de *C. reinhardtii*. Este porcentaje de similitud es extremadamente alto, aún entre organismos del mismo género. El uso de codones que se reporta en dicho trabajo también indica que hay una estrecha relación entre las dos especies. Para poder confirmar esta clasificación, es importante continuar con los estudios a nivel bioquímico de los complejos mitocondriales y a nivel molecular de algunos genes clave como son los RNA ribosomales, el gene del citocromo b: *cob* y el gene de la subunidad I de la citocromo c oxidasa: *cox1*, puesto que estos genes están muy conservados en toda la escala evolutiva. Nosotros tuvimos el interés particular de abordar el problema caracterizando bioquímicamente los complejos mitocondriales (Gutiérrez-Cirlos y col. 1994) y en forma paralela hacer un

estudio a nivel de biología molecular, caracterizando el genoma mitocondrial de *Polytomella* y comparándolo con el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas*.

El análisis comparativo de los genes y de la organización del genoma mitocondrial nos daría información acerca de la evolución que sufrió cada uno de los genomas mitocondriales: la organización del DNA, la fragmentación de los RNA ribosomales, el uso de codones, la importación de tRNAs del núcleo y la exportación al núcleo de algunos genes como los *atp6* y *atp8* de la ATPasa y los genes *cox2* y *cox3* de la citocromo c oxidasa. Además, nos podría proporcionar información acerca de la existencia de un ancestro común para ambos organismos, en particular, si compartieron el mismo endosimbionte como propuso Round en 1980. En dicho trabajo, se sugirió que la rama de las algas incoloras se separó de las algas fotosintéticas en un evento evolutivo relativamente reciente, posterior al evento endosimbótico que dio origen a las mitocondrias (figura 25).

El DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* se ha secuenciado completamente y se ha descrito el uso de codones para cada uno de los genes que codifica (Michaelis y col. 1990). Este DNA mitocondrial presenta características muy particulares: es lineal y extremadamente compacto, no presenta intrones, en los extremos tiene una regiones repetidas que podrían servir para su replicación (Varenholz y col. 1993), no se encuentran los genes que codifican para las subunidades 6 y 8 de la ATPasa, solo tiene tres tRNAs (M,W,Q), lo que explicaría en parte porqué su uso de codones está completamente sesgado, sus RNA ribosomales están fragmentados en módulos, tiene un gene con homología a una transcriptasa reversa, y no se encuentran presentes los genes que codifican para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa (Boer y Gray 1988).

A pesar del estudio tan detallado del genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*, los complejos mitocondriales no se han podido estudiar con tanto detalle a nivel bioquímico, pues todas las preparaciones aparecen contaminadas con proteínas de cloroplasto (Atteia y col. 1992; Atteia, 1994). Por eso creemos que *Polytomella*, siendo un alga sin cloroplastos, presenta la gran ventaja de que sus complejos mitocondriales se pueden aislar sin contaminaciones con relativa facilidad. De esta manera se puede hacer un estudio conjunto de los complejos mitocondriales, así como de los genes que los codifican.

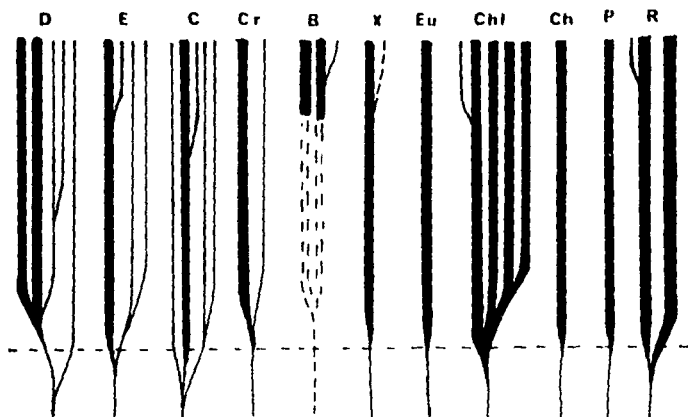


Figura 25: Arbol filogenético de diferentes algas tomado de Round (1980), líneas fotosintéticas ■; líneas no fotosintéticas —, líneas no documentadas - -; D, Dinoflagelados, E, Euglenoides; C, Chysofitas; Cr, Cryotifitas; B, Bacillariofita; X, Xanthofita; Eu, Eustigmatofita; Chl, Chlofitas; P, Prasinofita; Ch, Charofita; R, Rhodofita. La línea punteada horizontal indica los eventos endosimbióticos que dieron origen a los cloroplastos y a las mitocondrias.

