



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

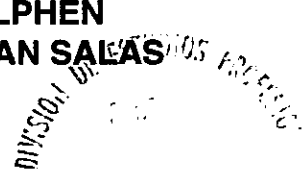
**ESTRUCTURA PARCIAL DEL GENOMA
MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA
POLYTOMELLA SPP.
ANALISIS DE LOS GENES QUE CODIFICAN
PARA EL CITOCROMO *B* Y LA SUBUNIDAD
4 DE LA NADH DESHIDROGENASA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

**DIRECTORES:
DR. DIEGO GONZALEZ HALPHEN
M. EN I.B.B. ANAID ANTARAMIAN SALAS**

MEXICO D.F. 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

25 8381





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estructura parcial del genoma mitocondrial del alga incolora Polytomella spp.
Análisis de los genes que codifican para el citocromo b y la subunidad 4 de
la NADH deshidrogenasa.

realizado por María Soledad Funes Argüello

con número de cuenta 9450337-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Diego González Halphen

Propietario M. en I.B.B. Anaid Antaramian Salas

Propietario M. en C. Víctor Manuel Valdes López

Suplente Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco

Suplente Biol. María Elena Cháñez Cárdenas

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el laboratorio 325 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección conjunta del Dr. Diego González Halphen y la M. en I.B.B. Anaid Antaramian Salas.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo 1371-N9306 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) número IN-204595.

Quiero agradecer la ayuda técnica que me brindó la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Marcela Sosa Garrocho y a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta miembros de la Unidad de Biología Molecular por la síntesis de oligonucleótidos.

Agradezco también la ayuda técnica prestada por Jorge Sepúlveda de la Unidad de Microscopía Electrónica.

Agradezco al Dr. Diego González Halphen, a la M. en I.B.B. Anaid Antaramian Salas, al M. en C. Víctor Valdes López, a la Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco y a la Biol. María Elena Chánez Cárdenas, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, así como sus valiosos comentarios.

AGRADECIMIENTOS

A Diego por permitir que me incorporara al mundo de la ciencia a través de su laboratorio, por su apoyo.

A Anaid por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por compartir conmigo su experiencia y su amor por la ciencia, por su amistad.

A Adrian, Ember, Miriam y Xochitl por su gran amistad, por los deliciosos momentos gastronómicos y su ayuda en todo momento.

Al Dr. Roberto Coria por todo su apoyo y asesoría durante la realización de este trabajo.

A Bertha por presentarme al IFC, por su amistad, su apoyo y sus libros.

A los miembros del laboratorio 302 ote. por su ayuda.

A Ek, el Demon, Choki, Aurora, Eduardo, Angélica, Leo, María Elena, Norman, Karina, Araceli, Ale Valero, Ale Fregoso, Sotres y Cynthia por soportar mis ataques de hostilidad, compartir las horas de estudio y convertirse en mis amigos para toda la vida.

A los Pedrajo-Hernández por su cariño, porque son verdaderamente mi familia.

A Edgar y María Elena por ser tan buenos amigos y apoyarme en todo momento durante estos años.

**A Jorge
por iluminar cada instante.**

**A mamá y papá,
por enseñarme a vivir,
por su amor y
su apoyo incondicional.**

**A Pablo,
por ser el mejor hermano,
por no permitir
que la lejanía nos separe.**

**A mi familia,
porque a pesar de la distancia
siempre estarán muy cerca de mi.**

Indice

Resumen	1
Introducción	3
El origen de las mitocondrias	5
Genomas mitocondriales	7
La cadena respiratoria mitocondrial	16
Complejo I. NADH Ubiquinona oxidoreductasa	20
La subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa	21
Complejo III. Complejo <i>bc₁</i>	22
El citocromo <i>b</i>	24
El género <i>Polytomella</i>	26
Antecedentes	31
Objetivos	33
Hipótesis de Trabajo	34
Materiales y Métodos	35
Resultados	53
Discusión	76
Conclusiones	84
Referencias bibliográficas	86

Abreviaturas

Å	Angström
ADP	Adenosin-5-difosfato
ATP	Adenosin-5-trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BSA	Albúmina de suero bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxioligonucleótidos de trifosfato
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
FAD	Flavín dinucleótido (forma oxidada)
FADH ₂	Flavín dinucleótido (forma reducida)
HQNO	n-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
KME	Amortiguador (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1mM)
µg	microgramos
µM	micromolar
mM	milimolar
µm	micrómetros
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfónico
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
nm	nanómetros
pb	pares de bases
Pi	Fosfato inorgánico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Detergente dodecil sulfato de sodio
SME	Amortiguador (sacarosa 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1mM)
TBE	Amoriguador (Tris-Borato-EDTA)
TBS	Amortiguador (Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M)
TEMED	N, N, N, N'-tetrametil etilenamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia

Resumen

Los genomas mitocondriales son moléculas de DNA, generalmente circulares, cuyas características de tamaño y estructura son muy variables entre los organismos de diferentes especies. En ellos se han conservado genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria altamente hidrofóbicas cuya estructura presenta varios cruces transmembranales. Los genes mitocondriales son utilizados frecuentemente como marcadores moleculares que permiten esclarecer la historia evolutiva de grupos de organismos, ya que en algunos casos presentan una tasa de mutación alta con respecto a los genes nucleares y por lo tanto es posible observar diferencias significativas en especies que se separaron recientemente desde el punto de vista filogenético.

Los organismos del género *Polytomella* son algas no fotosintéticas localizadas taxonómicamente dentro de la familia Chlamydomonadaceae y se distinguen del resto de los miembros de la familia por carecer de cloroplastos y pared celular. Recientemente se han propuesto como modelo para estudiar los complejos respiratorios de las Chlamydomonadaceas ya que es posible obtener preparaciones mitocondriales libres de contaminantes de cloroplastos.

En este trabajo caracterizamos el gen *citb* y el gen *nd4* de *Polytomella* spp. El gen *citb* que codifica para el citocromo *b* contiene 1113 nucleótidos que permiten deducir una secuencia peptídica de 371 aminoácidos. Esta secuencia presenta un 78% de similitud y un 56% de identidad con la proteína homóloga de *Chlamydomonas reinhardtii*. En la secuencia peptídica de *Polytomella* spp. se observa que en la posición 36 existe una serina en lugar de una alanina y en la posición 114 una tirosina en lugar de un triptofano. Estos dos cambios en aminoácidos muy conservados en otras especies podrían explicar tanto el corrimiento hacia el rojo como la bidentación observados en espectro de absorción del complejo *bc₁*, de este organismo.

El gen *nd4* que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa tiene un tamaño de 1365 nucleótidos que permiten deducir una secuencia de 455 residuos de aminoácidos. Esta secuencia presenta un 63% de similitud y un 40% de identidad con la secuencia reportada para *Chlamydomonas reinhardtii*. Se observa una modificación en el aminoácido 340 en donde en lugar de encontrar una arginina, existe una asparagina. En el presente trabajo se propone este aminoácido podría estar involucrado de alguna manera en la resistencia a rotenona que presenta la cadena respiratoria de *Polytomella* spp.

Los resultados obtenidos en las comparaciones de los genes *citb* y *nd4*, permiten confirmar que los organismos del género *Polytomella* se encuentran estrechamente relacionados con los del género *Chlamydomonas*.

Introducción

Las mitocondrias ocupan un gran porcentaje del volumen citoplásmico de la mayoría de las células eucariontes. Estos organelos han jugado un papel fundamental en la evolución de los organismos, ya que sin ellos los individuos seguirían dependiendo de la glucólisis como fuente de ATP. El piruvato, producto final de la glucólisis, es transportado a la mitocondria en donde es oxidado por oxígeno molecular a CO_2 y H_2O . La energía liberada produce alrededor de 30 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada. Las mitocondrias son organelos usualmente cilíndricos con un diámetro de entre 0.5 y 1.0 μm , sin embargo son extremadamente móviles y plásticos, por lo que pueden cambiar su forma e incluso fusionarse entre ellas. El movimiento mitocondrial en las células está determinado por los microtúbulos a los cuales se encuentran asociadas y es específico para cada tipo celular (Ernster, 1981).

Cada mitocondria se encuentra compartimentalizada por dos membranas altamente especializadas, ambas crean dos regiones mitocondriales separadas: la matriz interna y el espacio intermembranal. La membrana externa contiene una gran cantidad de proteínas transportadoras llamadas porinas, que forman grandes canales a través de la bicapa lipídica. Estos canales permiten la entrada de numerosas moléculas de hasta 5000 daltones, por lo que el espacio intermembranal es químicamente equivalente al citosol en cuanto a moléculas pequeñas se refiere. La membrana interna es altamente especializada, contiene una alta proporción de cardiolipina que se compone de cuatro ácidos grasos y probablemente confiere la impermeabilidad de la membrana hacia los iones. Contiene también una gran cantidad de proteínas transportadoras que la hacen selectivamente permeable a aquellas moléculas pequeñas que serán metabolizadas o que son requeridas por alguna de las enzimas mitocondriales.

Las rutas metabólicas más importantes que suceden en la mitocondria son: el ciclo de los ácidos tricarbóxicos; la degradación de ácidos grasos (β -oxidación) y la

fosforilación oxidativa, que permite la formación de ATP. La membrana interna se encuentra altamente plegada, formando una serie de invaginaciones conocidas como crestas mitocondriales. En la matriz mitocondrial se encuentran enzimas que pueden metabolizar el piruvato y los ácidos grasos para producir acetil CoA (Figura 1) (Sreere, 1982).

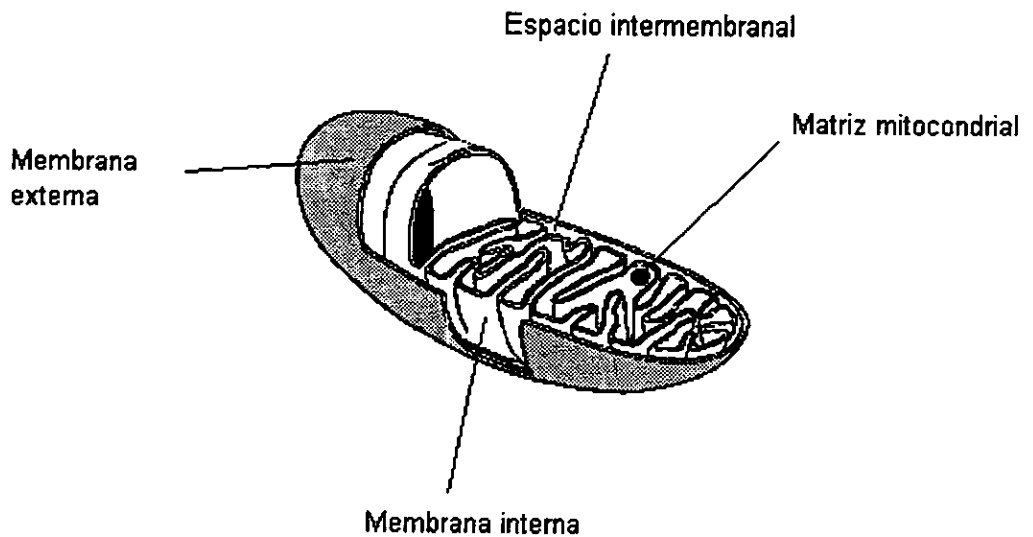


Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria donde se aprecian las dos membranas que la componen: la interna y la externa; la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal.

El origen de las mitocondrias

En la Tierra primitiva, la concentración atmosférica de oxígeno libre fue aumentando a medida que los organismos fotosintéticos poblaron los océanos existentes; la aparición de una atmósfera oxidante permitió el surgimiento de microorganismos respiradores, que dependían exclusivamente del oxígeno para su metabolismo. La hipótesis del origen endosimbionte de las mitocondrias propuesta por Margulis (1970), plantea que las bacterias aeróbicas que surgieron y presentaban sistemas respiratorios similares a los que presentan las mitocondrias, y fueron capaces de establecer una asociación que comenzó como casual y se constituyó como permanente con otras bacterias anaeróbicas de mayor tamaño que ellas. Para que esta asociación tuviera éxito, surgieron algunas modificaciones en ambos organismos. Por un lado, las células aeróbicas desarrollaron tolerancia hacia sus depredadores de manera que pudieran permanecer durante largos períodos de tiempo en su interior. Por el otro, las células anaeróbicas debieron desarrollar una membrana que les permitiera proteger su material genético del oxígeno que el huésped aeróbico necesitaba para desarrollarse. A pesar de que estas modificaciones significaban un gran costo para ambos organismos, también se vieron enormemente beneficiadas. Las células huéspedes obtuvieron protección de depredadores y aseguraron su permanencia en un medio estable rico en nutrientes, y las células hospederas, por su parte, no se encontraban limitadas a vivir en ambientes anaeróbicos, cuyo número iba disminuyendo, y además podían aprovechar los productos energéticos del medio ambiente. Esta asociación se favoreció paulatinamente, a medida que el oxígeno atmosférico aumentaba, y en algún momento de la historia, los hospederos se hicieron completamente dependientes de los que fueron sus parásitos y los huéspedes renunciaron a la vida libre convirtiéndose en las primeras mitocondrias (Margulis, 1993).

Esta hipótesis del origen endosimbionte de los eucariontes no solo se apoya en evidencias de tipo morfológico, ya que se han realizado numerosas investigaciones en las que se observa que las mitocondrias de todos los organismos contienen los componentes esenciales de los sistemas de replicación bacterianos, además de presentar su propio DNA, RNAs mensajeros, RNAs de transferencia y ribosomas. Estos últimos son sensibles a los mismos antibióticos que las bacterias aeróbicas como el cloramfenicol y la estreptomycinina (Margulis, 1993).

A pesar de todos los estudios realizados, ha sido difícil establecer cuál es el origen preciso de las mitocondrias, ya que la complejidad y diversidad estructural de los DNAs presentes en el interior de las mitocondrias ha complicado la recapitulación de su historia evolutiva. En primer lugar, los genomas mitocondriales varían enormemente en forma física, tamaño, composición nucleotídica e información que contienen, mostrando patrones de organización de genes diferentes en los diferentes eucariontes. Se ha observado también que los procesos transcripcionales y post-transcripcionales siguen vías divergentes en los diferentes tipos de eucariontes. Otra característica especial del DNA mitocondrial es que el código genético se desvía del código genético "universal" utilizado por procariontes y eucariontes, y varía también entre las mitocondrias de los diferentes organismos. Por otro lado, los ribosomas mitocondriales y los RNAs de transferencia son muy diversos en estructura y en muchos casos no comparten características con los que se encuentran en los procariontes y en el citoplasma de los eucariontes (Gray, 1982).

Genomas mitocondriales

Actualmente se considera que los genomas mitocondriales representan sólo una fracción del genoma del endosimbionte que les dio origen, debido a que a lo largo de la evolución, la mayoría de la información genética del ancestro mitocondrial ha sido transferida al genoma nuclear, además de que parte de la información se encontraba en ambos organismos y por lo tanto una de las copias se eliminó sin grandes dificultades.

La disminución en la cantidad de DNA mitocondrial ha sucedido paulatinamente, hasta que en la actualidad más del 90% de las proteínas mitocondriales se codifican en el genoma nuclear y se importan al interior de la mitocondria desde el citoplasma. Brenniker (1993) plantea que la transferencia física de genes desde la mitocondria hacia el núcleo puede ser dividida teóricamente en varios pasos que se resumen en la figura 2. En primer lugar, debe existir una disponibilidad del material genético, ya que, aunque en principio las unidades genéticas transferibles pueden incluir cualquier región del genoma mitocondrial, se ha propuesto que pueden ser fragmentos de DNA o moléculas de RNA, siempre y cuando se encuentren en número abundante, de manera que su ausencia no repercuta en el funcionamiento celular. La migración de material genético implica la salida de la mitocondria, que se ha planteado como resultado de rompimientos temporales de las membranas mitocondriales. Sin embargo, se ha observado también la presencia de RNAs de transferencia característicos del genoma nuclear en el interior de las mitocondrias, lo que indica que el transporte de ácidos nucleicos a través de las membranas mitocondriales sucede continuamente.

El paso físico final del transporte de material genético es la entrada al núcleo, el cual ocurre fácilmente a través de los poros de la membrana nuclear. Una vez que el material genético ha entrado al núcleo, debe insertarse en el genoma nuclear y coordinar su regulación y expresión en el nuevo sitio. Entre las modificaciones que deben incorporarse al gen originalmente mitocondrial dentro del genoma nuclear se pueden

mencionar: *i*) la adquisición de una presecuencia que codifique para un péptido señal que permita a la proteína entrar a la mitocondria una vez que fue sintetizada en el citoplasma; *ii*) deben modificar el uso de codones (si es que era diferente); *iii*) adquirir un nuevo promotor; *iv*) una señal que permita la poliadenilación y *v*) adquirir las señales "eucariontes" para la unión con ribosomas. Una vez que el gen ha sido activado en el núcleo, el gen mitocondrial deja de ser necesario y puede ser apagado después de un cierto período de tiempo durante el cual ambos genes son funcionales. Al no ser necesario, el gen mitocondrial va perdiendo algunos fragmentos hasta que finalmente es eliminado del genoma mitocondrial. El fenómeno de transferencia de genes sucede todavía y es posible identificar algunos organismos que presentan lo que podría llamarse etapas intermedias en el proceso de transferencia de genes (Brenniker, 1993).

Los genomas mitocondriales son generalmente moléculas circulares de DNA de doble cadena superenrollado, sin histonas y por lo tanto no organizado en nucleosomas. El tamaño del genoma mitocondrial varía entre los organismos de diferentes especies, pero es constante dentro de las mitocondrias de los individuos de una especie particular. En general, los genomas mitocondriales de los animales son mucho más pequeños que los de hongos y plantas. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de los humanos es de 16,569 pb, y el de *Drosophila melanogaster* contiene 18,000 pb. En cambio el genoma de *Neurospora crassa* es de 60,000 pb y el de *Saccharomyces cerevisiae* de 75,000pb. Los genomas mitocondriales de plantas son mucho mayores, desde 250,000 hasta 2 millones de pb según la especie. Las diferencias tan grandes en los tamaños de las moléculas obedecen fundamentalmente a que en los genomas mitocondriales de hongos y plantas se encuentran muchas regiones de DNA que no codifican para ningún producto cuya función se desconoce (Russell, 1992).

