

2 03081

2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del C.C.H.

**“Caracterización del gen nuclear COX2 y del gen
Mitocondrial citb que codifican para subunidades de los
complejos respiratorios del alga *Polytomella* spp.”**

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta:

M. en I.B.B. Anaid /Antaramián Salas

Dirigida por el Dr. **Diego González-Halphen.**

México, D.F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2 61040



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

	página
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
La cadena respiratoria	5
El complejo III mitocondrial o complejo <i>bc₁</i>	7
El citocromo <i>b</i>	9
Complejo IV mitocondrial o citocromo <i>c</i> oxidasa	11
Los genomas mitocondriales	15
Exportación de genes mitocondriales al genoma nuclear	16
El genoma mitocondrial de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
Importación de proteínas del citoplasma a la mitocondria	27
Antecedentes directos	
Un modelo alternativo: el alga incolora <i>Polytomella</i> spp	29
Objetivos generales	33
Objetivos particulares	34
Artículo	1
Resultados adicionales	35
Discusión	56
Conclusiones	76
Referencias	77
Anexo I: Materiales y Métodos	83
Anexo II: Abreviaturas	110
Anexo III: artículo "The deduced primary structure of subunit I from cytochrome <i>c</i> oxidase suggests that the genus <i>Polytomella</i> spp. shares a common mitochondrial origin with <i>Chlamydomonas</i> "	112

Este trabajo se realizó en el laboratorio 325 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Diego González-Halphen.

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 oligodesoxinucleótidos.

Agradezco al Dr. Diego González-Halphen, al Dr. Roberto Hernández, a la Dra. Marieta Tuena, al Dr. David Romero, al Dr. Angel Zarain, al Dr. Federico Martínez y al Dr. Jesús Aguirre por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, así como sus valiosos comentarios.

A los miembros del comité tutorial del doctorado: Dr. Alejandro Zentella-Dehesa, Dra. Marita Tuena Sangri y Dr. Diego González-Halphen por sus aportaciones y críticas al presente trabajo.

Al Dr. Eduardo Antaramián por los recursos brindados para la impresión de estos

AGRADECIMIENTOS:

A Diego por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, la ayuda que me brindó para desarrollarme académicamente, por su comprensión y apoyo, así como por todo lo que me ha enseñado.

A Sole por su increíble apoyo y ayuda incondicional, así como su amistad: un tesoro invaluable.

A Miriam por todo lo que hemos compartido y su gran amistad.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su amor.

A Roberto todo y más.

A mis hijos

Andrés y Adrián

RESUMEN:

El alga incolora *Polytomella* spp. es un protista que pertenece a la familia *Chlamydomonadaceae*. Carece de pared celular y de cloroplastos, lo que facilita la purificación de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

En el laboratorio estamos interesados en caracterizar los complejos mitocondriales de este organismo a nivel bioquímico y molecular por lo que en el presente trabajo se purificó el DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. y se construyó una genoteca con la enzima de restricción *HindIII*, como estrategia inicial en la caracterización del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp.. En esta genoteca se identificó una clona con la secuencia parcial del gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp. Mediante diferentes técnicas obtuvimos este gen completo, el cual tiene 1113 pb y no contiene intrones. La secuencia se comparó con el gen de *Chlamydomonas reinhardtii*, encontrando que ambos genes son similares (65% de similitud y 58% de identidad). En un análisis filogenético, la secuencia deducida de aminoácidos del citocromo *b* de *Polytomella* spp. se afilia claramente con los citocromos tipo *b* de *C. reinhardtii* y *C. smithii*, lo que presenta evidencia adicional de la estrecha relación de *Polytomella* spp. con el género *Chlamydomonas*. Sin embargo, encontramos dos diferencias importantes en el gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp.: una tirosina en la posición 114 substituyendo a un triptofano que se encuentra presente en todos los citocromo tipo *b* reportados hasta la fecha. Además, en la posición 36 se localiza una serina, que es un aminoácido polar en lugar de un residuo no polar (alanina o leucina) encontrado en todas las especies reportadas hasta la fecha. Estos aminoácidos se encuentran muy cerca del grupo hemo *b*₅₆₈ de acuerdo al modelo propuesto por Degli-Esposti (1993) y a la cristalografía de rayos X del complejo *bc*₁ reportada por Xia (1997). Estos cambios podrían explicar el corrimiento hacia el rojo que presenta el espectro de absorción del citocromo *b* de *Polytomella* spp. reportado por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994) y que no se encuentra en el complejo *bc*₁ de *C. reinhardtii*.

De especial interés para el presente trabajo es el hecho de que el genoma mitocondrial del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Este, a diferencia de otras especies, no codifica para ninguna de las subunidades de la ATPasa y carece de los genes *COX2* y *COX3* que codifican para las subunidades II y III de la citocromo *c*

oxidasa, respectivamente. Dado que las características de *Polytomella* spp. han permitido purificar los complejos mitocondriales con mayor facilidad que en *C. reinhardtii*, pues no tiene contaminantes de proteínas de cloroplasto. A partir de una preparación pura de la citocromo c oxidasa de *Polytomella* spp. fue posible obtener la secuencia amino-terminal y una secuencia interna de la subunidad II (Vázquez-Acevedo y col., datos sin publicar). Con estas secuencias se diseñaron oligodesoxinucleótidos para amplificar, mediante PCR, el gen COX2 que codifica para esta subunidad.

A partir de DNA total de *Polytomella* spp. y usando las técnicas de "PCR en descenso" y PCR anidado, se amplificó un producto de 300 pares de bases, que corresponde a una secuencia parcial del gen (120- 205 aminoácido, numeración de chicharo) que codifica para la subunidad II de la citocromo c oxidasa. Se realizó un hibridación tipo southern con DNA total de *Polytomella* spp. digerido con diferentes enzimas y se utilizó el producto de PCR como sonda radioactiva para obtener el gen completo. Se obtuvo una señal positiva en la región de 2 kb del DNA total digerido con *Pst*I. Se construyó un minibanco en el vector *BlueScript* con esta región. Se obtuvo una clona positiva que tiene un fragmento de 2 kb, el cual se secuenció en su totalidad y se determinó una secuencia parcial del gen COX2 de *Polytomella* spp. que incluye el extremo 3' del gen.

La similitud encontrada entre los genes caracterizados previamente en *C. reinhardtii* y en este trabajo, apoyan la hipótesis propuesta por Round (1980), de que los géneros *Chlamydomonas* y *Polytomella* compartieron el mismo evento endosimbiótico que dió origen a la mitocondria actual y cuyo genoma mitocondrial fue evolucionando a partir de un ancestro común. Por otro lado, la pérdida de pared celular y de cloroplastos en *Polytomella* fue un proceso relativamente reciente en la evolución. Nuestros datos sugieren que el gen COX2 de *Polytomella* spp. es nuclear y es la sonda ideal para localizar el gen COX2 de *C. reinhardtii*. Cuando se obtengan ambos genes completos se podrá analizar la secuencia y estimar el momento de la transferencia de estos genes que codifican para proteínas hidrofóbicas como COX2 de la mitocondria hacia el núcleo.

ABSTRACT:

Polytomella spp. is a colorless algae of the *Chlamydomonadaceae* family, that lacks chloroplast and cell wall, therefore, offering great advantages as a model to study the mitochondrial respiratory complexes. A highly active *bc₁* complex, sensitive to antimycin and myxothiazol, has been purified in the laboratory. Both in mitochondrial membranes and in the isolated complex, cytochrome *b* exhibited an atypical, red shifted α band with a maximum at 566 nm. In the present work the mitochondrial DNA from *Polytomella* spp. was isolated and cloned, also the mitochondrial gene encoding the cytochrome *b* from this alga was cloned and sequenced. The gene is 1113 bp long and contains no introns. The deduced protein sequence exhibits 57.6% identity and 68 % similarity with its counterpart in *Chlamydomonas reinhardtii*. In a phylogenetic analysis, the sequence of cytochrome *b* from *Polytomella* spp. is clearly affiliated with the *b*-type cytochromes of *C. reinhardtii* and *C. smithii*, providing additional evidence for the close relationship of *Polytomella* spp. with the genus *Chlamydomonas*.

A comparison of the primary structure of the *b*-type cytochromes, and its analysis based on the current structural model featuring 8 transmembrane stretches, allowed the identification of two amino acid residues that account for the apparently unique spectroscopic characteristics of the *bc₁* complex of *Polytomella* spp. The cytochrome from this alga has a tyrosine in position 114, which substitutes a tryptophan present in all mitochondrial *b*-type cytochromes sequenced to date. In addition, the primary sequence of the gene has a serine at position 36, instead of the non-polar residues (alanine or leucine) found in all other species. In the proposed model, both residues Y114 and S36 are in close proximity to the *b_H* heme. The above data suggest that the polar residues S36 and Y114, each one by themselves or in combination, may interact with heme *b_H* from the cytochrome *b* from *Polytomella* spp., and thus, may be responsible for the unique spectroscopic characteristics of this heme.

On the other hand we were interested in the localization, cloning and sequencing of the *COX2* genes from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* spp. since our hypothesis is that this gene is nuclear in these two algae and therefore, it should encode a presequence.

The cytochrome c oxidase from *Polytomella* was purified in the laboratory and the band corresponding to subunit II was transferred to a Problot membrane and the amino terminus was sequenced. In this analysis an internal sequence of the protein was also characterized. From these sequences it was confirmed that the protein was in fact subunit II of the cytochrome c oxidase.

Based on these sequences six different oligonucleotides were synthesized and were used to amplify by *Touchdown and Nested PCR* the *COX2* gene using as template total DNA from *Polytomella* spp. Different PCR products were cloned and sequenced. Several of them had a partial sequence of the *COX2* gene from this organism.

The PCR product was used as a radioactive probe in Southern blot hybridization, with total DNA from *Polytomella* spp. cut with different enzymes. A strong signal at 2 kb was obtained with the digestion of *Pst*I, then a large amount of DNA was cut with this enzyme. The fragments around 2 kb were purified from the agarose gel and used to construct a minilibrary in the phagemid *BlueScript*; 58 different clones were obtained from this minilibrary and were hybridized again with the partial *COX2* gene as probe.

Clone 1 gave a positive signal in a Southern analysis and in a PCR experiment, this clone was completely sequenced and has the 3' end of the gene including the stop codon. Towards the 5' end we found a large intron of 1 kb at least, so the clone is still missing about 300 nucleotides as compared to other *COX2* genes from other species.

The codon usage of the *COX2* gene from *Polytomella* spp. is very different from the mitochondrial genes characterized so far from this algae by our group.

The high similarity found in the genes characterized in this work support the hypothesis proposed by Round (1980) that *Polytomella* spp. and *Chlamydomonas reinhardtii* shared a common mitochondrial origin. The analysis of the *COX2* gene sequence from *Polytomella* spp. suggests that this gene is nuclear and we now expect to find the nuclear gene from *C. reinhardtii* using the gene from *Polytomella* spp. as a probe.

INTRODUCCION:

La función principal de la mitocondria es la fosforilación oxidativa, fenómeno donde se produce el ATP necesario para el metabolismo celular. La mitocondria tiene dos membranas, la externa y la interna, en medio de las cuales se encuentra lo que se denomina espacio intermembranal. La membrana interna contiene una gran cantidad de invaginaciones y limita el espacio de la matriz mitocondrial. Es en esta membrana donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, la cual se puede dividir en dos partes: la cadena respiratoria, que genera el gradiente electroquímico y que está formada por los complejos I, II, III y IV y la fosforilación que se lleva a cabo en el complejo V, y que utiliza el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria para sintetizar el ATP (Mitchell, 1975) (figura 1).

La cadena respiratoria mitocondrial:

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

Ubiquinona

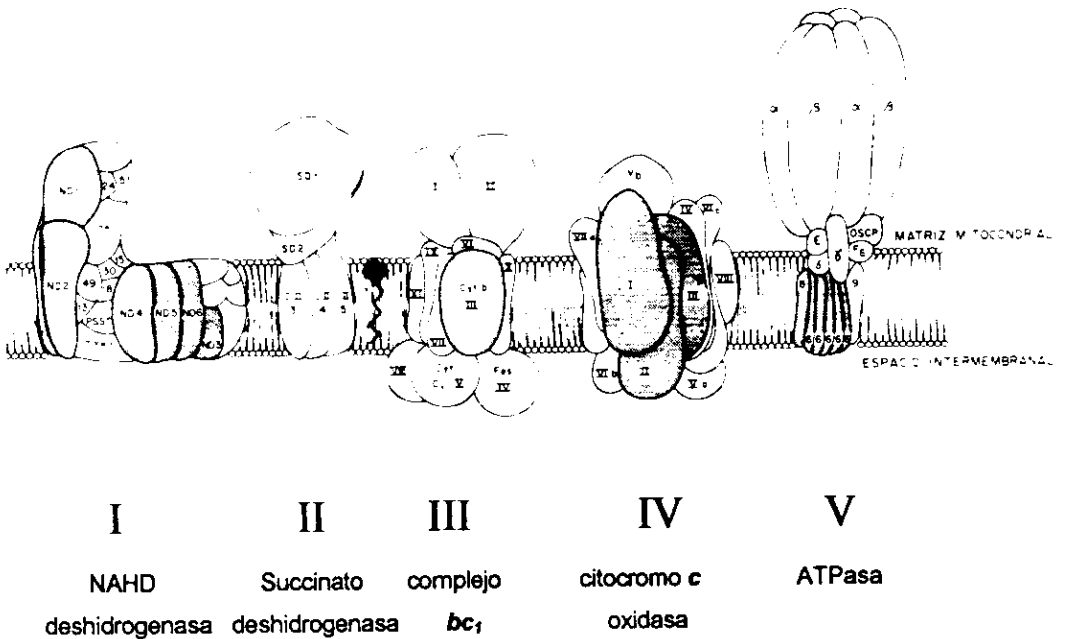


Figura 1: La cadena respiratoria mitocondrial: complejos I (NADH deshidrogenasa) , II (Succinato deshidrogenasa), III (*bc₁*), IV (citocromo c oxidasa) y V (ATPasa). En sombreado se muestran las subunidades hidrofóbicas codificadas en el genoma mitocondrial y en blanco las subunidades menos hidrofóbicas codificadas en el núcleo con la numeración usada comúnmente.

El complejo III mitocondrial o complejo bc₁ :

El complejo III mitocondrial o **bc₁**, de la cadena respiratoria está compuesto por 11 subunidades, se encuentra como dímero en la membrana y el monómero tiene un masa molecular de 250 kDa. El complejo **bc₁** acepta electrones de la poza de quinonas y los transfiere al citocromo c soluble. Este complejo tiene tres componentes redox: dos grupos hemo denominados de acuerdo a sus máximos de absorción **b₅₆₆** y **b₅₈₀** que están unidos al apocitocromo **b** formando un citocromo bihémico (Widger y col. 1984; Saraste, 1984), un hemo tipo c unido covalentemente a la apoproteína **c₁** y la proteína hierro-azufre o proteína de Rieske que contiene un centro Fe₂S₂. Esta última proteína interviene en la transferencia de electrones de la hidroquinona al citocromo **c₁** (Rieske y col. 1984). La transferencia de electrones a través del complejo **bc₁** está acoplada al transporte neto de protones de un lado al otro de la membrana.

Recientemente el grupo de Xia y col. (1997) obtuvo la estructura cristalográfica del complejo **bc₁** de bovino a una resolución de 2.9 Å; la unidad del cristal es de a=b= 153 Å y c= 597.7 Å. Con este cristal fueron capaces de construir un modelo que incluye a la proteína estructural 1 (445 aa), la proteína estructural 2 (420 aa), el citocromo **b** (378 aa), la subunidad 6 (103 aa), la subunidad 7(70aa), un fragmento del extremo carboxilo del citocromo **c₁** (60 de los 240 aa) y un fragmento del aminoterminal de la proteína hierro-azufre (62 de los 196 aa). El complejo está formado por trece cruces transmembranales, ocho de los cuales pertenecen al citocromo **b**. En este modelo pudieron identificar con exactitud los sitios de unión de los cuatro centros redox y los de unión a los inhibidores antimicina y mixotiazol (figura 2).

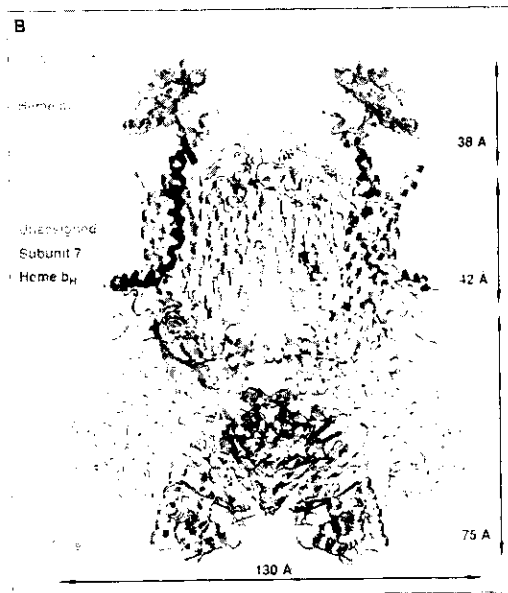


Figura 2: Estructura cristalográfica del complejo III mitocondrial de bovino (reproducido de Xia y col. 1997, *Science*. **277**: 60-66)

El citocromo *b*:

El citocromo *b*, es la subunidad catalítica central del complejo *bc₁*, es una proteína de aproximadamente 390 aminoácidos, tiene ocho hélices transmembranales y una novena hélice anfipática extramembranal (Crofts 1987). Las secuencias del citocromo *b* de 1000 especies muestran un alto grado de conservación en su estructura primaria, así como nueve residuos invariables. Estos residuos son: las cuatro histidinas que unen a los dos grupos hemo denominados *b₅₆₀* y *b₅₆₆*; las glicinas G33 y G143, que pueden estar relacionadas con el empaquetamiento del grupo hemo, el ácido aspártico D229 y el ácido glutámico E273 que se involucran en el equilibrio de protones entre la ubiquinona y los centros Q_o y Q_i; y por último el triptófano W114 cuya función se desconoce (Degli Esposti y col, 1993).

Las histidinas mencionadas se encuentran dos en la hélice B (H82, H96 en *S. cerevisiae*) y dos en la hélice denominada D (H183, H197) (Degli Esposti y col, 1993). Los potenciales redox de los dos hemos indican que la H82 y la H183 unen al *b₅₆₆* en el lado positivo de la membrana, es decir, en el espacio intermembranal, mientras que la H96 y la H197 unen al citocromo *b₅₆₀* en el lado negativo de la membrana o matriz mitocondrial (West y col. 1988). Mutaciones puntuales como: la C33-Y altera el espectro del hemo *b₅₆₆* y la mutación: S206-L afecta al hemo *b₅₆₀*, lo que confirma la unión de los hemos con las histidinas antes mencionadas (Lemesle-Meunier y col. 1993). La cristalografía del citocromo *b* también muestra la unión de las histidinas con los grupos hemo y su posición con respecto a la matriz mitocondrial, así como los ocho cruces transmembranales que se encuentran asociadas en dos grupos: las hélices A, B, C, D y E en un grupo y las hélices F, G y H en otro grupo, ambos extremos de la proteína se encuentran expuestos hacia la matriz mitocondrial (Xia y col. 1997).

Los inhibidores más conocidos del citocromo *b* son la antimicina y el mixotiazol; por mutaciones puntuales se ha demostrado que el sitio de unión de la antimicina se encuentra en el asa que une a las hélices D y E del lado negativo de la membrana, así como algunos aminoácidos del extremo amino terminal; este sitio también lo comparten inhibidores como la funiculosina y el diuron. La antimicina bloquea la transferencia de electrones del *b₅₆₀* a la ubiquinona en el sitio Q_n (este sitio se refiere al sitio de unión de la

quinona en el lado negativo de la membrana). El mixotiazol por su parte, bloquea la transferencia de electrones del b_{558} a la proteína Rieske en el sitio Q_p (el sitio de unión de la quinona en el lado positivo de la membrana) formado por la hélice extramembranal (denominada CD), el asa entre las hélices E y F y la zona distal de las hélices C y F (para mayor detalle ver Trumpower y Gennis, 1994 y Degli Esposti y col., 1993). Los cristales que se obtuvieron con la antimicina o el mixotiazol unidos al complejo bc_1 mostraron exactamente los sitios de unión de estos dos inhibidores, la antimicina ocupa una cavidad en la región transmembranal junto al hemo b_H y el mixotiazol en otra cavidad en la mitad del camino entre el hemo b_L y el centro fierro-azufre, comprobando así lo que se había demostrado bioquímicamente (Xia y col. 1997) (figura 3).



Figura 3: Estructura cristalográfica del citocromo *b* (reproducido de Xia y col. 1997, *Science*. 277: 60-66).

Complejo IV mitocondrial o citocromo c oxidasa:

La citocromo c oxidasa es el complejo terminal de la cadena respiratoria mitocondrial; acepta electrones del ferrocitocromo c soluble y los transfiere al oxígeno para formar una molécula de agua, esta reacción está acoplada a la traslocación de protones a través de la membrana. La enzima contiene dos sitios de unión de hemo y dos sitios de cobre, la subunidad II que se une al citocromo c tiene un grupo de cobre Cu_A unido a dos moléculas de cisteína y recibe los electrones del citocromo c. La subunidad I tiene dos hemos tipo a (Fe_a , Fe_{a3}) y otro grupo cobre (Cu_B). El hemo a_3 y el Cu_B forman el centro binuclear, donde se une el O_2 para formar el H_2O .

Este complejo enzimático ha sido muy estudiado en las últimas dos décadas. En bacterias como *Paracoccus denitrificans* (Yang y Trumppower 1986) y *Rhodobacter sphaeroides* (Gennis 1993) está compuesto por tres subunidades, por lo que representa un modelo sencillo para estudiar su bioquímica. Primero creyó que las tres subunidades eran necesarias para el funcionamiento del complejo; sin embargo, cuando se remueve la subunidad III de *P. denitrificans*, la translocación de protones aún continúa. Además, experimentos de interrupción génica indican que esta subunidad no se requiere para llevar a cabo la función (Haltia y col. 1991). Sin embargo, estudios posteriores indican que la subunidad III puede estar involucrada en el ensamblaje de las otras dos subunidades (Haltia y col. 1994).

En 1995 Iwata y col. (1995) obtuvieron la estructura cristalográfica con cuatro subunidades de la citocromo c oxidasa de *Paracoccus denitrificans* (figura 4) a una resolución de 2.8 Å. La enzima vista desde arriba de la membrana tiene una forma trapezoide, la parte inferior (que corresponde al citoplasma) mide 90 Å, la parte superior mide 75 Å y tiene una altura de 55 Å. El complejo está compuesto por 22 cruces transmembranales. Con la estructura tridimensional se pudo comprobar que la subunidad I tiene 12 cruces transmembranales y contiene los sitios de unión de los hemos a y a_3 , así como del Cu_B . La subunidad II por su parte, tiene dos cruces transmembranales y sus extremos carboxilo y amino interactúan estrechamente del lado periplásmico. La parte globular de la subunidad II está cercana al trapezoide por la parte de arriba dándole una

altura total a la enzima de 95 Å; esta parte globular es la que contiene al Cu_A. La subunidad III tiene siete cruces transmembranales que se encuentran en un arreglo irregular. El descubrimiento de la subunidad IV es reciente, todavía no se cuenta con la secuencia completa y no se sabe cuál es su función. Esta subunidad tiene un solo cruce transmembranal y está en contacto con las otras tres subunidades (Figura 4).