Genotecas mitocondriales de *Polytomella* spp:

Los genomas mitocondriales de otras especies cercanamente relacionadas con *Chlamydomonas reinhardtii* como son *Chlamydomonas moewusii* y *Chlamydomonas eugametos* también han sido caracterizados. Estos genomas son circulares y un poco más grandes que el de *Chlamydomonas reinhardtii*: 22 Kb en el caso de *Chlamydomonas moewusii* (Lee y col. 1991) y 24 Kb en el caso de *Chlamydomonas eugametos* (Denovan-Wright y Lee, 1992). Los genomas mitocondriales de estos organismos comparten características similares como son la presencia de RNAs ribosomales fragmentados y la ausencia de intrones, aunque su organización es un poco diferente (figura 26). En los estudios de los genomas mitocondriales de *Chlamydomonas moewusii* y *Chlamydomonas eugametos* se han localizado los genes *cob*, *cox1*, *nad1*, *nad2*, *nad5*, *rtl*, utilizando como sondas los genes de *C. reinhardtii*. Hasta ahora no se ha encontrado hibridación con los genes *atp6* y *cox2* de trigo, así como tampoco se ha localizado el gene *nad6* con la sonda de *C. reinhardtii*. (Lee y col. 1991 y Denovan-Wright y Lee 1992). Aunque el orden de los genes localizados hasta ahora en estas dos especies (figura 26) difieren del arreglo que presentan en el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* (figura 8), todos los datos indican que los genomas mitocondriales tuvieron un origen común. Nosotros tenemos el interés de estudiar si *Polytomella* spp. comparte el mismo origen mitocondrial que estas especies, es decir, si la organización y las características de su genoma mitocondrial son similares.

En el presente trabajo, purificamos por primera vez el DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. Construimos tres bancos con diferentes enzimas de restricción, encontramos que la suma de los fragmentos dan un total de 32 ± 2 Kb. Este tamaño es significativamente mayor que el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* 15.8 Kb (figura 8) (Michaelis y col. 1990). De las 45 clonas positivas que obtuvimos, la clona 1 de la genoteca de *HindIII* amplificó un producto de PCR de 1.1 Kb con los desoxiionucleótidos diseñados para el gene *cox1*, por lo que decidimos secuenciar en su totalidad esta clona.

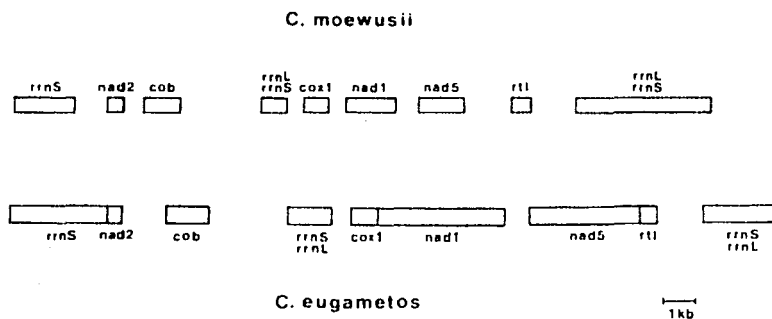


Figura 26: Esquema de los genomas mitocondriales de *Chlamydomonas moewusii*, tomado de Lee y col. (1991) y de *Chlamydomonas eugametos*, tomado de Denovan-Wright y Lee (1992).

FALLA DE ORIGEN

La clona 1 del banco de *Hind*III tiene en un extremo un fragmento del gene *nad*4 y en el otro extremo una secuencia que presenta una alta similitud con el fragmento 7 de la subunidad grande del RNA ribosomal (*rrn*7) de *C. reinhardtii* (figura 15). La similitud en la secuencia con este fragmento nos hace pensar que probablemente los RNA ribosomales de *Polytomella* también están fragmentados. Por otro lado la secuencia de de esta clona presenta características interesantes, pues al igual que el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*, no contiene intrones ni regiones intergénicas. Esto sugiere que el genoma mitocondrial de *Polytomella* tiene una organización similar al de las *Chlamydomonas* y también indica que ambas especies están estrechamente relacionadas.

Sin embargo, las tres genotecas parecen tener un tamaño aproximado de 32 Kb, mayor que el del genoma mitocondrial de *C. eugametos* (24 Kb). Por otra parte, las 6 clonas que hemos enviado a secuenciar a la Universidad de Yale (tres del banco de *Hind*III y tres del banco de *Eco*RI de aproximadamente 1.5 Kb cada clona) no presentan similitud con el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* en el análisis que hemos realizado hasta ahora. Esto sugiere que podrían ser regiones intergénicas o bien intrones, ya que algunos módulos de los RNAs ribosomales de *C. moewusii* tienen intrones. Sin embargo, la clona 1 del banco de *Hind*III no presenta regiones intergénicas ni intrones, como mencionamos anteriormente. Una explicación alternativa a estos datos sería que los bancos están contaminados con DNA nuclear, lo que aumentaría el tamaño aparente del genoma mitocondrial; pensamos que esta contaminación podría deberse a una digestión incompleta del DNA nuclear por la DNasa II, en la purificación del DNA mitocondrial (figura 11) y que no se haya degradado completamente el DNA nuclear en el momento de aislar las mitocondrias, contaminando así el DNA mitocondrial. Así mismo, cabe la posibilidad de que las mitocondrias obtenidas no hayan estado completamente selladas, y que la DNasa halla digerido parcialmente el DNA mitocondrial, de tal manera que las genotecas no estén 100% representadas.