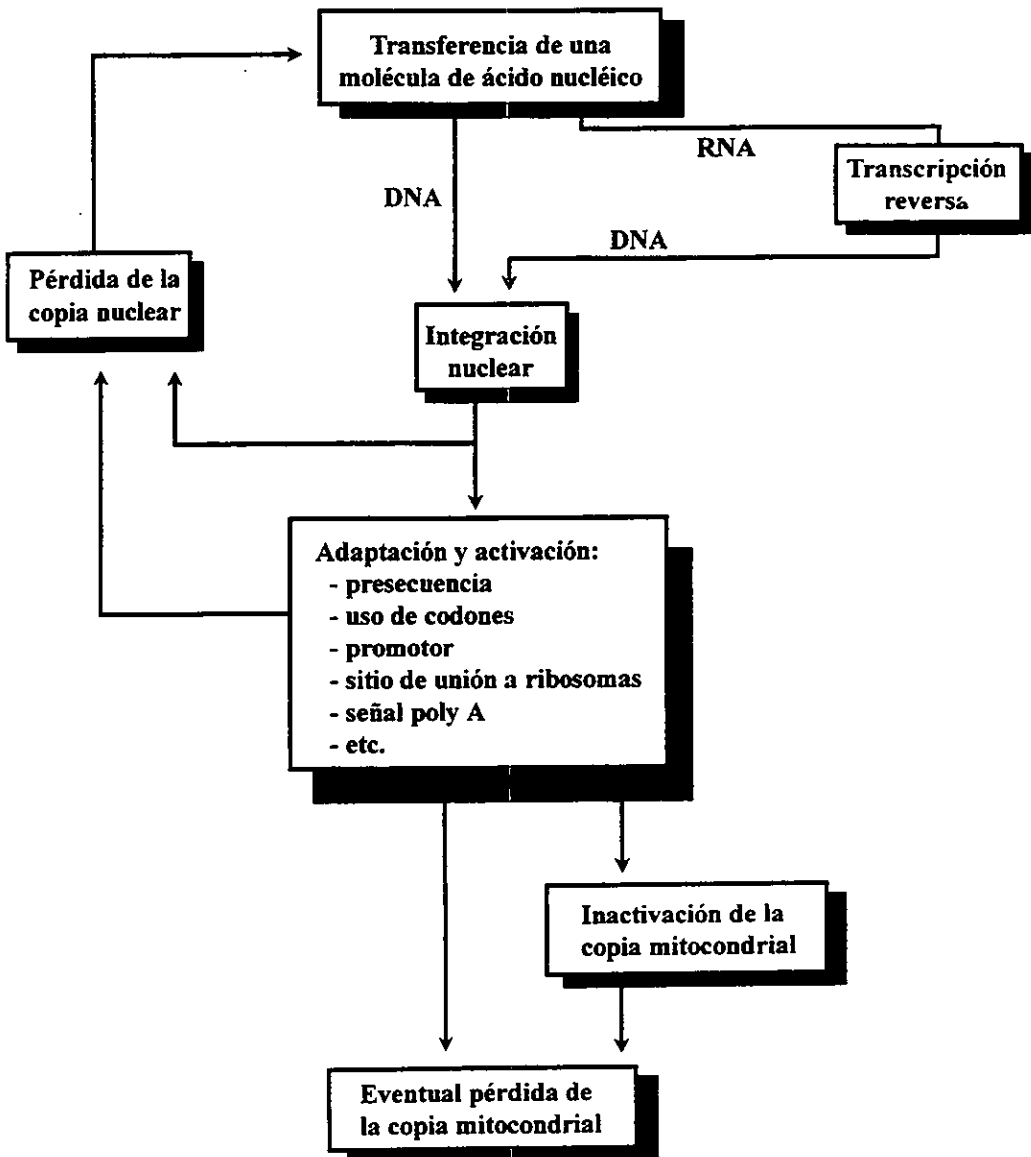


Figura 2. Esquema general de la secuencia de eventos que suceden durante la transferencia de información genética desde la mitocondria hacia el núcleo. Tomado de Brenniker (1993).

Aunque el contenido informacional del genoma mitocondrial es muy pequeño en comparación con el genoma nuclear, la cantidad relativa de DNA mitocondrial es en realidad muy alta. Dentro de las mitocondrias existen nucleoides (similares a los encontrados en las células bacterianas), que son regiones que contienen numerosas copias del genoma mitocondrial. Las levaduras, por ejemplo, contienen entre 4 y 5 moléculas de DNA por nucleoide y cada mitocondria contiene entre 10 y 30 nucleoides (Russel, 1992).

En el genoma mitocondrial se han mantenido los genes que codifican para las proteínas de la cadena respiratoria que son altamente hidrofóbicas y presentan varios cruces transmembranales como el citocromo *b* (con 8 cruces transmembranales) y las subunidades I y III de la citocromo *c* oxidasa (con 12 y 7 cruces transmembranales respectivamente) (von Heijne, 1986) y los genes de proteínas de un solo cruce transmembranal se codifican en el genoma nuclear y son transportadas hasta la membrana interna mitocondrial.

Aunque los genes que se han conservado en el genoma mitocondrial codifican para proteínas que presentan características generales, no existe un patrón que explique la ausencia de genes que se encuentran en otros DNAs mitocondriales. Es posible observar que, en cuanto a genes del complejo I (NADH deshidrogenasa) existen algunos protistas como *Prototheca wickerhamii* en los que 8 subunidades de este complejo se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial. En algunos hongos y en los animales se encuentran los genes que codifican para 7 subunidades (1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6). En el resto de los organismos el número de subunidades codificadas para la NADH deshidrogenasa varía entre 1 y 5, sin que sean los mismos genes los que se encuentran ausentes. Se observan también casos extremos como el de *Saccharomyces cerevisiae* en cuyo DNA mitocondrial no se encuentra ningún gen de este complejo, aunque cabe hacer notar que estos organismos tampoco cuentan con complejo I en su cadena respiratoria. Del complejo III (*bc₁*) se encuentra exclusivamente el gen que codifica para el citocromo *b* y

este gen se encuentra presente en todos los organismos hasta ahora caracterizados. En todos los organismos hasta ahora caracterizados se encuentran los genes de las subunidades I, II y III de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), excepto en *Chlamydomonas reinhardtii*, que sólo presenta el gen que codifica para la subunidad I y algunas plantas que únicamente presentan dos de las subunidades. En el caso del complejo V (ATP sintetasa) todos los organismos presentan por lo menos uno de los genes que codifican para las proteínas que lo constituyen, excepto *Chlamydomonas reinhardtii*, que no presenta ninguno de los genes; por su parte la mayoría de los hongos presentan los tres genes. Los genomas mitocondriales contienen información para RNAs de transferencia y RNAs ribosomales. Los dos RNAs ribosomales encontrados en los ribosomas mitocondriales están codificados por el DNA mitocondrial mientras que las proteínas ribosomales se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Attardi y Schatz, 1988 y Gray, 1992) (Figura 3).

Es importante conocer la estructura de otros DNAs mitocondriales caracterizados hasta la fecha para poder tener un marco de referencia con el cual podamos comparar los resultados que se obtengan. En este sentido, es importante mencionar las características del DNA mitocondrial de tres especies del género *Chlamydomonas* de los que se tiene una estructura general: *C. reinhardtii*, *C. moewusii* y *C. eugametos*.

El DNA de *C. reinhardtii*, ejemplifica el genoma mitocondrial de una Chlamydomonadacea: es un DNA lineal de 15.8 kb extremadamente compacto (con regiones intergénicas muy pequeñas y sin intrones) que contiene los genes que codifican para 7 proteínas de la cadena respiratoria, 3 RNAs de transferencia y RNAs ribosomales de la subunidad grande y de la subunidad chica fragmentados en módulos. Los siete genes que codifican para proteínas de la cadena respiratoria son: *nd1*, *nd2*, *nd4*, *nd5*, *nd6*, *citb* y *cox1*. Este genoma tiene características muy especiales como son la ausencia de los genes de las subunidades II y III de la citocromo *c* oxidasa, tampoco se encuentra ningún gen de la ATPasa ni el gen que codifica para la subunidad III de la NADH

deshidrogenasa, que son genes presentes en casi todos los organismos. En ambos extremos del DNA mitocondrial se encuentran secuencias repetitivas semejantes a los telómeros, las cuales se han postulado como responsables de posibles mecanismos para la duplicación. Se ha detectado también una secuencia que permite observar un marco de lectura abierto y que podría codificar para una proteína similar a una transcriptasa reversa (Figura 4) (Varenholz y col., 1993).

Los genomas de *C. moewusii* y *C. eugametos* han sido parcialmente caracterizados. Estos dos genomas son circulares y tienen un tamaño aproximado de 22 y 24 kb respectivamente. En ellos se han identificado los genes *citb*, *cox1*, *nd1*, *nd2*, *nd5* y *rtf* en un arreglo diferente al encontrado en *C. reinhardtii*. Se ha observado también que presentan los genes que codifican para las subunidades del rRNA fragmentados en módulos (Figura 5) (Lee, 1991 y Denovan-Wright, 1992).

	NADH desidrogenasa							Ubiquinol citocromo c reductasa	Citocromo c oxidasa			ATPasa	tRNA		
	nd1	nd2	nd3	nd4	nd4L	nd5	nd6	cob	cox1	cox2	cox3	6		8	9
<i>Homo sapiens</i>	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	▨	■	■	■	▨	▨		22
<i>Allomyces macrognus</i>	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	▨	■	■	■	▨	▨	▨	20
<i>Leishmania tarentolae</i>	☐			☐		☐		▨	■	■	■				***
<i>Arabidopsis thaliana</i>	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	▨	■	■	■	▨		▨	22
<i>Marchantia polymorpha</i>	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	▨	■	■	■	▨		▨	29
<i>Prototheca wickerhamii</i>	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	▨	■	■	■	▨		▨	26
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	☐	☐		☐		☐	☐	▨	■						3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								▨	■	■	■	▨	▨	▨	25

Figura 3. Genes que codifican para proteínas de la cadena respiratoria que se encuentran codificados en el DNA mitocondrial de varios organismos. Modificado de Gray (1992).



Figura 4. Genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*. Tomado de Varenholz y col. (1993)



C. moewusii



C. eugametos

Figura 5. Esquema de los genomas mitocondriales de *C. moewusii* y *C. eugametos*. Tomado de Lee (1991) y Denovan-Wright (1992).

La cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta principalmente de proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar uno o dos electrones. Cada componente de la cadena puede aceptar electrones del transportador precedente y transferirlos al siguiente en una secuencia específica. En la reacción global catalizada por la cadena respiratoria mitocondrial se transportan electrones desde el NADH, el succinato u otro donador de electrones primario, a través de flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferrosulfuradas y citocromos, hasta el O₂.

En el transporte de electrones intervienen moléculas con propiedades óxido-reductoras asociadas a proteínas, que en conjunto constituyen los complejos respiratorios mitocondriales. Algunos de estos complejos multiméricos son capaces de bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal a la vez que llevan a cabo el transporte de electrones. La translocación de protones genera una fuerza protón-motriz constituida por un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través de la membrana. El regreso de los protones a la matriz por acción del complejo de la ATPasa permite la formación de ATP (Mitchell, 1975).

La cadena respiratoria se compone funcionalmente de cuatro complejos de proteínas y lípidos: *i*) el complejo I o NADH:ubiquinona oxidorreductasa; *ii*) el complejo II o succinato:ubiquinona oxidorreductasa; *iii*) el complejo III o ubiquinol:ferrocitocromo c oxidorreductasa y *iv*) el complejo IV o citocromo c oxidasa. Estos cuatro complejos se muestran en la figura 6 (Hatefi, 1985).

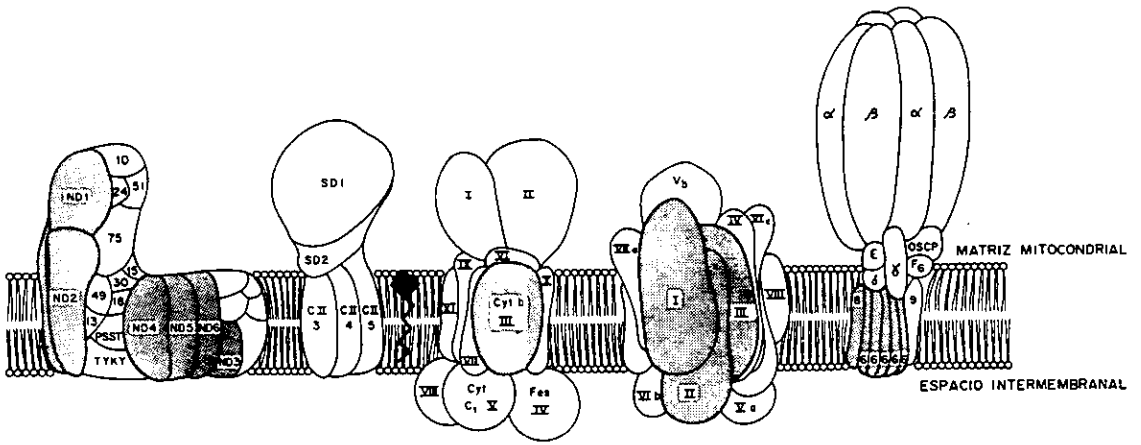


Figura 6. Complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial y el complejo V ATPasa. En sombreado se encuentran aquellas subunidades cuyos genes se encuentran en el genoma mitocondrial.

Las moléculas asociadas a las proteínas en los complejos respiratorios y que son capaces de transferir electrones pueden ser flavinas, centros fierro-azufre, grupos hemo o átomos de cobre. Además de estas moléculas unidas a polipéptidos de los complejos respiratorios transmembranales, forma parte de la cadena respiratoria otro grupo hemo unido a una proteína soluble que se encuentra en el espacio intermembranal, conocida como citocromo *c* soluble, y funciona como acarreador móvil de electrones entre la ubiquinol citocromo *c* oxido-reductasa (complejo bc_1) y la citocromo *c* oxidasa. Otro componente móvil de la cadena respiratoria es la ubiquinona o coenzima Q, que es reducida por las flavoproteínas membranales y que funciona como acarreador de electrones, desde la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa hacia el complejo *bc*, (Hinkle, 1978) .

El complejo I posee más de 30 subunidades y su masa molecular es casi tan grande como la subunidad mayor ribosomal. Los centros óxido-reductores que presenta son: una molécula de flavina (FMN) y siete centros binucleares Fe-S. La transferencia de dos electrones desde el NADH a una molécula de ubiquinona por el complejo I está asociada a una translocación de protones a través de la membrana interna. Este complejo es sensible a rotenona, demerol y piericidina A (Hatefi, 1969).

Otro complejo que puede alimentar la cadena a nivel de la reducción de ubiquinona es el complejo II, que transfiere los electrones desde el succinato proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El complejo II está formado por varios péptidos, los más grandes en masa molecular conforman la succinato deshidrogenasa, la primera de estas subunidades presenta un FAD covalentemente unido, así como un centro Fe-S. El segundo péptido, de menor tamaño, también contiene un centro Fe-S. Se sabe que este complejo presenta un hemo tipo *b* unido a una de las subunidades menores, probablemente involucrado en el transporte de electrones hasta la ubiquinona (Hatefi, 1985).

El complejo III o bc_1 presenta un número variable de subunidades dependiendo del organismo. En bovino se conocen alrededor de 11, tres de los cuales participan en la transferencia de electrones y presentan diferentes grupos redox asociados: un centro Fe-S en la subunidad V; un grupo hemo c_1 en la subunidad IV y dos grupos hemo tipo b en la subunidad III. El complejo III puede transferir electrones desde la ubiquinona reducida hasta el citocromo c soluble, acoplado a un bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. El transporte de electrones puede ser inhibido en este punto de la cadena respiratoria por antimicina, mixotiazol o HQNO (Trumpower, 1990).

El último paso en la transferencia de electrones es efectuado por el complejo IV, que toma los electrones del citocromo c soluble y reduce al oxígeno generando agua. De manera acoplada a esta reacción la citocromo c oxidasa transloca protones hacia el espacio intermembranal. Dentro de su estructura se localizan dos grupos redox asociados, los citocromos tipo a y a_3 ; además se localizan dos centros de cobre Cu_A y Cu_B de gran importancia para la transferencia de electrones al O_2 . La actividad de este complejo es inhibida por cianuro y azida (Nicholls y Ferguson, 1992).

El empleo de la energía del transporte de electrones permite el bombeo de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por los complejos I, II, III y IV. Ello genera un gradiente electroquímico de protones que es empleado por la ATP sintetasa (ATPasa $F_1 F_0$) o complejo V que, mediante un reflujo de protones hacia la matriz mitocondrial, transforma la energía del gradiente electroquímico en energía química de enlace para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell, 1961).

Complejo I. NADH Ubiquinona oxidorreductasa

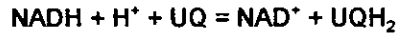
La NADH deshidrogenasa o complejo I fue aislada por primera vez en 1961 (Hatefi, 1961) a partir de mitocondrias de corazón de bovino. La preparación catalizaba la reducción de ubiquinona y la translocación de protones acoplada al transporte de electrones. Todo el complejo se encuentra incrustado en la membrana interna mitocondrial orientado de modo que el sitio de fijación de NADH mira hacia la matriz mitocondrial, de manera que pueda interactuar con el NADH producido por alguna de las deshidrogenasas de la matriz.

La NADH deshidrogenasa se compone aproximadamente por 30 diferentes polipéptidos que pueden ser divididos en tres diferentes grupos: los polipéptidos insolubles en agua; las proteínas ferrosulfuradas solubles en agua y las flavoproteínas ferrosulfuradas solubles en agua. En el grupo de polipéptidos insolubles en agua se encuentra la mayoría de las subunidades de este complejo, y se caracterizan por ser polipéptidos altamente hidrofóbicos.

Las propiedades catalíticas de este complejo se han adjudicado a las flavoproteínas ferrosulfuradas, ya que presentan una alta afinidad por quinonas y complejos férricos como aceptores de electrones (incluyendo análogos de ubiquinona y citocromo c), catalizando también la deshidrogenación de NADH a NAD.

El complejo cataliza la transferencia de electrones desde moléculas de NADH hacia homólogos de ubiquinona, ferricianuro y NAD. La reducción de ubiquinona está acoplada a la translocación de protones y puede ser inhibida por rotenona, piericidina A y demerol; estos inhibidores actúan impidiendo la reducción de ubiquinona y la oxidación de todos los centros hierro-azufre (Fe-S) (Hatefi, 1985).

La reacción global catalizada por el complejo I es:



en la que la ubiquinona oxidada (UQ) acepta un ion hidruro desde el NADH y un protón desde el agua disolvente de la matriz. El complejo enzimático transfiere primero un par de equivalentes de reducción desde el NADH a su grupo prostético, FMN. Los electrones viajan desde el FMN hasta la ubiquinona a través de los centros Fe-S. El complejo contiene siete centros Fe-S, de los cuales se han identificado al menos dos tipos diferentes. El ubiquinol difunde en la membrana desde el complejo I al complejo III, donde se oxida a ubiquinona (Lehninger, 1994).

La subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa

La subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa es una proteína hidrofóbica con al menos 10 cruces transmembranales. Se ha propuesto que esta subunidad se encuentra involucrada en la función de bombeo de protones del complejo I. De acuerdo al modelo de plegamiento elaborado por Degli-Esposti (1989), el residuo Arg³⁴⁰ localizado al comienzo de la hélice transmembranal J se encuentra cercano a la matriz mitocondrial y puede estar involucrado en la unión de rotenona y ubiquinona. Además, la secuencia proteínica que lo precede, hacia la región negativa de la membrana, muestra cierta similitud con los péptidos que reaccionan con quinonas de los complejos membranales, como el citocromo *b*. Dentro de esta región se observa una secuencia coincidente para *nd4* y citocromo *b*, que incluye los residuos altamente conservados His³¹⁹ e His²⁰², respectivamente. Similitudes estructurales de este tipo sugieren propiedades funcionales similares entre la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa y el citocromo *b*, por lo que es posible inferir que la ND4 posiblemente se encuentre involucrada en la unión del intermediario ubisemiquinona que se forma durante la oxidación del complejo I (Degli-Esposti, 1994).

Complejo III. Ubiquinol citocromo c oxidorreductasa (complejo bc_1)

Este complejo es un componente de todas las cadenas respiratorias de los eucariontes y las bacterias, así como del aparato fotosintético de las bacterias púrpuras. En las mitocondrias, este complejo cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c, fenómeno que está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana interna desde la matriz hasta el espacio intermembranal.

El complejo purificado contiene 11 subunidades proteicas que confieren un peso molecular total de 248 kD.

Los componentes redox del complejo son dos grupos hemo tipo *b* conocidos como b_L (o b_{565}) y b_H (o b_{562}); un hemo tipo *c* (c_1); un centro hierro-azufre de alto potencial (proteína Rieske) y ubiquinona. Además de los componentes activos redox, el complejo bc_1 presenta ocho proteínas nucleares que no están presentes en los complejos bacterianos, y que se ha pensado juegan un papel estructural más que funcional, ya que su presencia contribuye a incrementar la estabilidad y alta actividad del complejo con respecto a los complejos bacterianos (Xia y col. 1997).

El complejo bc_1 de mitocondrias de bovino, ha sido recientemente cristalizado por Xia y colaboradores (1997) y su estructura tridimensional puede observarse en la figura 7 con una resolución de 2.9Å. Los dos monómeros que constituyen al complejo bc_1 interactúan para formar un dímero con un diámetro máximo de 130Å y una altura de 155Å.