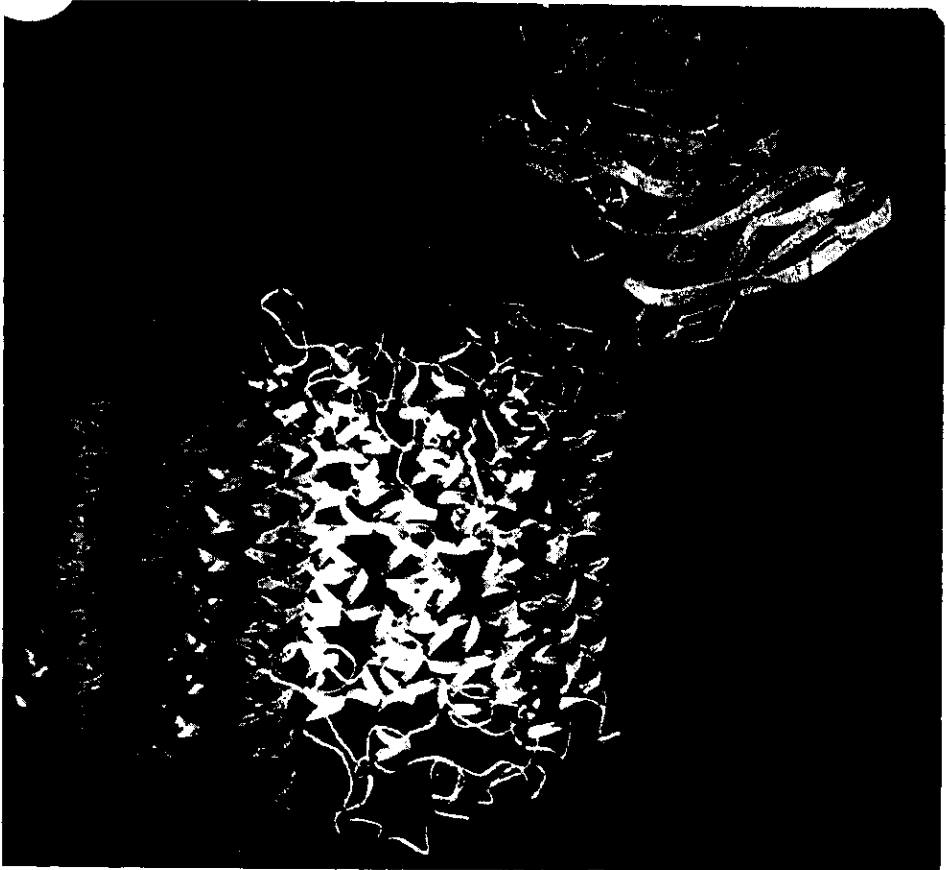


Figura 4: Estructura cristalográfica del complejo IV de *Paracoccus denitrificans* (reproducido de Iwata y col. 1995, Nature. 376: 660-669.).

En el caso de las citocromo *c* oxidasas mitocondriales, en particular la de corazón de bovino, la enzima está compuesta por 13 subunidades, dos de las cuales forman el centro activo (las subunidades I y II). Las subunidades I, II y III están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que el resto están codificadas en el núcleo y tienen que ser importadas desde el citoplasma hasta la membrana interna de la mitocondria. Al igual que en bacterias, la subunidad II se une al citocromo *c*, y contiene un grupo Cu_A . La subunidad I tiene los dos hemos tipo a y a_3 y el grupo Cu_B . El hemo a_3 y el Cu_B forman el centro binuclear, donde se une el O_2 para formar el H_2O .

En 1996 Tsukihara y colaboradores obtuvieron la estructura cristalográfica de la citocromo *c* oxidasa de bovino a una resolución de 2.8 Å (Figura 5), este estudio ha permitido corroborar los modelos anteriores y ha proporcionado gran información sobre el arreglo de las 13 subunidades. La enzima purificada es un dímero compuesto en total por 3606 aminoácidos, 5 fosfatidiletanolaminas, 3 fosfatidilgliceroles y 2 colatos, además de los hemos a y a_3 y de los 3 átomos de Cu, uno en la subunidad I (Cu_B) y otro en la subunidad II (Cu_A). Con el cristal se pudo ver que el Cu_A es binuclear. La enzima tiene además un magnesio y un zinc. Existen dos posibles rutas para el bombeo de protones y ambas se encuentran en la subunidad I, por lo que se han puesto en duda los modelos propuestos anteriormente, en los que involucraban a la subunidad III en el bombeo de protones.

Otro aspecto que llama la atención en la estructura del complejo es que los cruces transmembranales no son perpendiculares a la membrana sino que tiene una inclinación e involucran más aminoácidos que los predichos por los cálculos de hidropatía.

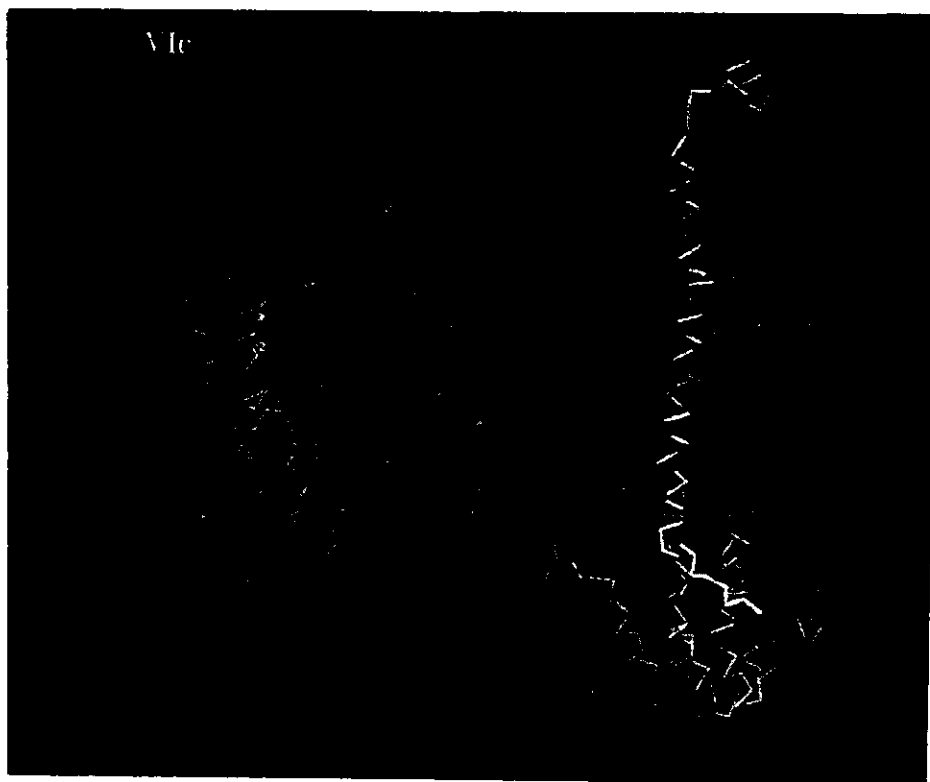


Figura 5: Modelo cristalográfico del complejo IV de bovino (Tsukihara y col. 1996, Science 272: 1136-1144).

Los genomas mitocondriales:

La teoría endosimbiótica postula que las mitocondrias se originaron de procariotes parásitos similares a las bacterias aeróbicas o a las bacterias púrpuras fotosintéticas (Margulis, 1970). Se piensa que, conforme pasó el tiempo, las mitocondrias fueron exportando sus genes hacia el núcleo, de tal manera que actualmente más del 90% de las proteínas mitocondriales son de origen citoplasmático. Sin embargo, las mitocondrias han conservado algunos de estos genes, en particular los que codifican para subunidades hidrofóbicas, así como toda la maquinaria necesaria para la replicación, transcripción y traducción de los genes mitocondriales (von Heijne, 1989). La exportación de genes al núcleo ha sido un proceso paulatino en los diferentes organismos (Brenicke y col., 1993) lo que ha dado lugar a características muy diferentes en los genomas mitocondriales (Gray y Doolittle, 1992):

- a) Los genomas mitocondriales varían mucho en forma (circulares o lineales), tamaño (desde 16 kb en el humano y hasta 2000 kb en el melón), composición de nucleótidos e información genómica.
- b) Los genomas mitocondriales muestran diferentes patrones de organización de los genes en los diferentes eucariotes. Pueden tener o no intrones y regiones intergénicas.
- c) Los procesos mitocondriales de transcripción y postranscripción son distintos en los diferentes eucariotes.
- d) El uso de codones mitocondrial difiere del uso de codones "universal" de eucariotes y de bacterias y varía también entre las diferentes mitocondrias.
- e) Los ribosomas y los RNA de transferencia mitocondriales tienen estructuras muy diversas y no siempre comparten características con sus contrapartes procariotes.

Exportación de genes mitocondriales al genoma nuclear.

En el principio de la simbiosis entre la bacteria huésped y la célula hospedera hubo una exportación masiva de genes de la primera hacia el núcleo de la segunda; resultando de gran interés el que los genes que codifican para las proteínas de la cadena respiratoria que son altamente hidrofóbicas con varios segmentos transmembranales, (figura 1) como el citocromo *b* (con 8 cruces transmembranales) y las subunidades I y III de la citocromo *c* oxidasa (con 12 y 7 cruces transmembranales, respectivamente), hayan permanecido en el genoma mitocondrial (von Heijne, 1986) y solo los genes de proteínas con un cruce transmembranal como las subunidades IV, VIa, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII de la citocromo *c* oxidasa están codificadas en el genoma nuclear (Capaldi, 1991).

Ha sido difícil determinar cómo era el genoma original de la protomitochondria, pues como se ha mencionado, los genomas mitocondriales varían mucho en tamaño, estructura y organización, así como en el contenido de genes. Sin embargo, recientemente se ha publicado el genoma mitocondrial completo de *Reclinomonas americana* (Lang y col. 1997), este genoma mide 69,034 pb y contiene el mayor número de genes hasta ahora identificados en un genoma mitocondrial (97). Estos incluyen los genes que codifican para el RNA ribosomal 5S, el componente de RNA de la RNasa P y al menos 18 proteínas que no se sabía previamente eran codificadas por genomas mitocondriales. Lo más sorprendente es que codifica para 4 genes de una RNA polimerasa multimérica tipo eubacteriana, por lo que se considera el primer ejemplo de lo que podría haber sido el ancestro del genoma proto-mitocondrial.

Todos los DNAs mitocondriales de vertebrados caracterizados a la fecha contienen genes que codifican para varias subunidades de los complejos mitocondriales: siete genes que codifican para polipéptidos del complejo I mitocondrial (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), un gen que codifica para el citocromo *b* del complejo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa) y tres genes para los polipéptidos (subunidades I, II y III) del complejo IV mitocondrial (citocromo *c* oxidasa) (Attardi y Schatz, 1988). Por otra parte, otros organismos parecen tener solamente algunos de los genes mitocondriales: tal es el caso de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, las cuales carecen de los genes correspondientes a las subunidades del complejo I,

careciendo también de la clásica NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (Lang y col., 1983; Grivell, 1987). Algunos géneros como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia* y *Chlamydomonas*, así como algunas plantas superiores, entre ellas el maíz, tienen solamente algunos de los genes del complejo I (figura 6) (Benne, 1985; Simpson, 1986; Gray y Boer, 1988; Bland y col., 1986; Stern y col., 1986).

Lo anterior sugiere que después de la exportación masiva de genes mitocondriales hacia el núcleo, el proceso ha continuado a lo largo de la evolución y ha seguido caminos diferentes en los diferentes organismos. El proceso de transferencia de genes al núcleo es paulatino y secuencial, de acuerdo a Brennicke y col. (1996), puesto que para que el gen sea transferido exitosamente tiene que adquirir ciertas características como son: presecuencia o péptido señal, promotor, cambios en el uso de codones, sitio de unión a ribosomas, señal de poli-A, y un mecanismo de importación de la proteína a la membrana interna mitocondrial. Una vez que todo esto ocurre, el gen nuclear se activa y el gen mitocondrial se inactiva y tiende a desaparecer paulatinamente (figura 7). Existen ejemplos en la literatura de cada uno de estos procesos, como se puede apreciar en la figura 8.

Podemos citar el caso de *Neurospora crassa*, donde el gen que codifica para la subunidad 9 de la ATPasa, una proteína muy hidrofóbica, se encuentra tanto en el núcleo como en la mitocondria (Pfaner y col., 1987), siendo el gen nuclear el único que se expresa.

Otro ejemplo es el gen *COX2*, que ha sido transferido al núcleo en algunas plantas angiospermas, en donde se puede ver el proceso paulatino de transferencia que se ha llevado a cabo (figura 9). En el chícharo, el gen *COX2* se encuentra en el núcleo y en la mitocondria, pero solamente es activo el mitocondrial (Nungent y Palmer, 1992); en la soya y en el frijol común existe el gen en ambos genomas y solamente se encuentra activo el nuclear, mientras que el mitocondrial se volvió silencioso; finalmente los genes *COX2* de frijol común y caupí están presentes solamente en el genoma nuclear. Estos genes han adquirido intrones y presecuencias para que la proteína pueda ser importada a la mitocondria, el gen nuclear de soya tiene en el extremo amino-terminal una secuencia que se asemeja a los péptidos señal de importación a la mitocondria y se encuentra separada del gen por un intrón (Covello y Gray 1992)(figura 9).

También se ha encontrado que el gen para la proteína ribosomal S11 (*RPS11*) se encuentra en el genoma mitocondrial de plantas no vasculares y en el genoma nuclear en las plantas vasculares. Kadowaki y colaboradores (1996) encontraron en arroz un pseudogen mitocondrial y un gen nuclear, este último tiene una presecuencia similar a la de la β -ATPasa. Sorprendentemente, encontraron una segunda copia nuclear que tiene 92% de identidad pero su presecuencia tiene similitud con la presecuencia del gen *COX5*, este segundo gen aparentemente no está activo, pues detectaron su RNA mensajero. Estos datos sugieren que los genes que son transferidos al núcleo pueden adquirir diferentes presecuencias y cuando obtienen una presecuencia funcional el gen se activa (figura 10).

Un ejemplo de la pérdida paulatina del gen mitocondrial es el caso de la *rps12* de *Oenothera* donde se ha encontrado una copia nuclear activa con presecuencia, mientras que en el genoma mitocondrial se encuentra un fragmento de este gen; sin embargo, en trigo y maíz *rps12* es un gen mitocondrial (Grohmann y col. 1992) (figura 11).

	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		
Homo sapiens	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	■	■	■	■	■		22	
Allomyces macrognus	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	■	■	■	■	■	■	20	
Leishmania tarentolae	☐			☐		☐		☐	■	■	■				...	
Arabidopsis thaliana	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	■	■	■	■	■	■	22	
Marchantia polymorpha	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	■	■	■	■	■	■	29	
Prototheca wickerhamii	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	■	■	■	■	■	■	26	
Chlamydomonas reinhardtii	☐	☐		☐		☐	☐	☐	■						3	
Saccharomyces cerevisiae								☐	■	■	■	■	■	■	25	

Figura 6: Genes conservados en el genoma mitocondrial de diferentes especies, modificado de Gray (1992).

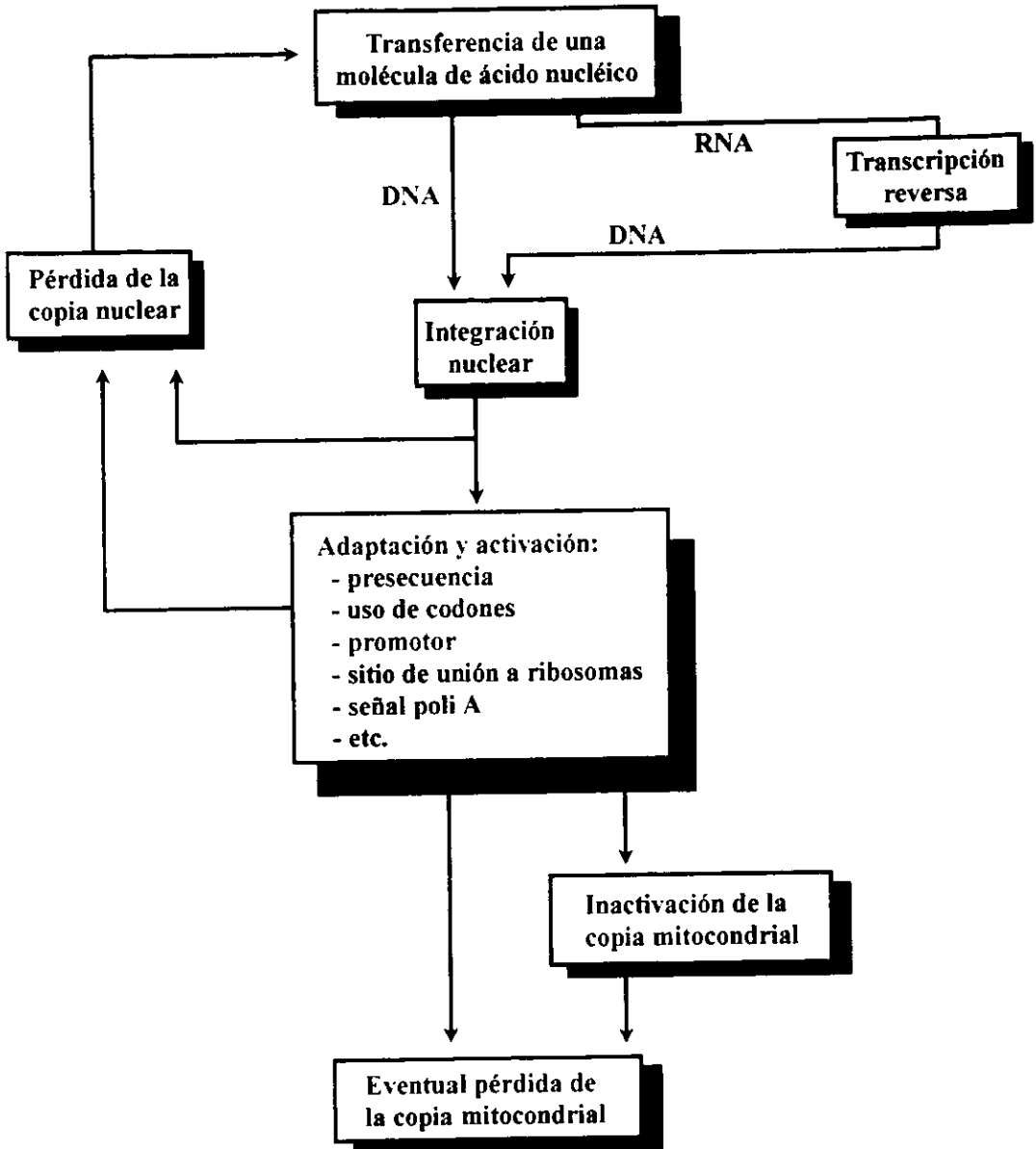


Figura 7: Esquema del proceso progresivo propuesto para la exportación de genes mitocondriales hacia el núcleo (modificado de Brennicke y col. 1993, FEBS lett. **325**: 11-19).

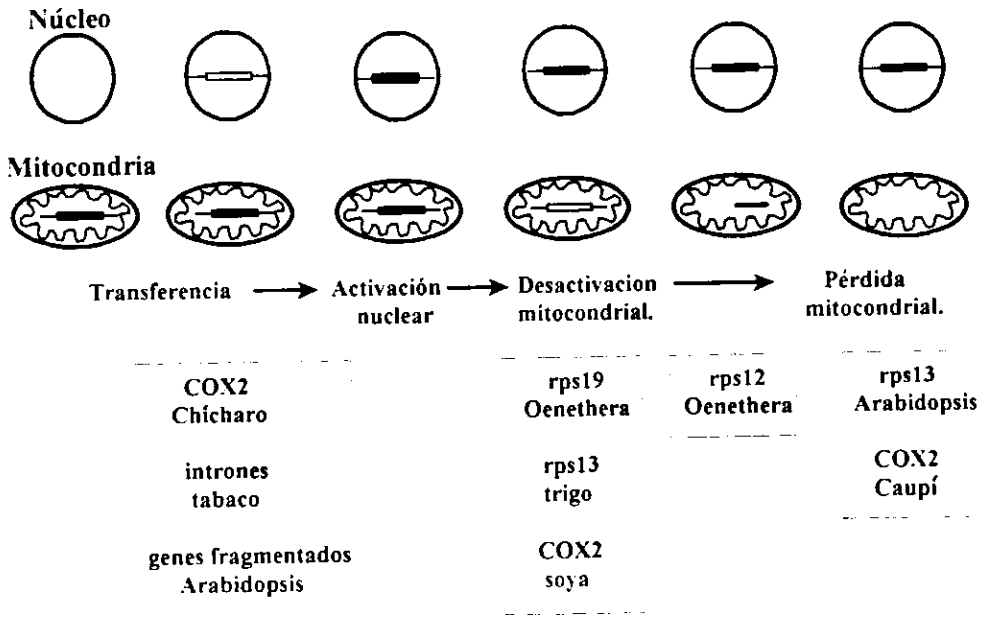


Figura 8: Transferencia paulatina de genes mitocondriales al núcleo. Se muestran los genes mitocondriales su aparición en el núcleo y la eventual desaparición en la mitocondria: los recuadros rellenos son los genes activos mientras que los blancos están inactivos, abajo de cada evento están los ejemplos que se han encontrado en diferentes organismos (modificado de Brennicke y col. 1993, FEBS lett. 325: 11-19.).

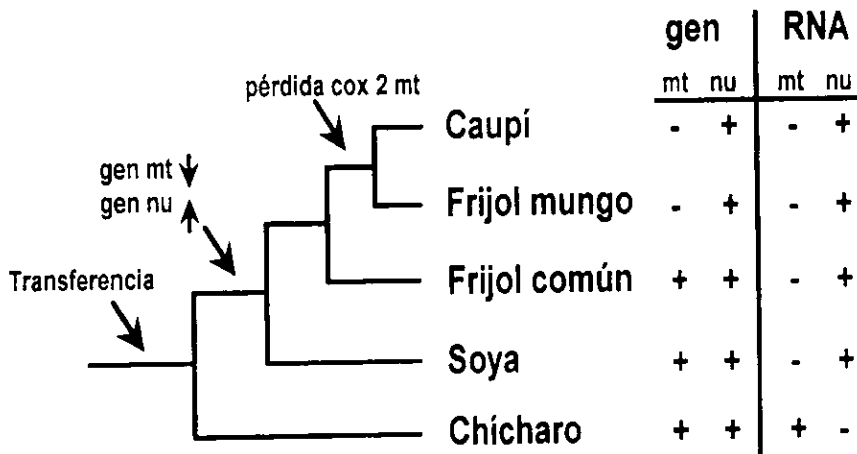


Figura 9: Representación esquemática de los eventos de transferencia del gen COX2 al núcleo durante la evolución de las plantas angiospermas, activación (+), inactivación (-). (modificado de Nungent y Palmer, 1991, Cell. 66: 473-481).