Para poder discernir entre la la presencia de regiones intergénicas, intrones o contaminaciones con DNA nuclear, se necesita hacer un análisis más exhaustivo de

las tres genotecas, así como preparar DNA mitocondrial por métodos alternativos como sería la purificación de DNA total y la separación de los diferentes tipos de DNA con un gradiente de cloruro de cesio con bisbenzimidazoles (Hudspeth y col. 1982). Es necesario construir nuevas genotecas carentes de contaminaciones y volver a determinar el tamaño del genoma mitocondrial. Así mismo, se requiere localizar con sondas de *C. reinhardtii* otros genes en las genotecas mitocondriales de *Polytomella* y secuenciarlos, para poder completar el análisis comparativo.

El gene *cox1*:

La secuencia del gene *cox1* de 1509 nucleótidos que reportamos en este trabajo (figura 16), predice una proteína de 503 residuos (figura 17) y codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa de *Polytomella*. El perfil de hidropatía predice la presencia de 12 cruces transmembrales; con este análisis pudimos hacer el modelo de la figura 18, donde se muestran las seis histidinas conservadas: la His106 en la hélice II y la His421 en la hélice X que unen al hemo α hexacoordinado de bajo spin, así como, la His333 y la His334 que unen al Cu_B . También se encuentran presentes la His419 que une al hemo tipo a_L pentacoordinado de alto spin y la His281 que une al Cu_B . (Trumpower y Gennis 1994).

El análisis comparativo con el gene *cox1* de *Chlamydomonas*, muestra una similitud de 88% y una identidad de 78%, este porcentaje tan alto sugiere que, en efecto, estas dos especies se encuentran estrechamente relacionadas entre sí.

Por otra parte, el uso de codones del gene *cox1* (tabla I) muestra algunas diferencias interesantes entre ambas especies, existen codones completamente ausentes en *Chlamydomonas reinhardtii* que sí están presentes en *Polytomella*, siendo las diferencias más destacadas en los codones: UUA (leu) *Polytomella* 16, *Chlamydomonas* 0; CUC (leu) *Polytomella* 20, *Chlamydomonas* 1; GGA (gly) *Polytomella* 18, *Chlamydomonas* 0, aunque hay algunas otras diferencias menores

(ver tabla 1). Muy interesante resulta el hecho de que no existe el caso contrario, en el cual *Chlamydomonas* utilice un codon que *Polytomella* no utilice. Fuera de estas diferencias, podríamos decir que el uso de codones en ambas especies es muy similar. Podríamos especular un poco y pensar que el uso de codones en *Chlamydomonas* está muy sesgado porque su genoma mitocondrial sólo tiene tres tRNAs (W,M;Q), esto implica que tiene que importar al menos 18 tRNAs del núcleo, por lo tanto el uso de codones es muy restringido. En el caso de *Polytomella*, no sabemos cuántos tRNAs están codificados en su genoma mitocondrial, tal vez codifica para más tRNAs que *Chlamydomonas*, por lo que aún no ha eliminado el uso de algunos codones en sus proteínas. Existe evidencia muy interesante de la importación de tRNAs a la mitocondria: Schneider y col. (1994) han establecido un sistema *in vivo* en *Trypanosoma brucei*, con este sistema y con mutagénesis dirigida de tRNAs, han demostrado directamente la importación de tRNAs a la mitocondria.

El árbol filogenético (figura 19) (cortesía del Dr. Spencer) con los genes *cox 1* de 46 especies, nos muestra que realmente *Polytomella* y *Chlamydomonas* están estrechamente relacionadas y que muy probablemente compartieron el mismo endosimbionte que dio origen a las mitocondrias.

Todos estos datos reunidos apoyan la teoría de Round (1980) y el árbol filogenético que él construyó para diferentes algas (figura 25). A partir de él, propuso que especies como *Polytoma* y *Polytomella* compartieron el mismo origen endosimbótico con la rama de *Chlamydomonas* y que se separaron posteriormente perdiendo la pared celular y el aparato fotosintético. Algo similar ocurre entre *Astasia longa* y *Euglena gracilis*: *Astasia* es un género incoloro de los euglenoides, que se separó al perder sus cloroplasto y su aparato fotosintético. Los datos que obtienen Gockel y col. (1994) con respecto al plástido de *A. longa*, con una alta similitud en organización y secuencia al DNA de cloroplasto de *E. gracilis*, también apoyan esta teoría. Sería muy interesante aislar DNA de los amíoplastos de *Polytomella* y estudiar si solamente perdió los genes del aparato fotosintético con respecto a los cloroplastos de *Chlamydomonas*.