El funcionamiento del complejo se basa en que existen dos sitios de unión para ubiquinona o ubiquinol separados. El ubiquinol es oxidado en el sitio Q_o , cerca del lado positivo de la membrana interna mitocondrial, y la ubiquinona es reducida en el sitio Q_i , cerca del lado negativo de la membrana. Un electrón es transferido desde el ubiquinol al centro hierro-azufre y a continuación al citocromo c_1 . La ubisemiquinona formada reduce

entonces el grupo hemo de bajo potencial (b_H). Una ubiquinona o ubisemiquinona se une al sitio Q_i y entonces se oxida el b_H reducido. La translocación de protones es resultado de una desprotonación del ubiquinol en el sitio Q_o y una protonación de la ubiquinona reducida en el sitio Q_i (Xia y col. 1997).

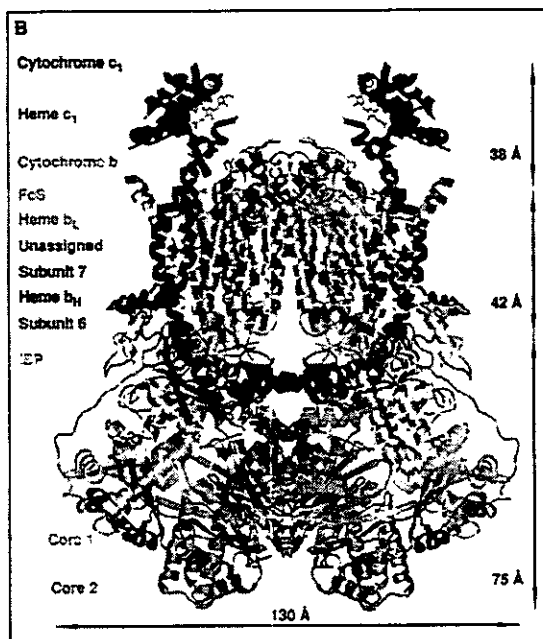


Figura 7. Modelo cristalográfico del complejo bc_1 . Tomado de Xia y col. (1997).

El citocromo *b*

El citocromo *b* es la subunidad catalítica central del complejo *bc₁*. Se trata de una proteína transmembranal involucrada en la oxidación del ubiquinol y en la formación del gradiente electroquímico de la fosforilación oxidativa. Es una proteína de 400 aminoácidos aproximadamente que se arreglan en ocho cruces transmembranales conectados por cuatro asas largas y tres asas cortas (Figura 8). Los dos grupos hemo tipo *b* que se encuentran en esta proteína, están unidos a las hélices A, B, C, y D mediante residuos de histidina: His⁸³ e His¹⁸² para el *b_L* e His⁹⁷ e His¹⁹⁶ para el *b_H* (las posiciones precisas corresponden a la proteína aislada de bovino) (Xia y col. 1997).

Hasta el momento se han obtenido las secuencias del citocromo *b* de más de 900 organismos y es posible observar nueve residuos de aminoácidos altamente conservados que deben conferir propiedades funcionales o estructurales indispensables para el funcionamiento de la proteína. Estos residuos son las cuatro histidinas que unen a los grupos hemo; las glicinas G³³ y G¹⁴³, que pueden estar relacionadas con el empaquetamiento del grupo hemo; ácido aspártico D²²⁹ y ácido glutámico E²⁷², que se involucran en el equilibrio de protones entre la ubiquinona y los centros Q_o y Q_i, y el triptofano W¹¹⁴ cuya función se desconoce (Degli-Esposti, 1993).

Existen dos grupos de inhibidores del complejo *bc₁*, que actúan al unirse específicamente al citocromo *b*. Un grupo que se conoce como inhibidores del centro Q_i que incluye a la antimicina, HQNO, funiculosina y diuron, estos inhibidores actúan bloqueando el flujo de electrones desde el hemo *b_H* a la ubiquinona. El otro grupo se conoce como grupo de inhibidores del centro Q_o e incluye compuestos como el mixotiazol y la estigmatelina. Estos inhibidores actúan al detener el flujo de electrones desde el ubiquinol hacia el centro hierro azufre e indirectamente también al complejo *b_L* (Xia y col. 1997). Un número de mutaciones puntuales afectan la sensibilidad de algunos organismos hacia los inhibidores, tales mutaciones producen substituciones de aminoácidos en unas

cuantas regiones discretas de la proteína modificando los sitios de unión para cada grupo de inhibidores (Ghelli, 1992).

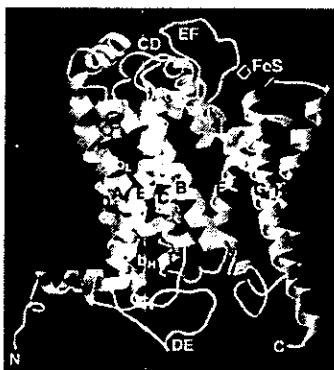


Figura 8. Modelo cristalográfico del citocromo *b*. Tomado de Xia y col. 1997.

El género *Polytomella*

Los organismos del género *Polytomella* son considerados como algas incoloras y se localizan taxonómicamente dentro de la familia Chlamydomonadaceae, dentro del orden Chlamydomonadales, la clase Chlorophyceae, el phylum Chlorophyta y el reino Protocista (Figura 9). El género fue descrito por primera vez por Aragao (1910) refiriéndose a organismos que generalmente habitan en medios dulceacuícolas ricos en nutrientes orgánicos y con un bajo grado de acidez (con un pH entre 6 y 7). Se considera que existen seis especies, cuyas diferencias morfológicas son muy pequeñas pero que habitan en sitios completamente diferentes desde el punto de vista ecológico (Pringsheim, 1955).

La ubicación taxonómica del género *Polytomella* no ha sido muy sencilla, ya que aunque morfológicamente tenga un gran parecido con *Chlamydomonas*, la ausencia de cloroplastos y de pared celular ha causado grandes conflictos en cuanto a su posición filogenética. Sin embargo, se han realizado varios estudios que confirman la estrecha relación que existe entre estos organismos: a nivel de microscopía electrónica en cuanto a la estructura del aparato flagelar (Brown y col., 1976) y a nivel molecular al encontrar un alto porcentaje de similitud entre los genes nucleares β -*tub* (98%) y los genes mitocondriales *cox1* (87%) de ambos géneros. Estos genes codifican para la tubulina y la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa respectivamente. Estas evidencias permiten suponer que *Polytomella* pudo haber surgido a partir de la separación de un grupo de algas del grupo de las Clorofitas por la pérdida del aparato fotosintético y la pared celular (Round, 1980).

Dentro del género *Polytomella* se encuentran organismos unicelulares de aproximadamente 17 μ m de largo y 11 μ m de ancho (Lewis y col.1974) con cuatro undulipodia apicales cuya base tiene forma de brazaletes. Se distinguen del resto de los Chlamydomonadales por la ausencia de cloroplastos y de pared celular de glucoproteínas.

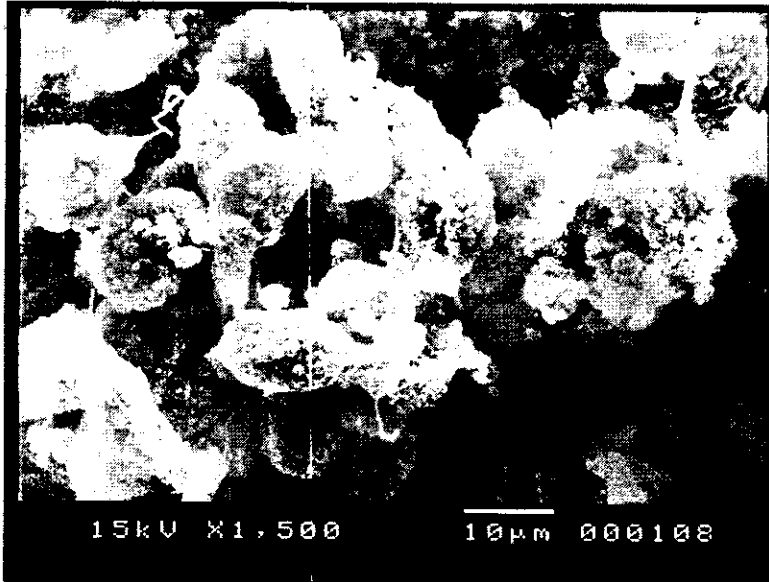


Figura 9. Fotografía de *Polytomella* spp. tomada por microscopía electrónica de barrido. Cortesía de Jorge Sepúlveda, encargado de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al realizar análisis por microscopía electrónica de estos organismos, se ha observado que dentro de las células se encuentran gránulos de almidón que funcionan en el individuo como reserva de energía (Sheeler y col. 1968).

En otros estudios de microscopía electrónica, se ha observado que el número y tamaño de las mitocondrias presentes en cada organismo puede variar según el estado metabólico de la célula, ya que se modifica la actividad mitocondrial. Es posible observar que durante la fase de crecimiento exponencial de un cultivo, el número de mitocondrias aumenta considerablemente llegando a ser alrededor de 40, la mayoría de forma elongada y distribuidas alrededor de la periferia celular. En cambio, cuando los cultivos se encuentran cerca de la fase estacionaria, puede observarse una sola mitocondria que se considera resultado de la fusión de las mitocondrias observadas en la fase anterior (Burton y Moore, 1974). La modificación en el número y tamaño de las mitocondrias puede ser resultado de la demanda de la actividad respiratoria, ya que se sabe que en *Polytomella* el consumo de oxígeno y la actividad específica de las enzimas mitocondriales decrece hacia la fase estacionaria de crecimiento (Cantor y Withroe, 1970; Cooper y Lloyd, 1972).

Durante el ciclo de vida de *Polytomella* es posible observar dos etapas desde el punto de vista reproductivo: una fase asexual en donde la reproducción es por fisión binaria, y una fase sexual isogamética. La división celular en la fase asexual se desarrolla durante la etapa exponencial de crecimiento; se inicia en la región posterior de la célula y termina con la separación de dos individuos por la región anterior después de la formación de los cuatro nuevos flagelos; este proceso tiene una duración de 5 a 6 minutos. La reproducción sexual isogamética puede ocurrir en cualquier momento durante el crecimiento del cultivo; sin embargo, la frecuencia de este tipo de reproducción aumenta cuando la densidad de la población es mayor. Los isogametos son monoicos y de menor tamaño que las células vegetativas; cuando dos de ellos se ponen en contacto comienza la fusión por la parte anterior de las células, desencadenando la formación de

un cigoto de cuatro flagelos con una movilidad similar a la del resto de las células. Entre 3 y 3.5 horas después de la formación de este cigoto se observa una reducción en su movilidad y comienzan a formarse placas de división que generan cuatro células hijas, una de ellas conserva los flagelos originales y el resto genera nuevos flagelos posteriormente (Figura 10)(Lewis, 1974).

Poco antes de la fase estacionaria del cultivo es posible observar una fase de enquistamiento, en la cual el 80% de la población se encuentra constituida por quistes. Este enquistamiento sucede cuando la célula vegetativa reduce su movilidad, toma una forma esférica y comienza a desarrollar la cubierta del quiste; se observa una reducción en el tamaño y disminución en el número de organelos celulares y se pierden aparentemente los flagelos. Este fenómeno sucede como respuesta a las condiciones del medio (Lewis y col. 1974). La cubierta del quiste se compone de cuatro capas de pared celular colocadas secuencialmente sobre la membrana plasmática (Brown y col. 1976).

Los estudios de complejos mitocondriales realizados en *Chlamydomonas* resultan complicados al no ser posible obtener preparaciones de mitocondrias libres de membranas tilacoidales (Atteia y col. 1992; Atteia y col. 1994). En este sentido, *Polytomella* presenta varias características que permiten proponerla como modelo de estudio: *i)* es un organismo que puede mantenerse en forma enquistada durante largos períodos de tiempo (Reed y col. 1976); *ii)* se desarrolla en medios de cultivo relativamente sencillos y económicos; *iii)* la ausencia de pared celular en los organismos permite romper las células con facilidad de manera que los organelos pueden obtenerse relativamente intactos y *iv)* la ausencia de cloroplastos permite realizar preparaciones de mitocondrias libres de pigmentos o proteínas contaminantes.

REPRODUCCION ASEJUAL

REPRODUCCION SEXUAL

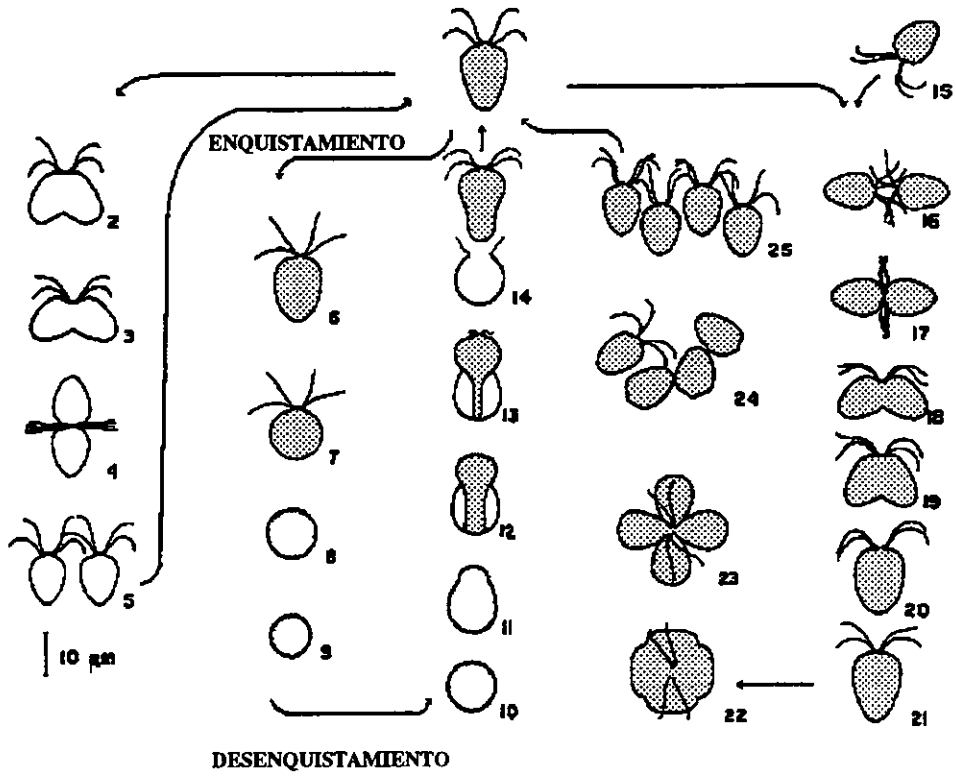


Figura 10. Ciclo de vida de *Polytomella* spp. (Tomado de Lewis, 1974).

Antecedentes

Como se ha mencionado en la sección anterior, las características particulares del alga incolora *Polytomella* spp. han permitido realizar trabajos sobre los complejos mitocondriales de los Chlamydomonadales de manera mucho más clara que los estudios realizados con organismos del género *Chlamydomonas*. Entre esos trabajos se incluyen análisis de tipo bioquímico y molecular.

En 1989 Conner y colaboradores realizaron un análisis comparativo entre los genes que codifican para la β -tubulina de *Chlamydomonas* y *Polytomella* observando un 98% de similitud entre las secuencias deducidas de aminoácidos.

En 1994 Gutiérrez-Cirlos y colaboradores aislaron el complejo bc_1 de *Polytomella* activo. Este complejo se compone de 11 polipéptidos y es sensible a antimicina y mixotiazol, siendo el primer reporte de un complejo bc_1 de un protoctista sensible a inhibidores. En este trabajo se realizó también un análisis espectrofotométrico, obteniéndose los espectros de absorción del citocromo b y el citocromo c_1 . Los resultados muestran que al reducir el citocromo b con ditionita se observa un corrimiento de 8 nm hacia el rojo en el pico α de absorción.

En 1996 Antaramian y colaboradores describieron el gen mitocondrial *cox1* de *Polytomella* spp. que codifica para la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa, obteniendo una secuencia de 1512 nucleótidos que les permitieron deducir una secuencia de 502 residuos de aminoácidos. Al comparar esta secuencia con el gen *cox1* de *C. reinhardtii* observaron una similitud del 88 % entre ambas proteínas. Obtuvieron también un producto de PCR con el gen *citb* que se utilizó como sonda para la identificación del gen completo en este trabajo.

Observaciones morfológicas sumadas a los resultados comunicados por Conner y colaboradores (1989) y por Antaramian y colaboradores (1996) han permitido confirmar que los organismos del género *Polytomella* están estrechamente relacionados con los del género *Chlamydomonas* a pesar de que *Polytomella* carezca de cloroplastos y pared celular. Podría decirse también que ambos géneros debieron compartir el mismo ancestro y que su separación ha sido un evento relativamente reciente en la evolución.

Objetivos

Clonar y secuenciar el gen que codifica para el citocromo *b*, ya que es un gen que se encuentra en todos los genomas mitocondriales descritos hasta la fecha.

Identificar diferencias en los residuos de aminoácidos de regiones conservadas del citocromo *b* a partir de un análisis comparativo entre las secuencias reportadas y la secuencia deducida de aminoácidos que se obtenga.

Elaborar un cladograma con las comparaciones realizadas con las secuencias de citocromo *b*.

Clonar y secuenciar el gen *nd4* que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, ya que es una de las subunidades del complejo I involucrada en la unión de ubiquinona y de algunos inhibidores.

Identificar diferencias entre las secuencias al hacer un análisis comparativo de la secuencia primaria de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa que se obtenga a partir de la secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos reportadas para esta proteína de otros organismos.

Establecer el patrón de distribución de los genes que se han identificado hasta la fecha del DNA mitocondrial de *Polytomella* spp.

Hipótesis de Trabajo

A partir de los estudios realizados hasta la fecha es posible suponer que las secuencias de nucleótidos que se obtengan de los genes *citb* y *nd4* permitirán deducir secuencias de residuos de aminoácidos que presenten un alto porcentaje de similitud (más del 50 %) al compararlos con las proteínas correspondientes reportadas para *Chlamydomonas reinhardtii*.

Los análisis que se realicen comparando las proteínas obtenidas con algunas de las proteínas reportadas hasta la fecha, deberán permitir identificar residuos de aminoácidos que difieran y que posiblemente confieran características especiales a las proteínas que se analizan en este trabajo. Además se podrá construir un cladograma en donde se aprecie la estrecha relación que existe entre los organismos del género *Chlamydomonas* y *Polytomella*.

Al tener los organismos del género *Polytomella* una estrecha relación con los organismos del género *Chlamydomonas*, puede esperarse que los genomas mitocondriales presenten características similares en cuanto a estructura general (regiones intergénicas, genes presentes, orden de los genes y forma del genoma).

Materiales y Métodos

Medio de cultivo para crecer *Polytomella* spp.

La cepa de *Polytomella* spp. que se cultiva y estudia en el laboratorio se adquirió de la colección de algas Sammlung von Algenkulturen que se localiza en el Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen de Alemania y actualmente se conserva en el cepario del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Los cultivos frescos de *Polytomella* spp. se realizan mediante la inoculación de medios esterilizados preparados de acuerdo a una modificación a lo reportado por Wise (1955 y 1959). Este medio contiene acetato de sodio 0.4% p/v, extracto de levadura 0.2% p/v y bacto triptona 0.2% p/v; además se le añaden vitaminas B₁ y B₁₂ en concentraciones de 0.01 mg/ml y 0.5 µg/ml respectivamente, ya que la falta de estas vitaminas durante el crecimiento de los organismos puede causar modificaciones en la estructura mitocondrial y en el contenido de grupos hemo (Cantor y Burton, 1975).

El medio preparado se depositó en volúmenes de 2 litros dentro de matraces para cultivo de base ancha, de manera que se favoreciera el intercambio de gases, ya que los cultivos no se hicieron en agitación debido a que como *Polytomella* spp. no tiene pared celular, se produciría un rompimiento de los organismos, disminuyendo así el rendimiento del cultivo. Los matraces se colocaron a una temperatura de entre 25 y 28 °C, ya que temperaturas fuera de este intervalo provocan una disminución en el ritmo de multiplicación y favorecen el enquistamiento.