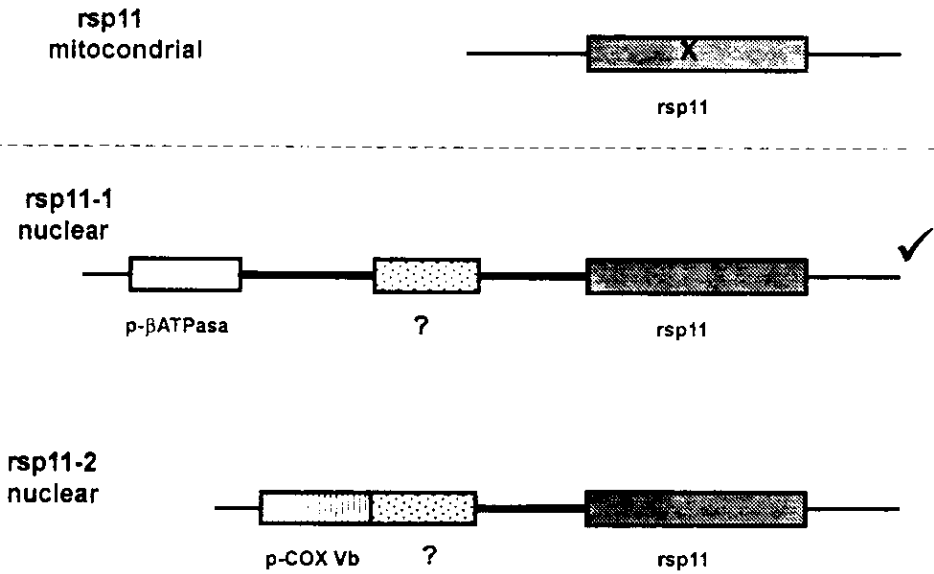


Figura 10: Los tres genes que se han encontrado en arroz de *rps11* que codifica para la proteína ribosomal S11. A: el pseudogen mitocondrial, B: copia nuclear *nu-rsp11-1* que tiene dos intrones y una presecuencia muy similar a la de la β -ATPasa, un marco de lectura abierto del cual se desconoce su función y finalmente la región codificante, esta es la única copia funcional y C: copia nuclear *nu-rsp11-2* con una presecuencia parecida a la de la subunidad V de la citocromo c oxidasa, un intrón y la región codificante (modificado de Kadowaki y col., 1996, *Embo J.* 15: 6652-6661).

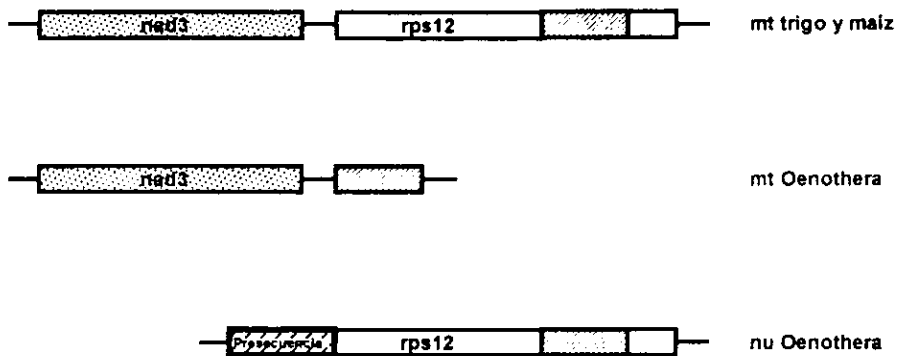


Figura 11: Pérdida paulatina propuesta para el gen mitocondrial *rps12* en *Oenothera* y su transferencia al núcleo. En trigo y en maíz el gen es mitocondrial mientras que en *Oenothera* existe sólo un fragmento del gen en el genoma mitocondrial y la copia completa y funcional se encuentra en el núcleo, donde además ya adquirió una presecuencia (modificado de Grohmann y col. 1992, Nuc. Acid. Res. 20: 5641-5646).

El genoma mitocondrial de Chlamydomonas reinhardtii:

Chlamydomonas reinhardtii es una alga verde unicelular que pertenece a la familia Chlamydomonadaceae, su DNA mitocondrial es una molécula lineal de 15.8 kpb, la cual difiere mucho en tamaño del DNA mitocondrial de plantas que varían entre 200 y 2400 kb y se asemeja más al tamaño del DNA mitocondrial de animales.

La gran mayoría de los genomas mitocondriales caracterizados hasta la fecha son circulares, por lo que existía la posibilidad de que el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* fuera un fragmento que se obtenía artificialmente durante la purificación. Sin embargo, el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido completamente secuenciado y presenta en los extremos secuencias repetidas muy peculiares que semejantes a estructuras teloméricas cromosomales con las cuales se pueden postular mecanismos de replicación (Varenholz y col., 1993). Esto confirma la idea de que se trata de un genoma lineal. Este DNA mitocondrial está organizado de manera extremadamente compacta como en los animales, no posee intrones y codifica para 7 proteínas de la cadena respiratoria, un gen similar a la transcriptasa reversa, 3 RNAs de transferencia, un RNA ribosomal para la subunidad grande del ribosoma y uno para la pequeña; tiene además la particularidad de que estos RNAs ribosomales están fragmentados (Boer y col, 1985)(figura 12).

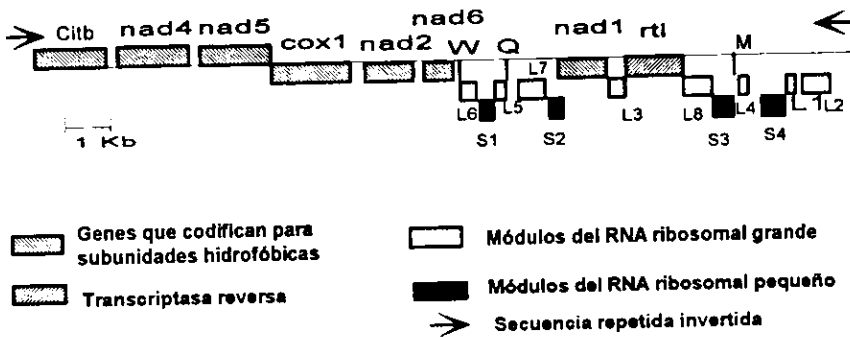


Figura 12: Genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*. (modificado de Varenholz y col. 1993, Curr. Genet. 24:241-247)

Importación de proteínas a la mitocondria:

El 98% de aproximadamente las 1000 proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo y sintetizadas en el citosol. ¿Cómo se importan estas proteínas al interior de las mitocondrias?

Muchas de las proteínas importadas a la mitocondria tienen una secuencia adicional, en el extremo amino-terminal (de 20 a 80 aminoácidos) que se considera la señal de reconocimiento para ingresar a la mitocondria. Esta señal puede o no ser cortada una vez en el interior de la mitocondria y las proteínas con presecuencia se les denomina precursores o preproteínas. La existencia de presecuencias se demostró con híbridos de proteínas citoplasmáticas que normalmente no se importan a la mitocondria y secuencias "líder" de una proteína que si se importa al interior de la mitocondria (Hurt y col.,1984 y Keng y col.,1986). Gearing y Nagley (1986) por su parte, se ha reportado que el gen mitocondrial de la subunidad 8 de la ATPasa de levadura, unido al péptido señal de la subunidad 9 (nuclear) de *Neurospora crassa* puede ser expresado *in vitro* y el producto se importa exitosamente al interior de la mitocondria. También se vió que alteraciones (mutaciones puntuales o interrupciones) en estas secuencias previenen la importación de las proteínas a la mitocondria (Hurt y col.,1984; van Loon y Young,1986).

Los precursores de las proteínas mitocondriales tienen que mantenerse en una conformación susceptible para su translocación al interior de las membranas mitocondriales, mediante la interacción con chaperonas citosólicas son llevadas hasta la translocasa de la membrana externa mitocondria (TOM, por sus siglas en inglés: translocase of the outer membrane), que incluye receptores y un poro de importación general. El transporte hacia el interior de la matriz mitocondria es mediado por la maquinaria de transporte de la membrana interna (TIM) (Pfanner y Meijer,1997).

Existen dos factores cruciales para la importación de precursores al interior de la matriz mitocondria: el gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$) y la proteína Hsp70 de la matriz mitocondria. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las proteínas más hidrofóbicas de la cadena respiratoria han permanecido codificadas en el genoma mitocondria, de esta manera no es necesaria una maquinaria especial para importar

proteínas altamente hidrofóbicas al interior de la mitocondria. Recientemente Herrman y col. (1997) describieron la importación a la membrana interna mitocondrial de una proteína codificada en el genoma nuclear pOxa1 con cinco supuestos cruces transmembranales. Este es el primer reporte de la importación de una proteína tan hidrofóbica a la mitocondria; los autores demuestran que tiene una presecuencia y que la importación es dependiente de ATP, potencial de membrana, mtHsp70 y de la peptidasa mitocondrial procesadora: MPP (lo que indica que la proteína tiene que entrar en primera instancia a la matriz mitocondrial).

ANTECEDENTES DIRECTOS:

Un modelo alternativo: el alga incolora Polytomella spp.:

El flagelado *Polytomella* (Aragão, 1910) puede considerarse como protozoario o como un alga incolora del orden de los *Chlamydomonadales* (Melkonian, 1990). El género *Polytomella* (figura 13) pertenece a la familia de los tetrablefáridos (que también se les conoce con el nombre genérico de fitoflagelados) y se relaciona con otros protozoarios unicelulares del mismo orden como *Chlamydomonas*, *Carteria*, *Haematococcus* y *Chlorogonium*. Después de los trabajos pioneros de Aragón (1910), Pringsheim aisló y caracterizó 6 especies de *Polytomella* en cultivos puros, provenientes de lugares muy diversos desde el punto de vista ecológico (Pringsheim, 1955). Las especies difieren solamente en características morfológicas menores.

A pesar de ser un organismo clasificado entre las algas verdes y relacionarse cercanamente por sus características morfológicas con el género *Chlamydomonas*, no posee pared celular ni cloroplastos (Bold y Wynne, 1978), además, almacena carbohidratos en forma de almidón, al igual que las plantas superiores (Sheeler y col., 1968).

A la fecha, todas las preparaciones de complejos mitocondriales de *Chlamydomonas* presentan una gran cantidad de contaminantes (Atteia, 1992) o requieren de múltiples pasos para su purificación, esto ha resultado de suma importancia para nuestro grupo de trabajo, ya que pensamos que utilizando *Polytomella* spp. se puede hacer un estudio integral de los complejos mitocondriales de los *Chlamydomonadales* a nivel molecular y a nivel bioquímico. Al ser *Polytomella* un alga incolora, tiene la ventaja sobre *Chlamydomonas* de que los complejos mitocondriales no se obtienen contaminados con proteínas del cloroplasto.

En el trabajo realizado por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994) en nuestro laboratorio se demostró que es posible obtener al complejo bc_1 de *Polytomella* spp. activo y puro. Este complejo tiene 11 polipéptidos y es sensible a antimicina y mixotiazol. Este es el primer reporte de un complejo bc_1 de un protista con actividad de ubiquinol-citocromo *c* reductasa sensible a inhibidores. Es de particular interés para el presente trabajo que el

complejo *bc*, presenta un corrimiento de 8 nm hacia el rojo en el máximo de absorción de la banda α del citocromo *b*, en el presente trabajo se caracterizaron las posibles causas a nivel molecular de este corrimiento, ya que es de esperarse que cambios en la secuencia del gen pueden generar cambios en la estructura terciaria de la proteína que explique este corrimiento.

En 1989, Matagne y col. utilizaron acriflavina para generar mutante de *Chlamydomonas reinhardtii*, este agente produce deleciones en los genomas mitocondriales. De esta manera obtuvieron una mutante que sufrió una deleción de 1.5 kb en el genoma mitocondrial. La mutante, denominada *dum1*, presenta una segregación no mendeliana y es incapaz de revertir; no crece en la obscuridad y en acetato como fuente de carbono. En la figura 14 se muestra el genoma mitocondrial de la mutante *dum1*. Cuando se transforma esta mutante con los DNAs mitocondriales completos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlamydomonas smithii* (Randolph-Anderson y col., 1993) recupera su capacidad de crecer en la obscuridad y en acetato como fuente de carbono. Esta mutante es el modelo idóneo para transformarla con el gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp. y determinar qué aminoácidos están involucrados en el corrimiento hacia el rojo del espectro del citocromo *b*.

Por otro lado, en el laboratorio se ha obtenido una preparación pura de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* spp. en la que se han podido identificar 7 subunidades. La actividad de la citocromo *c* oxidasa es sensible a cianuro. Se han podido identificar varias de las subunidades en inmunorreplicas tipo Western, utilizando anticuerpos convencionales contra las subunidades I, II, III y IV de la levadura.

La subunidad II se transfirió a una membrana de polivinil-difluoruro y se secuenció el extremo amino terminal, al mismo tiempo se obtuvo una secuencia interna. Con estas secuencias se diseñaron oligodesoxinucleótidos para amplificar, mediante la técnica de PCR, el gen *COX2* que codifica para esta subunidad.

El trabajo realizado por Conner y col. (1989) presentó evidencia de que *Polytomella* y *Chlamydomonas* están estrechamente relacionadas, pues los genes que codifican para la β -tubulina tienen el mismo número y localización de intrones, ambos organismos tienen el mismo uso de codones y los genes presentan 98% de similitud. Además,

Chlamydomonas y *Polytomella* spp comparten características morfológicas. Por otro lado, el gen mitocondrial *COX1* tiene una similitud de 88% entre ambas especies; por lo que también deben compartir grandes similitudes en las características de sus genomas mitocondriales (Antaramián y col., 1996).

La caracterización del gen que codifica para el citocromo *b* de *Polytomella* spp. y el análisis comparativo con su homólogo de *Chlamydomonas reinhardtii*, aportarán nuevas evidencias de que ambos organismos están estrechamente relacionados y que compartieron el mismo endosimbionte. Por otro lado la caracterización y localización del gen *COX2* en ambas especies, nos permitirá distinguir si comparten características en la presecuencia, en la longitud y localización de los intrones, en el uso de codones y en los sitios de poliadenilación.



Figura 13: Fotografía de microscopía electrónica de *Polytomella* spp. Se puede apreciar como este organismo carece de pared celular y tiene cuatro flagelos, células crecidas en las condiciones descritas en materiales y métodos.

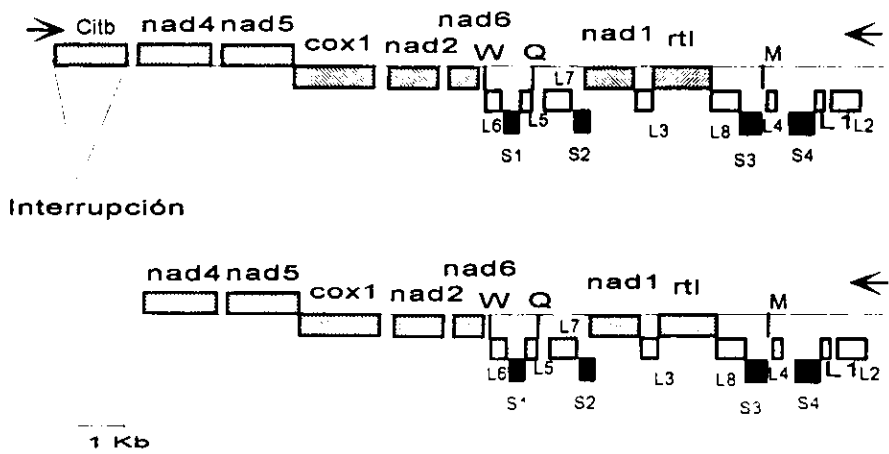


Figura 14: Mutante *dum 1* de *Chlamydomonas reinhardtii* que carece de todo el gen del citocromo *b* (tomado de Matagne y col. ,1989, J. Cell Biol. **108**. 1221-1226).

OBJETIVOS GENERALES:

En el presente trabajo estamos interesados en caracterizar el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp., su estructura, genes que codifica, uso de codones, presencia de intrones y características de los RNA ribosomales.

De especial interés para este trabajo es el hecho de que el DNA mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* carece de los genes que codifican para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa (COX2 Y COX3) (Gray y Boer, 1988; Matagne y col., 1989)(figura 6). Esto nos sugiere que los genes que codifican para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa (COX2 y COX3) y la subunidad 6 de la ATPasa (*atp6*) en este microorganismo se encuentran en el genoma nuclear, siendo el caso de COX3 y *atp6* únicos en la literatura. De alguna manera, estas subunidades se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos para después ser importadas hasta la membrana interna mitocondrial. Esto puede llevarse a cabo a través de proteínas precursoras, que una vez dentro de la mitocondria se ensamblan en un complejo funcional. Si esto es posible, la ruta de inserción de estas proteínas sería muy peculiar, distinta a la de cualquier otro organismo, ya que implica que polipéptidos muy hidrofóbicos como es la subunidad III de la citocromo oxidasa, pueden ser importadas al interior de la mitocondria. Otra posibilidad es que los RNAs mensajeros son los que se importen a la mitocondria y dentro de esta se sintetizen las proteínas. Una tercera alternativa es que los complejos mitocondriales de estas algas carezcan de estas subunidades, sin embargo, la evidencia bioquímica que se ha reunido en los últimos años, indican lo contrario (Atteia y col., 1992, Vázquez-Acevedo, comunicación personal).

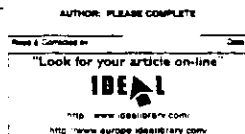
Las posibilidades previamente descritas plantean problemas biológicos que sitúan a las algas verdes en un contexto especial con respecto a los otros organismos: ya sea que la biogénesis de la citocromo c oxidasa mitocondrial tenga una ruta de ensamblaje distinta a la conocida normalmente para este tipo de complejos, lo que supone la importación de proteínas con varios segmentos hidrofóbicos hacia el interior de la membrana mitocondrial o la importación de sus RNAs mensajeros que también necesitaría de un mecanismo especial para importar y proteger RNAs tan grandes. Como un primer paso para resolver este problema biológico, es necesario identificar y caracterizar los genes nucleares de COX2, COX3 y *atp6*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Caracterizar el DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. para lo cual se construirá una genoteca con la enzima de restricción *HindIII*.
- 2) Obtener la secuencia del gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp y determinar que aminoácidos pueden ser los responsables del corrimiento hacia el rojo en el espectro de éste, reportado por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994).
- 3) Hacer un análisis comparativo de los genes del citocromo *b* para comprobar la relación filogenética entre *Polytomella* y *Chlamydomonas*, que previamente establecimos con el gen *COX1* de ambos organismos (Antarmián y col, 1996).
- 4) Establecer el uso de codones del gen del citocromo *b* en *Polytomella* spp. y hacer un análisis comparativo con el uso de codones de *C. reinhardtii*, reportado por Michaelis y col. (1990). Compararlo también con el reportado para el gen *COX1* (Antarmián y col., 1996).
- 5) Localizar el gen *COX2* de *Polytomella* spp. para comprobar si es un gen mitocondrial como en la gran mayoría de los organismos descritos a la fecha o nuclear como se ha reportado para algunas plantas angiospermas.
- 6) Obtener la secuencia del gen *COX2* de *Polytomella* spp. y hacer un análisis de ésta, establecer la presencia de una posible presecuencia y compararla con las existentes en los bancos de datos. Si el gen *COX2* de *Polytomella* spp. es un gen nuclear como en las plantas angiospermas reportadas hasta la fecha, es de gran interés establecer la presecuencia de este gen y si tiene intrones o no.
- 7) Utilizar el gen *COX2* de *Polytomella* spp. como sonda para localizar el gen nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii*, clonarlo, secuenciarlo y caracterizarlo. Comparar las presecuencias de las subunidades II de la citocromo c oxidasa de ambas algas.

179

ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS
Vol. 354, No. 1, June 1, pp. 000-000, 1998
Article No. BB980680



Two Unusual Amino Acid Substitutions in Cytochrome b of the Colorless Alga *Polytomella* spp.: Correlation with the Atypical Spectral Properties of the b_H Heme¹

Fa1

Fa2

Anaid Antaramian, Soledad Funes, Miriam Vázquez-Acevedo, Ariane Atteia, Roberto Coria, and Diego González-Halphen²

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

Received January 7, 1998

The dithionite-reduced spectra of the purified bc_1 complexes from the colorless alga *Polytomella* spp. and the closely related green alga *Chlamydomonas reinhardtii* were compared. The spectrum of the bc_1 complex from *C. reinhardtii* showed a profile similar to those of the bc_1 complexes from other species. In contrast, the bc_1 complex from *Polytomella* spp. exhibits a double-peak spectrum in the α -band region, where the absorption bands of cytochrome *c*, and cytochrome *b* are completely resolved. To further understand the molecular basis of these spectroscopic differences, the mitochondrial gene encoding cytochrome *b* of *Polytomella* spp. was cloned, sequenced, and compared with that of *C. reinhardtii*. The *Polytomella* spp. cytochrome *b* gene is 1113 bp long and does not contain introns. The deduced protein sequence exhibits 56% identity and 68% similarity with the cytochrome *b* of *C. reinhardtii*, and in a phylogenetic analysis it clearly affiliated with the b-type cytochromes of *C. reinhardtii* and *C. smithii*. A comparison of the primary sequences of the *Polytomella* spp. cytochrome *b* with other b-type cytochromes, and its analysis based on the structure featuring eight transmembrane stretches, allowed the identification of a tyrosine in position 114, which substitutes for a tryptophan present in all mitochondrial b-type cytochromes sequenced to date. In addition, the primary sequence of the cytochrome *b* from *Polytomella* spp.

has a serine at position 36, instead of a nonpolar residue (alanine or leucine) found in all other species. In the proposed model for cytochrome *b*, both residues Tyr₁₁₄ and Ser₃₆ are in close proximity to the high-potential b_H heme. The above data suggest that the polar residues Y₁₁₄ and S₃₆, each one by itself or in combination, may interact with heme b_H of *Polytomella* spp. and, thus, may be responsible for the unique spectroscopic characteristics of cytochrome *b*.

© 1998 Academic Press

Key Words: *Polytomella*; *Chlamydomonas*; mitochondria; bc_1 complex; cytochrome *b*; Chlorophyceae.

The algae of the genus *Polytomella* (1, 2) are colorless members of the family Chlamydomonadaceae (3, 4). The genus *Polytomella* is thought to have arisen by secondary evolution from the *Chlamydomonas* lineage, losing its cell wall and its functional chloroplasts (5, 6). Structural, functional, biochemical, and molecular evidence supporting the close relationship between the genera *Polytomella* and *Chlamydomonas* have been provided by different authors (4, 7-11).

Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (bc_1 complex) is a multisubunit mitochondrial membrane enzyme that binds three redox prosthetic groups: a c-type heme in cytochrome *c*, an Fe₂S₂ center in the Rieske protein, and two b-type hemes in cytochrome *b* (12). Embedded in the inner mitochondrial membrane, cytochrome *b* constitutes the hydrophobic core of the bc_1 complex (13, 14). The available data indicate that the tertiary structure of cytochrome *b* is dominated by eight transmembrane stretches (15-18), two of which contain invariant histidine residues that ligate the heme irons: H₈₂ and H₁₈₃ (yeast numbering) coordinate

¹ The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBank under Accession No. U87396.

² To whom correspondence should be addressed at Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510 México, D.F., México. Fax: (525) 622-5611 or (525) 548-0387. E-mail: dhalphen@ifsun1.ifsun1.unam.mx.

heme b_L on the P-side of the membrane, and H_{36} and H_{197} ligate heme b_H on the N-side of the membrane (19). The crystal structure of the bc_1 complex from bovine heart mitochondria (20) has confirmed the predicted topology of cytochrome b. The two heme groups b_L and b_H are associated with two redox catalytic units in the bc_1 complex, the Q_o center and the Q_i center, respectively (21-25).

A highly active bc_1 complex from *Polytomella* spp. has been purified and characterized (26). It exhibits a clearly defined double-peak spectrum in the α -region with absorption maxima at 553 nm for cytochrome c_1 and at 567 nm for cytochrome b. The spectroscopic characteristics of *Polytomella* spp. cytochrome b are thus distinct from those in mammals, plants, yeasts, and bacteria. In order to interpret on a molecular basis the spectroscopic differences of the cytochrome b, we have compared the fully reduced spectra of the bc_1 complexes from *Polytomella* spp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. We also describe the nucleotide sequence of the *cytb* gene and the deduced primary structure of the mitochondrial apocytochrome b of *Polytomella* spp. and compare it to its homologue in *C. reinhardtii*. Two striking substitutions were found in the amino acid sequence of cytochrome b from *Polytomella* spp.: residues S_{36} and Y_{114} were unique to this sequence, replacing residues A_{36} and W_{114} present in the cytochrome b of *C. reinhardtii* and of several other species. In particular, W_{114} is one of the invariant amino acids in all apocytochrome b sequences reported to date, and its replacement by a tyrosine could account for the peculiar spectroscopic characteristics of the cytochrome b of *Polytomella* spp.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids. *Polytomella* spp. (198.80, E. G. Frangshem) was grown in the medium described by Wise (3) supplemented with vitamins B_1 (0.06 mg/liter) and B_{12} (0.08 mg/liter) (27). *Escherichia coli* DH5 α was used to amplify recombinant plasmids. Bluescript phagemid (Stratagene) was used for subcloning and sequencing.