La secuencia del gene *cox1* de *Polytomella* no presenta ninguna característica en particular comparada con otras secuencias reportadas; este gene está altamente conservado en todas las especies estudiadas hasta ahora, es decir, ni el *cox1* de *Polytomella* ni el *cox1* de *Chlamydomonas* tienen alguna característica que nos hagan pensar que tienen alguna función extra además de las ya conocidas para otras citocromo c oxidasas (Trumpower y Gennis 1994). Sin embargo, resulta muy interesante el hecho de que el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* carece de los genes *cox2* y *cox3* (Boer y Gray 1988), que son indispensables para la función de la citocromo c oxidasa. Una posibilidad es que estos genes no existieran en *Chlamydomonas* y que el gene *cox1* codificara para una subunidad I con características diferentes a las descritas hasta ahora, por ejemplo que tuviera el sitio de unión al Cu_A. El gene que codifica para la subunidad II de la citocromo c oxidasa no está presente en el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*, por lo que este gene debería encontrarse en el núcleo. Esta hipótesis se apoya en el estudio realizado por Nungent y Palmer (1991) con varias leguminosas, donde encontraron que en el chícharo existe una copia del gene *cox2* tanto en la mitocondria como en el núcleo, siendo la copia mitocondrial la única que se expresa. En soya, al igual que en frijol, este gene se encuentra en ambos DNAs, pero la copia que se expresa es la nuclear. En otras leguminosas, sin embargo, la copia del gene mitocondrial desapareció y solo queda una copia en el núcleo, tal es el caso del frijol mungo y el caupí (especie de garbanzo). Con este estudio se pudo construir una representación esquemática donde se muestran los diferentes estadios de la transferencia del genoma mitocondrial al genoma nuclear del gene *cox2* (Nungent y Palmer, 1991; Covello y Gray, 1992) (figura 27). Para mayor información sobre la transferencia de genes mitocondriales al núcleo en plantas superiores ver Brennicke y col.(1993).

Todavía no podemos descartar la posibilidad de que el gene *cox2* esté presente en el genoma mitocondrial de *Polytomella*, lo que implicaría que la transferencia de este gene al núcleo de *Chlamydomonas* sucedió después de que *Polytomella* se separó de esta especie, que según el árbol filogenético de Round (1980) fue un evento evolutivo relativamente reciente.

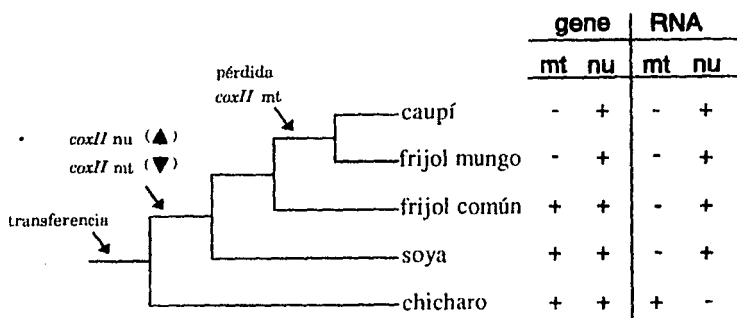


Figura 27: Representación esquemática de los eventos de transferencia del gene *cox2*, durante la evolución de las angiospermas; (▲), activación; (▼), inactivación. Tomado de Nungent y Palmer (1991).

El citocromo b:

Con la reacción en cadena de la polimerasa, usando como molde el DNA mitocondrial de *Polytomella*, también pudimos amplificar un fragmento del citocromo b. En un principio pensamos que este fragmento podría tener un intrón, ya que el tamaño del producto de PCR era alrededor de 200 nucleótidos más grande de lo esperado. Al obtener la secuencia de este producto, observamos que no contiene intrones y que el motivo por el cual el fragmento fue mayor que lo esperado (de 811 nucleótidos) es que el mismo oligonucleótido diseñado en la región extremadamente conservada PEWY, se alineó en ambos lados de la reacción: en el extremo 3' de manera específica y en el extremo 5' de manera inespecífica. En el extremo 5' se obtuvo la secuencia del citocromo b en el nucleótido 27, es decir a partir del aminoácido 9, por lo que sólo nos faltan alrededor de 9 aminoácidos para conocer la metionina inicial. Esta secuencia, como era de esperarse, también tiene una similitud muy alta con el gene del citocromo b de *Chlamydomonas* (78%) (figura 23). Esta segunda secuencia de un gene mitocondrial de *Polytomella* nos confirma la idea de que ambos organismos tuvieron el mismo origen mitocondrial.

El citocromo b es un gene muy conservado a lo largo de todas las ramas evolutiva y existen alrededor de 900 reportes en la literatura de secuencias de este gene (Degli Esposti y col 1993; Trunpover y Gennis 1994). Nosotros consideramos que es indispensable secuenciar este gene para caracterizar el genoma mitocondrial de cualquier organismo. Al ser un gene tan conservado, se pueden contruir árboles filogenéticos y de esta manera podemos ubicar a la *Polytomella* como lo hicimos con el gene *cox1*. Este tipo de análisis sería un elemento más de apoyo en la clasificación de *Polytomella* dentro de la familia Chlamydomonadacea. Por otra parte, el estudio de mutagénesis dirigida tan detallado que existe para organismos como *S. cerevisiae*, nos permite predecir algunas características que puede presentar el citocromo b de *Polytomella*.