Aislamiento de Mitocondrias de *Polytomella* spp.

Las células se cosecharon 48 horas después de la inoculación, cuando el cultivo se encontraba en la fase exponencial de crecimiento, por medio de una centrifugación a 3,500xg durante 10 minutos.

Una vez cosechadas las células, se tomaron 20 gr (peso húmedo) y se resuspendieron en un amortiguador que contenía sacarosa 250 mM, MOPS 10 mM y EDTA 2 mM a pH 7.5 (SME) y se lavaron por centrifugación a 3,500xg durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en 15 ml aproximadamente de amortiguador SME y se rompieron empleando un vástago de teflón en un tubo de vidrio de 10 ml. Para obtener las mitocondrias que se utilizaron en los experimentos de consumo de oxígeno, al resuspender las células, el amortiguador SME se complementó con polivinilpirrolidona (PVP) al 0.7% p/v, cisteína 0.4 mM y albúmina de suero bovino libre de lípidos (ASB) al 0.2 % p/v.

Las células rotas de ésta manera, fueron sometidas a dos tratamientos diferentes:

1) Para los experimentos de consumo de oxígeno el homogenado resultante se centrifugó a 1000xg durante 8 minutos y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10,000xg durante 15 minutos para obtener la fracción mitocondrial, la cual fue resuspendida en el mismo amortiguador para lavarla y se centrifugó nuevamente a 10,000xg durante 10 minutos.

2) El homogenado obtenido se diluyó en 1 ml de una solución 12 % v/v de OptiPrep™ diseñado por Nycomed para el aislamiento *in vitro* de partículas biológicas. Esta preparación se depositó en un gradiente de densidad que incluyó 10 ml de solución Optiprep 35 % v/v y 10 ml de solución Optiprep 25 % v/v. Se centrifugó a 23,500xg durante 10 minutos. Al finalizar la centrifugación, se observó un precipitado resultante de

almidón y cuatro fracciones solubles. La segunda fracción es la que contiene a las mitocondrias.

Las mitocondrias aisladas por ambos métodos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con DNasa II con el fin de degradar el DNA nuclear que se encontrara en la fracción mitocondrial.

Los métodos de obtención de mitocondrias se resumen en la figura 11.

Purificación de DNA mitocondrial

Las mitocondrias obtenidas de ambas maneras se resuspendieron en un amortiguador que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8.2), EDTA 10 mM, NaCl 10 mM y Sarkosil 2 % y se incubaron 12 horas a 4 °C de manera que se lisaran de acuerdo al método descrito por Hudspeth y col (1980). El DNA se extrajo dos veces con fenol saturado con Tris-HCl 2M (pH 8.0), una vez con fenol-cloroformo y una vez con cloroformo. Se precipitó con acetato de sodio 3M y con tres volúmenes de etanol 100% a -20 °C durante 2 horas. Se centrifugó durante 10 minutos a 30,000xg, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70 %. Una vez que el precipitado se secó completamente el DNA se resuspendió con agua hasta alcanzar una concentración final de 1 µg/µl.

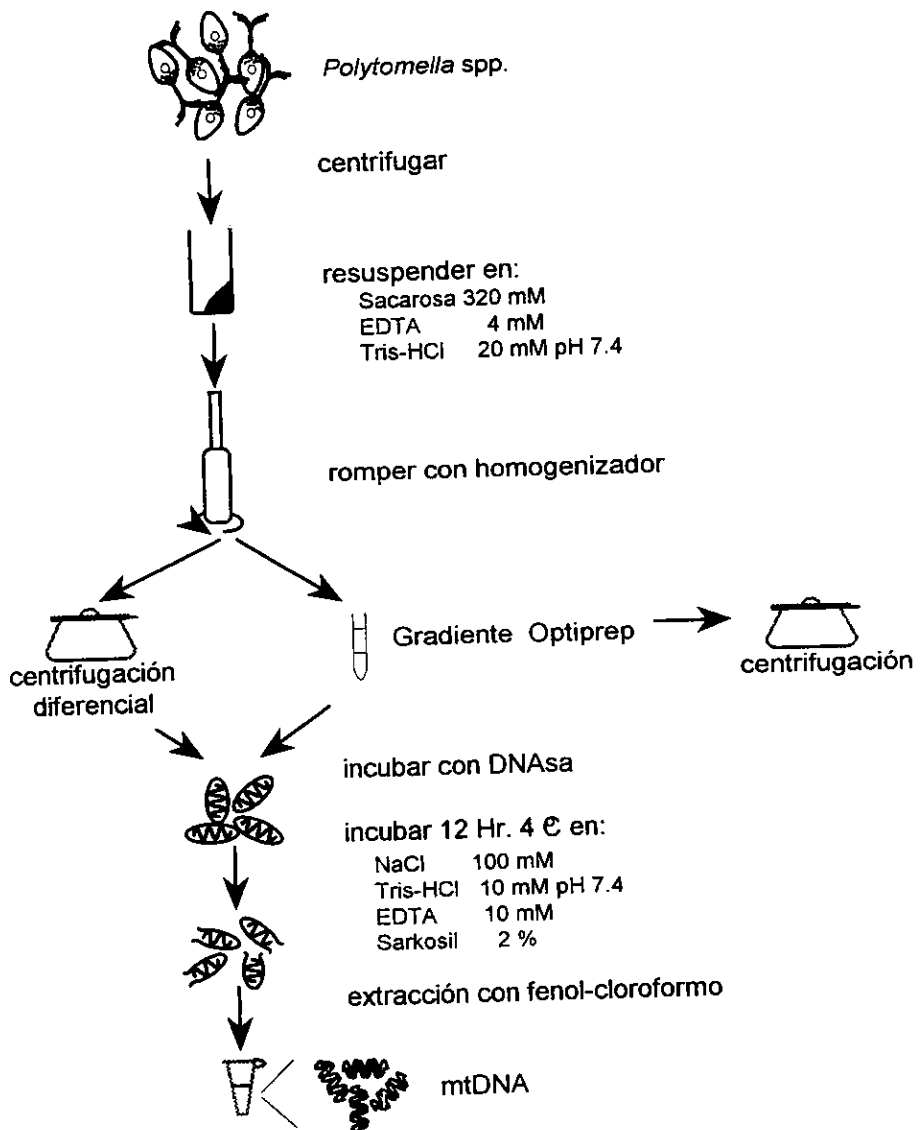


Figura 11. Métodos de aislamiento de mitocondrias y purificación de DNA mitocondrial.

Bancos genómicos de DNA mitocondrial del alga incolora *Polytomella* spp.

En 1995 Antaramian construyó dos bancos genómicos con la enzima de restricción *HindIII* cuyas clonas fueron utilizadas durante este trabajo. Estos bancos fueron construídos realizando digestiones totales del DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. con la enzima de restricción *HindIII* de *Boehringer* y clonando los fragmentos obtenidos en el vector PTZ18R y en Bluescript (de 14 y 8 clonas respectivamente). En total, se cuenta con 22 clonas diferentes que han sido numeradas de la clona 1H a la clona 22H para facilitar su manipulación.

Purificación de plásmidos

Los plásmidos de las clonas de las bibliotecas de DNA mitocondrial se purificaron utilizando columnas de Quiagen siguiendo el protocolo que sugiere el proveedor obteniendo soluciones de 500ng/ μ l.

Identificación del gen *citb* de *Polytomella* spp.

Se tomaron las clonas del banco genómico construído con la enzima de restricción *HindIII* por Antaramian (1995) y se realizó una prueba tipo Southern (dot-blot) en la cual se colocó 1 μ g del DNA de cada una de las clonas en una membrana de Nylon Hybond-N de *Amersham* de manera que el resultado fuera una pequeña mancha de DNA localizada para cada muestra. En la misma membrana se colocó como control positivo el producto de PCR obtenido por Antaramian (1995) que contiene un fragmento del gen del citocromo b y como control negativo el plásmido Blue Script. Esta membrana se introdujo cinco minutos en una solución 1M NaOH y 1.5 M NaCl para que se desnaturalizara y cinco minutos en una solución 1M Tris pH 8.0 y 1.5 M NaCl para que se neutralizara. Finalmente se entrecruzó el DNA con la membrana por medio de luz ultravioleta en un UV-Stratalinker.

Se colocó la membrana a prehibridar durante 2 horas a 50 °C en un amortiguador que contenía 6X SSC, 5X solución de Denhardt, 20 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.2 % SDS y 10 mg de esperma de salmón (hervido previamente 10 minutos y enfriado en hielo 10 minutos).

Esta membrana se hibridó con el producto de PCR obtenido por Antaramian (1995) que contiene un fragmento del citocromo *b*, el cual se marcó con biotina mediante la técnica de cebadores al azar (Random Primer) con el sistema Bioprime™ DNA labeling System de Gibco BRL de la siguiente manera:

1. A 100 ng de DNA añadir 20 μ l de 2.5 X solución de cebadores al azar y hervir durante 5 minutos.
2. Colocar en hielo y añadir 5 μ l de 10 X de mezcla de dNTP y agua hasta 49 μ l finales.
3. Añadir 1 μ l de fragmento Klenow y mezclar.
4. Centrifugar 15 segundos y dejar incubando 1 hora a 37 °C.
5. Al concluir el tiempo de incubación, añadir 5 μ l de amortiguador de término.
6. Hervir durante 10 minutos y enfriar en hielo 10 minutos.

A continuación se añadió la sonda al recipiente donde se encuentra la membrana en proceso de prehibridación y se dejó hibridando toda la noche a 50 °C.

A la mañana siguiente se realizó la reacción de PhotoGene System 2.0 de detección quimioluminiscente:

1. Incubar 2 minutos con TBS-Tween 20 a temperatura ambiente.
2. Incubar 1 hora a 65 °C con TBS-Tween 20 y albúmina al 3%.
3. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente con fosfatasa alcalina conjugada disuelta en TBS-Tween 20.

4. Hacer dos lavados de 15 minutos cada uno con TBS-Tween 20.
5. Incubar 1 hora con la solución de lavado final a temperatura ambiente.
6. Incubar 30 minutos a 37 °C en una dilución 1 a 10 de LumiPhos 530 y solución de lavado final.
7. Exponer las membranas en una placa fotográfica Biomax de Kodak.

Identificación del gen *Nd4*

Se secuenciaron parcialmente (en ambos extremos) las 9 clonas de una de las bibliotecas de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. A partir de estas secuencias se realizaron deducciones de estructura primaria buscando marcos de lectura abiertos. Por otro lado, las secuencias se compararon con los genes presentes en el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*. De observarse una identidad mayor al 50% con algún gen sería posible considerar que se trataba del gen correspondiente en el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp.

De esta manera se identificó claramente la presencia de un fragmento del gen que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa en la clona 8H.

Secuenciación de las clonas del banco genómico

La clona que dió un resultado positivo en la hibridación con el producto de PCR que incluye un fragmento del citocromo *b* y los extremos de las 8 clonas de una de las bibliotecas de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp, se secuenciaron utilizando el sistema "Thermo Sequenase cycle sequencing" de *Amersham*, basado en el método de terminación de cadena descrito por Sanger (1977), siguiendo los siguientes pasos:

1. Desnaturalizar 5 μg de DNA disueltos en 24 μl de agua añadiendo 6 μl de 1 M NaOH.
2. Dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente
3. Precipitar con 3 μl de 2 M acetato de amonio y 70 μl de etanol 100 %.
4. Se deja incubar a - 70 °C durante 1 hora.
5. Centrifugar 10 minutos a 18,000xg.
6. Lavar con etanol 70 % y dejar secar.
7. Resuspender en 10 ng de oligonucleótido, 6 μl de agua y 2 μl de amortiguador de reacción.
8. Incubar en un baño a 70 °C dejando enfriar hasta que la temperatura del baño llegue a los 37 °C.
9. Añadir a cada reacción de secuencia 0.5 μl de ^{35}S dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 1 μl de 3 mM dCTP, 1 μl de 3 mM dGTP, 1 μl de 3 mM dTTP, 2 μl termo secuenasa DNA polimerasa (4 U/ μl)
10. Incubar 5 minutos a 70 °C.
11. Incubar 5 minutos a 45 °C.
12. Centrifugar 10 segundos a 18,000xg.
13. Colocar 4 μl de ddATP en un tubo y marcarlo con la letra A. Hacer lo mismo con tubos marcados con las letras C, G y T añadiéndoles el dideoxinucleótido correspondiente.
14. Transferir 4 μl de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos marcados en el paso anterior.
15. Incubar 10 minutos a 70 °C.
16. Añadir 4 μl de solución de término.

Búsqueda de fragmentos de genes específicos por la técnica de PCR (Figura 12)

Una vez que se ha obtenido la secuencia parcial de un gen, es posible conocer los segmentos faltantes mediante la técnica de PCR utilizando un desoxioligonucleótido específico diseñado a partir de la secuencia que se tiene del gen y cinco secuencias de 10 nucleótidos al azar (decámeros).

En el caso del gen del *citb*, identificado en la clona 9H y en cuya secuencia no se encuentra la región que codifica para el extremo carboxilo de la proteína, se diseñó un desoxioligonucleótido específico en el nucleótido 1101 de la clona 9H en la cadena con sentido de 22 nucleótidos:

5' tta acc aag gca aag ctg aac c 3'

Para el caso del gen de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, identificado en la clona 8H, se diseñaron dos desoxioligonucleótidos de 20 bases de longitud, uno en la cadena con sentido (109) y otro en la cadena complementaria (129) en el nucleótido 109 de la clona 8H:

5' gaa tta gta gca gac gac aa 3'

3' ctt aat cat cgt ctg ctg tt 5'

Estos PCRs se realizaron de la siguiente manera:

A cada tubo se añadieron:

10 μ l de 1 mM dNTPs

5 μ l de amortiguador para PCR 10 X

1 μ l de 50 mM MgCl₂

0.5 μ l de Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l

1 μ l de DMSO

1 μ l de BSA

4 μ l del decámero correspondiente 2 μ M

10 μ l del oligonucleótido específico para el citocromo *b* (200ng)

1 μ g de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp.(excepto en el control negativo)

Agua hasta 50 μ l finales

Las muestras fueron sometidas a los siguientes ciclos de temperatura:

10 minutos a 94 °C

45 segundos a 94 °C

45 segundos a 50 °C 50 ciclos

1 minuto a 72 °C

10 minutos a 72 °C

Desoxioligonucleótidos específicos

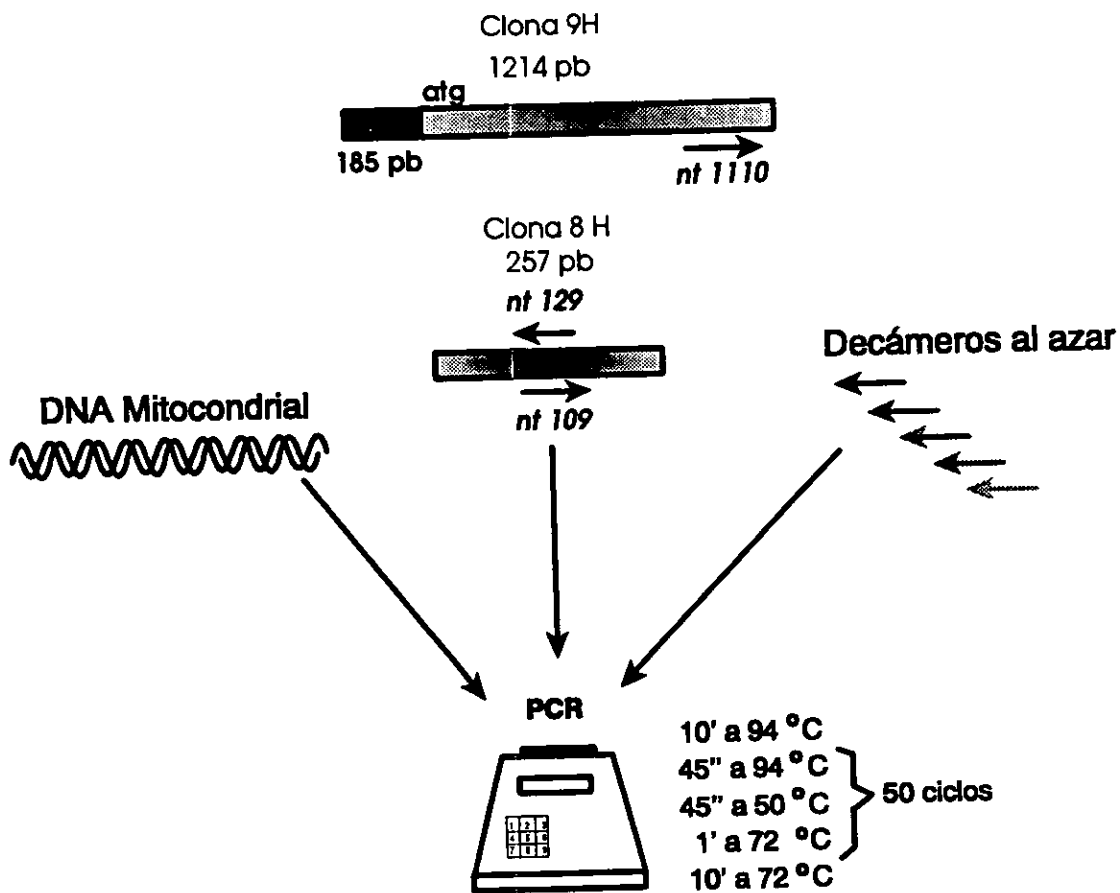


Figura 12. PCR utilizando 1 desoxioligonucleótido específico y cinco decámeros al azar empleado para localizar secuencias de fragmentos de genes.

Análisis tipo Southern de los productos de PCR

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis a 100 V en un gel de agarosa 1% y se transfirieron a una membrana de nylon de acuerdo al método de Southern (1979):

1. Se coloca el gel en una lámpara de luz ultravioleta durante 5 minutos.
2. El gel se desnaturaliza durante 1 hora con una solución 1M NaOH y 1.5 M NaCl.
3. El gel se neutraliza durante 1 hora con una solución 1M Tris-Cl pH 8.0 y 1.5M NaCl.
4. Finalmente se coloca el gel en un dispositivo como el que se muestra en la figura 13. El gel se coloca entre el vidrio y el papel Whatman, rodeado por Parafilm de manera que la columna de toallas absorbentes no entren en contacto con el puente de papel impregnado de solución 10 X SSC. Es importante que el dispositivo quede bien balanceado para que la transferencia del DNA a la membrana de nylon suceda adecuadamente.
5. Se deja transferir toda la noche y a la mañana siguiente se desecha el gel y se marcan cuidadosamente en la membrana los sitios en donde se encontraban los pozos del gel.
6. Se entrecruza el DNA con la membrana por medio de luz ultravioleta en un UV-Stratalinker.

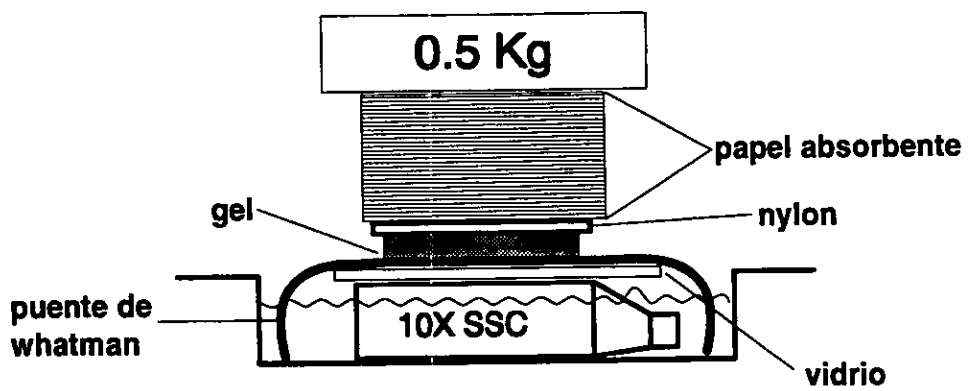


Figura 13. Dispositivo montado para transferir el DNA de un gel de agarosa a una membrana de nylon.