Mitochondrial DNA isolation and construction of the genomic mitochondrial DNA library. Mitochondria from *Polytomella* spp. were prepared as described by Gutiérrez-Cirlos et al. (28). The mitochondrial HindIII DNA library was constructed as described by Antaramian et al. (10).

Amplification and partial sequencing of the *cytb* gene. Mitochondrial DNA (1 μ g) from *Polytomella* spp. was used as a template for amplification by the polymerase chain reaction (PCR) in the presence of 8 mM $MgCl_2$ and 200 ng of each of the following degenerate oligodeoxynucleotides, which were synthesized on an Applied Biosystems Model 381A DNA synthesizer at the Molecular Biology Facilities of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Mexico). The forward primer, 5'-agt(c) ttg tt(c) tt(c) att gta(c) gta(c) tac(t) ttc(t)gta; cact-3', corresponded to the conserved region from amino acid 87 to 95 of *C. reinhardtii* cytochrome b (SLFFIVVYLH). The backward primer, 5'-ta at(a) cca caa sig(a) sig(a) caa ctc aa(gg t(a)ac atg atg-3', corresponded to the complementary region of *C. reinhardtii* cytochrome b from amino acid 267 to 278 (HIVPEWYFL-

WVY). The oligodeoxynucleotides were designed based on the mitochondrial codon usage of *C. reinhardtii* (28).

For PCR amplification, samples were denatured for 12 min at 94°C and subjected to 50 cycles of 30-s denaturation at 94°C, 45-s annealing at 55°C, and 2-min extension at 72°C. A final extension for 12 min at 72°C was carried out. The PCR product was gel purified and ligated into the pCRII plasmid (Invitrogen). Transformed *E. coli* DH5 α cells were plated on ampicillin LB plates and recombinant plasmids were selected by loss of β -galactosidase activity. Positive clones were sequenced using the kit Seq Ver 2 from USB, based on the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (29). Standard recombinant DNA techniques were carried out essentially as described by Sambrook et al. (30).

Southern analysis. The mitochondrial library clones were transferred to a nylon membrane and hybridized with the ³²P radioactive probe of the *cytb* gene PCR-amplified product from *Polytomella* spp. The hybridization was carried out at 55°C, and the nylon membrane was washed twice with 5 \times SSC containing 0.5% SDS and once with 0.2 \times SSC containing 1% SDS at the same temperature and was exposed overnight with X-OMAT AR Kodak film. With this procedure, clone 9H from the HindIII mtDNA library was found to hybridize with the radioactive probe and to contain a partial sequence of the *cytb* gene.

PCR amplification of the upstream region of the *cytb* gene. Since clone 9H from the HindIII library did not contain the complete *cytb* gene, an additional PCR amplification step was carried out in order to obtain the sequence of the corresponding 3' end region. The PCR was done with mtDNA from *Polytomella* spp. as a template, with the specific forward primer 5'-tta acc aag gca aag ctg aac c-3' (nucleotides 1101 to 1122 from the known *cytb* gene sequence from clone 9H) and five different randomly synthesized decamers as backward primers (synthesized at the Instituto de Fisiología Celular, UNAM). The mixture for PCR contained 1 mM $MgCl_2$, 0.5% dimethyl sulfoxide, and 0.5% bovine serum albumin. Samples were denatured for 10 min at 94°C and subjected to 50 cycles of 45-s denaturation at 94°C, 45-s annealing at 50°C, a 1-min extension at 72°C, and an additional extension for 10 min at 72°C. The PCR products thus obtained were subjected to Southern blot analysis using the same 9H clone as a probe. Two different positive 1-kb products were identified, cloned in pMOS (Amersham), and sequenced; both were found to contain the 3' end of the *cytb* gene.

Purification of *bc_1* complexes. The bc_1 complex from *Polytomella* spp. was purified as described by Gutiérrez-Cirlos et al. (26). The bc_1 complex from *C. reinhardtii* was purified following the methods of Atteia (31) and Atteia and Franzén (32), using the multiple-photosynthetic mutant strain BF45F14 (33). Both bc_1 complexes were kept at -70°C until used.

Difference spectra of the *bc_1* complex. Difference spectra were recorded using bc_1 complexes at concentrations of 2.0-6.0 μ M cytochrome b, using a few grains of dithionite as reductant.

Purification of cytochrome b from *Polytomella* spp. and determination of its N-terminal sequence. Subunit III (cytochrome b) from the bc_1 complex from *Polytomella* spp. was purified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. For this purpose, the purified bc_1 complex (200 μ g of protein per lane, 10 lanes) was run in a Coomassie blue SDS-PAGE as described by Schagger et al. (34) with the modifications described by Vázquez-Acevedo et al. (35). The stained band of interest was excised from the gel and ground in a mortar in the presence of sand (1:1 w/w). When a fine paste was formed, 2 vol of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) was added, and the mixture centrifuged at 30,000g for 15 min. The supernatant, which contained the extracted and purified polypeptide, was lyophilized and subjected to SDS-

³ Abbreviations used: CAPS, 3-cylohexylamino-1-propanesulfonate acid; mtDNA, mitochondrial DNA; SSC, standard saline citrate.

PAGE as described by Schagger *et al.* (36). Subunit III cytochrome b₁ was transferred onto a ProBlott membrane (Applied Biosystems) at 400 mA for 2.5 h (4°C) in the presence of 10 mM Caps (pH 11.0) and 10% methanol following the procedure of Matsudaira (37). The membrane was stained with Coomassie brilliant blue, destained, and air-dried as described by the same author. Amino-terminal sequence analysis was carried out by Dr. J. D'Alayer on an Applied Biosystems sequencer at the Laboratoire de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur, Paris (France).

Sequence analysis. L Sequences were analyzed using the GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI). Alignments were carried out with the Pileup program (38) using sequences in the SwissProt data bank. Distances in the cladogram were corrected according to Kimura (39). The terms similarity and homology are used as suggested by Reece *et al.* (40). Accepted amino acid substitutions for considering similarity were K=R, D=E, S=T, I=L, V=M, and F=Y.

RESULTS

Spectral characterization of the bc₁ complexes. The dithionite-reduced spectra of the bc₁ complexes purified from *Polytomella* spp. and from its photosynthetic counterpart *C. reinhardtii* were recorded at room temperature. The fully reduced bc₁ complex of *Polytomella* spp. exhibited absorption maxima at 553 nm for cytochrome c₁ and at 567 nm for cytochrome b in the α -region of the spectrum (Fig. 1A). This gives rise to a double-peak spectrum of the bc₁ complex, in which the absorption maximum of cytochrome c₁ is clearly resolved from that of cytochrome b at room temperature. In contrast, the absorption spectrum of the dithionite-reduced bc₁ complex from the closely related alga *C. reinhardtii* (Fig. 1B) showed a maximum at 561.5 nm, corresponding to heme b, and a shoulder at 554.7 nm, characteristic of cytochrome c₁. This profile is similar to those of bc₁ complexes from several other organisms, including mammalian, plant, yeast, and bacterial bc₁ complexes, in which the absorption bands of cytochromes c₁ and b are overlapped. Thus, the b-type heme from *Polytomella* spp. exhibits a redshifted α -band, which seems to be unique to the bc₁ complex from this colorless alga. To understand the molecular basis of these spectroscopic differences, the mitochondrial gene encoding cytochrome b (*cytb*) of *Polytomella* spp. was cloned and sequenced.

*Characterization of the *cytb* Gene from *Polytomella* spp.* Two degenerate oligodeoxynucleotides were designed based on highly conserved regions of the *cytb* gene of *C. reinhardtii*. With these primers, a PCR-amplification product of 0.5 kb was obtained, using mtDNA from *Polytomella* spp. as a template. Nucleotide sequence analysis showed that it was an amplified product of the *cytb* gene that exhibited 68% similarity with the *cytb* gene from *C. reinhardtii*. The 0.8-kb PCR product was used as a probe to screen the *Hind*III mtDNA library of *Polytomella* spp. A single clone from this library (clone 9H) gave a positive signal in Southern blot analysis. Nucleotide sequencing of the 9H clone revealed the

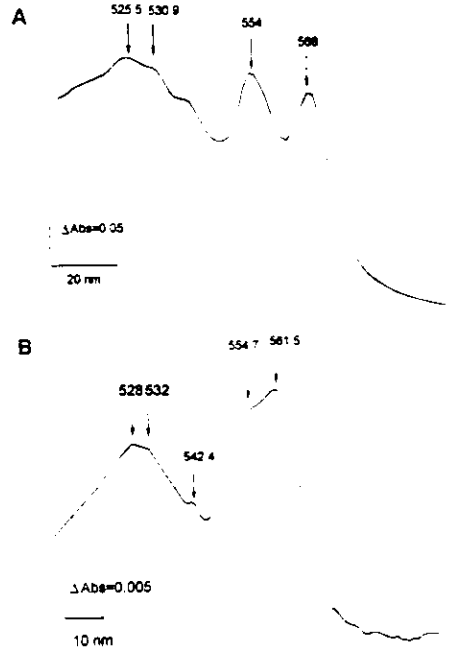


FIG. 1. Spectra of the dithionite-reduced bc₁ complexes from *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii*. A: The bc₁ complex from *Polytomella* spp. was diluted in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 2 mM EDTA and 0.1 mg/ml lauryl maltoside and was fully reduced with a few grains of dithionite. B: The bc₁ complex from *C. reinhardtii* was diluted in 20 mM Tris-acetate buffer (pH 7.0) containing 0.05% Triton X-100 and fully reduced with a few grains of dithionite.

presence of an open reading frame of 1029 bp encoding the 343 residues of the sequence of cytochrome b, including its N-terminus. Since clone 9H from the *Hind*III library did not contain the complete sequence of the *cytb* gene, an additional PCR amplification step with randomly synthesized decameric primers was carried out in order to obtain the sequence that encoded the carboxy-terminal region of cytochrome b (see Materials and Methods). The PCR products were transferred to a nylon membrane and hybridized with the *cytb* gene from clone 9H as a probe. Two different positive 1-kb products that contained the 3' end of the *cytb* gene were identified and sequenced.

The complete nucleotide sequence of the *cytb* gene from *Polytomella* spp. and the predicted primary struc-

(-184) aagcttgacttctatgatacactac
 aacgagaggtgacaaaccagcagatgcgacagcaagaaacacagcaaaccttaaccttaacgaaaggctttgctct
 tgcctagcttccctccatgagatcaagcttcatacactgctagccatagcttggcggcggcgaactcaacacgggcaaaa
 atg cgt tta cat caa aag aat aat atg cta cag ctt tat tac caa cac att gas gcc tac
 M R L X Q K N M L Q L Y Q N I R A A T T
 cca aca cct tgc aac cta aaa tac tct tgg aac atg ggc agt ctt tcc gca tca ctt tta
 P T P C E L K Y S W H M G S L S G L L L
 gct agc caa att gtc eca gga act ctt ttg gct atg cat tac tgc cca gat act tca ttg
 A S Q I V T Q I L L A M H C P D Y S L
 gca ttc tac agc gta att cat tta eca gtt gat gta oot tat gga ttt gca att cga tac
 A F Y S V T H L T V D V P T G P V I S Y
 ttt cac atg aat ggc gcc agc tta tto ttc gta gcc gta tto ttg cat tta ttc cga aac
 F H M H G A S L F F V A V F L E L P R H
 ttg tat tac aac agc ggc tgc caa cca cgc gag tta cta tac att agt ggt gtc gta ata
 L Y Y K S Q S Q P R H L L Y I S G V I I
 ctt cta cta atg gta ata eca gca ttc ata gga tac gtt tta cct tgg gga caa atg agt
 L L L H V I T A F I G Y L P W G R S
 ttc tgg ggc gct act gta atc acc agt ttg gta agt gct gtg cca ata gtt gct acc gta
 P W G A T V I T S L V S A V P I V T T D
 cct gtt tat tat tta tgg gga gga ttt agc gtt agc aac cca aag tta aac gcc ttc ttc
 L V T Y L E H G Q G V S H P Y L H R Y P
 agc ttc caa tat ctc tta eca ttt gta cta gcc ggt tta cca agt gca cca cta gct gct
 S P H Y L 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 ctc ata sat tca gta gca aaa gtt cca ttt
 L H S Y O S T H L S I P S V A H
 ggt tcc tac tac atc att aaa gac ctg ctg gcc ctt cta att att gga gca gct atg etc
 G S Y Y I I K D L L G V L I I G A M I
 gta tta gcc ttc ttc tta cca gag gct ctc aac cat tcc gac aat tac atc cca gca sat
 V L A P P P P X A L M H S D M Y I P A H
 cca tac agt aca cca gct csc atc gtc cca gca tgg tas ttc tta cca gtt tac gct att
 P Y S P P L S I V S H M Y L P V Y A I
 tta cga agc atc ccc gat aaa gga att ggt att tta gct gta tta ctg ttt ttc ata ggt
 L R S I P D X G I G I L A V L L P F I T G
 tta ggt tta cag cca ttc tta agc caa ggc aaa gct gas cca csc ttt tat gct tct ttc
 L G L G P L S G G K A H P H F Y A S P
 ata gga ggc tta tcc gtt ctg ggc tgg ctg ggc tca aaa gaa att aca gac gta ace agt
 I G G L F V L G W L G S X H I T D V T Z
 gca gcc cca agc ttc ttc aca tta ttc sea ttt gcc tas etc ttc gta gta agt cct tgg
 A P S P P T L F T F A Y L P V V S P L
 tcc agc tgg ctg tac aac cga gta aac ggt taa caaaccaaaaagaggaact (1116)
 T S L L L Y N R V K G

FIG. 2. Nucleotide sequence of the mitochondrial *cyt b* gene from *Polytomella* spp. The derived primary sequence of apocytochrome b is also shown.

F2

ture of the apocytochrome are illustrated in Fig. 2. The nucleotide sequence showed a continuous open reading frame of 1113 bp that was not interrupted by intervening sequences. Translation of the DNA sequence predicts a protein of 370 residues with a molecular mass of 41,226 Da. To corroborate that the deduced primary sequence was also present in the cytochrome b of the mitochondrial bc₁ complex from *Polytomella* spp., subunit III (35.5 kDa) was purified and subjected to 15 cycles of N-terminal sequencing. The identified residues are shown in Fig. 3. These first 15 amino acid residues were identical to those deduced from the nucleotide sequence (Fig. 2), indicating that the sequence of the mature and assembled cytochrome b is encoded by the *cyt b* gene. The predicted apoprotein of cytochrome b from *Polytomella* spp. shows a hydrophathy profile similar to those of cytochrome b from other organisms (data not shown) and fits the eight-transmembrane-helices structure (20). It contains the four invariant histidine residues (H₉₂, H₉₆, H₁₈₃, and H₁₉₇) that ligate heme b_L and b_H. In addition, it contains the other highly conserved residues found in the cytochrome b sequences and considered to be invariant (41): G₃₃, G₄₇, G₇₅, G₁₁₇, G₁₃₁, S₁₄₀, T₁₇₅, H₂₀₂, D₂₂₉, P₂₇₁, E₂₇₂, W₂₇₃, L₂₈₂, and G₂₉₁ (yeast numbering). Notably, the completely conserved residue W₁₁₄ was

substituted by a tyrosine in the *Polytomella* spp. cytochrome b sequence. The derived sequence of apocytochrome b of *Polytomella* spp. was also compared with the one from *C. reinhardtii* (28, 42), revealing an identity of 56% and an overall similarity of 68% (Fig. 4). This similarity is less evident in the carboxy-terminal

F4

F3

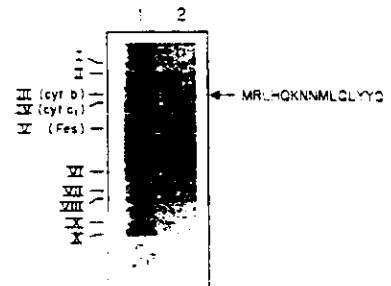


FIG. 3. N-terminal sequence of cytochrome b (subunit III) of the bc₁ complex from *Polytomella* spp. Lane 1, purified bc₁ complex from *Polytomella* spp. The 10 subunits which constitute the complex are indicated (26). Lane 2, the N-terminal sequence of the purified 35.5-kDa polypeptide (subunit III) is shown.

		2nd					
		U	C	A	G		
U	Phe 18 5	Ser 3 7	Tyr 9 5	Cys 0 1	U		
	Phe 20 20†	Ser 3 1	Tyr 17 17	Cys 2 2†	C		
	Leu 2 9	Ser 3 0	Stop 1 1	Stop 0 0	A		
	Leu 8 27	Ser 1 0	Stop 8 0	Trp 6 11	G		
C	Leu 7 5†	Pro 6 1	Val 7 2†	Arg 1 5	U		
	Leu 8 11	Pro 1 0†	Val 12 12	Arg 2 2	C		
	Leu 7 18	Pro 17 18	Gln 8 9†	Arg 4 9	A		
1st	Leu 4 1†	Pro 6 0	Gln 3 2	Arg 9 0†	G		
	Ala 13 16	Thr 1 14	Asn 1 0	Ser 3 7	U		
A	Ala 7 11	Thr 2 7	Asn 8 15	Ser 14 10	C		
	Asp 7 3	Thr 58 0	Lys 7 5	Arg 6 0	A		
	Met 8 15	Thr 1 0	Lys 1 0	Arg 6 0	G		
G	Val 3 4	Ala 14 21	Asp 4 3	Gly 1 22	U		
	Val 3 7	Ala 7 8	Asp 3 4	Gly 7 5	C		
	Val 14 19†	Ala 6 0	Glu 4 0	Gly 5 2	A		
	Val 4 1	Ala 6 0	Glu 3 5	Gly 1 0	G		

FIG. 6. Comparison between the codon usage of the mtDNA sequences of *cytb* from *Polytomella* spp. and from *C. reinhardtii*. Boxes indicate the main differences in codon usage. Codon usages were derived from the sequences of *cytb* from *Polytomella* spp. (bold characters, this study) and from *C. reinhardtii* (25).

pombe (44), *Aspergillus nidulans* (45), *Neurospora crassa* (46), or the related alga *C. smithii* (47).

The deduced primary structure of cytochrome b from *Polytomella* spp. exhibited similarity with its green

counterparts *C. reinhardtii* and *C. smithii*, clearly affiliating with these two species in a phylogenetic analysis and thus providing additional evidence for the close relationship between the genus *Polytomella* and the genus *Chlamydomonas*. The similarity between the cytochromes b from *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii* is significantly higher in the N-terminal regions (67% identity), including the first four transmembrane helices, than in the C-terminal part (49% identity), consistent with all other sequences of apocytochrome b (41, 48, 49).

Although the apocytochromes b from *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii* share highly similar amino acid sequences (56% identity), the cytochromes exhibit different spectroscopic properties when assembled in the mitochondrial bc₁ complex (Fig. 1). In *Polytomella* spp., the maximum absorption peak of cytochrome b is shifted 3–4 nm to the red, compared with its counterpart in *C. reinhardtii*.

Residue Y₁₁₄ and possibly S₃₆ may confer the atypical spectroscopic characteristics on the b_H heme of *Polytomella* spp. A comparison of the primary structures of the b-type cytochromes from *Polytomella* spp. and all other species, including the closely related alga *C. reinhardtii*, shows the unique substitution of W₁₁₄ for Y (yeast numbering). Based on the eight-transmembrane-helices structure, we propose that S₃₆ and Y₁₁₄

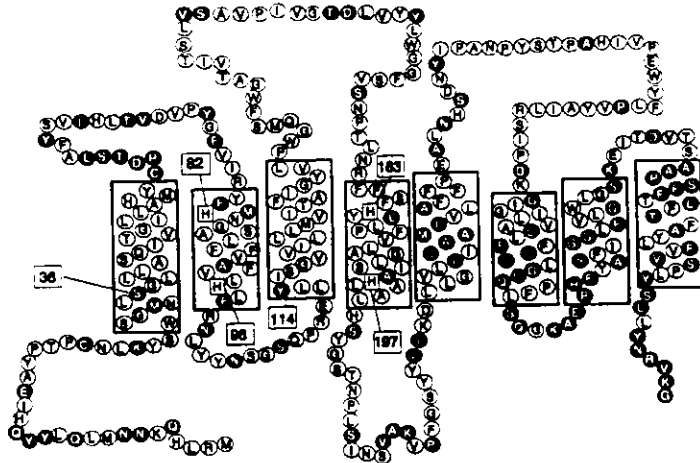


FIG. 7. Proposed transmembrane structure of cytochrome b from *Polytomella* spp. A model based on hydropathy plots that proposes eight transmembrane segments (A to H), with amino and carboxy termini exposed to the mitochondrial matrix surface. The model also shows a comparison of amino acid residues between *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii*. Identical residues are shown in white circles, conserved residues in gray, and variant residues in black. The four invariant histidines that bind the hemes are indicated, as well as residues S₃₆ and Y₁₁₄.

TWO UNUSUAL RESIDUES IN *Polytomella* CYTOCHROME b

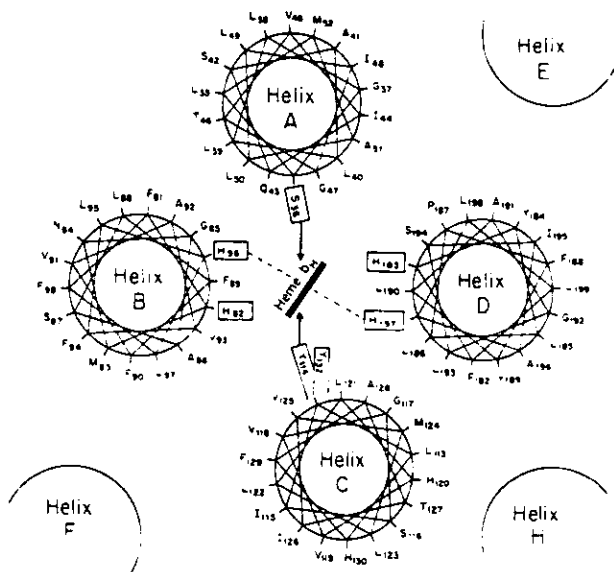


FIG. 8. Helical wheel representation of helices A to D of *Polytomella* spp. cytochrome b as seen from the mitochondrial intermembrane space. The bars of histidines that bind the heme groups are H32, 96, 163, and 197. The two putative changes in the amino acid residues that may interact with the b_L heme group are S₄₄ in helix A, and Y₁₁₄ in helix C. The position of residue Y₁₂₅, exactly 18 amino acids away from Y₁₁₄, is also depicted (see text).

FT
 FN

are likely to be in close proximity to the b_H heme in *Polytomella* spp. (Figs. 7 and 8). Tryptophan 114 is one of the invariant amino acids present in all cytochromes b sequenced to date (41). Although the exchange Trp to Tyr is relatively common in members of the same protein family, the fact that this occurs only in *Polytomella* spp. at position 114 could be related to the unusual spectroscopic properties of cytochrome b. The aromatic residues surrounding the heme groups seem to maintain a tightly packed hydrophobic environment around these prosthetic groups and must contribute to their spectroscopic properties. As discussed by Mathews (50), cytochrome b_{562} from *E. coli* and the cytochrome c' monomer from *Rhodospirillum rubrum* have highly similar three-dimensional structures, and the heme group is located in very similar structural environments in the two proteins. The large differences in the spectroscopic properties of the two hemes are the result of differences in the amino acids that surround these prosthetic groups, particularly tryptophans, tyrosines, and phenylalanines.