La secuencia del fragmento del citocromo b de *Polytomella* spp. presenta las

cuatro histidinas invariables que unen a los dos grupo hemo de los citocromo b_{560} y b_{660} . Estas histidinas se encuentran en la hélice denominada B (His82, His96 en *S. cerevisiae*) y en la hélice denominada D (His183, His197) (Degli Esposti y col, 1993). La secuencia presenta un cambio de una alanina conservada en muchos organismos por una serina en la posición 194. Esta serina está presente tanto en *Polytomella spp.* como en *C. reinhardtii*. Este cambio puede conferirle un ambiente diferente al hemo b_{660} . Esto puede explicar el comportamiento espectroscópico del citocromo b, en particular, un corrimiento hacia el rojo de 8 nm observado en el complejo bc_1 purificado (Gutiérrez-Cirlos y col. 1994). Por otra parte, la alanina 194 está involucrada en la unión del inhibidor funiculosina. El cambio de A--S194 en el citocromo b de *Polytomella spp.* predice que el complejo bc_1 de este organismo presentará una sensibilidad menor a funiculosina en comparación al complejo bc_1 de otras especies.

Nos parece muy interesante que la serina 194 también está presente en *Schizosaccharomyces pombe* (Lang y col. 1985) y en algunas especies de plantas. En el árbol filogenético que pudimos construir para el gene *cox1*, el organismo más cercano a *Polytomella* después de *Chlamydomonas* fue *Schizosaccharomyces pombe*. La serina en la posición 194 del citocromo b en las tres especies parece confirmar esta posición en el árbol filogenético, aunque necesitamos tener el gene completo para poder construir otro árbol filogenético basado en el citocromo b.

Otra característica que encontramos muy interesante es la ausencia de 10 aminoácidos en la secuencia del citocromo b de *Polytomella*, estos 10 residuos sí están presentes en el gene del citocromo de *Chlamydomonas reinhardtii* (del aminoácido 205 al 215), precisamente en el asa que une las hélices D y E, en el lado negativo de la membrana (Degli Esposti y col. 1993). En la hélice D se encuentran las histidinas conservadas His183 e His197, por lo que pensamos que la ausencia de los diez residuos también podría modificar el ambiente de unión del citocromo b_{660} .

Brasseur y col. (1992) reportaron un estudio de mutagénesis dirigida en el citocromo b de *S. cerevisiae*, donde cambian el aspartico en la posición 208, por una tirosina o una lisina, incrementando así la resistencia a HQNO 12 veces. Este estudio

nos parece de particular interés, pues el citocromo b de *Polytomella* no presenta un aspártico en la posición 298, es uno de los diez aminoácidos ausentes comparado con el citocromo b de *Chlamydomonas* y otras especies. Por lo tanto la secuencia obtenida también predice una resistencia incrementada al HQNO en el complejo bc₁ de *Polytomella* spp.

Por otra parte, la región donde *Polytomella* spp. carece de estos diez aminoácidos es justamente donde los genes de cloroplasto que codifican para el citocromo b₆ y la subunidad IV del complejo b₆f se dividen (Cramer y col.1994; Degli Esposti y col.1993). En los cloroplastos de plantas el complejo b₆f es el homólogo del complejo bc₁ mitocondrial. El citocromo b₆ tiene algunas características particulares, el gene está dividido en dos partes (es bicistónico) dando lugar a las dos subunidades antes mencionadas. La primera subunidad es la denominada b₆, con 214 residuos y con un peso molecular de 24 kD. La secuencia de cloroplasto de esta subunidad equivale del aminoácido 1 al 210 del citocromo b mitocondrial de *S. cerevisiae* (Nobrega y Tzagaloff, 1980) y es donde están presentes las cuatro histidinas conservadas que unen a los hemo (Trumpower y Gennis, 1994). La segunda subunidad, es la subunidad IV, de 160 residuos y con un peso molecular de alrededor de 17 kD. La secuencia de cloroplasto de esta subunidad equivale del aminoácido 224 al 350 del citocromo b mitocondrial (en *S. cerevisiae*).

Este dato nos parece muy interesante, ya que puede indicar que esta región no es indispensable para la función del citocromo b, pues no está presente ni en *Polytomella* ni en los genes de cloroplastos; probablemente un ancestro del gene completo dió lugar a las dos genes en cloroplasto.

Para poder seguir analizando la secuencia del citocromo b y poder hacer otras comparaciones, necesitamos el gene completo. Para obtenerlo, vamos a utilizar como sonda el producto de PCR biotinilado y vamos a buscar en las tres genotecas que tenemos con la técnica de Southern, buscando una clona positiva.

CONCLUSIONES.