Obtención fragmentos utilizados como sondas para hibridación

Los plásmidos de las clonas 8 y 9H obtenidos mediante el sistema *Quiagen* se digirieron con la enzima *HindIII*. Estas digestiones permitieron aislar los fragmentos deseados en cada caso y se purificaron con el sistema *GeneClean* de *Bio101*:

1. A 100 μ l de agarosa 1% que contenga el fragmento deseado, añadir 50 μ l de "TBE Modifier" y 3 volúmenes de NaI.
2. Calentar a 55 °C hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.
3. Añadir 5 μ l de perlas de vidrio.
4. Incubar en hielo durante 5 minutos agitando cada minuto.
5. Centrifugar 5 segundos a 18,000 g. Retirar el sobrenadante.
6. Resuspender las perlas de vidrio en 450 μ l de solución "New Wash".
7. Centrifugar 5 segundos a 18,000 g. Retirar el sobrenadante.
8. Repetir los lavados 3 veces (en el último centrifugar 30 segundos).
9. Resuspender las perlas en 20 μ l de agua para eluir el DNA.
10. Incubar a 55 °C durante 5 minutos.
11. Centrifugar 30 segundos a 18,000 g.
12. Recuperar el DNA eluido.

Hibridación con ³²P

Los fragmentos de DNA purificados por el sistema *GeneClean*, se marcaron radioactivamente con ³²P utilizando el sistema de marcaje de cebadores al azar de *GIBCO BRL*:

Desnaturalizar 25 ng de DNA disueltos en 20 μ l de agua hirviendo durante 5 minutos. Colocar rápidamente en hielo.

Añadir :

2 μ l de solución dATP

2 μ l de solución dGTP

2 μ l de solución dTTP

15 μ l de mezcla amortiguadora de cebadores al azar.

5 μ l (50 μ Ci) de α -³²P dCTP (*Dupont*)

Agua hasta 49 μ l finales

Mezlar brevemente.

Añadir 1 μ l de fragmento Klenow.

Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente

Añadir 5 μ l de solución de paro y 150 μ l de agua.

Centrifugar en una columna de Sephadex G50 de centrifugación rápida (*Boehringer*) durante 3 minutos.

Hervir 10 minutos

Enfriar en hielo 10 minutos

Añadir a la solución de prehibridación

Clonación de Productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos por la técnica de los decámeros que presentaron una señal positiva al hibridarlos con la sonda específica, se clonaron en el plásmido pMOSBlue T-Vector de *Amersham* siguiendo los protocolos incluidos en el sistema para la ligación del producto de PCR con el vector y la transformación de células.

Después de ambos procedimientos se plaquean las células transformadas en cajas de Petri con medio LB enriquecido con 100 μ g/ml de ampicilina añadiendo 35 μ l de 2% X-gal y 10 μ l de 80 mM IPTG. Las células se dejaron incubando durante toda la noche a 37 °C y se seleccionaron las colonias blancas.

Purificación de plásmidos que contienen los productos de PCR.

Los plásmidos que contienen los productos de PCR con los fragmentos de los genes deseados, se purificaron utilizando columnas de *Quiagen* siguiendo el protocolo que sugiere el proveedor obteniendo soluciones de 500ng/ μ l.

Secuenciación de los productos de PCR

Las secuencias de los plásmidos purificados de los productos de PCR obtenidos con la técnica de los decámeros ya clonados se realizaron siguiendo dos protocolos diferentes, ambos basados en la técnica de terminación de cadena propuesto por Sanger (1977). Algunas muestras fueron secuenciadas con el sistema "Thermo Sequenase cycle sequencing" y otras utilizando el sistema "Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing", ambos distribuidos por *Amersham*, siguiendo en ambos casos el protocolo propuesto por el proveedor.

La ventaja de utilizar el último sistema de secuenciación sobre los mencionados anteriormente, es que en este caso se incluyen los dideoxinucleótidos marcados radioactivamente con [α -³³P] de manera que solo se marcan las cadenas que terminan adecuadamente según los postulados de Sanger (1977), eliminándose los artificios en la secuencia ya que no se marcan las cadenas de DNA que no terminen en un dideoxinucleótido. Por otro lado, permite secuenciar moléculas de DNA mitocondrial directamente, es decir sin la necesidad de clonarlo en algún vector, siempre y cuando se cuente con los desoxiligonucleótidos específicos para ese DNA.

Las muestras obtenidas con este método y con el mencionado para la secuenciación de las clonas de las bibliotecas genómicas, se corren en un gel de contiene 28.8 g de urea seca, 14.4 ml de amortiguador TBE 5X , 9 ml de una solución de 40% acrilamida-bisacrilamida (19:1) y se añade agua hasta un volumen final de 60 ml. Esta solución debe incubarse a 37 °C hasta que se disuelva por completo. Una vez disuelta se filtra a través de un filtro Millipore de 0.4 μ m y se le añaden 300 μ l de 100 μ g/ μ l persulfato

de amonio y 24 μ l de TEMED.

Las secuencias obtenidas por el último método de secuencia, deben correrse en un gel tolerante al glicerol al 6%. Este gel se compone de los siguientes ingredientes:

9 ml de solución 40 % de acrilamida - bisacrilamida (19:1)

28 g de urea

2.5 ml de amortiguador para gel tolerante al glicerol

Agua hasta 60 ml finales

El amortiguador para gel tolerante al glicerol se compone de 216 g de Tris base, 72 g de taurina, 4 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y agua hasta 1000 ml.

La solución preparada para cualquiera de las técnicas se vierte lentamente a través de dos vidrios separados por 0.4 mm, colocados de manera inclinada en un ángulo de 45° aproximadamente. Los vidrios de secuencia deben encontrarse libres de polvo y grasa, para lo cual deben ser cuidadosamente lavados con metanol y acetona antes de verter la solución del gel. Los vidrios deben cubrirse con una capa de sigmacote, que forma sobre los vidrios una delgada capa de silicón repelente al agua que permitirá que la solución fluya de manera constante a lo largo de los vidrios. La electroforesis de las muestras debe realizarse por lo menos 2h después de que se ha vaciado para que la polimerización sea completa. Las muestras deben ser calentadas durante 2 minutos a 70°C antes de ser cargadas. Las muestras se corren a 2,000 V. El amortiguador para la electroforesis debe ser 1.2 X TBE o 6% de amortiguador tolerante al glicerol según el tipo de gel con el que se esté trabajando. La duración de la electroforesis puede variar entre 4 y 8 horas aproximadamente.

Al terminar la corrida el gel se separa cuidadosamente de los vidrios y se seca al vacío a 80 °C. Una vez que se ha secado, se coloca a exponer en una placa fotográfica Biomax de Kodak.

Análisis de las Secuencias

Las estructura primaria de las proteínas estudiadas en este trabajo se obtuvieron a partir de deducciones hechas de las secuencias de nucleótidos obtenidas experimentalmente. Estas deducciones así como los análisis comparativos de las secuencias se realizaron con el programa GCG (Wisconsin) y con el banco de datos del Gene Bank actualizado a 1996.

Consumo de oxígeno

Para la medición del consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark con un amortiguador de incubación que contenía KCl 120mM, MOPS 10 mM, EDTA 1mM y Na₂HPO₄ 1 mM a pH 7.2 (amortiguador KME), en una cámara de 1.9 ml de volumen con agitación constante a 25 °C.

Para medir el grado de inhibición del complejo I por rotenona, se utilizó NADH 1mM como sustrato y añadiendo diferentes concentraciones de rotenona a la cámara de incubación en donde se encontraban las mitocondrias aisladas de *Polytomella* spp.

Resultados

Identificación del gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp.

Al realizar un tamizado con biotina de todas las clonas del banco mitocondrial de *HindIII* se observó una señal positiva con la clona 9H al utilizar como sonda el producto de PCR obtenido por Antaramian (1995) (Figura 14).

La clona 9H se secuenció completamente y a partir de los 1214 nucleótidos que la componen, se obtuvo la secuencia de residuos de aminoácidos con el programa GCG. Esta secuencia incluye el extremo 5' del gen *citb* y una región anterior, pero no el extremo 3' (figura 15) . Al traducir esta secuencia, estaba ausente el extremo carboxilo terminal del citocromo *b*.

Para poder encontrar la secuencia de este extremo faltante, se realizó una búsqueda por PCR en el DNA mitocondrial de *Polytomella* spp., utilizando un oligonucleótido específico diseñado en la base 1100 de la secuencia de la clona 9H y cinco decámeros. A partir de este PCR, se obtuvo una serie de amplicones que fueron transferidos a una membrana de nylon y se hibridaron radioactivamente utilizando como sonda a la clona 9H. Se obtuvieron 5 productos de PCR con una señal positiva (Figura 16).

Los productos de PCR que mostraron una señal positiva, de diferentes tamaños, se clonaron y secuenciaron; de manera que pudo observarse que todos los productos de PCR contienen la misma secuencia de nucleótidos de la cual se leyeron alrededor de 100 bases, los cuales corresponden con la parte final de la clona 9H y el extremo 3' del gen *citb* (Figura 17). Al tener cinco productos amplificados independientes que presentan todos la misma secuencia, es posible descartar la presencia de una mutación en el gen producto de un error durante el proceso de PCR.

La secuencia completa del gen *citb*, tiene 1113 nucleótidos a partir de los cuales se puede deducir una secuencia de 371 aminoácidos (Figura 18).

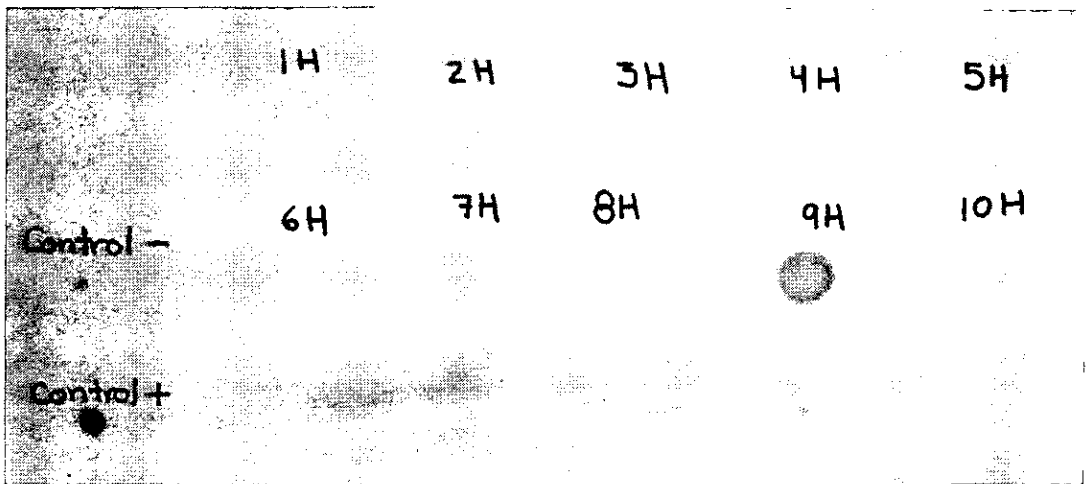


Figura 14. Hibridación con biotina de las 9 clonas de la biblioteca de DNA mitocondrial construida con la enzima *HindIII* utilizando como sonda el producto de PCR obtenido por Antaramian (1995). Se observa claramente que la clona 9H es positiva.

1 aagcttgact tctatgataa ctatcaacga agagggtgaca aaccagcggat
51 gcgaacagaa agaaaacagc aaagataacc tataattaag aaaagggttg
101 gtctttgcct agcttttcac tatgagataa gtttatacat gctagccata
151 gatggcgcgc aggtgaatat cacacgagaa acaaatg~~cg~~gt ttacatcaaa
201 agaataatat gctacagctt tattaccaac acattgaagc ctacccaaca
251 ccttgcaacc taaaatactc ttggaacatg ggcagtcttt cgggcttact
301 tttagctagc caaattgtca caggaattct tttggctatg cactactgcc
351 cagatacttc attggcattc tacagcgtaa ttcatttaac agttgatgta
401 ccttatggat ttgtaattcg atattttcac atgaatggcg ccacgttatt
451 cttcgtagcc gtattcttgc atttattccg aaacttgtat tacaacagcg
501 gatcgcaacc acgcgagtta ctatacatta gtgggtgctgt aatacttcta
551 ttaatggtaa taacagcatt cataggatac gttttacctt ggggacaaat
601 gagtttctgg ggcgctactg taatcaccag tttggtaagt gctgtgccaa
651 tagttggtac cgatcttggt tattatttat ggggaggatt tagcgttagc
701 aaccaacgt taaaccgctt cttcagcttt cactatctct taccatttgt
751 cctagccggt ttaagcatcg ctcatctagc tgctctccat agctatggaa
801 ctacaaatcc actctctata attcagagca aagttccatt tggttcctac
851 tacatcatta aagacttgct gggagttcta attattggag cagctatgat
901 cgtgttagcc ttcttcttcc cagaggctct caaccattcc gacaattaca
951 tccagcaaaa tccagacagt acaccagctc acatcgtgcc agaatggtac
1001 ttcttaccag tttacgctat tttacgaagc atccccgata aaggaattgg
1051 tattttagct gtgttactgg tttttcatag gtttagggtt acagccattc
1101 **ttaaccaagg caaagctgaa ccacactttt** atgcttcttt cataggaggc
1151 ttattcgttc tgggctggct tgggtcaaaa gaaattacag acgtaacaag
1201 cgcagcccca agctt

Figura 15. Secuencia de nucleótidos que integran la clona 9H. En negritas se muestra la secuencia del desoxiligonucleótido diseñado para realizar la búsqueda del extremo carboxilo terminal mediante la técnica de PCR con decámeros.

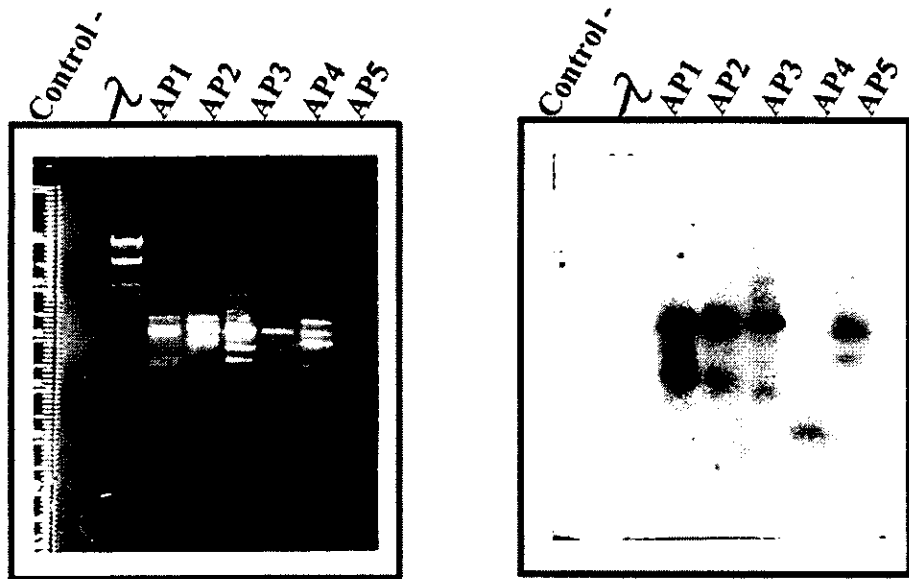


Figura 16. Productos de PCR obtenidos con la técnica de PCR con decámeros e hibridación con la clona 9H como sonda.

1 cttcacatta ttcacatttg cctacctctt cgtagtaagt cctttgtaca
51 gcttgctgta caaccgagta aaaggttaac aaaacaaaaa aaaagagaac

Figura 17. Secuencia de nucleótidos de los productos de PCR obtenidos que contienen el extremo carboxilo del gen *citb*.

(-184) aagcttgacttctatgataactac

aacgaagaggtgacaaaccagcgtgCGAACAGAAAGAAAACAGCAAAGATAACCTATAATTAAGAAAAGGTTGGTCT
 TGCCTAGCTTTTCACTATGAGATAAGTTTATACATGCTAGCCATAGATGGCGCGCAGGTGAATATCACACAGAGAAACAA

```

atg cgt tta cat caa aag aat aat atg cta cag ctt tat tac caa cac att gaa gcc tac
M R L H Q K N N M L Q L Y Y Q H I E A Y
cca aca cct tgc aac cta aaa tac tct tgg aac atg ggc agt ctt tcc ggc tta ctt tta
P T P C N L K Y S W N M G S L S G L L L
gct agc caa att gtc aca gga att ctt ttg gct atg cat tac tgc cca gat act tca ttg
A S Q I V T G I L L A M H Y C P D T S L
gca ttc tac agc gta att cat tta aca gtt gat gta cct tat gga ttt gta att cga tat
A F Y S V I E L T V D V P Y G F V I R Y
ttt cac atg aat ggc gcc agc tta ttc ttc gta gcc gta ttc ttg cat tta ttc cga aac
F H M N G A S L F F V A V F L H L F R N
ttg tat tac aac agc gga tgc caa cca cgc gag tta cta tac att agt ggt gtc gta ata
L Y Y N S G S Q P R E L L Y I S G V V I
ctt cta tta atg gta ata aca gca ttc ata gga tac gtt tta cct tgg gga caa atg agt
L L L M V I T A F I G Y V L P W G Q M S
ttc tgg ggc gct act gta atc acc agt ttg gta agt gct gtg cca ata ttt ggt acc gat
F W G A T V I T S L V S A V P I V G T D
ctt gtt tat tat tta tgg gga gga ttt agc gtt agc aac cca acg tta aac cgc ttc ttc
L V Y Y L W G G F S V S N P T L N R F F
agc ttt cac tat ctc tta cca ttt gtc cta gcc ggt tta agc atc gct cat cta gct gct
S F H Y L L P F V L A G L S I A H L A A
ctc cat agc tat gga agt aca aat cca ctc tct ata aat tca gta gca aaa gtt cca ttt
L H S Y G S T N P L S I N S V A K V P F
ggt tcc tac tac atc att aaa gac ttg ctg gga gtt cta att att gga gca gct atg atc
G S Y Y I I K D L L G V L I I G A A M I
gtg tta gcc ttc ttc ttt cca gag gct ctc aac cat tcc gac aat tac atc cca gca aat
G L A F F F P E A L N H S D N Y I P A N
cca tac agt aca cca gct cac atc gtg cca gaa tgg tac ttc tta cca gtt tac gct att
P Y S T P A H I V P E W Y F L P V Y A I
uua cga agc atc ccc gat aaa gga att ggt att tta gct gtg tta ctg ttt ttc ata ggt
L R S I P D K G I G I L A V L L F F I G
tta ggt tta cag cca ttc tta agc caa ggc aaa gct gaa cca cac ttt tat gct tot ttc
L G L Q P F L S Q G K A E P H F Y A S P
ata gga ggc tta ttc gtt ctg ggc tgg ctt ggg tca aaa gaa att aca gac gta aca agc
I G G L F V L G W L G S K E I T D V T S
gca gcc cca agc ttc ttc aca tta ttc aca ttt gcc tac ctc ttc gta gta agt cct ttg
A A P S F F T L F T F A Y L F V V S P L
tac agc ttg ctg tac aac cga gta aaa ggt taa caaaacaaaaaaagagaact (1316)
Y S L L Y N R V K G *

```

Figura 18. Secuencia completa de nucleótidos del gen *citb* y secuencia deducida de aminoácidos.

Con la secuencia de aminoácidos derivada, se construyó un modelo topológico de la proteína basado en el diseñado a partir de un perfil de hidropatía según Kyte-Doolittle(1982) (Figura 19).

Se obtuvo también la frecuencia en el uso de codones para el gen *citb* de *Polytomella* y se analizó al compararlo con el uso de codones de la misma proteína reportado para *C. reinhardtii* (Figura 20).