Using computer simulations, Link *et al.* (51) proposed a model of the amino acid residues that constitute the environments of hemes b_L and b_H . In this model heme b_H is surrounded by three tryptophan residues, W₂₉, W₃₀, and W₁₁₄ (yeast numbering). It is relevant that W₁₁₄ was predicted to have an angle of 70° at a distance of 3.2 Å from heme b_H . X-ray crystallography of the bovine bc_1 complex (20) has confirmed a closest distance of 4 Å between this residue and heme b_H (Chang-An Yu, personal communication). The replacement of W₁₁₄ by Y₁₁₄ in *Polytomella* spp. cytochrome b maintains the aromatic character of the residue, but introduces differences regarding the size and H-bonding capacity of the amino acid group. Tyrosine 114 could produce a different electronic environment around the b_H heme, delocalizing electrons of the tetrapyrrole ring in a manner different from that of tryptophan.

Only a few inhibitor-resistant mutations of cytochrome b have been characterized in *C. reinhardtii*. Bennoun *et al.* (52) described a Y_{132C} mutation that

confers resistance to the inhibitors myxothiazol and mucidin. Data obtained with this mutant suggest a close proximity of Y_{132} to the b_H heme, an essential component of the Q_x center. This residue is also present at position 132 of the deduced *Polytomella* spp. cytochrome b sequence. When the α helix modeling is carried out on the C transmembrane stretch, Y_{132} is found to lie 18 residues away from Y_{114} , which as suggested here would interact with the b_H heme (Fig. 3). This face of the C transmembrane α helix would be exposed to the space in which both heme moieties are present, and thus Y_{114} must be located near the b_H heme and Y_{132} near the b_L heme. These data are in accord with the proposal made here of a close proximity of Y_{114} with the b_H heme.

The precise nature of the protein factors that determine the optical properties of b-type cytochromes is not known. However, it is most likely that the electronic density and relative polarity of the heme pocket influences the magnitude and polarization of the orthogonally polarized transitions of the heme group (Q_X, Y) that determine the α -band (53). In this view, the proximity and orientation of electron-dense aromatic groups close to the tetrapyrrole ring should have a dominant effect on the properties of the electronic transitions, thus influencing their optical absorption band. In the case of *Polytomella* spp. cytochrome b, it is feasible that Y_{114} alone or in combination with S_{16} introduces an electronic environment distinct from that in other species that have W_{114} , so that the energy levels of the Q_X and Q_Y transitions are much more separated. This induces a splitting of the α -band of the b_H heme, when normally they are so close that they fuse into a single band of larger width (25). To our knowledge, this is the first documented case of a natural variation of a single amino acid that may confer detectable differences in the spectroscopic characteristics of a heme moiety in a b-type cytochrome. The present results also predict that site-directed mutagenesis $Y_{114}W$ on the *Polytomella* spp. *cytb* gene or, alternatively, the $W_{114}Y$ mutation on the *C. reinhardtii* gene should alter the spectroscopic properties of their respective b_H hemes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the technical expertise of Dr. Laura Ongay (Unidad de Biología Molecular, IFC, UNAM) in the synthesis of *cytb* oligodeoxynucleotides. We are grateful to Drs. M. Degli Esposti, C. Gomez-Lojero, A. Gomez-Puyou, E. B. Gutierrez-Cirlos, and D. W. Krogmann, for helpful discussions and critical review of the manuscript. This work was supported by Grants IN-204595 from DGAPA, UNAM, and 2260P-N from CONACYT, Mexico.

REFERENCES

1. Aragno, H. (1910) *Mem. Inst. Osiologico Cuzco* 2, 40-57.
2. Pringsheim, E. G. (1955) *J. Protozool.* 2, 137-145.
3. Wise, D. L. (1959) *J. Protozool.* 6, 19-23.
4. Melkonian, M. (1990) in *Handbook of Protozoists* (Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J., Eds.), pp. 608-616, Jones & Bartlett, Boston.
5. Preisig, H. R., and Melkonian, M. (1984) *Plant Syst. Evol.* 146, 57-74.
6. Round, F. E. (1980) *Biosystems* 12, 61-69.
7. Mattox, K. R., and Stewart, K. D. (1984) in *Systematics of the Green Algae* (Irvine, D. E. G., and John, D. M., Eds.), pp. 29-72, Academic Press, London.
8. Conner, T. W., Thompson, M. D., and Silflow, C. (1989) *Gene* 84, 345-358.
9. Melkonian, M., and Surek, B. (1995) *Bull. Soc. Zool. Fr.* 120, 191-208.
10. Antaramian, A., Coria, R., Ramirez, J., and Gonzalez-Halphen, D. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 198-202.
11. Atteia, A., Dreyfus, G., and Gonzalez-Halphen, D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 275-284.
12. Trumppower, B. L., and Gennis, R. B. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 675-716.
13. Gonzalez-Halphen, D., Lindorfer, M. A., and Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* 27, 7021-7031.
14. Akiba, T., Toyoshima, C., Matsunaga, T., Kawamoto, M., Kurota, T., Fukuyama, K., Namba, K., and Matsubara, H. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 553-561.
15. Saraste, M. (1984) *FEBS Lett.* 166, 367-372.
16. Widger, W. R., Cramer, W. A., Herrman, R. G., and Trebst, A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 674-678.
17. Crofts, A. R., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S., and Berry, E. (1987) in *Cytochrome Systems, Molecular Biology and Bioenergetics* (Papa, S., Chance, B., and Ernster, L., Eds.), pp. 617-624, Plenum, New York.
18. Yun, C. H., Van Doren, S. R., Crofts, A. R., and Gennis, R. B. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10967-10973.
19. Yun, C. H., Crofts, A. R., and Gennis, R. B. (1991) *Biochemistry* 30, 6747-6754.
20. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurn, A., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) *Science* 277, 60-66.
21. Mitchell, P. (1976) *J. Theor. Biol.* 62, 327-367.
22. Trumppower, B. L. (1981) *J. Bioenerg. Biomemor.* 13, 1-24.
23. de Vries, S., Albracht, S. P. J., Berden, J. A., and Slater, E. C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11996-11999.
24. Robertson, D. E., and Dutton, P. L. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 935, 273-291.
25. Howell, N., and Robertson, D. E. (1993) *Biochemistry* 32, 11162-11172.
26. Gutierrez-Cirlos, E. B., Antaramian, A., Vazquez-Acevedo, M., Coria, R., and Gonzalez-Halphen, D. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9147-9154.
27. Cantor, M. H., and Burton, M. D. (1975) *J. Protozool.* 22, 135-139.
28. Michalakis, G., Vahrenhoiz, C., and Praty, E. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223, 211-216.
29. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
31. Atteia, A. (1994) *C. R. Acad. Sci. Ser. III* 317, 11-19.
32. Atteia, A., and Franzen, L.-G. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 792-799.

TWO UNUSUAL RESIDUES IN *Polytomella* CYTOCHROME b

9

- 33 Chua, N. H., Mathis, K., and Bennoun, P. (1975) *J. Cell Biol.* **67**, 361-377.
- 34 Schagger, H., Aquila, H., and von Jagow, G. (1975) *Anal. Biochem.* **173**, 201-205.
- 35 Vazquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N., and Gonzalez-Halphen, D. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 401-410.
- 36 Schagger, H., Link, T. A., Engel, W. D., and von Jagow, G. (1996) *Methods Enzymol.* **126**, 224-237.
- 37 Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- 38 Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- 39 Kimura, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- 40 Reeck, G. R., de Haen, C., Teller, D. C., Doolittle, R. F., Fitch, W. M., Dickerson, R. E., Chambon, P., McLachlan, A. D., Margoliash, E., Jukes, T. H., and Zuckerkandl, E. (1987) *Cell* **50**, 667.
- 41 Degli Esposti, M., de Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., PartaneLo, T., and Meyer, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 243-271.
- 42 Ma, D. P., Yang, Y. W., King, T. Y., and Hasnain, S. E. (1990) *Plant Mol. Biol.* **15**, 357-359.
- 43 Nobrega, F. G., and Tsagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 9828-9837.
- 44 Zimmer, M., Wesler, F., Oraler, G., and Wolf, K. (1987) *Cell Genet.* **12**, 329-336.
- 45 Waring, R., Davies, R. W., Lee, S., Grist, E., McPhan, Berks, M., and Scuzzocchio, C. (1981) *Cell* **27**, 4-11.
- 46 Burke, J. M., Breitenberger, C., Heckman, J. E., Dujon, B., and RayBhandary, U. L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 504-511.
- 47 Colleaux, L., Michel-Wolwertz, M. R., Matagne, R. F., and Dujon, B. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223**, 288-296.
- 48 Howell, N. (1989) *J. Mol. Evol.* **29**, 157-169.
- 49 Irwin, D. M., Kocher, T. D., and Wilson, A. C. (1991) *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144.
- 50 Mathews, P. S. (1985) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **45**, 1-56.
- 51 Link, T. A., Wallmeier, H., and von Jagow, G. (1994) *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 197-203.
- 52 Bennoun, P., Delosme, M., Godehart, L., and Kuck, M. (1992) *Mol. Gen. Genet.* **234**, 147-154.
- 53 Gouterman, M. (1961) *J. Mol. Spectrosc.* **6**, 15-16.

RESULTADOS ADICIONALES:

Transformación de la mutante carente de citocromo *b*: *dum1* de *C. reinhardtii*.

Cuando comparamos el gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp. con el citocromo *b* de *C. reinhardtii* pudimos observar dos cambios significativos en las posiciones 36 y 114, este último es un triptofano invariable en todas las secuencias reportadas hasta la fecha. Estos datos nos hicieron pensar que tal vez estos aminoácidos son los responsables del corrimiento hacia el rojo en el espectro del citocromo *b* de *Polytomella* spp. reportado por Gutiérrez-Cirios y col. (1994).

Para poder comprobar esta hipótesis contábamos con la mutante *dum 1* carente del citocromo *b* descrita por Matagne y col. (1989). Como mencionamos en la introducción, esta mutante no es capaz de crecer en acetato como fuente de carbono, ni en la oscuridad, por lo que se pueden seleccionar las transformantes, creciéndolas en estas condiciones. Decidimos por lo tanto transformar la mutante con el gen silvestre de *C. reinhardtii*, con la mutante S36, la mutante Y114, la doble mutante y con el gen de *Polytomella* spp.

Para poder lograr nuestro objetivo se amplificó el gen del citocromo *b* de *C. reinhardtii*, utilizando como templado DNA total de este organismo y dos oligodesoxinucleótidos en las posiciones 450pb y 1750 pb del gen reportado en el *GenBank*, el gen fue amplificado y clonado en el vector PCRTM^{II}, como se describió en materiales y métodos (figura 5 del anexo I).

Una vez que tuvimos varias clonas se secuenciaron al menos dos para verificar que no tuvieran ningún error.

A partir de estas clonas se realizaron dos PCRs con los oligodesoxinucleótidos específicos para crear los cambios A36S y W114Y, primero se hizo un PCR con los oligodesoxinucleótidos que llevan los cambios y el oligodesoxinucleótido de la posición 1750, el producto de estos PCR se utilizó como cebador para la siguiente reacción con el desoxi oligodesoxinucleótido 450 para amplificar el gen completo. Los productos del segundo PCR se clonaron y secuenciaron como se muestra en la figura 6 del anexo I.

Para construir la doble mutante se cortaron los plásmidos que contienen el gen de citocromo *b* de *C. reinhardtii* con los cambios en la S36 y en la Y114 con la enzima *AccI* que corta en dos sitios diferentes que separan justamente las posiciones 36 y 114. Con esta enzima se generaron dos fragmentos, uno que contenía el plásmido y un fragmento del gen hasta después de la S36 y otro fragmento pequeño de 600 nt que incluye la Y114. Estos fragmentos se purificaron, el plásmido con el fragmento que incluyó la posición S36 y el fragmento que lleva la Y114, se ligaron ambos fragmentos, se transformaron células competentes y se secuenció una clona para comprobar que tenía ambos cambios (figura 7 del anexo I).

En la transformación se utiliza 1 µg del DNA de interés, como control positivo se utiliza DNA mitocondrial entero de *C.reinhardtii* (se obtienen 11 transformantes) y como control negativo se crece la mutante *dum1* (no crece nada) se crecen las células en la oscuridad en acetato como fuente de carbono, durante 8-12 semanas.

Hasta ahora se ha transformado con éxito la mutante *dum 1* con el citocromo *b* silvestre, se obtuvieron dos transformantes que están siendo analizadas para comprobar la inserción del gen del citocromo *b* en el genoma mitocondrial y localizar su sitio de inserción. Otra opción es que el gen se insertó en el genoma nuclear, esta posibilidad nos parece muy remota pues el gen tuvo que insertarse después de un sitio donde exista una posible presecuencia y antes de un sitio de poliadenilación, transcribirse sin importar el uso de codones para posteriormente importarse hasta la mitocondria. Una tercera opción sería que la apoproteína fuera importada al interior de la mitocondria sin necesidad de una presecuencia y que es capaz de transcribirse en el núcleo y traducirse en el citoplasma, con las características que lleva el gen mitocondrial. La transformación de la mutante *dum 1* con las otras construcciones se está llevando a cabo en el laboratorio de los Dres. Boynton y Gillham (Duke University).

El gen COX2 de *Polytomella* spp:

Debido al interés que tenemos en el laboratorio de caracterizar el DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. y su similitud con los miembros del género *Chlamydomonas*, pensamos que esta alga incolora es un buen modelo para localizar el gen COX2, esperando que al igual que en *Chlamydomonas* se encuentre codificado en el núcleo. Esto nos llevaría a analizar el tipo de importación que requiere esta proteína, que en la gran mayoría de los organismos es mitocondrial, a excepción de algunas plantas angiospermas y en *C. reinhardtii*.

Para lograr esto se purificó en el laboratorio la citocromo c oxidasa de *Polytomella* spp. y se transfirió a membranas de polivinildifluoro una banda que reaccionaba con el anticuerpo que reconoce la subunidad II de la citocromo c oxidasa de levadura. Se obtuvo la secuencia del extremo amino-terminal y una secuencia interna de esta subunidad (figura 9 del anexo I). Estas secuencias mostraron 65 % similitud con el gen que codifica para la subunidad II de la citocromo c oxidasa de chícharo, como se muestra en la figura 15. De esta forma pudimos comprobar que en efecto se trataba de la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *Polytomella* spp.

Chicharo 1 MKLEWLFLTI APCDAAEPWQ LGFQDAATPM MQGIIDLHHD IFFFLILILV
Polytomella Amino-terminal: EAPVAWQ LGFQDSATSQ AQA

51 FVSRILVRAL WHFHYKKNPI PQRIVHGTTI EILRTIFPSI IPMFIAIPSF

101 ALLYSMDGVL VDPAMTIKAI GHQWYRTY EY SDYNSSDEQS LTFDSYTIPE

151 DDLELGQSG L LEVDNRVVVP AKTHLR IIVT PADVPHSWAV PSLGVKCDAV
 secuencia interna: XMDAI

201 PGRLNQISIB VQREGVY YGQ CSEICGTNHA FPIVVEAVPS KDYGSRVSNQ
 PG-LNQIWL T INREG

251 LIPQTGEA

Figura 15: Comparación de las secuencias del extremo aminoterminal y de una región interna de la proteína identificada como la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *Polytomella* spp. Comparación con la secuencia de la subunidad II de chícharo.

Amplificación del gen COX2 mediante PCR :

Con la secuencia aminoterminal de la proteína y con la secuencia interna se diseñaron diferentes oligodesoxinucleótidos degenerados (para abarcar todo el posible uso de codones) como se muestra en la figura 9 del anexo I. Estos oligodesoxinucleótidos se utilizaron para amplificar el gen COX2 de *Polytomella spp* utilizando como molde DNA total de este organismo. Para lograr este objetivo se utilizó la técnica de "PCR en descenso" con diferentes concentraciones de magnesio. De esta amplificación se obtuvieron diferentes bandas de diversos tamaños, sin embargo, no teníamos manera de saber de qué tamaño sería la banda con el amplificado del gen COX2 puesto que podía tener intrones. Tampoco contábamos con una sonda adecuada para identificar por hibridación la banda correcta. Dadas estas circunstancias llevamos a cabo un segundo PCR "anidado" con los oligodesoxinucleótidos más internos que teníamos (figura 9 y 10 del anexo I) y en este segundo PCR se obtuvieron algunas bandas notablemente más intensas, por lo que decidimos clonar y secuenciar las 7 bandas más intensas de los diferentes PCR.

De estos 7 productos clonados al menos tres productos de PCR presentaron la misma secuencia con cambios de 1 ó 2 nucleótidos, la secuencia de nucleótidos traducida a aminoácidos es la siguiente:

QDSATSQAQA SPSFRAELKD KLKAALLSKV PASQPIQYNF DSYMVTDVQP

GQLRMLEVDE RLVLPNTLV RLLVTASDVI HSAWVPSLGI **KMDAIPGRLN**

Los aminoácidos subrayados y en negritas corresponden a los oligodesoxinucleótidos diseñados para amplificar el fragmento.

Esta secuencia se comparó con otras secuencias reportadas del gen COX2 comprobando que es una parte de este gen; en la figura 16 se pueden apreciar la comparación del producto de PCR traducido a aminoácidos con la secuencia de

aminoácidos de los genes *COX2* de chicharo y de *Tupaia glis* . Los otros productos de PCR fueron amplificadas inespecíficos que no tienen nada que ver con el gen de interés.

El producto de PCR es de 300 nucleótidos y no es el gen completo.

Para poder obtener el gen completo realizamos digestiones con diferentes enzimas del DNA total de *Polytomella* spp. y se corrieron en un gel de agarosa al 1 % utilizando como marcador λ *EcoRIHindIII*

A continuación amplificamos radioactivamente el producto de PCR con los mismos oligodesoxinucleótidos y el plásmido con la secuencia parcial del gen *COX2* como molde, utilizando dCTP ³²P para usar el producto como sonda radiactiva en una réplica tipo Southern de DNA total de *Polytomella* spp. digerido con diferentes enzimas (ver figura 17).

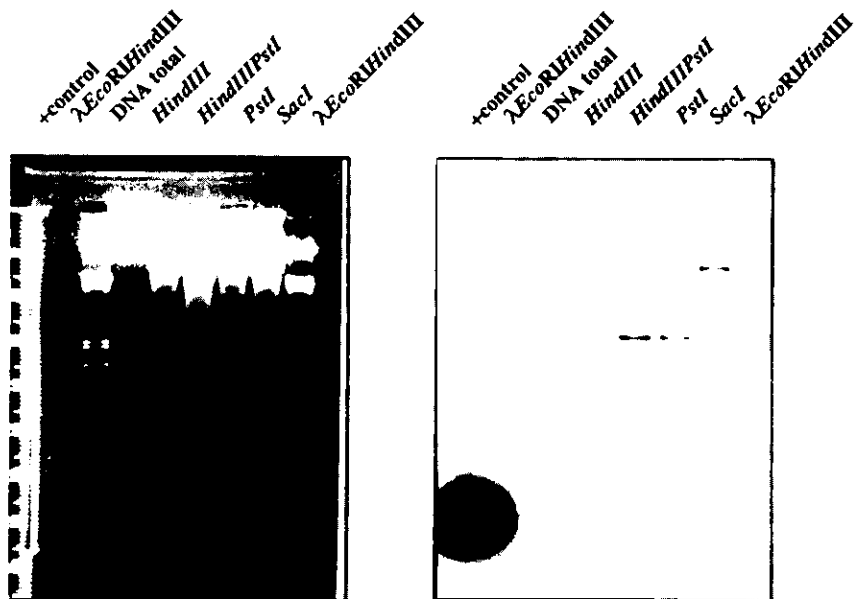


Figura 17: Hibridación del Southern con DNA total de *Polytomella* spp. digerido con diferentes enzimas usando como sonda el producto de PCR marcado radiactivamente.

Como se puede apreciar en la figura 17, obtuvimos una señal intensa en la digestión con *Pst*I de una banda de alrededor de 2kb. A continuación decidimos construir un minibanco con la región de 2 kb que nos dió señal, para lo cual se digirieron 30 µg de DNA total de *Polytomella* con la enzima *Pst*I y el plásmido *BlueScript* con la misma enzima, se realizó una ligación durante toda la noche y se transformaron células competentes DH5α de *Escherichia coli*, de esta transformación se obtuvieron alrededor de 60 clones diferentes, las cuales se crecieron en parche y se transfirieron a nylon (figura 11 del anexo I). Se hibridó nuevamente con el producto de PCR de *COX2* y se seleccionaron 6 posibles clones positivas.

Se purificó el plásmido de estas 6 clones los cuales se transfirieron a un nylon mediante la técnica de Southern (1979), el nylon se hibridó nuevamente en las mismas condiciones utilizadas anteriormente y obtuvimos una señal positiva en la clona 1, (figura 18).

Por otro lado para comprobar cuál de las clones obtenidas tenía el gen *COX2*, hicimos una amplificación mediante la técnica de PCR con el DNA de la clona 1 y el DNA de la clona 6 que fueron las que mejor reacción dieron y los oligos F2 y B1. Como se puede apreciar en la figura 19 solo la clona 1 amplificó el producto de PCR con el tamaño esperado de 300 nucleótidos. Con estos resultados pudimos concluir que la única clona que contiene el gen *COX2* es la clona 1, por lo que procedimos a secuenciarla

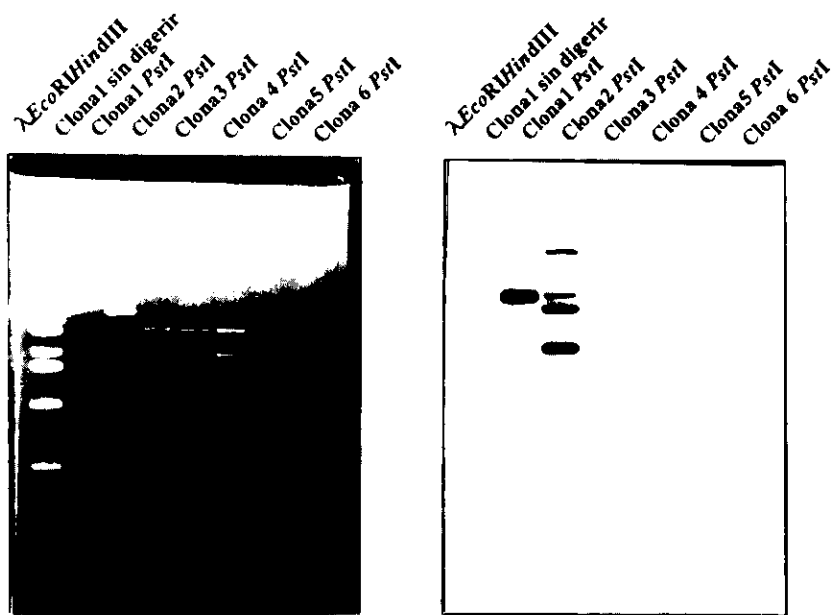


Figura 18: Southern de las seis clonas que dieron una señal positiva del minibanco de *PstI*, 5 µg de cada plásmido digeridos con *PstI*, transferidos a nylon e hibridados con el producto de PCR de COX2.