-Hemos construido tres genotecas de DNA mitocondrial del organismo *Polytomella spp.* Con estas genotecas podemos estimar que el genoma mitocondrial de *Polytomella spp.* mide alrededor de 32 Kb.

-Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa pudimos identificar la clona en la genoteca de *HindIII* que tiene el gene *cox1* completo, que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa.

-Secuenciamos completamente el gene *cox1* de *Polytomella* y comprobamos que tiene una alta similitud (88%) con su homólogo en *C. reinhardtii*.

- La proteína que codifica el gene *cox1* de *Polytomella spp.* no presenta características estructurales peculiares. La similitud de estos genes con los genes de otras especies nos hacen pensar que la citocromo c oxidasa de *Polytomella spp.* debe tener las subunidades II y III. Queda por estudiar si estas subunidades se encuentran codificadas en el genoma nuclear o en el mitocondrial.

- Amplificamos un fragmento del gene de citocromo b por PCR, usando como molde el DNA mitocondrial de *Polytomella spp.*; este producto se clonó y se secuenció.

-La secuencia del producto de PCR del fragmento del citocromo b, por su parte, también tiene una alta similitud con el citocromo b de *Chlamydomonas* (78%), aunque pudimos encontrar algunas diferencias interesantes, localizadas principalmente en el asa que une a las hélices D y E.

-El hecho de que la secuencia del fragmento del citocromo b tenga el asa entre las hélices D y E más corta nos parece de especial interés, pues carece del aspártico

N208 que está involucrado en la sensibilidad de HQNO, por lo que podemos predecir que la sensibilidad a este inhibidor se verá modificada en el citocromo b de *Polytomella spp.* Además es posible que la ausencia de los diez residuos junto con el cambio de una alanina (conservada en muchos organismos) por una serina (como en algunas plantas) explique el corrimiento hacia el rojo del pico α en el espectro del citocromo b de *Polytomella spp.* (Gutiérrez-Cirlos y col 1994).

REFERENCIAS

- Aragão, H. (1910) Pesquisas sobre a *Polytomella agilis n.g.n.sp.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2: 42-57.
- Attardi, G. and G. Schatz. (1988) Biogenesis of Mitochondria. Ann. Rev. Cell Biol. 4: 289-333.
- Atteia, A., Vitry, C., Pierre, Y. and Popot, J.L. (1992) Identification of Mitochondrial Proteins in Membrane Preparations from *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. 267: 226-234.
- Atteia, A. (1994) Identification of Mitochondrial Respiratory Proteins from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemistry.(Paris) 317: 11-19.
- Babcock, G.T. and Wikström, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. Nature 356: 301-309.
- Benne, R. (1985) Mitochondrial genes in *Trypanosoma*. Trends Genet. 1: 117-121.
- Bland, M.M., Levings, C.S. III and Matzinger, D.F. (1986) Mol. Gen. Genet. 204: 8-16.
- Boer, P.H., Bonen, L., Lee, R.W. and Gray, M.W. (1985) Genes for respiratory chain proteins and ribosomal RNAs are present on a 16-kilobase-pair DNA species from *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3340-3344.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. (1978) Introduction to the Algae. Structure and reproduction. Prentice Hall, New Jersey, 706.p.p.
- Brasseur, G. (1988) Calculation of the Three-dimensional Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome b Inserted in Lipid Matrix. J. Biol. Chem. 263: 12571-12575.
- Brasseur, G., Raymond, S. and Brivet-Chevillotte, P. (1992) Seventh EBEC Reports p 23.
- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V. and Schuster, W. (1993) The mitochondrial genome on its way to the nucleus different stages of gene transfer in higher plants. FEBS lett. 325: 140-145.

ESTA TESIS NO
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Brown, D.L., Leppard, G.G. and Massalski, A. (1976) Fine Structure of Encystment of the Quadriflagellate Alga, *Polytomella agilis*. *Protoplasma*, **90**: 139-154.
- Burton, M.D. and Moore, J. (1974) *J. Ultrastructure Research*, **48**: 414-419.
- Capaldi, R.A. (1990) Structure and Function of Cytochrome c Oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 569-596.
- Capaldi, R.A. (1991) Structural features of the mitochondrial electron-transfer chain. *Current Opinion in Structural Biology* **1**: 562-568.
- Capaldi R.A., González-Halphen D., Zhang Y.Z., and Yanamura W. (1988) Complexity and Tissue Specificity of the Mitochondrial Respiratory Chain. *J. Bioenerg. Biomem.* **20**: 291-311.
- Conner, T.W., Thompson, M.D. and Silflow, C.D. Structure of the Three β -tubulin-encoding genes of the unicellular alga, *Polytomella agilis*. (1989) *Gene* **84**: 345-358.
- Covello, P.S. and Gray, M.W. (1992) Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (*cox2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO Journal* **11**: 3815- 3820.
- Crofts, A., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S. and Berry, E. (1987) in *Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics* pp: 617-624. Plenum Press. New York.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. and Shekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursors polypeptides. *Nature* **332**: 800-805.
- Denovan-Wright, E.M. and Lee, R.W. (1992) Comparative analysis of the mitochondrial genome of *Chlamydomonas eugametos* and *Chlamydomonas moewusii*. *Curr. Genet.* **21**: 197-207.
- Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Partanella, T. and Meyer, A. (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1143**: 243-271.
- Evans, D.A. and Lloyd, D. (1966) *J. Protozool.* **13**: 119.
- Gennis, R.B., (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 992-998.