Al comparar la secuencia de aminoácidos obtenida, con la reportada para *C. reinhardtii* se obtuvo una identidad del 56 % y una similitud del 78 % (figura 21). Se realizó también una comparación con las secuencias del citocromo *b* reportadas para otros organismos y se construyó un árbol filogenético considerando estas secuencias (Figura 22).

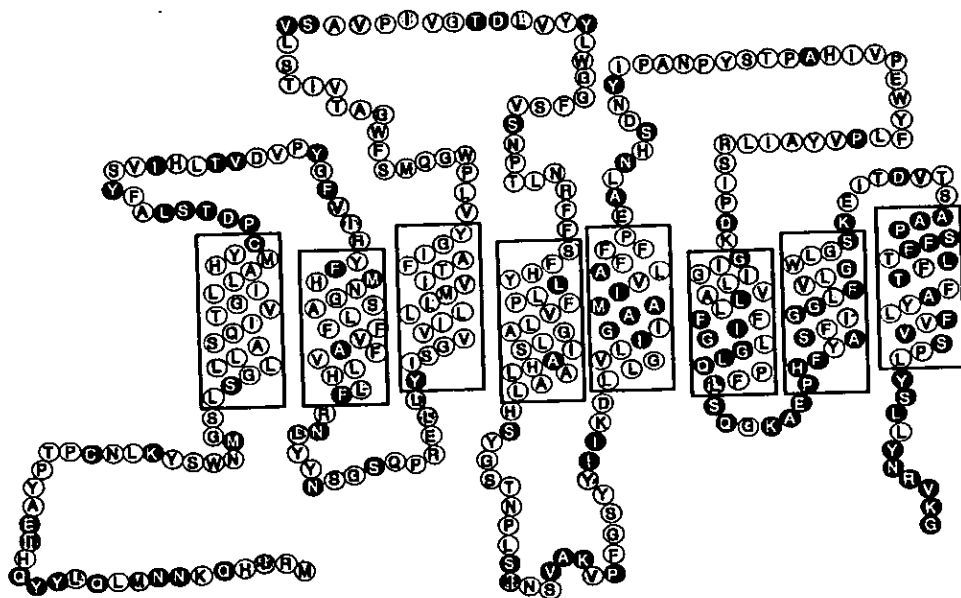


Figura 19. Modelo topológico del citocromo *b* de *Polytomella* spp. En círculos blancos se muestran los aminoácidos idénticos al citocromo *b* de *C. reinhardtii*, en círculos grises se muestran los aminoácidos semiconservados y en círculos negros los aminoácidos diferentes.

		2nd								
		U	C	A	G					
1st	U	Phe	10 5	Ser	3 7	Tyr	9 5	Cys	0 1	U C A G
		Phe	20 20	Ser	3 1	Tyr	17 17	Cys	2 2	
		Leu	23 0	Ser	3 0	Stop	1 1	Stop	0 0	
		Leu	8 27	Ser	1 0	Stop	0 0	Trp	6 11	
	C	Leu	7 5	Pro	4 1	His	7 2	Arg	1 5	U C A G
		Leu	5 1	Pro	1 0	His	6 12	Arg	2 2	
		Leu	7 19	Pro	17 18	Gln	6 9	Arg	4 0	
		Leu	4 1	Pro	0 0	Gln	2 2	Arg	0 0	
	A	Ile	13 16	Thr	2 14	Asn	7 0	Ser	8 7	U C A G
		Ile	7 11	Thr	2 7	Asn	8 15	Ser	14 10	
		Ile	7 0	Thr	10 0	Lys	7 5	Arg	0 0	
		Met	8 15	Thr	1 0	Lys	1 0	Arg	0 0	
	G	Val	9 4	Ala	14 21	Asp	4 3	Gly	8 29	U C A G
		Val	3 7	Ala	7 8	Asp	3 4	Gly	7 5	
		Val	14 19	Ala	6 0	Glu	4 0	Gly	12 1	
		Val	4 1	Ala	0 0	Glu	2 5	Gly	1 0	

Figura 20. Uso de codones del gen *citb* de *Polytomella spp.* en números oscuros comparado con el uso de codones del gen *citb* de *C. reinhardtii* en números claros. Los recuadros señalan algunas de las diferencias más significativas entre las dos especies.

Polytomella	1	MRLHQKNMLQLYYQHIEAYPTPCNLKYSWNMGSLSGLLLASQIVTGILL	50
		: . . : : . : . . : : :	
Chlamydomonas	1	MRMENKIQLLSVLNTHLVAYPTPMNLNYSWNGGSLAGMMLASQMLTGILL	50
	 : : : : . : : : .	
	51	AMHYCPDTSLAFYSVIHLLTVDVPYGFVIRYFPHMGASLFFVAVFLHLEFRN	100
	 : : : : . : : : .	
	51	AMHYVGHVDYAFASVQHMLTDVPSGMILRYAHANGASLFFIVVYLEVLGRG	100
	 : : : : . : : : .	
	101	LYNSGSQPRELLYISGVVILLVMVITAFIGYVLPWQMSFWGATVITSL	150
		: . . : : :	
	101	MYYGSGAQPREIVWISGVVILLVMIITAFIGYVLPWQMSFWGATVITSL	150
		: . . : : :	
	151	VSAVPIVGTDLVYYLWGGFSVSNPTLNRFFSFHYLLPFVLAGLSIAHLAA	200
		. . : : : . : : : :	
	151	ATAIPVVGKHHIMYWLGGSVDNPTLNRFYSHYTLFFILAGLSVFIHAA	200
		. . : : : . : : : :	
	201	LHSYGSTNPLSINSVAK.VPFGSYYIHKDLLGVLIIGAAMIVLAFPPPEA	249
		: : . . . : . : : . : : : . . : : . : :	
	201	LHQYGSTNPLGVNSQSSLIISFGSYFGAKDLVGALFLALVFSILVFFYPDL	250
		: : . . . : . : : . : : : . . : : . : :	
	250	LNHSDNYIPANPDSTPAHIVPEWYFLPVYAILRSIPDKGIGILAVLLFFI	299
		. . . : : : : : : .	
	251	LGHPDNLIPANPYSTPQIHIVPEWYFLWVYAILRSIPNKAMGVLAIGLVFA	300
		. . . : : : : : : .	
	300	GLGLQPFLSQGKAE.PHFYASFIGGLFVLGWLGSKEITDV TSAAPS	344
		: : : : . : : : : : . : 	
	301	SLFAMPFIFGLGGGKFRIITEWLYWTFADVLLLTWLGNEITPITSFVGQ	350
		: : : : . : : : : : . : 	
	345	FFTLFTFAYLFVVSAlySLLYNRVK	370
		: : . : 	
	351	CCTAYLFFYLLVLCQPLVGYLETQFAHGQTQ	381

Figura 21. Comparación entre las proteínas citocromo *b* de *Polytomella* spp. y *Chlamydomonas reinhardtii*. Muestran un 56% de identidad y un 78% de similitud. Las líneas indican aminoácidos idénticos, los dos puntos (:) aminoácidos conservados y un solo punto (.) aminoácidos semiconservados.

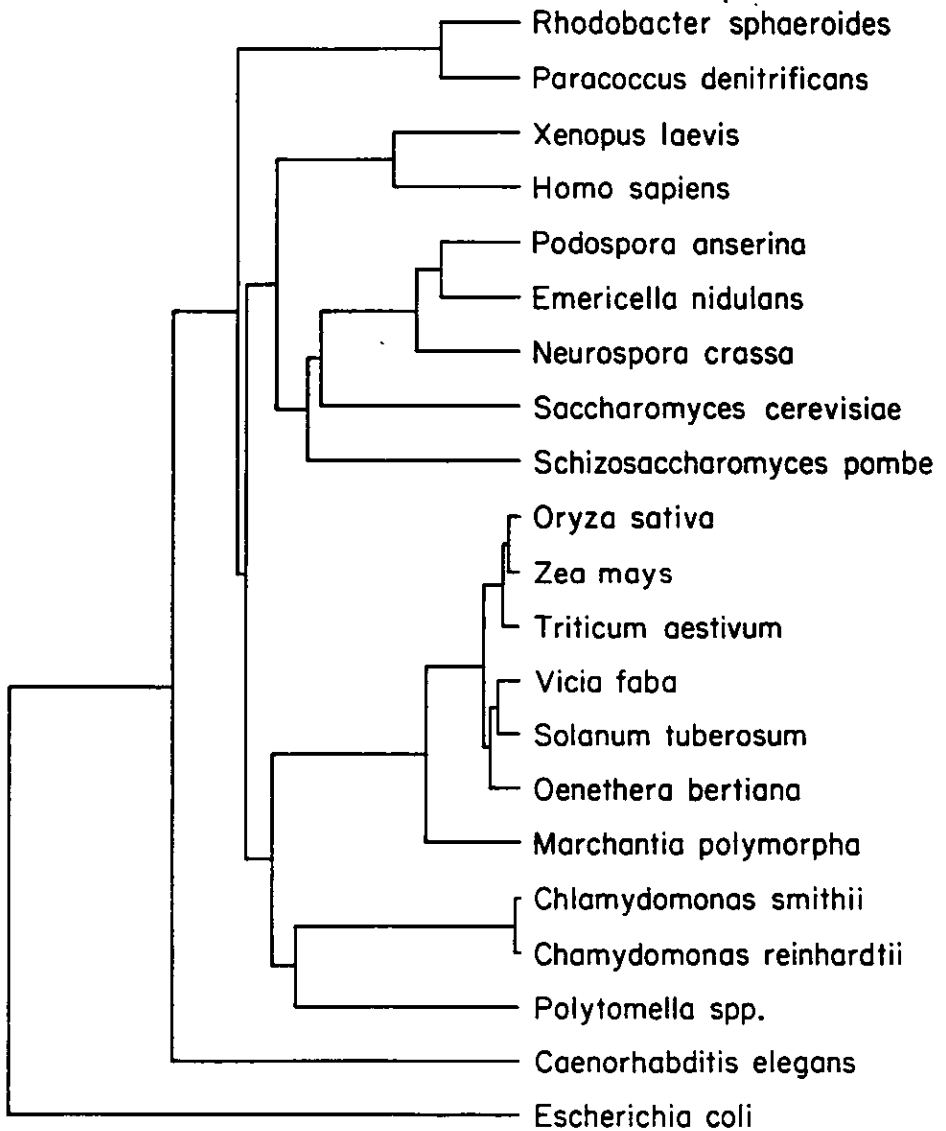


Figura 22. Cladograma construido utilizando algunas de las secuencias peptidicas reportadas para el citocromo *b*.

Identificación del gen Nd4

Actualmente se cuenta con dos genotecas de DNA mitocondrial construidas con la enzima de restricción *HindIII* en las que se calcula que puede encontrarse una gran parte del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. fragmentado en un total de 22 clonas.

En la primera genoteca construida por Antaramian (1995), se encuentran 13 clonas y en una segunda 9 clonas más. Hasta el momento se ha identificado que dos clonas son iguales en las diferentes genotecas, con un fragmento de 257 nucleótidos (clona 8H y clona 1H).

Durante este trabajo se secuenciaron los dos extremos de las 8 clonas de una de las bibliotecas de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. A partir de estas secuencias se realizaron deducciones de estructura primaria buscando marcos de lectura abiertos. Las secuencias también se compararon con los genes presentes en el DNA mitocondrial de *C. reinhardtii* de manera que si se encontraba una identidad de más del 50 % con algún gen podría identificarse el mismo gen mitocondrial de *Polytomella* spp.

Haciendo las mencionadas deducciones se observó que la clona 8H de 257 pb contenía un solo marco de lectura abierto que incluía a todos los nucleótidos de la clona (Figura 23). Al comparar los aminoácidos deducidos en este marco de lectura con el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*, se observó una similitud de 70 % con la secuencia peptídica del gen *nd4*, que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, lo que nos permitió concluir que la secuencia de la clona 8H es un fragmento del gen *nd4* (Figura 24).

En este caso sólo se tenía un fragmento interno del gen (no se tenía ni el extremo 5' ni el extremo 3'), por lo que se realizó un PCR con decámeros diseñando dos desoxioligonucleótidos específicos, uno en el nucleótido 109 en la cadena con sentido y otro en el nucleótido 129 en la cadena complementaria (Figura 23).


```

1  AAGCTTAGTG TTGGTATTCT TGTAAGAAT  GCCTACTAAT AAGAATAGCC
51  CGGGGGAAAT CAAACCGTGA GCAATGCAGT  ATAGCACAGC TCCTTGAATA
101 CCTAGACCGG AATTAGTAGC AGACGACAAA AACACTATAG CCATGTGAGA
      C TTAATCATCG TCTGCTGT
151 TATACTACTG TAGGCTACTA TTTTCTTTAA  ATCTATCTGC TTTAGTGTGC
201 TAAAACTGCT GAATATAAAG CTGCCTAAGC  AAATGCTTAA AATCAAAGGG
251 AAAGCTT

```

Figura 23. Secuencia de nucleótidos de la clona 8H que contiene un fragmento del gen *nd4*. En negritas se muestran los desoxioligonucleótidos diseñados para utilizarlos en un PCR con decámeros.

```

clona 8H      1 AFPLILSICLGSFIFSSFSTLKQIDLKKIVAYSSISHMAIVFLSSATNSG 50
               .|||: .:| |. ||: ||.: |||: ||||| ||||| ||||| .|||. :| |. ..|:
crnd4        251 VFPLVSTLCLVSFLFSTLSTLRQIDLKKIVAYSSIAHMSMVTLAIFSQSE 300
               51 LGIQGAVLYCIAHGLISPGLFLLVGILYKNTNTKL..... 85
               :: :. :. ||||| ||||: |||: |||||...: ||:
               301 FSAYSSSFLMIAHGLISPALFLIVGILYDRAHTKFILYFSGLGASMPIGS 350

```

Figura 24. Comparación de las secuencias peptídicas del gen *nd4* de *C. reinhardtii* y la clona 8H de *Polytomella spp.* Se observa una similitud del 74% y una identidad del 56.5% entre ambas proteínas.

A partir de este PCR se obtuvieron 10 fragmentos que mostraron una señal positiva al hibridarlos con la clona 8H marcada radioactivamente con ^{32}P . No obstante sólo se escogieron 5 de ellos, tomando en cuenta su tamaño y la intensidad de la señal producida por la hibridación. De estos cinco productos de PCR dos contienen la secuencia de nucleótidos hacia el extremo 5' (clonas A y B) y una la secuencia del extremo 3' (clona E). Se obtuvo un cuarto producto de PCR que dió una señal positiva muy tenue, pero que fue clonado pensando que la débil señal se debía a que había menos DNA que en el resto de las muestras; este producto de PCR (clona C) contiene un fragmento del gen *nd5* que codifica para la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (Figura 25).

Antaramian (1995) obtuvo la secuencia de la clona 1H (que es una clona de aproximadamente 3 kb), encontrando que en uno de los extremos se presenta un fragmento del gen *l7* en el centro de la clona se encuentra el gen *COX1*, y el otro extremo de la clona presentaba un fragmento del gen *nd4*. Al comparar la secuencia de la clona 1H y de la clona 8H con la secuencia de las clonas A y B, es posible observar que la clona 8H se encuentra en el DNA mitocondrial junto a la clona 1H, ya que las clonas A y B contienen un fragmento de la clona 1H y un fragmento de la clona 8H incluyendo el sitio que reconoce la enzima de restricción *HindIII* y que separa a ambas clonas.

La clona E tiene un tamaño de 0.9 Kb. Se secuenció completamente, encontrándose dos marcos de lectura abiertos: uno de los marcos corresponde a un fragmento del gen *nd4*, en donde se observa la secuencia que codifica para el extremo carboxilo de la proteína; el otro marco de lectura corresponde a un fragmento del gen *nd2* en el cual se observa el codón de inicio de la proteína (Figura 26).

A partir de la secuencia de nucleótidos determinada en los productos de PCR fue posible identificar la secuencia completa del gen *nd4*, que se compone de 1365 pb, los cuales permiten deducir una secuencia de 455 residuos de aminoácidos (Figura 26).

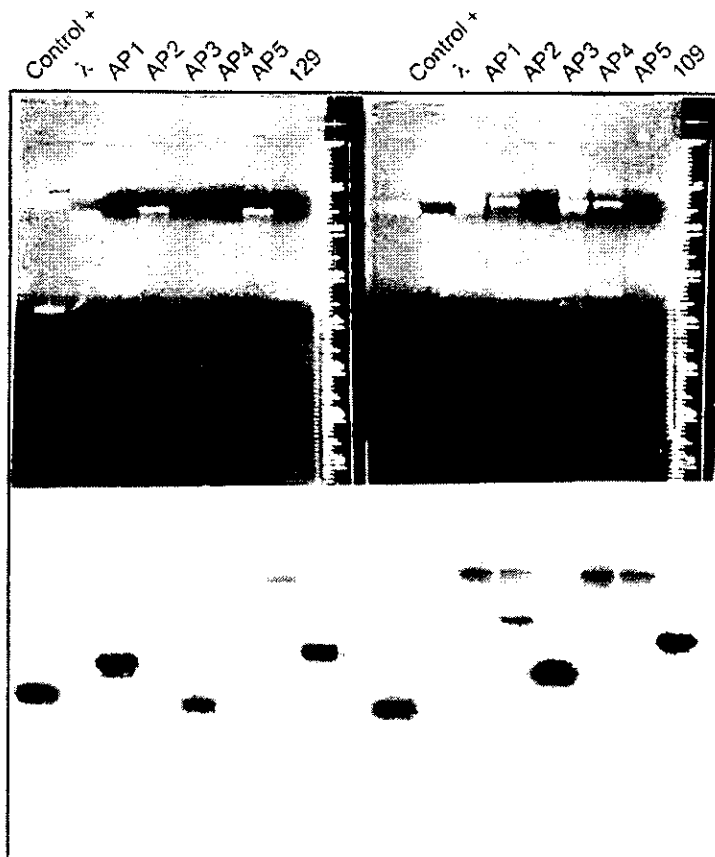


Figura 25. Productos de PCR obtenidos al realizar un PCR con desoxioligonucleótidos específicos para el gen *nd4* y 5 decámeros al azar. Hibridación utilizando la clona 8H como sonda. Los productos clonados se muestran como A, B, C y E.