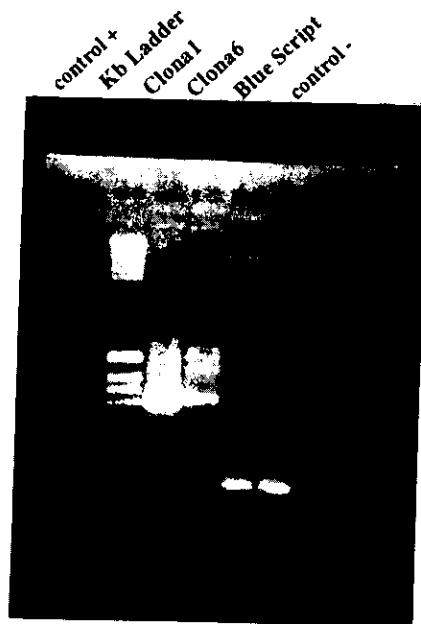


Figura 19: Amplificación por PCR con los oligodesoxinucleótidos F2 y B1 de las clonas 1 y 6.

Secuencia de la clona 1 del minibanco de *Pst*I:

La clona 1 se secuenció totalmente con el kit de Thermosequenase con dideoxinucleótidos marcados con P³³ (*Amer sham*), si se traduce a aminoácidos esta secuencia se puede encontrar el marco de lectura abierto del gen COX2:

```
CTACTACTACGGGATTTCCTTTTTAGTGTTCTAAAACGAATAATAATATATAAAAATCTATT
L L L R D S F L V F * N E * * Y I K S I
TTCTCAATGTGGAATCGTATACGTTGTCGTATCGTCGACAATAATGCAATAAGTGTTTAT
F S M W N R I R C R I V D N N A I S V Y
AGAAAACACTAAAGGAATACTATACAAGTATGGCGAACAATAAATAAATACGACTCACCT
R K H * R N T I Q V W R T I N K Y D S P
ACAAGGTATGGACTTATATGACGAAATATTTAACATTTTAATAAAAAAGACTAGGCAATC
T R Y G L I * R N I * H F N K K D * A I
AAGAGATGACGTTCGAAGACCCCGATAGTTGCGAATAAAATACAAATTTAGTAAATTTAA
K R * R S K T P I V A N K I Q I * * I K
ACAATATAATTCTATAGCAATTAAGAACTTCCAATCCTTATCGACTGGAAGGAATTGG
T I * F Y S N * R N F Q S L S T G R N W
GTGTGAGTGGGGCACATTTTCAATATTGAAAGTTGACATTACTAATTTCTATTTTCGTTGT
V * V G H I F N I E S * H Y * F L F R C
GCTAAATCTAATTACTTATGATTGGTCTAATTTTGGCAATTAATTTATCATCCTGCCACT
A K S N Y L * L V * F W Q L N Y H P A T
GGTATTCTCAATAAATCGTATAATAGCTACATCTGTGATTTTATTTTCGCGCATTTCATT
G I L K * I V * * L H L * F Y F R A F I
TTTTCTATGTTAAAACATGGCATCAGTATTTTATCAATCAATCCTTGAGGTGTAGCCTTG
F S M L K H G I S I L S I N P * G V A L
AAAATTATGAGTAATTTATATAAACCGTGAAATGCTAACGTGGGAAGTCACTTTTCCTCTT
K I M S N L Y K P * N A N V G S H F P L
```

TGTTCTCTATTTAAGGCAAATATAATCATATACGCTTATTTTTATTCTTTGAATTGTGTC
C S L F K A N I I I Y A Y F Y S L N C V

ATTCTATTCTAATTGTTTTATACATACAAGTAGCTTTGTTCAACCATTAATAGTTAGGTT
I L F * L F Y T Y K * L C S T I N S * V

CTATAATTGAAGTCAACCGAATATTTCCGAACTAACGGTGAGTGACGTGTGATTTGCGCT
L * L K S T E Y F E T N G E * R V I C A

TGGAAAAGGAGCGGTATGGAGTACCAGCTGAAGGAAAAGTAACCCGGTTATAAGCGGTGC
W K R S G M E Y Q L K E K * P G Y K R C

AATAATAAAGGCTTAGTACCCCTCGTTAAGCGGTTTGTAATATCATCAAAGAGCCATAATC
N N K G L V P L V S G L * Y H Q R A I I

GAAATGTCGGATGCTAAGGACCAGCTCAAGGAGCAGCTCAAGGCCAGCCCTAGCTTCAGG
E M S D A K D Q L K E Q L K A S P S F R

GCTGAGTTGAAGGACAAGCTGAAGGCTGCCCTCCTCTCCAAGGTGCCTGCCTCCCAGCCC
A E L K D K L K A A L L S K V P A S Q P

ATTCAGTATAACTTTGACAGTTACATGGTTACTGATGTTTCAGCCTGGTCAGCTCCGATG
I Q Y N F D S Y M V T D V Q P G Q L R M

CTTGAGGTCGATGAGCGCCTTGTTCTCCCTACTAACACCCTCGTTCGCCTCCTCGTCACC
L E V D E R L V L P T N T L V R L L V T

GCCTCTGATGTGATTCACTCTTGGGCTGTCCCTCCCTCGGTATTAAGATGGATGCTATC
A S D V I H S W A V P S L G I K M D A I

CCTGGTCGTCTTAACCAGATCTGGTTGACCATTAACCGTGAGGGTGTTTTCTATGGTCAG
P G R L N Q I W L T I N R E G V F Y G Q

TGCTCTGAGATTTGCGGAGCTAACCATTCTTTTCATGCCCATCGTCGTTGAGGCCATCTCT
C S E I C G A N H S F M P I V V E A I S

CCCAGGGCCTTCCTCACTGAGTACGTCAAGAAGTGGATTCAAGTAAATGTCATTTTATATG
P R A F L T E Y V K K W I Q * M S F Y M

CTAAGAAGTCATGGTCTTAACAGCTTATTTTTAATAAACTATAAATAAATTGTAATT
L K K S W S * T A Y F L I N Y K * I V I

TTTAGTTACTTTTCTTACCATTTGTTTGTAAGATTAATACTTAAATATTTTTTATTTAAG
F S Y F S Y H L F V R L I L K Y F L F K

GCGTATTATATTATTTACAGTTTTGAAATTTTGGCACAGTTTCTATGGGTCCGTCTTTT
 A Y Y I I L Q F * I F G T V S M G P S F
 ATTTTTTTTGGACTTGGCATAATGTCCTTATATTGAGCTATGTCTAAAAAGGTTTATTT
 I F F G L G I M S L Y * A M S K K G L F
 TCTTGAAATGGTTAAGCAAGGTGGTGAGSTGGATTTAGTTAAGTTTATTGAGCAAGGGCA
 S * N G * A R W * G G F S * V Y * A R A
 ACTTATAAAAGGTTTGAACACAAGTTTTAAGGTATAAGACGTTTACTTAATATTTATTTTC
 T Y K R F E H K F * G I R R L L N I Y F
TGTAATTAAATAATTTTGAATGATTATTAAGTTATTATAAATTTAAATTTCTCACATAGTT
 C N K * F * N D Y * L I I N * N S H I V
 TCGATATTTTTTTTCGGCTTCTTACTTCATTTTTATAATTAAGTAAAGTGATATTTAAA
 S I F F S A S Y F I F I I K V K V Y I K
 CGAGTAAAGGGAAATTTCTACTTAAAAGCACTATAAATTTACTTATGTTGCCATTTTTAATT
 R V K G N S T * K H Y K L L M L P F L I
 TGCAAAAGGCAGAGGTGGAAAATATGCAGATATAAGAAAGTTAAGAGTTTTTTTTTCGTGA
 C K R Q R W K I C R Y K K V K S F F S *
 AAATAGGGAGATAATCGTACTGCAG
 K * G D N R T A

Figura 20: Secuencia y traducción a aminoácidos de la clona 1 de *PstI*. En negritas y subrayados están los posibles sitios de término del intrón, alrededor del nucleótido 960 donde empieza el marco de lectura abierto marcado con negritas y subrayado el sitio de unión al Cu, el **codón** de término se encuentra en el nucleótido 1427. En los recuadros de los nucleótidos 1499-1503 y de los nucleótidos 1806-1810 se marcan los únicos dos posibles sitios de poliadenilación de acuerdo a lo reportado por Conner y col. (1989).

En la traducción a aminoácidos se puede apreciar que hacia el extremo 3' se encuentra el gen hasta el codón de término, pero hacia el extremo 5' no se localiza la metionina inicial ni la secuencia correspondiente al extremo amino-terminal que se obtuvo de la secuencia de la proteína (EAPVAWQLGFQDSATSQAQA).

Estos datos nos sugieren que el gen posee un intrón de alrededor de 900nt, sin embargo, el tamaño exacto solo se podrá conocer cuando se obtenga la secuencia completa del DNA genómico. Suponemos que de acuerdo al tamaño de la proteína nos faltan alrededor de 100 aminoácidos.

La secuencia traducida a aminoácidos del marco de lectura abierto se comparó nuevamente con la traducción a aminoácidos de los genes *COX2* de chicharo y *Tupaia glis* como se muestra en la figura 21.

Por otro lado se construyó el cladograma, al igual que hicimos para el gen del citocromo *b* utilizando esta vez la secuencia del gen *COX2* de 18 especies diferentes (figura 22), en esta ocasión el gen de *C. reinhardtii* no ha sido secuenciado y como no se tiene la secuencia completa del gen *COX2* de *Polytomella* spp. no encontramos una relación clara con ningún organismo, hay que esperar la obtención del gen completo para poder terminar este análisis.

Otro aspecto importante para el análisis del gen es obtener el uso de codones puesto que existen diferencias entre el uso de codones entre los genomas mitocondriales y nucleares, por lo que obtuvimos el uso de codones del fragmento del gen *COX2* que tenemos de *Polytomella* spp. (figura 23), este es diferente a los encontrados en los genes mitocondriales de *Polytomella* spp.: *citb*, *COX1*, *nad4* y *nad2*, lo que nos hace pensar que no es mitocondrial, estas diferencias se hacen evidentes en la tabla I (pag 60).

Polytomella x Chicharo

Similitud: 51.95 % Identidad: 42.20 %

```

321 .....SKM 323
51 FVSRIDVLRALWHEFYKYNPIQRIWHGTTIEILRTIFFSIIIRMSIAIPSE 100
324 SDAKDQLKEQLKASPSFRAELKYLKKAALLSKVPASQPIQYNFDSYMV 371
101 ALLYSMDGVLVDFPAMTIKAIGHQWYRTYEYSDYNSSEIQSLTEFSYTIPE 150
372 TDVQPGQLRMLEVDERLVLPTNTLVRLLVTASDVIHSWAVPSLGIKMTAI 401
151 DDLELGQSGLLLEVDRKVVVPAKTHLRIVVTPADVPHSWAVPSLGVKCDAV 200
422 PGRLNQIWLITINREGVYFGQCSEICGANHSFMPIVVEAISPRAFLTEYVK 471
201 PGRLNQISISVQREGVYFGQCSEICGNTNHAFFPIVVEAIPSKDYGSEVSN 349
472 KWIQ..... 475
250 QLIPQTGEA 258

```

Polytomella x Tapir

Similitud: 50.649 % Identidad: 43.506 %

```

321 .....SKMSDAKDQLKEQLKASISFRAELKYLK 349
51 THTSTIDAQEVETI*TILPAIILILIALPSLRILYIIDEINNPSLTVKTI 100
349 KAALLSKVPASQPIQYNFDSYMV..TDVQPGQLRMLEVDERLVLPTNTLV 399
101 GHQ*Y*SYEYTDYEELTFDSYMIPTLDLKPGRVRLLEFATNEKMLPREEPV 150
397 RLLVTASDVIHSWAVPSLGIKMTAIPGRLNQIWLITINREGVYFGQCSEIC 449
151 RMLISSEDLVLS*AVPSLGLKTDALPGRLNQATLISTRPGLFYGQCSEIC 200
447 GANHSFMPIVVEAISPRAFLTEYVKKWIQ 475
201 GSNHSFMPIVLELVPLKHFEN*TTIL*. 228

```

Figura 21: Comparación de la secuencia de aminoácidos del fragmento del gen COX2 de *Polytomella* spp. con los genes de chicharo y *Tupaia glis*.

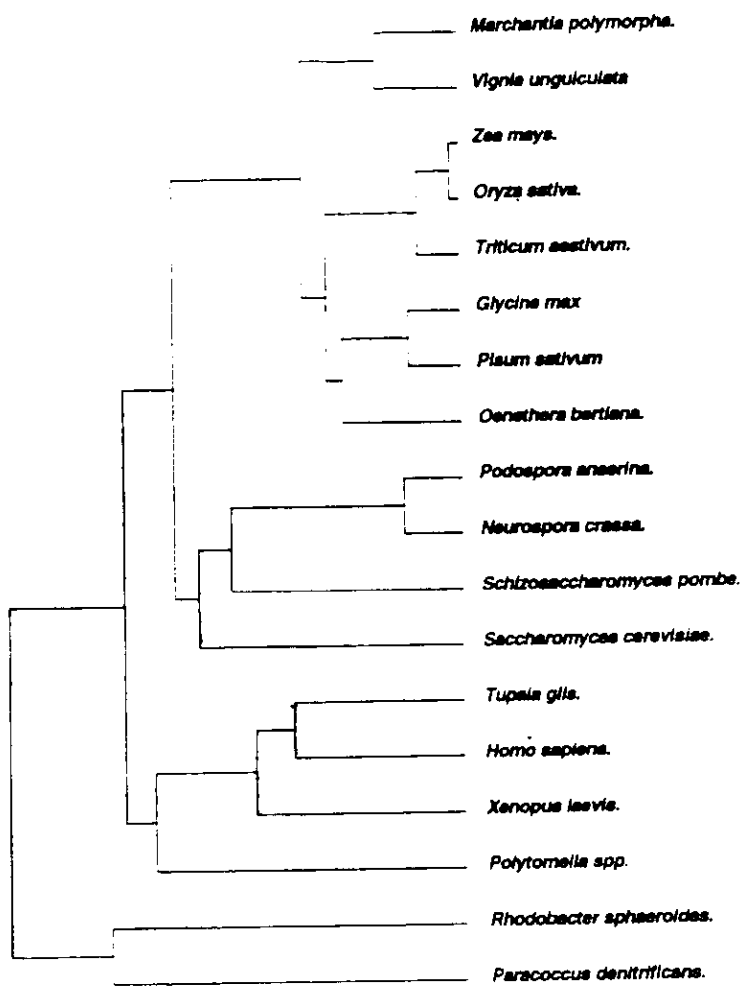


Figura 22: Cladograma construido para el gen COX2 con 18 especies diferentes.

		2da					
		U	C	A	G		
1a	U	Phe 1	Ser 5	Tyr 3	Cys 0	U C A G	3a
		Phe 4	Ser 3	Tyr 2	Cys 2		
		Leu 0	Ser 0	Stop 1	Stop 0		
		Leu 2	Ser 1	Stop 0	Trp 3		
	C	Leu 3	Pro 5	His 2	Arg 3	U C A G	
		Leu 11	Pro 4	His 1	Arg 2		
		Leu 0	Pro 0	Gln 1	Arg 0		
		Leu 1	Pro 0	Gln 9	Arg 0		
	A	Ile 6	Thr 3	Asn 5	Ser 1	U C A G	
		Ile 5	Thr 3	Asn 3	Ser 2		
		Ile 1	Thr 0	Lys 3	Arg 1		
		Met 5	Thr 0	Lys 8	Arg 2		
G	Val 6	Ala 7	Asp 5	Gly 5	U C A G		
	Val 5	Ala 6	Asp 3	Gly 0			
	Val 0	Ala 0	Glu 1	Gly 1			
	Val 2	Ala 0	Glu 8	Gly 0			

Figura 23: Uso de codones del gen *COX2* de *Polytomella* spp.

Solo para comprobar que el gen COX2 que encontramos, no se encuentra en el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. hicimos una réplica tipo Southern utilizando DNA mitocondrial sin digerir y digerido con *Pst*I y como se puede apreciar en la figura 24 no encontramos ninguna señal en DNA mitocondrial, lo que apoya la idea de que el gen COX2 de *Polytomella* spp. es un gen nuclear.

Por otro lado, consideramos importante localizar el gen COX2 de *C. reinhardtii* pues como se mencionó este gen no se encuentra en el genoma mitocondrial por lo que decidimos utilizar el producto de PCR de *Polytomella* para buscar una señal en el DNA total de *C. reinhardtii*, esperando que como los otros genes también tengan similitud. El DNA total de *C. reinhardtii* fue digerido con varias enzimas, y se obtuvo una señal positiva de aproximadamente 4 kb en la digestión con *Kpn*I. Como es un fragmento muy grande para construir un minibanco, decidimos hacer dobles digestiones con *Kpn*I (figura 25) y otras enzimas de restricción para obtener un fragmento más pequeño. Esperamos tener pronto una señal en alguna digestión doble para poder construir un minibanco y obtener la secuencia de COX2 de *C. reinhardtii*.

Por otro lado el Dr. Lars-Gunar Franzén (Universidad de Gotenburgo) nos proporcionó una genoteca de cDNA de *Chlamydomonas reinhardtii* clonada en λ gt10, con esta biblioteca se hizo un búsqueda en 10^6 pfu, utilizando como sonda el producto de PCR que contiene una parte del gen COX2 de *Polytomella* spp. Se aislaron 12 posibles clonas positivas, se realizó una segunda búsqueda y se aislaron 4 clonas, de las cuales se purificó el fago y se analizó mediante digestiones con *Eco*RI el tamaño del inserto en geles de agarosa, estos fragmentos se transfirieron mediante la técnica de Southern (1979) a un nylon y se hibridó nuevamente con el producto de PCR. La clona 9-1 dio una señal muy fuerte por lo que se procedió a ligar los fragmentos que contiene en el vector *BlueScript* digerido con *Eco*RI y defosforilado. Se transformaron bacterias y se hizo una selección de las colonias blancas con IPTG y X-Gal.

Actualmente nos encontramos en el proceso de secuenciar una de las clonas que contiene un fragmento de alrededor de 1.7 kb que da señal positiva

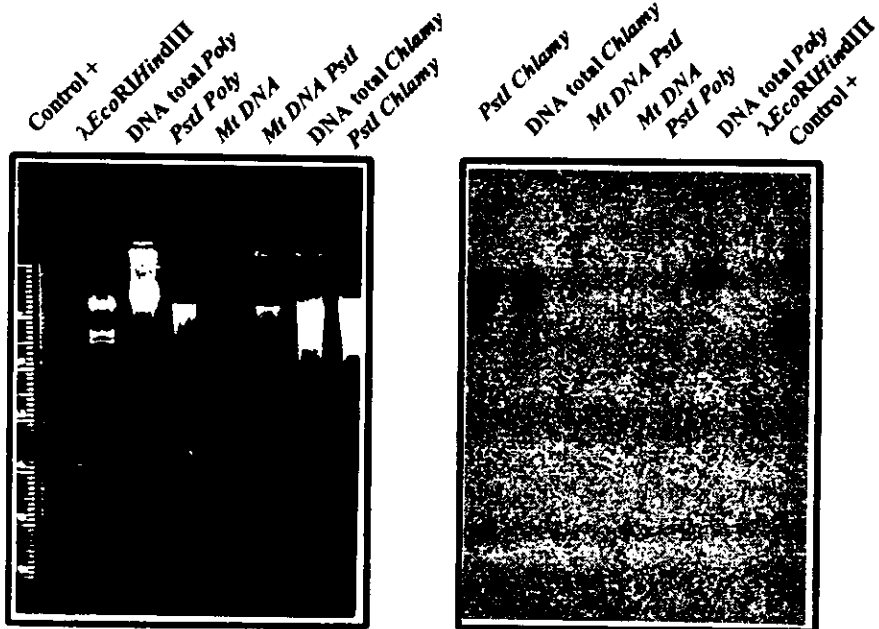


Figura 24: Réplica tipo Southern del DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. sin digerir y digerido con *PstI*, utilizando como sonda el mismo producto de PCR con parte del gen COX2.

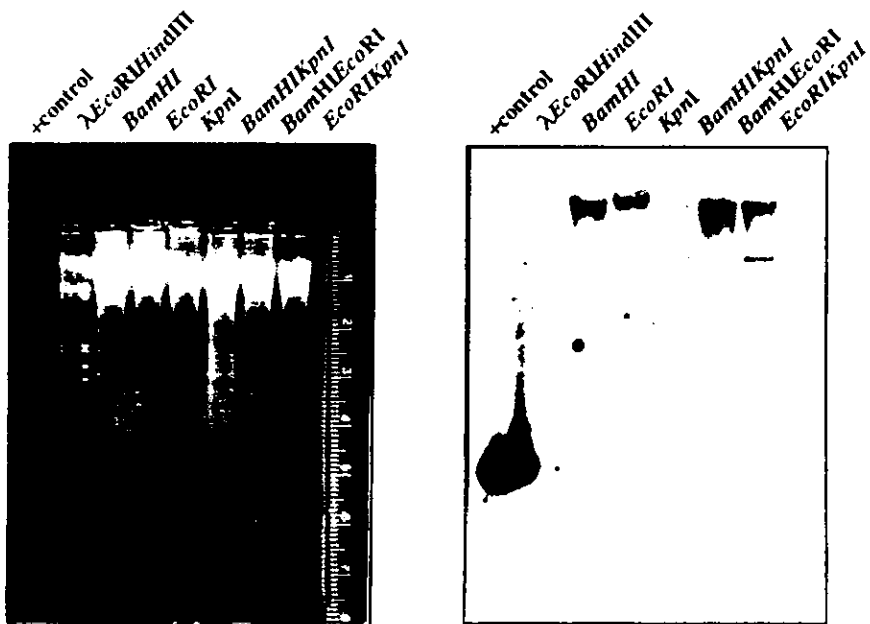


Figura 25: Hibridación de la réplica tipo Southern con DNA total de *C. reinhardtii* digerido con diferentes enzimas de restricción, usando como sonda el producto de PCR del gen *COX2* de *Polytomella* spp.

DISCUSION:

El genoma mitocondrial de *Polytomella* spp.

El género *Polytomella* fue descrito por primera vez por Aragão en 1910. *Polytomella* es un alga no fotosintética y carece de cloroplastos, sin embargo, almacena energía en gránulos de almidón (amiloplastos) (Sheeler y col. 1968). Estos gránulos podrían ser reminiscencias de cloroplastos, aunque hasta ahora no se ha reportado la presencia de DNA en estos plástidos. Sin embargo, *Astasia longa*, que es un protista no fotosintético relacionado con *Euglena gracilis* (protista fotosintético), contiene DNA de 73 kb en sus plástidos. Este DNA presenta componentes del aparato de traducción del cloroplasto con una organización similar al de *Euglena*, pero no codifica para ninguna proteína del aparato fotosintético (Gockel y col 1994). Por lo anterior, no sería difícil pensar que *Polytomella* tenga algún tipo de DNA en sus amiloplastos que presente similitud con el DNA de los cloroplastos de *Chlamydomonas*.

Recientemente Melkonian y col. (1990) han clasificado a *Polytomella* en el phylum Chlorophyta, clase Chlorophyciae, orden Chlamydomonadales y familia Chlamydomonadaceae. Esta clasificación va de acuerdo con los resultados encontrados por Conner y col. (1989), quienes reportaron que los genes para la β -tubulina de *Polytomella agilis* presentan 98% de similitud con los genes de *C. reinhardtii*. Este porcentaje de similitud es extremadamente alto, aún entre organismos del mismo género. El uso de codones que se reporta en dicho trabajo también indica que hay una estrecha relación entre las dos especies. Por otro lado nosotros reportamos que el gen mitocondrial COX1 también presenta una similitud muy alta (88%), y el análisis filogenético de este gen mitocondrial coloca a *Polytomella* junto a *Chlamydomonas* (Antaramián y col. 1996).