Gray, M.W. and Boer, P.H. (1988) Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. Philos. Trans. R. Soc. London. **319**: 135-147.

Grivell, L.A. (1987) Mitochondrial DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In "Genetic Maps 1987" (O'Brien, S.J.ed.) Cold Spring Harbor Labs., New York, **4**: 290-297.

Gockel, G., Hachtel, W., Baier, S., Fliss, C. and Henke, M. (1994) Genes for components of the chloroplast translational apparatus are conserved in the reduced 73 Kb plastid DNA of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. Curr. Genet. **26**: 256-262.

González-Halphen, D. (1990) Complejo bc₁ de la cadena respiratoria mitocondrial. Ciencia **41**: 133-152.

Gutiérrez-Cirlos E.B., Antaramián, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. and González-Halphen, D. (1994) A Highly Active Ubiquinol-Cytochrome c Reductase (bc₁ Complex) From the Colorless Alga *Polytomella* spp., a close Relative of *Chlamydomonas*. J. Biol. Chem. **269**: 9147-9154.

Haltia, T., Saratre, M. and Wilkstrom, M. (1991) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. EMBO J. **10**: 2015-2021.

Haltia, T., Saino, N., Arrondo, J.L.P., Goñi, F.M. and Freire, E. (1994) Thermodynamic and Structural Stability of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Biochemistry **33**: 9731-9740.

Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. **166**: 557.

Hudspeth, M.E.S., Ainly, W.M., Shumard, D.S., Butow, R.A.G. and Grossman, L.I. (1982) Rapid Purification of Yeast Mitochondrial DNA in high yield. Cell. **30**: 617-626.

Hudspeth, M.E.S., Shumard, D.S., Tatti, K.M. and Grossman, L.I. (1980) Rapid Purification of Yeast Mitochondrial DNA in high yield. Biochim. Biophys. Acta **610**: 221-228.

Jaraush, F. and Kadenbach, B. (1985) Structure of Cytochrome c Oxidase complex of rat liver. Eur. J. Biochem. **146**: 219-225.

Kadenbach, B. (1983) Anew. Chem. Int. Ed. Engl. **28**: 275-283.

- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Lang, B.F., Ahne, F. and Bonen, L. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**: 353-566.
- Lang, B.F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H. and Kaudewitz, F. (1983) in "Mitochondria 1983. Nucleo-mitochondrial Interactions" (Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. eds.) De Gruyter, Berlin, p.p. 319-329.
- Leary, J.J., Brigati, D.J. and Ward, D.C. (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc.Natl.Acad. Sci.* **80**: 4045.
- Lee, R.W., Dumas, c., Lemieux, C. and Turmel. (1991) Cloning and characterization of the *Chlamydomonas moewusii* mitochondrial genome. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 53-58.
- Lemesle-Mennier, D., Brivet-Chevillotte, P., Di Rago, J.P., Slonimski, P.P. and Bruel, C. (1993). Cytochrome b-deficient Mutants of the Ubiquinol-cytochrome c Oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**:15626-15632.
- Lemieux, C., Turmel, M. and Lee, R.W. (1980) Characterization of Chloroplast DNA of *Chlamydomonas eugametos* and *C. moewusii* and its Inheritance in Hybrid Progeny. *Curr. Genet.* **2**:139-147.
- Lemieux, J.J., Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Ingledew, WJ and Gennis, R.B. (1992) Determination of ligands of the Low Spin Heme of the Cytochrome c Oxidase Complex Using Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**: 2105-2113.
- Lewis, E., Munger, G., Watson, R. and Wise, D. (1974) Life Cycle of *Polytomella caeca*. *J. Protozool.* **21**: 647.
- Lloyd, D. and Chance, B. (1968) Electron Transport in Mitochondria Isolated from the Flagellate *Polytomella caeca*. *Biochem. J.* **107**: 829-837.
- Lloyd, D., Evans, D.A. and Venables, S.E. (1968) *Biochem. J.* **109**: 897.
- Malatesta, F. and Capaldi, R. (1982) Localization of Cysteine₁₁₅ in Subunit III of Beef Heart Cytochrome c Oxidase to the C Side of the Mitochondrial Inner Membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **109**: 1180-1185.

Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C. and Sluse, F. (1989) Induction and Characterization of Mitochondrial DNA Mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **108**: 1221-1226.

Margulis, L. (1970) *Origin of Eucariotic Cells*. (Yale University Press, New Haven, Conn).