(- 122) **ggaacagttctttaccctgctccagcaccttaccagaaccgca**
ccagttcttgagtggttgtgcccagctactccagccttccatactttctctgaagttccagttacttccgctagcttaacc

atg tcg ctt tat ctt ttt atg tta ttt ttg cag cct ctt tct tta tct ttt gtt tca cgc
M S L Y L F M L F L Q P L S L S F V S R
tct ttt tct aag att tcc tct ctt atg atg tct ttt gct act ctt tgg tcg gcg ttt aca
S F S K I S S L M M S F A T L W S A F T
tgt ggt tca caa gta acg gtg cta atc aga ctt ttt atc aag ttg ttt ctt ggg ggt ccg
C G S Q V T V L I R L F I K L F L G G P
att ggt cta cat tcg gtg ttt gtt aca ctt ctt tgt ata ttt gca tta ctt tgc att act
I G L H S V F V T L L C I F A L L C I T
ttg cgc ggt ttt atc ttt cca att tgt gta att tta gtt caa gcc aat gcc gcg ttg tca
L R G F I F P I C V I L V Q A N G A L S
att tta ata tgt att cag act gcg gta tct ctg tca ata gtg agt ttg cat atg tta gct
I L I C I Q T A V S L S I V S L H M L A
ttt tat cga ctg ttt gag agc agt ctt ctt ctt ttt ttt atc ctt att ggt cgt cgc aag
F Y R L F E S S L L L F F I L I G R R K
tac ggt agc ctt tct gct gct tat aat atc tct att tat act ttt att agt gct ttg gga
Y G S L S A A Y N I S I Y T F I S A L G
ttc tta atc agc gcg ttt tgg cta aat tgg agc ttt gcc agc tga tgt gct ctg ctt cca
F L I S A F W L N W S F G S V C A L L P
aat gaa gag gct aat agt ttc gtt gct ttt ggt ata ttc ctt ttg ctt tgg gta aaa gca
N E E A N S F V A F G I F I L L W V K A
cct ctt gta cct ttt cat ttg tgg ctg cca gaa gct cac gtt tac gcc cct aca gct ggt
P L V P F H L W L P E A H V S L A P T A G
agt gtc tta cta gct gga gtt cta cta aaa ata agc ata gta ggt ctt cat gtc ttt ttc
S V L L A G V L L K I S I V G L H V F F
ctg cct att tgc gct agt agc ata gtc aaa gct ttc cct ttg att tta agc att tgc tta
L P I C A S S I V K A P P L I L S I C L
ggc agc ttt ata ttc agc agt ttt agc aca cta aag cag ata gat tta aag aaa ata gta
G S F I F S S F S T L K Q I D L K K I V
gcc tac agt agt tct cac atg gct ata gtt ttt ttg tgc tct gct act aat tcc ggt
A Y S S I S H M A I V F L S S A T N S G
cta ggt att caa gga gct gtg cta tac tgc att gct cac ggt ttg att tcc ccc ggg cta
L G I Q G A V L Y C I A H G L I S P G L
ttc tta tta gta ggc att ctt tac aag aat acc aac act aag ctt gtt ttt tac ctg cga
F L L V G I L Y K N T N T K L V F Y L R
gga cta agt caa caa gct cct gta tgg tgg tct gtt tgg gtt ttc ttt atg cta gga aat
G L S Q Q A P V W W S V W V F F M L G N
ttg gcg ttt cct tta ttc cca aat ttc ata gct gaa gtg gta tgt tta agc gct ctt ttt
L A F P L F P N F I A E V V C L S A L F
aag aac cat gag ctt tat gct tac gca ttt ata ttt ttc agt ttc ggt ggg act ata tat
K N H E L Y A Y A F I F S F V G T I Y
agc agt act gtg tta ggt cgt ctt aaa gga ggg gta tcc agt cag tgc gtt gac gct tct
S S T V L G R L K G G V S S Q C V D A S
cgt tta gat gtg atc tct tgg aat cca tta gtt ttg gct acc gtt vtg gcg gat agg cta
R L D V I S W N P L V L A T V G R Y R L
tat gta aat att aaa att aat gtg ggg aac ttg atg gtg act tag acattcttattatgctttt
Y V N I K I N V G N L M V T *

taaraatcactatatttgcrttaataagttgttagatgactctgcacacaacaactgcagcacttgaaggatgctttataa
catctagctagggcgattacacafaccttcagctatttta (1504)

Figura 26. Secuencia de nucleótidos del gen *nd4* y su traducción a residuos de aminoácidos. En negritas se muestra el codón de término del gen *cox1* y subrayada la secuencia del gen *nd2*.

Se construyó un modelo hipotético del plegamiento de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa a partir del modelo propuesto por Degli-Esposti (1994) (Figura 27).

Se realizó también un análisis entre el uso de codones para el gen *nd4* de *Polytomella* y se comparó con el uso de codones de la misma proteína reportado para *C. reinhardtii* (Figura 28).

La secuencia de aminoácidos deducida para *Polytomella spp* se comparó con la secuencia reportada para *C. reinhardtii*, encontrándose una similitud de 63.4 % y una identidad del 40 % entre ambas proteínas (Figura 29).

Se tomaron las proteínas reportadas en el banco de datos SWISSPROT y se realizó una comparación entre ellas y la deducida por nosotros utilizando el paquete GCG, de manera que se pudo construir un cladograma (Figura 30).

En la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa se observa un cambio en la posición 340, donde en lugar de una arginina se encuentra una asparagina. Esta modificación podría indicar una resistencia a rotenona, ya que Degli-Esposti (1994) reporta que en las mitocondrias de seres humanos con neuropatía óptica hereditaria de Leber existe una modificación en este mismo aminoácido, que confiere al complejo I resistencia a rotenona. A partir de esta información, realizamos mediciones de consumo de oxígeno utilizando rotenona como inhibidor y observamos que existe una reducción de 40% en la actividad de las mitocondrias aisladas de *Polytomella spp.* al añadir una concentración de 0.3 μM de este inhibidor. Esta inhibición es muy pequeña si se compara con la que produce la rotenona a una concentración de 0.02 μM en partículas submitocondriales de hígado de rata, ya que en este caso la actividad se reduce más del 90% con una concentración más de diez veces menor a la aplicada sobre las mitocondrias de *Polytomella* (Figura 31).

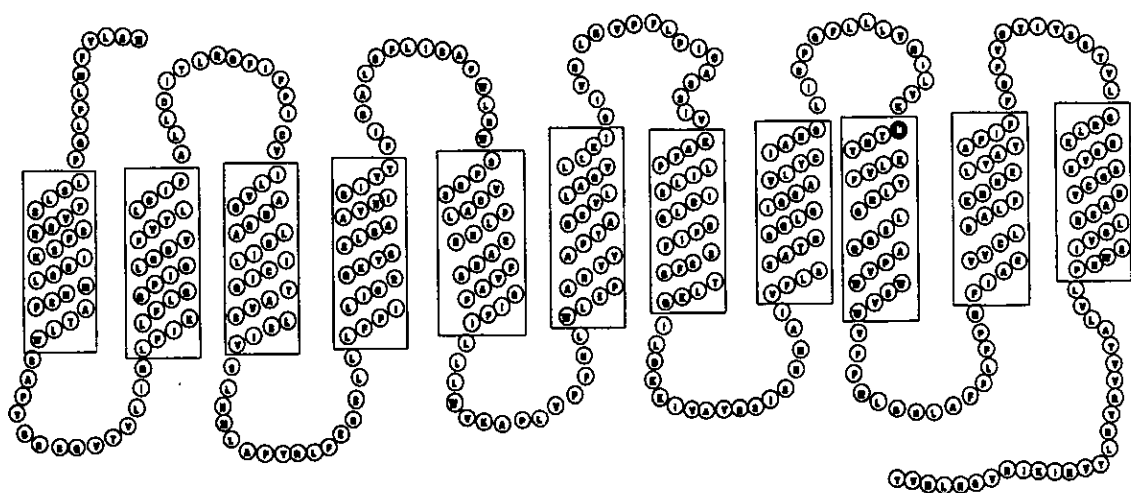


Figura 27. Modelo topológico hipotético de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa de *Polytomella* spp.

		2nd								
		U	C	A	G					
1st	U	Phe	31 9	Ser	14 9	Tyr	8 5	Cys	6 3	U
		Phe	12 26	Ser	4 0	Tyr	7 9	Cys	5 7	C
		Leu	18 0	Ser	4 0	Stop	0 1	Trp	9 0	A
		Leu	14 44	Ser	4 0	Stop	1 0	Stop	0 9	G
	C	Leu	24 10	Pro	8 9	His	5 5	Arg	3 7	U
		Leu	0 0	Pro	1 0	His	3 8	Arg	3 3	C
		Leu	13 23	Pro	5 11	Gln	5 5	Arg	2 0	A
		Leu	6 3	Pro	1 0	Gln	4 0	Arg	1 0	G
	A	Ile	20 19	Thr	9 17	Asn	12 1	Ser	13 9	U
		Ile	7 11	Thr	2 7	Asn	2 5	Ser	13 12	C
		Ile	15 0	Thr	4 0	Lys	6 6	Arg	1 0	A
		Met	8 20	Thr	1 0	Lys	8 1	Arg	1 0	G
	G	Val	13 13	Ala	23 29	Asp	2 4	Gly	13 22	U
		Val	2 5	Ala	3 10	Asp	2 2	Gly	4 4	C
		Val	13 25	Ala	3 0	Glu	3 0	Gly	6 4	A
		Val	12 1	Ala	5 0	Glu	3 11	Gly	5 0	G

Figura 28. Uso de codones del gen *nd4* de *Polytomella* spp. en números oscuros comparado con el uso de codones del gen *nd4* de *C. reinhardtii* en números claros. Los recuadros señalan algunas de las diferencias más significativas entre las dos especies.

<i>Chlamydomonas</i>	1	MFISVLLILFALCVTLIPEAHYHMVRVWVSFVATIIPMWWVTWMMWNFDA	49
<i>Polytomella</i>	4	MSLYLFMLFLQPLSLSFVS.....RSFSKISSLMMSFATLWSXFTC	44
	50	SGHGLQMLVILGRSHLA..FGIDGVALSLM.....LLTTVLFPICMM	89
	45	GSQVTVLIRLFIKLFLGGPIGLHSVFVTLLOCIFALLCITLRGFIFPICVI	94
	90	LLRTVAGFMTFILLEVLVLSALCVLDLLGFYILFEASLILLFLLIGRAPY	139
	95	LVQNGALSILICIQTAVSLIIVSLHMLAFYALFESSLLFFLIGRRKY	144
	140	GSLEAAYKIVLYTMAGSLVLL.PTFLMIYSECCTTNVLYMTCAYNHQTVL	188
	145	GSLSAAYNISYTFISALGFLISAFWLNWSFGSVCALL...PNEEANSFV	191
	189	GWGLLAVLAVKIPMPVHLWLPEAHVAAPTAGSVLLAGVLLKLGGIGFLR	238
	192	AFGIFILLWVKAPLVPFHLWLPEAHVYAPTAGSVLLAGVLLKISIVGLHV	241
	239	FMLPVVPEFCVSVFPLVSTLCLVSFLFSTLSTLRQIDLKQIVAYSSIAHM	288
	242	FFLPICASSIVKAFPLILSICLGSFIFSSFSTLQIDLKQIVAYSSISHM	291
	289	SMVTLAIFSQSEFSAYSSSLFMIAHGLISPALFLIVGILYDRAHTKFIY	338
	292	AIVFLSSATNSGLGIQAVLYCIAHGLISPGLFLLVGILYKNTDTKLIFY	341
	339	FSGLGASMPIGSTLFFLFTLGNLAFPLFPNFIAEVLCMVVSIFAVHELLAY	388
	342	LRGLSQQAPVWWSVWVFFMLGNLAFPLFPNFIAEVVCLSALFKNHELYAY	391
	389	VFCVCQVLGAAYGFWAFNRVVHGLPRGPADVTRTEFHVTLPLLIGAV...	435
	392	AFIFFSFVGTVYSSVTLGRLKGGVSSQCVDASRLDVISWNPLVLATVVRY	441
	436	..WLGKIPMA*.....	444
	442	RLYVNIKINVGNLMVT*	458

Figura 29. Comparación entre la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa de *Polytomella* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Muestran un 40 % de identidad y un 64% de similitud.

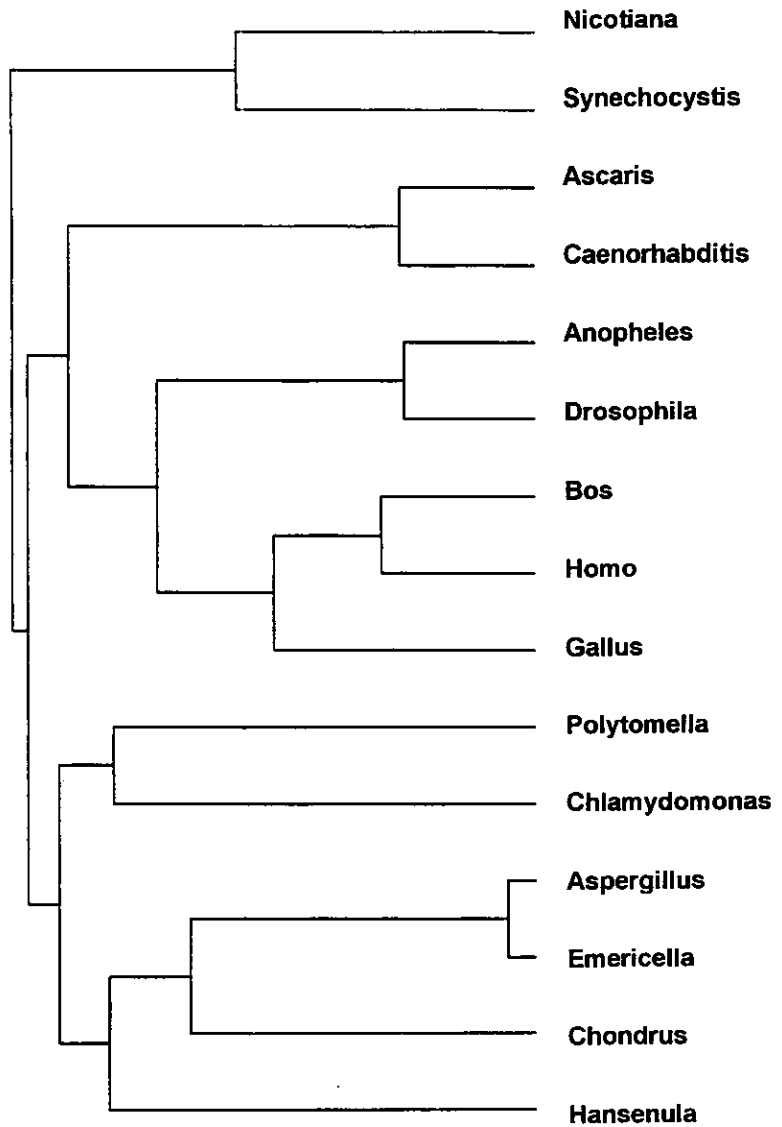


Figura 30. Cladograma construido a partir de secuencias peptídicas de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa.

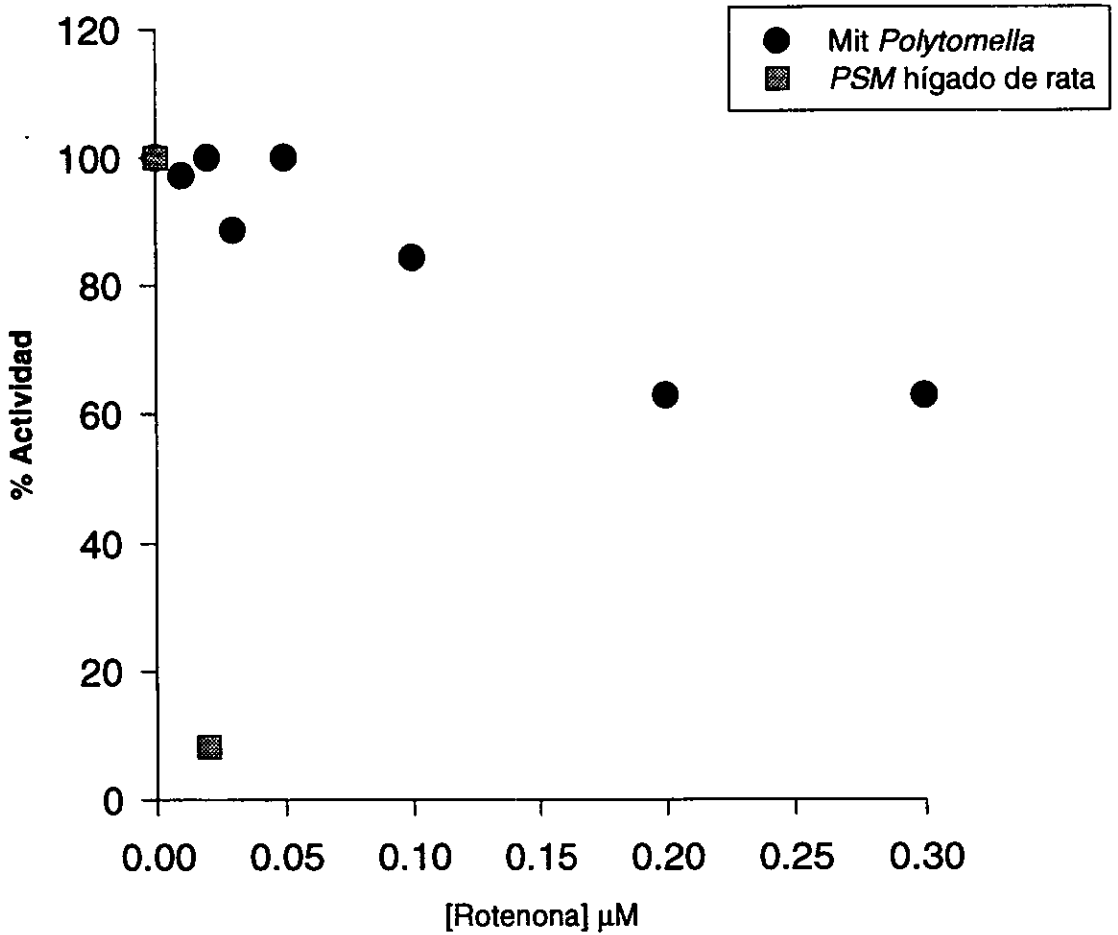


Figura 31. Efecto de la rotenona sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de *Polytomella spp.* y de partículas submitocondriales de ratón.

Discusion

El citocromo *b*

En este trabajo fue posible obtener la secuencia completa de nucleótidos del gen mitocondrial *citb* que codifica para el citocromo *b*, subunidad catalítica del complejo bc_1 . Esta proteína se encuentra muy conservada en todos los organismos, y en la proteína encontrada para *Polytomella* spp. se identificaron las cuatro histidinas invariables que unen a los dos grupos hemo de los citocromos b_L y b_H . Sin embargo, al deducir la secuencia de residuos de aminoácidos, fue posible observar que se encuentran dos cambios muy particulares: *i*) se advierte una serina en la posición 36 en lugar de una alanina, y *ii*) se observa una tirosina en la posición 114 substituyendo a un triptofano. Estos cambios son muy interesantes, ya que ambos aminoácidos se conservan en la mayoría de los organismos que se han reportado hasta ahora. En la posición 36, los animales y los hongos presentan una leucina, mientras que las plantas y *Chlamydomonas* presentan una alanina. El triptofano 114 es considerado uno de los 9 aminoácidos invariables reportados para las más de 300 secuencias que se tienen hasta la fecha (Degli-Esposti, 1993). Es posible considerar que el cambio de alanina por leucina observado en los animales no tenga ninguna influencia importante en la proteína, ya que se conserva la naturaleza del aminoácido. Sin embargo, en el caso de *Polytomella*, se observa un cambio en la naturaleza de aminoácido, ya que la alanina es un aminoácido no polar hidrofóbico y la serina es un aminoácido polar hidrofílico. Por otro lado, a pesar de que el triptofano y la tirosina son dos aminoácidos aromáticos, la tirosina presenta un grupo hidroxilo con el que puede formar puentes de hidrógeno actuando como grupo funcional.

Según el modelo propuesto por Degli-Esposti, estos dos aminoácidos se encuentran muy cerca de los grupos hemo del citocromo *b*. De hecho, Cang-An Yu (comunicación personal) nos informó que en el modelo cristalográfico del citocromo *b* de mitocondrias de corazón de bovino, la posición 114 se encuentra sólo a 4Å del grupo

hemo (Figura 32). Es posible suponer que el ambiente que rodea a los dos grupos hemo se ve modificado al variar la naturaleza de los aminoácidos que los rodean, y que podrían estar involucrados en el corrimiento al rojo observado en el espectro de absorción reportado por Gutiérrez-Cirlos (1994).

Esta situación particular permitiría predecir que en organismos que presentaran una proteína con estos cambios se observaría un cambio en el espectro de absorción. De manera que para poder determinar la acción de cada uno de estos aminoácidos modificados sobre el espectro de absorción del complejo bc_1 , en el laboratorio se construyeron tres mutantes del gen *citb* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Esto se hizo mediante un proceso de mutagénesis dirigida por PCR, en el que se diseñaron dos desoxioligonucleótidos diferentes que modificaran el gen exclusivamente en la región deseada. Se obtuvo entonces una mutante con el cambio A36S, otra con el cambio W114Y y una doble mutante. Estos genes mutantes están en proceso de ser introducidos por balística en una cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* llamada dum-1 que no contiene el gen *citb* y que por lo tanto no puede crecer en la oscuridad (Randolph-Andersen, 1993). Una vez que los genes se hayan introducido exitosamente, será posible purificar el complejo bc_1 de las mutantes y obtener su espectro de absorción, de manera que se cuantifique la influencia de cada uno de los aminoácidos propuestos en el corrimiento al rojo del espectro del bc_1 . Otro punto importante de este trabajo de mutagénesis radica en que la mutante dum-1 ha sido siempre transformada al genotipo silvestre con genomas mitocondriales completos de *C. smithii*, por lo que el hecho de que se introduzca sólo el gen del citocromo *b* permitiría realizar algunos análisis, como por ejemplo determinar en qué región del genoma mitocondrial se inserta.