Nosotros tuvimos el interés de abordar el problema caracterizando bioquímicamente los complejos mitocondriales (Gutiérrez-Cirlos y col. 1994) y en forma paralela hacer un estudio a nivel de biología molecular, caracterizando el genoma mitocondrial de *Polytomella* y comparándolo con el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas*. Hasta ahora la purificación de los complejos mitocondriales ha sido

mucho más sencilla que en *Chlamydomonas*; en el laboratorio ya se tiene una preparación del complejo III puro y otra del complejo IV.

El análisis comparativo de los genes y de la organización del genoma mitocondrial nos está proporcionando información acerca de la evolución que sufrió cada uno de los genomas mitocondriales: la organización del DNA, la fragmentación de los RNA ribosomales, el uso de codones, la importación de tRNAs del núcleo y la exportación al núcleo de algunos genes como los *atp6* y *atp8* de la ATPasa y los genes *COX2* y *COX3* de la citocromo c oxidasa. Además, nos podría proporcionar información acerca de la existencia de un ancestro común para ambos organismos, en particular, si compartieron el mismo endosimbionte como propuso Round en 1980. En dicho trabajo, se sugirió que la rama de las algas incoloras se separó de las algas fotosintéticas en un evento evolutivo relativamente reciente, posterior al evento endosimbiótico que dio origen a las mitocondrias (figura 26).

Hasta ahora hemos podido comprobar con el presente trabajo y el trabajo realizado en la tesis de licenciatura de Soledad Funes, en nuestro laboratorio, que el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. no tiene regiones intergénicas, ya que entre un gen y otro existen 10 o menos nucleótidos. También hemos encontrado similitud en secuencias con los módulos de los RNA ribosomales de *Chlamydomonas*, lo que sugiere que en *Polytomella* estos genes también se encuentran fragmentados (figura 27).

El uso de codones en los genomas mitocondriales de ambos organismos presenta algunas diferencias; sin embargo, en conjunto son muy similares. En la tabla I se muestra el uso de codones de todos los genes secuenciados hasta ahora del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. Como se puede apreciar en la comparación del uso de codones de los genes *citb* de *C. reinhardtii* y de *Polytomella* spp. (figura 6 del artículo) ambos tienen un uso sesgado, sin embargo, el uso de codones de *Polytomella* spp. es menos limitado que el de *C. reinhardtii* (Gray y Boer, 1989). Esta misma característica se puede apreciar en el gen *COX1* reportado por nosotros anteriormente (Antaramian, y col. 1995).

Por otro lado, el uso de codones de la secuencia parcial que tenemos del gen *COX2* presenta diferencias significativas con respecto a los otros tres genes mitocondriales de este organismo, lo que apoya la idea de que este gen es de origen nuclear (tabla I).

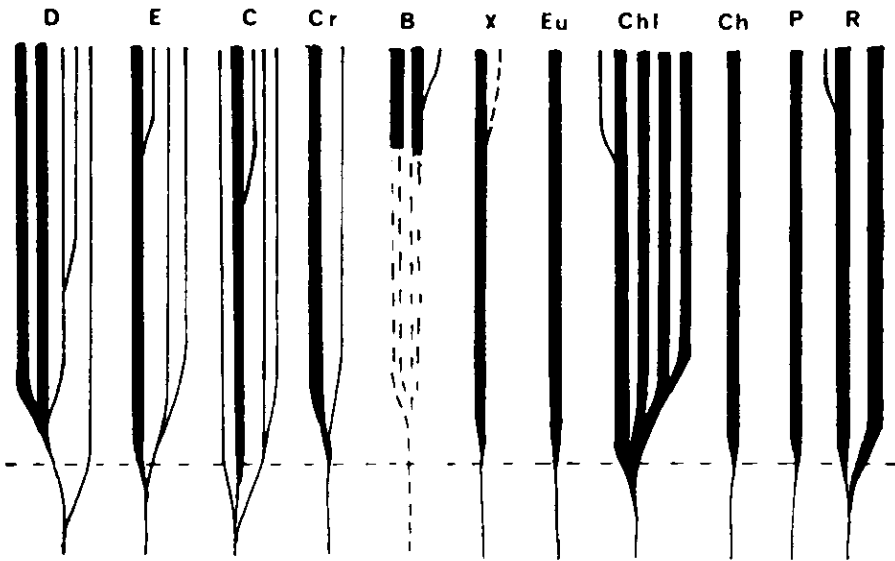


Figura 26: Arbol filogenético de diferentes algas tomado de Round (1980), líneas fotosintéticas ■, líneas no fotosintéticas _ , líneas no documentadas _ _ : D: Dinoflagelados, E: Euglenoides, C: Chisofita, Cr: Criotifita, B: Bacillariofita, X: Xanthofita, Eu: Eustigmatofita, Chl: Chlorofita, P: Prasionofita, Ch: Charofita, P: Prasinofita y R: Rhodofita. La línea punteada horizontal indica los eventos endosimbióticos que dieron origen a los cloroplastos y mitocondrias.

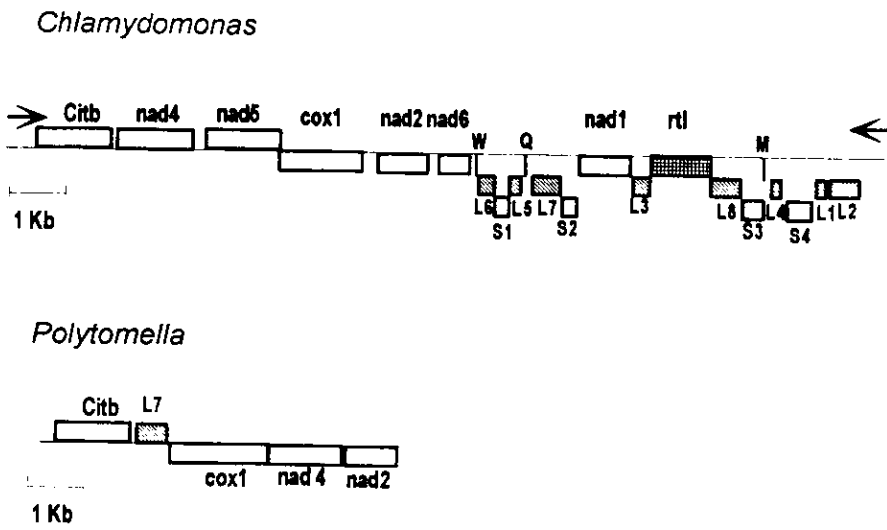


Figura 27: Mapa preliminar del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. y mapa del genoma mitocondrial de *C.reinhardtii*.

amino ácido	codon	NAD4	CYTB	COX1	COX2	amino ácido	codon	NAD4	CYTB	COX1	COX2
glicina	GGG	6	1	2	0	triptofano	TGG	9	6	8	3
	GGA	6	12	18	1	stop	TGA	0	0	0	0
	GGT	13	8	28	5	cisteína	TGT	6	0	0	0
	GGC	4	7	2	0	stop	TGC	5	2	1	2
	GAG	3	2	3	8	stop	TAG	1	0	0	0
glutámico	GAA	3	4	2	1	stop	TAA	0	1	1	1
	GAT	2	4	10	5	tirosina	TAT	8	9	12	3
	GAC	2	3	4	3	leucina	TAC	7	17	11	2
valina	GTG	12	4	5	2	fenilalanina	TTG	14	8	26	2
	GTA	13	14	12	0	serina	TTA	18	23	16	0
alanina	GTT	13	9	18	6	serina	TTT	31	10	10	1
	GTC	2	3	9	5	glutamina	TTC	12	20	20	4
	GCC	5	0	0	0	arginina	TCG	4	1	0	1
	GCA	3	6	5	0	glutamina	TCA	4	3	0	0
	GCT	23	14	30	7	glutamina	TCT	14	3	8	5
arginina	GCC	2	7	7	6	glutamina	TCC	4	3	2	3
	AGG	1	0	0	2	arginina	CGG	1	0	0	0
	AGA	1	0	0	1	arginina	CGA	2	4	0	0
serina	AGT	13	8	13	1	leucina	CGT	3	1	8	3
	AGC	13	14	10	2	leucina	CGC	3	2	2	2
lisina	AAG	8	1	0	8	glutamina	CAG	4	2	5	9
	AAA	6	7	6	3	glutamina	CAA	5	6	5	1
asparagina	AAT	12	7	8	5	histidina	CAT	5	7	8	2
	AAC	2	8	10	3	histidina	CAC	3	5	3	1
metionina	ATG	8	8	22	5	leucina	CTG	6	4	3	1
isoleucina	ATA	15	7	2	1	leucina	CTA	13	7	5	0
	ATT	20	13	24	6	leucina	CIT	24	7	20	3
treonina	ATC	7	7	3	5	prolina	CTC	0	5	5	11
	ACG	1	1	0	0	prolina	CCG	1	0	0	0
	ACA	2	10	7	0	prolina	CCA	5	17	13	0
	ACT	9	2	21	3	prolina	CCT	8	4	8	5
	ACC	2	2	5	3	prolina	CCC	1	1	1	4

Tabla I: uso de codones de los genes mitocondriales secuenciados hasta la fecha por nuestro grupo: *Cytb*, *COX1*, *Nad4* y *COX2*.

No sabemos todavía el tamaño del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. pero aparentemente es más grande que el de *C. reinhardtii*, como lo indican los datos que tenemos de análisis de restricción de las 22 clonas del DNA mitocondrial de este organismo que obtuvimos a la largo de este trabajo. Por otro lado, el mapa preliminar que tenemos indica que va a ser un genoma muy compacto, sin intrones, con regiones intergénicas sumamente reducidas y con los RNA ribosomales fragmentados, características que comparte con el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii* (figura 27). Nos resta averiguar cuantos genes contiene este genoma y si es circular o lineal. Al igual que en el genoma de *C. reinhardtii* algunos genes se encuentran en una cadena del DNA y otros en la cadena complementaria. La organización de los genes es diferente entre estas dos algas relacionadas y también es diferente a la que presentan *Chlamydomonas moewusii* y *Chlamydomonas eugametos* (figura 28) (Lee y col. 1991, Denovan-Wright y Lee, 1992), miembros también de la familia *Chlamydomonadaceae*, del primero se tiene un mapa preliminar, sin embargo, recientemente se reportó el genoma completo de *C. eugametos*. De este se pueden destacar algunas características que comparte con el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii* como la fragmentación de los RNA ribosomales, carece de los genes *COX2*, *COX3*, *atp6*, posee solamente tres RNAs de transferencia, los mismos que *C. reinhardtii*, sin embargo, posee algunas características que lo diferencian de *C. reinhardtii*, carece de un gen similar a la transcriptasa reversa, es una molécula circular de 22,897 pb. y posee intrones tipo I (Denovan-Wright y col, 1998). Como se puede apreciar existen diferencias notables entre la organización, la posición de los genes, el tamaño del genoma total entre los genomas mitocondriales de este grupo de *Chlamydomonadaceae*, pero al mismo tiempo comparten características que sugieren un origen mitocondrial común.

Actualmente nos encontramos en proceso de secuenciar de manera automática todas las clonas que se han obtenido en las dos genotecas del DNA mitocondrial para poder analizarlas, en un futuro esperamos contar con la secuencia completa de este genoma, esto nos permitirá clasificar el genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. de una manera más precisa, conocer a cuantos genes codifica, el número de sus módulos ribosomales, tamaño exacto y encontrar si es un genoma lineal o circular.

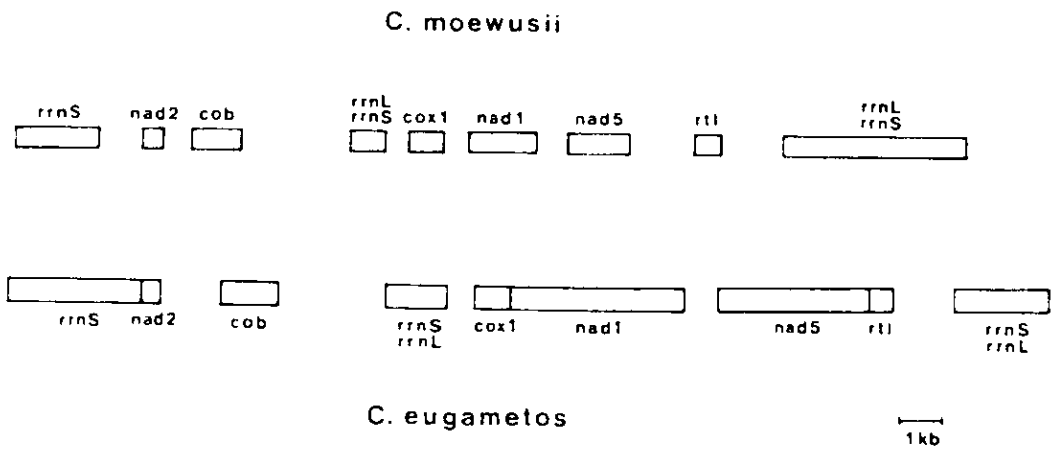


Figura 28: Mapas mitocondriales de *Chlamydomonas moewusii* (Lee y col. 1991) y de *Chlamydomonas eugametos* (Denovan-Wright y lee, 1992)

El citocromo *b*:

Consideramos que el gen que codifica para el citocromo *b* mitocondrial también puede ayudar a la clasificación de este organismo, pues es un gen muy conservado a lo largo de toda la evolución y existen más de 1200 secuencias reportadas de diversos organismos.

Con la reacción en cadena de la polimerasa, usando como molde el DNA mitocondrial de *Polytomella*, pudimos amplificar un fragmento del citocromo *b*. Con este producto de PCR localizamos una clona positiva en la genoteca de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. Esta clona contiene 1214 nucleótidos, pero desafortunadamente no presentó el gen completo. Con la técnica de amplificación por PCR utilizando decámeros al azar pudimos amplificar la región 3' de este gen y de esta manera se obtuvo la secuencia completa del mismo.

El citocromo *b* es un gen muy conservado a lo largo de todas las ramas evolutivas y existen alrededor de 900 reportes en la literatura de secuencias completas de este gen (Degli-Esposti y col 1993; Trumppower y Gennis 1994). Nosotros consideramos que es indispensable secuenciarlo para caracterizar el genoma mitocondrial de cualquier organismo. Al ser un gen tan conservado, se pueden contruir árboles filogenéticos y de esta manera podemos ubicar a la *Polytomella* como lo hicimos con el gen *COX1*. Este tipo de análisis sería un elemento más de apoyo en la clasificación de *Polytomella* dentro de la familia Chlamydomonadacea. Por otra parte, el estudio de mutagénesis dirigida tan detallado que existe para organismos como *S. cerevisiae*, nos permite predecir algunas características que puede presentar el citocromo *b* de *Polytomella*.

La secuencia del fragmento del citocromo *b* de *Polytomella* spp., igual que *C. reinhardtii*, no tiene intrones a diferencia de sus homólogos de *Saccharomyces cerevisiae* (Nobrega y Tzagoloff, 1980), *Neurospora crassa* (Burke y col., 1984) o del alga relacionada *Chlamydomonas smithii* (Colleaux y col., 1990).

El análisis comparativo de la estructura primaria deducida de la secuencia del gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp. muestra una gran similitud con las algas relacionadas *C. reinhardtii* y *C. smithii*, puesto que se afilian claramente en el cladograma que construimos con 2 especies diferentes (figura 5 del artículo). Esto proporciona evidencia

adicional de que el género *Polytomella* pertenece a la familia de las *Chlamydomonadaceae*, como ya habíamos propuesto anteriormente con el análisis del gen *COX1* (Antaramián y col, 1996). El gen de *Polytomella* spp. muestra el mayor grado de similitud con su homólogo de *C. reinhardtii* presentando 56.6 % de identidad y 74.6 % de similitud (figura 4 del artículo). El porcentaje de similitud, aunque no es tan alto como el porcentaje de similitud que presentan los genes *COX1* de ambas especies (88% de similitud), es muy alto para las secuencias reportadas del citocromo *b*. La identidad que presentan ambas secuencias en el extremo amino-terminal es significativamente mayor (67% de identidad) que la que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal (48%), este dato es consistente con todas las secuencias reportadas para los genes del citocromo *b* (Degli-Esposti y col. 1993) (figura 7 del artículo).

El gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp. presenta las cuatro histidinas invariables que unen a los dos grupo hemo de los citocromo *b₅₆₀* y *b₅₆₈*. Estas histidinas se encuentran en la hélice denominada B (H82, H96 en *S. cerevisiae*) y en la hélice denominada D (H183, H197) (Degli Esposti y col, 1993). La secuencia presenta, sin embargo, dos cambios muy significativos que no se encuentran presentes en el gen de *C. reinhardtii*, el primer cambio es una serina en la posición 36 en lugar de una alanina sumamente conservada a lo largo de toda la evolución, este aminoácido de acuerdo al modelo de 8 hélices transmembranales propuesto por Degli-Esposti (1993) se encuentra muy cercano al grupo hemo de alto potencial. El segundo cambio es en el aminoácido 114 donde en lugar de un triptofano invariable, en el gen de *Polytomella* spp. encontramos un tirosina (figura 8 del artículo).

Existen solamente 9 aminoácidos invariables a lo largo de toda la escala evolutiva en el gen del citocromo *b*, las cuatro histidinas antes mencionadas y otros aminoácidos de los cuales no se conoce muy bien su función, entre estos se encuentra el triptofano 114, de particular interés para el presente trabajo. La presencia de una tirosina en el gen de *Polytomella* spp. modificaría el ambiente hidrofóbico del grupo hemo de alto potencial. En la estructura cristalográfica de la proteína de bovino se puede apreciar que el residuo 114 se encuentra a 4 Å tan solo del grupo hemo (Chan-An Yu, Universidad de Oklahoma, comunicación personal).

El espectro del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. presenta un corrimiento hacia el rojo de 3-4 nm en el máximo pico de absorción del citocromo b (Gutiérrez-Cirlos y col.,1994) al compararlo con su contraparte de *C. reinhardtii* (Atteia, comunicación personal). Nosotros postulamos que es debido a la cercanía de la serina 36 y de la tirosina 114 con el grupo hemo b_H , y que estos aminoácidos son los responsables del espectro anómalo que se encontró en el citocromo b de *Polytomella* spp., en especial el cambio del W114 por la Y ya que este es un aminoácido invariable a lo largo de toda la escala evolutiva.

Usando simulaciones en computadora, Link y col. (1994) construyeron un modelo en el cual los triptofanos, W29, W39 y W114 (numeración de levadura) rodean al hemo b_H , además en el análisis de cristalografía del complejo bc_1 de bovino el aminoácido W114 tiene un ángulo de 70° y se encuentra a tan solo 3.2Å con respecto al hemo b_H , este dato es consistente con la distancia de 4 Å que encontró Chang-An Yu (comunicación personal). El cambio de W114 por una tirosina mantiene el carácter aromático del residuo; sin embargo, cambia el tamaño y la capacidad de unir hidrógenos. La tirosina podría generar un ambiente electrostático distinto y deslocalizar a los electrones del anillo tetrapirrol de manera diferente que el triptofano (figura 8 del artículo).

Por otro lado Bennoun y col. (1992) caracterizaron una de las pocas mutantes resistentes a inhibidores que existen en *C. reinhardtii*, el cambio Y132C en el gen del citocromo b de este organismo confiere resistencia de mixotiazol y a mucidina. Los estudios realizados en esta mutante sugieren que este residuo se encuentra cerca del hemo b_L , componente esencial del centro Q_o . Este residuo también se encuentra en el gen del citocromo b de *Polytomella* spp.. Cuando se hace el modelo de hélice alfa en el cruce transmembranal C, el residuo 132 se encuentra a 18 aminoácidos de la Y114 del gen de *Polytomella* spp. (figura 8 del artículo), estos datos concuerdan con el modelo que proponemos de la influencia de la Y114 sobre el hemo b_H .

Para poder contestar si en efecto estos aminoácidos son los responsables en el corrimiento hacia el rojo en el espectro, decidimos transformar la mutante *dum 1* de *C. reinhardtii* que carece de todo el gen del citocromo b con las diferentes construcciones, primero con el gen silvestre de *C. reinhardtii* por sí solo, puesto que hasta ahora solo se ha

transformado esta mutante con genomas completos de *Chlamydomonas*, y primero teníamos que ver si es posible obtener transformantes con el gen desnudo. Hasta ahora se ha transformado exitosamente con el gen silvestre esta mutante *dum 1*, aunque la eficiencia de transformación fue baja (solo se han obtenido dos clonas). En el laboratorio se está localizando el sitio de inserción del gen mediante PCRs con decámeros al azar. Estos son datos muy alentadores porque significa que el gen desnudo del citocromo *b* es capaz de insertarse nuevamente en el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii* y logra ser expresado y traducirse en una proteína funcional.

Actualmente se está transformando la mutante *dum 1* con las diferentes construcciones (A36S, W114Y, A36S-W114Y) así como con el gen silvestre de *Polytomella* spp. Si se obtienen transformantes, el siguiente paso es purificar parcialmente el complejo *bc₁*, y obtener el espectro del citocromo *b* para comprobar en cual de las mutantes logramos el corrimiento hacia el rojo. Si alguna de ellas presenta el corrimiento nos va a indicar como se ve influenciado el hemo *b_H* por el ambiente creado por los aminoácidos cercanos.

Las transformantes que se obtuvieron de la mutante *dum 1* son por sí mismas de gran interés puesto que anteriormente se había transformado esta cepa con los genomas totales de *C. smithii* y de *C. reinhardtii*. Estos nuevos experimentos implican que es posible transformar la cepa con el gen aislado, por lo que sería muy interesante encontrar en qué parte del genoma se insertó el gen del citocromo *b*.

El gen COX2:

Los genomas mitocondriales de *C. reinhardtii* y *C. eugametos* se han secuenciado completamente y como se ha mencionado con anterioridad, no se encuentran presentes los genes que codifican para las subunidades II y III de la citocromo c oxidasa (Boer y Gray 1988, Denovan-Wright y col, 1998).

Polytomella spp. es un buen modelo alternativo de estudio por ser un alga sin cloroplastos y que presenta la gran ventaja de que sus complejos mitocondriales se pueden aislar sin contaminaciones con relativa facilidad. De esta manera se puede hacer un estudio conjunto de los complejos mitocondriales, así como de los genes que los codifican, en particular de la citocromo c oxidasa, que en este organismo presenta 7 subunidades.

Nuestro interés era localizar el gen COX2 de *Polytomella* spp. y comprobar si en efecto al igual que en *C. reinhardtii* y *C. eugametos* se encuentra en el núcleo; de ser así, deseamos analizar su secuencia, localizar una posible presecuencia, la existencia de intrones, así como estudiar el uso de codones. En el estudio realizado por Nungent y Palmer (1991) con varias leguminosas, demostraron que en el chícharo existe dos copias del gen COX2, una en la mitocondria y otra en el núcleo, siendo la copia mitocondrial la única que se expresa. En soya y en frijol, este gen se encuentra en ambos DNAs, pero la copia que se expresa es la nuclear. En otras leguminosas, sin embargo, la copia del gen mitocondrial desapareció y solo queda una copia en el núcleo, tal es el caso del frijol mungo y el caupí (especie de garbanzo). En este estudio pudieron construir una representación esquemática de la transferencia del gen COX2 de la mitocondria al núcleo (Nungent y Palmer, 1991, Covello y Gray, 1992) (figura 9).

La subunidad II de la citocromo c oxidasa consta de 250 a.a. variando un poco entre cada especie, el gen que codifica para esta subunidad varía entre 750-800 nucleótidos. Esta subunidad tiene un peso molecular de alrededor de 24 kD, posee dos cruces transmembranales y en el extremo carboxilo se encuentra una parte globular como se puede apreciar en la estructura cristalográfica de la figura 29, donde se localiza el sitio de unión a Cu (Iwata y col 1995).