Michaelis, G., Varenholz, C. and Pratje, E. (1990) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: The gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 Kb DNA. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 211-216.

Minagawa, J., Mogi, T., Gennis, R.B. and Anraku, Y. (1992) Identification of Heme and Copper Ligands in Subunit I of the Cytochrome bo Complex in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* **267**: 2096-2104.

Mitchell, P. (1975) Protonmotive Redox Mechanism of the Cytochrome b-c₁ Complex in the Respiratory Chain: Protonmotive Ubiquinone Cycle. *FEBS Lett.* **56**: 1-6.

Moore, J. and Cushing, S.D. (1979) Conjugation in *Polytomella agilis*. *Aragão (Volvocida Polyblepharidae)* *J. Protozool.* **26**: 63.

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

Nishikimi, M., Shimomura, Y. and Ozawa, T. (1986) *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **138**: 1291-1297.

Nungent, J.M. and Palmer, J.D. RNA-Mediated Transfer of Gene *coxII* from the Mitochondrion to the Nucleus during Flowering Plant Evolution. (1991) *Cell.* **66**: 473-481.

Ohnishi, T. (1987) Structure of the succinate-ubiquinone oxidoreductase (Complex II) *Curr. Top. Bioenerg.* **15**: 37-65.

Pfanner, N., Muller, H.K., Harme, M.A., Neupert, N. (1987) Mitochondrial protein import: involvement of mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites. *EMBO J.* **6**: 3449-3454.

Pfanner, N. and Neupert, N. (1990) The Mitochondrial Protein Import Apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 331-353.

Pilkington, S.J., Arizmendi, J.M. Fearnley, I.M., Runswick, M.J., Skehel, J.M. and Walker, J.E. (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 26-31.

Pring, D.R. and Lonsdale, D.M. (1985). *Int. Rev. Cytol.* **97**: 1-46.

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

Prochaska, J.L. and Fink, P.S. (1987) MINI-REVIEW On the Role of Subunit III in the Proton Translocation in Cytochrome c Oxidase. *J. Bioenerg. Biomem.* **19**: 143-166.

Reed, R.B., Simone Jr., F.P. and McGrath, M.S. (1976) *J. Gen. Microbiol.* **97**: 29-34.

Rieske, J.S., Hansen, R.E. and 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**: 3017-3021.

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

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2nd Edition CSH.

Saraste, M. (1990) *Q Rev. Biophys.* **23**: 331-66.

Schagger, H., Link, T.A., Engel, W.D. and Von Jagow, G. (1986) Isolation of the Eleven Protein Subunits of the bc₁ Complex from Beef Heart. *Methods Enzymol.* **126**: 224-237.

Schatz, G. (1986) *EMBO J.* **5**:1343-1350.

Shapleigh, J.P., Hosler, J.P., Tecklohon, M.M.J., Kim, Y., and Babcock, G.T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 4786-90.

Schneider, A., Martin, J. and Agabian, N. A. (1994) Nuclear Encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* Is Imported into Mitochondria. *Mol. and Cell. Biol.* **14**: 2317-2322.

- Sheeler, P., Moore, J., Cantor, M. and Granik, R. (1968) The Stored Polysaccharide of *Polytomella agilis*. *Life Sci.* **7**: 1045-1051.
- Simpson, L. (1986) *Int. Rev. Cytol.* **99**: 119-179.
- Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N., Neupert, W. (1989) *Cell* **59**: 1061-1070.
- Stern, D.B., Bang, A.G. and Thompson, W.F. (1986) *Curr. Genet.* **10**: 857-869.
- Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H. and Neupert, W. (1982) Biogenesis of mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductase (cytochrome bc₁ complex) *J. Biol.Chem.* **257**: 10364-10371.
- Trumpower, B.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **268**: 11409-11412.
- Trumpower, B.L. and Gennis, R.B. (1994) Energy Transduction by Cytochrome Complexes in Mitochondrial and Bacterial Respiration: The Enzymology of Coupling Electron Transfer Reactions to Transmembrane Proton Translocation. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 675-716.
- Tyler, D.D. (1992) *The mitochondrion in health and disease*. VCH Publishers, Inc., New York, 557 p.p.
- Varenholz, C., Riemen, G., Prätze, E., Dujon, B. and Michelis, G. (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-Kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.* **24**: 241-247.
- von Heijne, G. (1986) *FEBS Lett.* **198**: 1-4.
- von Heijne, G., Steppuhn, J and Herrman, R.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**: 535-545.
- West, I.C., Mitchell, P. and Rich, P.R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* **933**: 35-41.
- Wise, D.L. (1955) Carbon Sources for *Polytomella caeca*. *J. Protozool.* **2**: 156.
- Wise, D.L. (1959) *J. Protozool.* **6**: 19.

Yang, X. and Trumpower, B.L. (1986) Purification of a three-subunit Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase Complex from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **261**: 12282-12289.

Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in Ten Minutes. *Biotech* **8**.