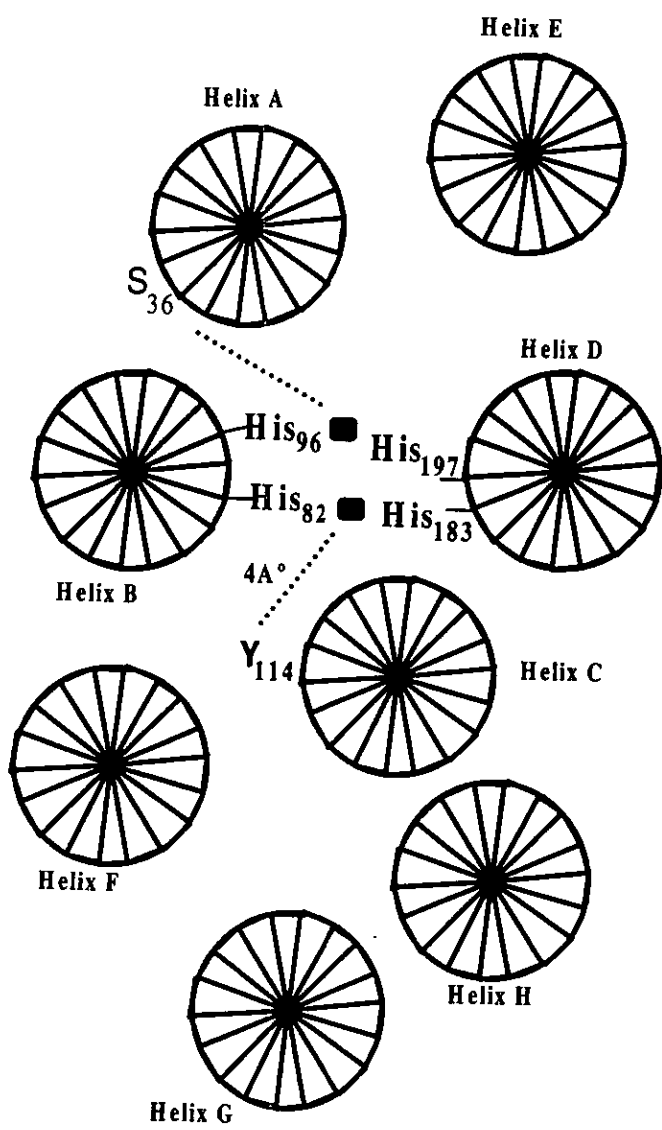


Figura 32. Modelo propuesto por Degli-Esposti (1993) que permite apreciar el citocromo *b* desde el espacio intermembranal. Se observan claramente las 4 histidinas conservadas uniendo a los dos grupos hemo y la cercanía de la S36 y la Y114 a ambos grupos hemo.

La subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa

En este trabajo se obtuvo la secuencia del gen *nd4* que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa. Esta proteína no se encuentra tan conservada a lo largo de la evolución como el citocromo *b*, y por lo tanto presenta muchos cambios de residuos de aminoácidos si se compara con los genes reportados para otros organismos. Sin embargo, es posible localizar un aminoácido muy conservado, una histidina en la posición 319 que se ha propuesto que esté involucrada con la interacción del complejo I con el intermediario de ubisemiquinona que se forma durante la oxidación del ubiquinol. Entre los múltiples cambios que se observan, hay uno muy particular en la posición 340: en la mayoría de los organismos se presenta una arginina y en *Polytomella* se observa una asparagina.

Degli-Esposti (1994) propone que la unión entre el complejo I y los aniones de la ubiquinona se establece por la presencia de aminoácidos cargados positivamente como la arginina. De acuerdo con ello, la sustitución de este aminoácido por uno polar sin carga como la asparagina, podría reducir la estabilidad de la unión entre la ubisemiquinona y el complejo I, por lo que podría observarse una reducción en la energía desarrollada por la reacción de la unión entre ubiquinona y el complejo I. Degli-Esposti plantea que esta mutación en el gen *nd4* de humanos enfermos de neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) produce grandes alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial (y por lo tanto en la fosforilación oxidativa), ya que la unión poco estable de la ubiquinona con el complejo I, permite que reaccione con el oxígeno formando radicales que podrían contribuir al daño mitocondrial.

La arginina 340 está involucrada también en el sitio de unión a rotenona, por lo que podría explicar de alguna manera que las mitocondrias de *Polytomella* presenten una alta resistencia a este inhibidor.

Los resultados mostrados por Degli-Esposti (1994) en humanos enfermos se obtuvieron con proteínas que únicamente presentan el cambio de la arginina en la posición 340 por una histidina. El resto de la secuencia es idéntica a la de los individuos sanos. Al tratar las mitocondrias de los individuos enfermos con rotenona se observa una resistencia, ya que la inhibición no llega al 100% sino que se conserva una actividad de aproximadamente 15% al añadir una concentración de 50 nM.

Tomando en cuenta estos antecedentes, decidimos que un experimento en el que se observara la respuesta del complejo I de *Polytomella spp.* sería muy interesante, ya que permitiría de alguna manera evaluar la influencia de este aminoácido en la unión de rotenona.

Si comparamos los resultados mostrados por Degli-Esposti (1994) en humanos enfermos y los obtenidos por en este trabajo, es posible observar que en el caso de organismos del género *Polytomella*, a concentraciones relativamente altas (en relación a las concentraciones necesarias para inhibir la actividad del complejo I de mitocondrias de mamífero), la actividad se conserva por encima del 60%. Esto indica que el complejo I de *Polytomella spp.* es mucho más resistente a la rotenona que las células de humanos enfermos con LHON. Por ello que es posible suponer que en el caso de *Polytomella spp.* el sitio de unión de rotenona debe estar modificado por un número mayor de aminoácidos que actúen al mismo tiempo que la asparagina 340.

Es necesario realizar experimentos de producción de ATP y la inhibición de esta producción al añadir rotenona con las mitocondrias aisladas de *Polytomella*, ya que los resultados hasta ahora obtenidos permiten identificar que el consumo de oxígeno tiene un comportamiento resistente al inhibidor. Sin embargo una fracción, de este consumo puede ser resultado de la acción de deshidrogenasas externas a la cadena respiratoria, por lo que podríamos estar observando una "falsa resistencia" del complejo I. Medir la producción de ATP permitirá eliminar la resistencia producida por la presencia de deshidrogenasas alternas, ya que estas deshidrogenasas no contribuyen al gradiente de protones que resultará en la producción de ATP.

Estructura parcial del DNA mitocondrial

Hasta el momento, han sido secuenciadas completamente las clonas 1H, 8H y 9H de las bibliotecas de DNA mitocondrial. La clona 1H contiene un fragmento de DNA de 3 kb en el cual se encuentra un fragmento del gen *17* que codifica para uno de los fragmentos de la subunidad grande de rRNA, el gen completo *cox1* y un fragmento del gen *nd4*. La clona 8H es de 257 nucleótidos que contienen la región media del gen *nd4*. La clona 9H contiene un fragmento del gen *17* y gran parte del gen *citb*. Utilizando las secuencias de los productos de PCR obtenidos con la técnica de los decámeros, ha sido posible determinar el orden en el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. de estas tres clonas, ya que los productos de PCR incluyen los sitios de corte de la enzima *HindII* y la secuencia que los rodea. Recientemente fue posible unir las clonas 9H y 1H ya que se obtuvo un producto de PCR que contiene un fragmento del gen *citb*, el gen *17* y un fragmento del gen *cox1* (Xochitl Pérez-Martínez, resultados no publicados).

Al analizar los productos de PCR obtenidos para conocer la secuencia completa del gen *nd4* se obtuvo una clona (clona B) que contiene un fragmento del gen *nd4* y un fragmento del gen *cox1* y que permite unir la clona 1H con la clona 8H.

Otro de los productos de PCR utilizando desoxioligonucleótidos específicos para el gen *nd4* permitió amplificar un fragmento de DNA de 2.5 kb. Este fragmento se ha secuenciado en sus dos extremos y se ha encontrado que se encuentran un fragmento del gen *L8* y un fragmento del gen *nd5*. Es posible suponer que los desoxioligonucleótidos específicos pudieron alinearse en la secuencia del gen *nd5*, ya que en ambas proteínas se observa una región homóloga y por lo tanto las secuencias de nucleótidos en esa región deben ser similares.

Hasta el momento, se ha construido un mapa parcial del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. que se muestra en la figura 33. Es posible también describir ciertas características generales de estos segmentos de DNA que suponemos se deben cumplir

a lo largo de todo el genoma mitocondrial: i) es una molécula en la que no existen regiones intergénicas grandes, es decir, los genes se encuentran separados unos de otros por unos cuantos nucleótidos (el codón de término del gen *cox1* y el codón de inicio del gen *nd4* se encuentran a dos nucleótidos de distancia); ii) los genes que codifican para las subunidades del rRNA se encuentran fragmentados en módulos y iv) los marcos de lectura de los genes, pueden encontrarse en cualquiera de las dos cadenas de DNA, por lo tanto pueden estar orientados en diferentes direcciones (el gen *citb* se encuentra en una hebra y el gen *cox1* en la otra). Estas características son muy similares a las que se observan en los genomas mitocondriales de *C. reinhardtii*, *C. moewusii* y *C. eugametos*. Sin embargo, es posible observar que la disposición de los genes es diferente en *Polytomella* spp. con respecto a los genomas mitocondriales de los organismos del género *Chlamydomonas*. Es posible observar también que los genes *nd2* y *nd4* se encuentran contiguos y codificados en la misma hebra de DNA en el genoma mitocondrial de *Polytomella* y de *C. eugametos*, mientras que en *C. reinhardtii* el gen *nd4* se encuentra contiguo al gen *citb* y está codificado en la hebra de DNA opuesta a los genes *cox1* y *nd2*. Esto podría considerarse como una evidencia de que el género *Polytomella* se separó de la línea de *Chlamydomonas* antes de que el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii* se especializara hasta quedar como es ahora y que por alguna razón durante este proceso transfirió el gen *nd4* a la hebra contraria a la que se encontraba originalmente.

Las características observadas en los genomas mitocondriales, así como las similitudes entre los genes estudiados en este trabajo, permiten confirmar una vez más la hipótesis de Round (1980) la cual plantea que todos estos organismos han evolucionado a partir de un ancestro común; que compartieron el mismo evento endosimbionte que dio origen a sus mitocondrias actuales, y que las características especiales de *Polytomella* (por ejemplo la ausencia de cloroplastos y de pared celular) son resultado de pérdidas relativamente recientes en la evolución.

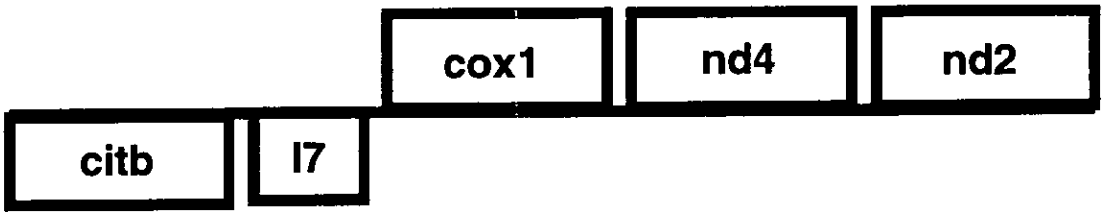


Figura 32. Mapa parcial del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp.

Conclusiones

Se clonó y secuenció el gen *citb* que codifica para el citocromo *b* de *Polytomella* spp. El gen tiene 1113 nucleótidos que permiten deducir una secuencia de 371 residuos de aminoácidos.

La secuencia primaria del citocromo *b* de *Polytomella* spp. se comparó con la proteína reportada para *C. reinhardtii* y se observó una identidad del 56% y una similitud del 78%.

En la secuencia de residuos de aminoácidos de *Polytomella* spp se observan dos cambios significativos al compararla con *C. reinhardtii* y con otros organismos cuyas proteínas de citocromo *b* están reportadas. Estos cambios son A36S y W114Y, que podrían explicar el corrimiento hacia el rojo observado en el espectro de absorción del complejo bc_1 y la bidentación del espectro del hemo de alto potencial (b_H) de *Polytomella* spp.

Se clonó y secuenció completamente el gen *nd4* que codifica para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa. El gen tiene 1317pb que permiten deducir una secuencia de 439 residuos de aminoácidos.

Al comparar la secuencia proteica de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa de *Polytomella* spp. con la proteína reportada para *Chlamydomonas reinhardtii*, se observa un 63% de similitud y un 40% de identidad.

El consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de *Polytomella* spp. se inhibe parcialmente hasta que la actividad se reduce al 60% al añadir una concentración de 0.30 μ M de rotenona. Esta reducción no es significativa si se compara con la inhibición total en el consumo de oxígeno que se observa en partículas submitocondriales de ratón con rotenona 0.02 μ M. Tal resistencia a rotenona podría estar producida por el cambio

R340N en la estructura primaria de la proteína predicha por la secuencia de nucleótidos obtenida.

Hasta el momento, las secuencias de nucleótidos obtenidas han permitido identificar los genes mitocondriales *citb*, *17*, *nd4*, *nd2* y *nd5*.

El genoma mitocondrial de *Polytomella spp* presenta características similares a las descritas para *C. reinhardtii*. No se ha observado ningún intrón en los genes secuenciados y las regiones intergénicas son muy pequeñas (de unos cuantos nucleótidos), lo que predice un genoma compacto. Sin embargo, las características en detalle del genoma mitocondrial de *Polytomella spp*. como el tamaño, la forma, la distribución de genes y si es compacto o no, no se conocerán hasta que se obtenga la secuencia completa de este genoma mitocondrial.

Referencias bibliográficas

- Antaramian, A. 1995. Aislamiento y Caracterización 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 c. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica.
- Antaramian, A.; Coria R.; Ramírez, J. & González-Halphen, D. 1996. The deduced subunit I from cytochrome c oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*. *Biochimic et Biophysic Acta*. 1273:198-202
- Aragao,H. 1910. Pesquisas sobre *Polytomella agilis n.g.n.sp.**Mem.Inst.Oswaldo Cruz*.2:42-57
- Attardi, G. and Schatz, G. 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.
- Brennike, A. Grohmann, L.; Hiesel, R.; Volker K. and Schuster W. 1993. The mitochondrial genome its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS letter*. 325 (1,2):140-145.

- Brown, D.L.; Leppard, G.G. and Massalski, A. 1976. Fine Structure of Encystment of the Quadriflagellate Alga *Polytomella* spp. *Protoplasma*, **90**:139-154.
- Burton, M.D. and Moore, J. 1974. The mitochondrion of the flagellate, *Polytomella agilis*. *J. Ultrastructure Research*. **48**:414-419
- Cantor, M.H. and Burton, M. 1975. Effects of thiamine deprivation and replacement on the mitochondrion of *Polytomella agilis*. *J. Protozool.* **22**(1):135-139.
- Cantor, M.H. and Withroe, J. 1970. *Amer. Zool.* **10**:514.
- Conner, T.W.; Thompson, M.D. and Silflow, C.D. 1989. Structure of the Three β -tubulin-encoding genes of the unicellular alga *Polytomella agilis*. *Gene*. **84**: 345-358.
- Cooper, R.A. and Lloyd, D. 1972. *J. Gen . Microbiol.* **72**:59.
- Degli-Esposti, M. 1989 *Biochim. Biophys. Acta.* **977**: 249-265.
- Degli-Esposti, M.; De Vries, S.; Crimi, M.; Ghelli, A.; Patarnello, T. and Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1143**:243-271.
- Degli-Esposti, M.; Carelli, V.; Ghelli, A.; Ratta, M.; Crimi, M.; Sangiorgi, S.; Montagna, P.; Lenaz, G.; Lugaresi, E. and Cortelli, P. 1994. Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS letters.* **352**:375-379.

- 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.
- Ernster, I. and Schats, G.M.. 1981. Mitochondria: an historical review. *J.Cell.Biol.* 91:227-255.
- Ghelli, A.; Crimi, M.; Orsini, S.; Gradoni, L.; Zannotti, M.; Lenaz, G. and Degli-Esposti, M. 1992. Cytochrome *b* of protozoan mitochondria: relationships between function and structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B(2): 329-338.
- Gutiérrez-Cirlos, E.B.; Antaramian, A.; Vázquez-Acevedo, M.; Coria, R. and González - Halphen, D. 1994. A highly ubiquinol-cytochrome *c* reductase (*bc₁* complex) from the colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. *J.Biol.Chem.* 269:9147-9154.
- Gray, M. and Ford-Doolittle, W. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proved?. *Microbiol. Rev.* 46 (1):1-42
- Gray, M. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141: 233-357.
- Hatefi, Y.; Haavik, A.G. and Griffiths, D.E. 1961. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 4: 441-453
- Hatefi, Y.; Galante, Y.M.; Stigall, D.L. and Ragan, C.I. 1979. *Methods Enzymol.* 56:577-602
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1015-1069.

- Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157:105-132.
- Lee, R.W.; Dumas, C.; Lemiux, C. and Turmel. 1991. Cloning and characterization of the *Chlamydomonas moewusii* mitochondrial genome. *Mol. Gen. Genet.* 231: 53-58.
- Lehninger, A.; Nelson, D.L. and Cox, M. 1994. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. USA. 1013 p.
- Lewis, E.; Munger, G.; Watson, R. and Wise, D. 1974. Life Cycle of *Polytomella caeca*. *J. Protozool.* 21: 647.
- Margulis, L. 1970. Origin of eucaryotic cells. Yale University Press. USA.
- Margulis, L. 1993. Early life. Jones and Bartlett Publishers. USA. 140 p.
- Michaelis, G.; Vahemholz, 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.
- Mitchell, P. 1975. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *bc₁* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS lett.* 56:1-6.
- Mitchell, P 1961. *Nature.* 191: 423-427.
- Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J. 1992. Bioenergetics 2. Academic Press. London. 255 p.

- Pringsheim, E.G. 1955. The Genus *Polytomella*. *J. Protozool.* 2:137-145.
- Reed, R.B.; Simone, F.P. and Mc. Grath. 1976. *J. Gen. Microbiol.* 97:29-34.
- Round, F.E. 1980. The evolution of pigmented and unpigmented unicells: a consideration of the protista. *Biosystems.* 12:61-69.
- Russel, P.J. 1992. *Genetics*. Harper Collins. USA.758 p.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Sheeler, P. ; Cantor, M. and Granik, R. 1968. The stored polysaccharide of *Polytomella agilis*. *Life Sciences* 7 (II):1045-1051.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Srere, P.A. 1982. The structure of the mitochondrial innermembrane-matrix compartment *Trends Biochem. Sci.* 7:375-378.
- Trumpower, B.L. 1990. The protonmotive Q cycle: energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the *bc₁* complex. *J. Biol.Chem.*265:11409-11412.
- Varenholz, C. Riemen, G.; Pratje, E.; Dujon, B. and Michaelis, 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.

Watson, J. D. ; Gilman, M.; Witkowski, J. and Zoller, M. 1996. **Recombinant DNA**. Scientific American Books. USA. 626 p.

Xia, D.; Yu, C-A.; Kim, H.; Xia, J-Z; Kachurin, A.M.; Zhang, L.; Yu, L. and Deisenhofer, J. 1997. **Crystal Structure of the cytochrome *bc₁* complex from bovine heart mitochondria.** *Science.* **277**: 60-66