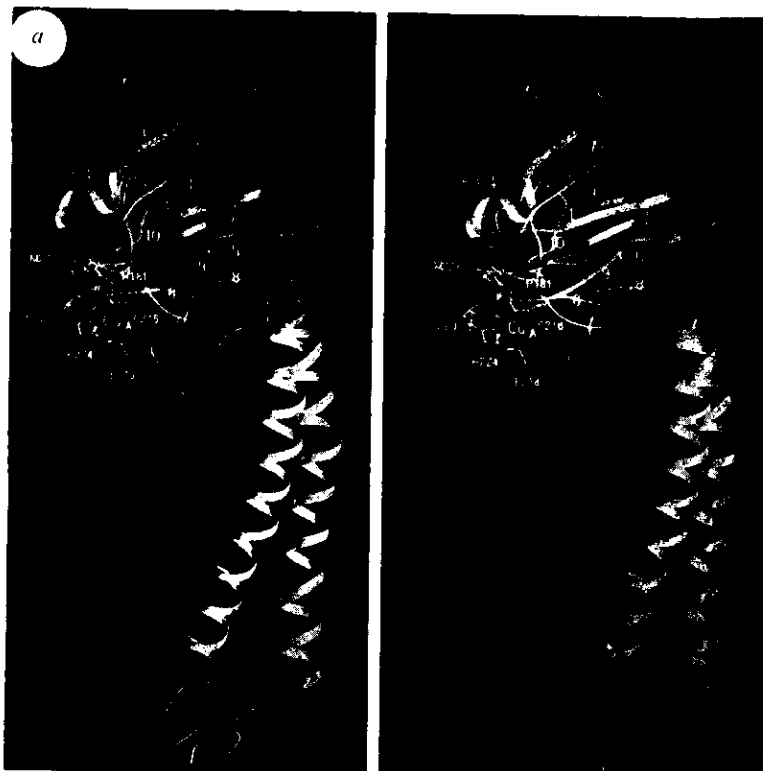


Figura 29: Estructura cristalográfica de la subunidad II de *P. denitrificans* (Iwata y col. 1995).

Primera secuencia parcial y estructura del gen COX2 de *Polytomella* spp.:

El producto de PCR que obtuvimos utilizando los oligodesoxinucleótidos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína tiene un tamaño menor al esperado, sin embargo, como en la preparación que se obtuvo en el laboratorio de la citocromo c oxidasa la proteína identificada como la subunidad II tiene un peso molecular de 18 kD, menor al reportado en otros organismo, no era de extrañar que el gen también fuera menor. Por otro lado la subunidad II de *C. reinhardtii* tiene un peso molecular de 14 kD (Atteia, comunicación personal), esto nos hace pensar que probablemente la subunidad II de estas algas *Chlamydomonadaceas* que son de menor tamaño y podrían tener una estructura diferente.

La secuencia del producto de PCR que obtuvimos presentó una alta similitud con el gen COX2 de chicharo y el gen COX2 de *Tupaia glis*. En este análisis no se encontró similitud con el gen COX2 de otros organismos, lo que explicaría la ausencia de señal cuando utilizamos las sondas de *Rhodobacter sphaeroides*, de *Saccharomyces cerevisiae*, de bovino o de soya, a pesar de que utilizamos condiciones de baja severidad. La traducción a aminoácidos de esta secuencia confirma las similitudes encontradas en la secuencia de nucleótidos. En este producto de PCR no encontramos el sitio de unión a Cu, característico de la subunidad II de la citocromo c oxidasa que está muy conservado en todas las especies. Tampoco localizamos ninguno de los dos cruces transmembranales (figura 29), sin embargo, como esta subunidad es menor que las reportadas anteriormente es posible que solo tenga un cruce transmembranal.

Con el producto de PCR obtuvimos una señal clara y única en la réplica tipo Southern con DNA total de *Polytomella* spp., por lo que se construyó un minibanco con *PstI* con el DNA de 2 kb. De este minibanco obtuvimos una clona positiva que fue secuenciada en su totalidad. En esta secuencia pudimos localizar un marco de lectura abierto que definitivamente es parte del gen, en esta secuencia localizamos el sitio de unión al Cu: **GQCSEICG** indicado en la figura 20, este sitio se encuentra 18 aminoácidos antes del codón de término. Sin embargo, hacia el extremo amino-terminal se pierde completamente la similitud con los genes reportados para COX2, como se puede apreciar más específicamente para los genes de chicharo y *Tupaia glis* (figura 21) y aparece un

codón de término alrededor de 100 aminoácidos antes que en cualquiera de los genes reportados, esto nos sugiere la presencia de un intrón.

Por esta razón decidimos buscar similitud entre la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal de la proteína y la secuencia de 2 kb que obtuvimos, pero desafortunadamente no encontramos ninguna similitud que nos indicara que el marco de lectura se recupera posteriormente, esto indica que a partir del nucleótido 960 o probablemente después, empieza un intrón, que mide al menos 1 kb. La secuencia consenso de terminación de intrones es AT y existen dos posibles sitios de terminación del intrón como se muestra en la secuencia completa de la clona alrededor del nucleótido 960. Por lo pronto, si este es el intrón, es de al menos 960 nucleótidos, mucho más grande que los reportados para los genes nucleares COX2 de caupí y de soya (Covello y Gray, 1992). La presencia de un intrón en el gen también sugiere que este gen es nuclear, puesto que en el mapa parcial del genoma mitocondrial de *Polytomella* spp. no hemos encontrado ningún gen que contenga intrones (figura 27).

Para determinar el tamaño exacto del intrón es necesario clonar un fragmento más grande con otras enzimas de restricción. En el laboratorio, la Dra. Yan Xiao clonó un fragmento de 4 kb que da señal en la digestión con ScaI en la réplica tipo Southern (figura 17), actualmente nos encontramos en el proceso de secuenciar esta clona para localizar el inicio del gen y la posición del intrón, así como determinar la presecuencia de la proteína. El análisis de esta presecuencia sería de gran interés para nosotros, porque sería la señal para importar nuevamente a la proteína al interior de la mitocondria. Hasta ahora no hay ninguna presecuencia reportada para *Polytomella* spp. y las presecuencias reportadas para *C. reinhardtii* parecen compartir características entre las proteínas mitocondriales y las proteínas de cloroplasto, por lo que no se sabe cómo distinguen las proteínas entre un organelo y otro. La comparación entre la presecuencia de COX2 de *Polytomella* spp. y las presecuencias de *C. reinhardtii* tal vez pueda esclarecer este punto.

Por otro lado en el análisis de perfil de hidropatía del marco de lectura abierto no se encontraron secuencias que sugieran la presencia de cruces transmembranales, por lo que necesitamos localizar el gen completo para poder determinar si esta proteína tiene uno o dos cruces transmembranales.

El gen COX2 de Polytomella spp. es nuclear:

El presente trabajo aporta suficientes evidencia para sugerir que el gen COX2 de *Polytomella spp.* es un gen nuclear:

- a) No se obtiene ninguna señal con el DNA mitocondrial de *Polytomella spp.*
- b) El contenido de GC es menor al del DNA mitocondrial en el marco de lectura abierto de la clona 1 de *psfI*.
- c) El gen tiene un intrón de al menos 1 kb, mientras que los genes mitocondriales de *Polytomella spp.* con los que se cuenta hasta la fecha, no presentan ningún intrón.
- d) La secuencia presenta dos posibles sitios de poliadenilación, ausente en los genes mitocondriales.
- e) El uso de codones es evidentemente diferente a los genes mitocondriales (tabla 1).
- f) Encontramos dos ejemplos de posibles ediciones del RNA mensajero característica de la transferencia de genes mitocondriales al núcleo.

El gen COX2 de *Polytomella spp.* es nuclear y existe una sola copia del gen ya que si hubiera dos copias del gen, una mitocondrial y otra nuclear, lo más probable sería encontrar al menos dos señales en la réplica tipo Southern, por lo que pensamos que no existen pseudogenes como en el caso de una de las copias nucleares de COX2 en plantas donde todavía no se expresa el gen nuclear y solo se expresa el gen mitocondrial (Nungent y Palmer, 1991) (figura 9) o en el caso del gen *rsp 11* de arroz (Kadowaki y col. 1996) que obtienen dos copias del gen uno de los cuales es el que se expresa (figura 10). Además en las réplicas tipo Southern realizadas con el DNA mitocondrial y el DNA total, no encontramos ninguna señal en el DNA mitocondrial (figura 24), este es un dato negativo que sugiere que este gen es nuclear. Por otro lado después del codón de

término encontramos dos posibles sitios de poliadenilación iguales a los reportados por Conner y col. (1989), estos sitios tienen la secuencia TGTA y se encuentran marcados en los recuadros de los nucleótidos 1499-1503 y de los nucleótidos 1806-1810 de la secuencia (figura 20 y figura 30), mientras que los genes mitocondriales secuenciados hasta la fecha no presentan sitios de poliadenilación.

El contenido de GC en la clona de *PstI* es peculiar, del nucleótido 0 al 1021 hay 200 GC, es decir, un 20 % y un 80 % de AT, porcentaje similar al reportado en los genomas mitocondriales, del nucleótido 1021 al 1492 donde se encuentra el marco de lectura abierto del gen COX2 hay 200 GC, o sea un 42.4% GC y un 47.6% de AT. porcentaje característico del genoma nuclear, del nucleótido 1493-2070 hay 160 GC, esto es 28% de GC y 72% de AT, nuevamente como los genomas mitocondriales (figura 30).

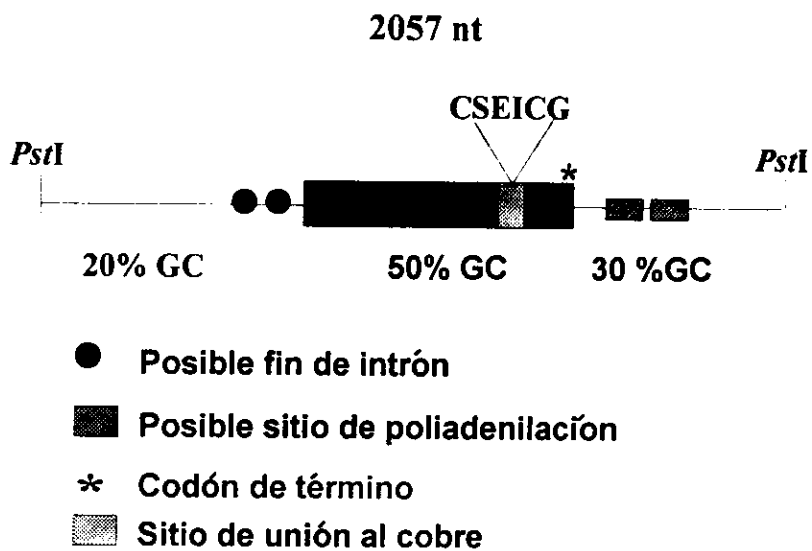


Figura 30: Esquema de la estructura del gen COX2 de *Polytomella* spp.

Uso de codones del gen COX2 y edición del RNA mitocondrial al DNA nuclear:

Otro análisis sumamente interesante es el uso de codones de este gen. Como se puede ver claramente en la tabla I, el uso de codones del gen *COX2* en *Polytomella* spp. es muy diferente al uso de codones de los otros genes mitocondriales secuenciados hasta la fecha de este organismo (Antaramián y col., 1996, este trabajo, Soledad Funes, comunicación personal). Aunque el gen está incompleto, los datos sugieren que no es mitocondrial y que el uso de codones de este gen es más sesgado que el uso de codones mitocondrial. Como se puede apreciar en la figura 23, hay 15 codones que no se encuentran en el gen *COX2*, aunque para completar este análisis se necesita la secuencia completa del gen.

Por otro lado se ha reportado que en la transferencia de genes mitocondriales al núcleo hay cambios de uridinas por citosinas, este fenómeno se debe a una edición del RNA mensajero, en nuestra secuencia encontramos dos ejemplos de este caso en el nucleótido 1378: TCT un serina en vez de CCC una prolina encontrada en otros organismos y en el nucleótido 1369: ATG un metionina en vez de ACG, treonina en los otros genes, aunque solo sean dos ediciones faltaría averiguar con el gen completo cuántos casos hay de edición del RNA mensajero de uridinas por citosinas (figura 20).

En el presente trabajo presentamos diferentes evidencias de que el gen *COX2* de *Polytomella* se encuentra en el genoma nuclear y presenta al menos un intrón, nos resta localizar la presecuencia. En la réplica tipo Southern con el DNA mitocondrial que hicimos demuestra que este gen no se encuentra presente en el genoma mitocondrial de *Polytomella*, por lo que ya ha sido suprimido del genoma mitocondrial. Nuestros datos parecen indicar que un fragmento de DNA mitocondrial se transfirió al núcleo y este fragmento ha sufrido modificaciones en la parte que codifica para la subunidad II de la citocromo c oxidasa en el uso de codones, en el contenido de GC, aparentemente hubo edición del RNA mensajero: de citosinas por uracilos, adquisición de sitios de poliadenilación y de un intrón.

Este sería el primer gen *COX2* que se encuentra en el genoma nuclear reportado en algún organismo diferente a las angiospermas, nuestros datos además apoyarían la

idea de que los genes *COX2* de *C. reinhardtii* y *C. eugametos* también son nucleares y el producto de PCR que nosotros obtuvimos es la sonda ideal para localizar estos genes en ambos organismos.

No sabemos, sin embargo, si el proceso de transferencia del gen al núcleo se llevó a cabo antes de que se separara *Chlamydomonas* de *Polytomella* o si la transferencia de estos genes fue un proceso independiente en cada especie después de que ambas se separaron, aunque cabe mencionar que según el árbol filogenético de Round (1980) la separación fue un evento evolutivo relativamente reciente (figura 26).

CONCLUSIONES.

- Se obtuvo la secuencia completa del citocromo **b** de *Polytomella* spp. y se comparó con el gen homólogo de *Chlamydomonas reinhardtii*.

-Encontramos dos cambios significativos en la secuencia del gen del citocromo **b** de *Polytomella* spp: A36S y W114Y que podrían explicar el corrimiento hacia el rojo en el espectro del complejo bc₁ de *Polytomella* spp. y la bidentación del espectro del hemo de alto potencial. Según el modelo propuesto por Degli-Esposti y la cristalografía de rayos X, estos aminoácidos se encuentran cerca del hemo de alto potencial y su polaridad afectaría el ambiente que rodea al grupo hemo.

-La transformación por balística de la mutante *dum1* de *C. reinhardtii* que carece del citocromo **b** y el estudio del espectro de los complejos bc₁ de estas transformantes nos van a dar la respuesta de cómo afectan la S36 y el Y144 al ambiente del hemo de alto potencial.

-El gen que codifica para la subunidad II de la citocromo **c** oxidasa parece encontrarse en el genoma nuclear en el alga incolora *Polytomella* spp.

-Este gen posee un intrón y a pesar de que tiene una zona muy conservada con el resto de los genes COX2 reportados a la fecha posee algunas características peculiares: el uso de codones es nuclear y presenta dos secuencias en la región 3' que son posibles sitios de poliadenilación.

REFERENCIAS

- Akiba, T., Toyoshima, C., Matsunaga, T., Kawamoto, M., Kubota, T., Fukuyama, K., Namba, K. and Matsubara, H. (1996) *Nature Structural Biology* **3**: 553-561.
- Antaramián, A., Ramírez, J., Coria, R. and González-Halphen, D. (1996) *Biochimica et Biophysica Acta*. **1273**: 198-202
- Antaramian, A., Funes-Argüello, S., Vázquez-Acevedo, M. Coria, R. and González-Halphen, D. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.* (en prensa)
- Aragão, H. (1910). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2**: 42-57.
- Attardi, G. and G. Schatz. (1988). *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 289-333.
- Atteia, A., Vitry, C., Pierre, Y. and Popot, J.L. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**. 226-234.
- Benne, R. (1985). *Trends Genet.* **1**: 117-121.
- Bennoun, P., Delosme, M., Godehart, I. and Kück, U. (1992) *Mol. Gen. Genet.* **234**: 147-154.
- Bland, M.M., Levings, C.S. III and Matzinger, D.F. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **204**: 8-16.
- Boer, P.H., Bonen, L.Lee, R.W. and Gray, M.W. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **82**: 3340-3344.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. (1978). Prentice Hall, New Jersey, 706.p.p.
- Brasseur, G. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 12571-12575.
- Brasseur, G. Raymond, S. and Brivet-Chevillotte, P. (1992) *Seventh EBEC Reports* p 23.
- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V. and Schuster, W. (1993). *FEBS lett.* **325**. 140-145.
- Burke, J.M, Breitenberger, C., Heckman, J.E., Dujon, B. and RajBhandary, U.L. (1984). *J.Biol. Chem.* **259**: 504-511.
- Capaldi, R.A. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 569-596.
- Capaldi, R.A. (1991). *Current Opinion in Structural Biology* **1**:562-568.

- Capaldi R.A., González-Halphen D., Zhang Y.Z., and Yanamura W. (1988). *J. Bioenerg. Biomem.* **20**: 291-311.
- Conner, T.W., Thompson, M.D. and Silflow, C.D. (1989). *Gene* **84**: 345-358.
- Covello, P.S. and Gray, M.W. (1992). *EMBO Journal* **11**: 3815-3820.
- Colleaux, L. Michel-Wolwartz, M.R., Matagne, R.F. and Dujon, B. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223**: 288-296.
- Crofts, A., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S. and Berry, E. (1987) Plenum Press. New York. pp: 617-624.
- Collura, R.V. and Stewart, C.B. (1995) *Nature*. **378**: 485-489.
- Degli-Esposti, M. De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patanello, T. and Meyer, A. (1993) *Biochimica et Biophysica Acta.* **1143**: 243-271.
- Deshaias, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. and Shekman, R. (1988). *Nature* **332**: 800-805.
- Denovan-Wright, E.M. and Lee, R.W. (1992). *Curr. Genet.* **21**: 197-207.
- Denovan-Wright, E.M., Nedelcu, A.M. and Lee, R.W. (1998). *Plan Mol. Biol.* **36**: 285-295.
- Dieffenbach, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. and Schekman, R. (1988) *Nature*. **322**: 800-805.
- Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. (1995). *PCR primer. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Partanello, T. and Meyer, A. (1993). *Biochim. Biophys. Acta.* **1143**: 243-271.
- Evans, D.A. and Lloyd, D. (1966) *J. Protozool.* **13**: 119.
- Franzén, L.G. Rochaix, J.D. and von Heijne, G. (1990). *FEBS letters.* **260**: 165-168.
- Gennis, R.B., (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 992-998.
- Gray, M.W. and Boer, P.H. (1988). *Philos. Trans. R. Soc. London.* **319**: 135-147.
- Gray, M.W. and Doolittle, W.F. (1992). *Microbiol. Rev.* **46**: 1-42
- Grivell, L.A. (1987) O'Brien, S.J. ed. *Cold Spring Harbor Labs., New York*, **4**: 290-297.

- Gockel, G., Hachtel, W., Baier, S., Fliss, C. and Henke, M. (1994). *Curr. Gent.* **26**: 256-262.
- González-Halphen, D. (1990). *Ciencia* **41**: 133-152.
- Goodenough, V.W. (1992) *Cell* **70**:533-538.
- Grivell, L.A. (1987) in "Genetic Maps 1987" (O'Brien, S.J. ed.) Cold Spring Harbor Labs., New York, **4**: 290-297.
- Grohmann, L., Brennicke, A. and Schuster, W. (1992). *Nuc. Acid Res.* **20**:5641-5646.
- Gutiérrez-Cirlos E.B., Antaramián, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. and González-Halphen, D. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**: 9147-9154.
- Haltia, T., Sarastre, M. and Wilkström, M. (1991). *EMBO J.* **10**: 2015-2021.
- Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J.L.P., Goñi, F.M. and Freire, E. (1994). *Biochemistry.* **33**: 9731-9740.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**: 557.
- Harris, E.H.(1989) *The Chlamydomonas Sourcebook*, Academic Press, San Diego.
- Hartl, F.U., Pfanner, N., Nocholson, D.W. and Neupert, W. (1989), *Biochim. Biophys. Acta.* **988**: 1-45.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R. (1997). *EMBO Journal* **16**: 2217-2226.
- Hoffman and Winston.(1987) *Gene* **57**:267-272.
- Hudspeth, M.E.S., Shumard, D.S., Tatti, K.M. and Grossman, L.I. (1980) Rapid Purification of Yeast Mitochondrial DNA in high yield. *Biochim. Biophys. Acta* **610**: 221-228.
- Hurt, E.C., Soltanifar, N., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.D. and Schatz, G. (1984) *EMBO J.* **5**:1343-1350.
- Hurt, E.C. and van Loon, A.P.G.M. (1986) *Trend. Biochem. Sci.* **175**:205-212.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995). *Nature.* **376**: 660-669.
- Jaraush, F. and Kadenbach, B. (1985). *Eur. J. Biochem.* **146**: 219-225.
- Kadenbach, B. (1983) *Anew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**: 275-283.
- Kadowaki, K., Kubo, N., Ozawa, K. and Hirai, A. (1996). *Embo Journal.* **15**: 6652-6661.

- Keng, T., Alani, E. and Guarente, L. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**: 355-364.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Lang, B.F., Ahne, F. and Bonen, L. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**: 353-566.
- Lang, B.F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H. and Kaudewitz, F. (1983) Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. eds. De Gruyter, Berlin, p.p. 319-329.
- Lang, B.F., Burger G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. and Gray, M.W. (1997). *Nature*. **387**: 493-497.
- Lee, R.W., Dumas, c., Lemieux, C. and Turmel. (1991). *Mol. Gen. Genet.* **231**: 53-58.
- Lemesle-Meunier, D., Brivet-Chevillotte, P., Di Rago, J.P., Slonimski, P.P. and Bruel, C. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**:15626-15632.
- Lemieux, C., Turmel, M. and Lee, R.W. (1980). *Curr. Genet.* **2**:139-147.
- Lemieux, L.J., Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Ingledew, WJ and Gennis, R.B. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**: 2105-2113.
- Link, T.A., Wallmeier, H. and von Jagow, G. (1994). *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 197-204
- Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C. and Sluse, F. (1989). *J. Cell Biol.* **108**: 1221-1226.
- Margulis, L. (1970) *Origin of eucariotic cells.* (Yale University Press, New Haven, Conn)
- Melkonian, M (1990) in *Handbook of protoctista* (Margulis, L. corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J. Eds.) pp 608-616, Johns and Bartlett, Boston.
- Michaelis, G., Varenholz, C. and Pratje, E. (1990). *Mol. Gen. Genet.* **223**: 211-216.
- Mitchell, P. (1975. *FEBS Lett.* **56**: 1-6.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Sharf, S., Saiki, R., Him, G. and Erlich, H. (1986). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nishikimi, M., Shimomura, Y. and Ozawa, T. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**: 1291-1297.
- Nobrega, F.g. and Tzagolof, A. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**: 329-336.
- Nungent, J.M. and Palmer, J.D. (1991). *Cell.* **66**: 473-481.

- Ohnishi, T. (1987) *Curr. Top. Bioenerg.* **15**: 37-65.
- Pfanner, N., Müller, H.K., Harmey, M.A., Neupert, N. (1987). *EMBO J.* **6**: 3449-3454.
- Pfanner, N and Neupert, N. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 331-353.
- Pfanner, N. and Meijer, M. (1997). *Curr. Genet.* **7**: 100-103.
- Pilkington, S.J., Arizmendi, J.M. Fearnley, I.M., Runswick, M.J., Skehel, J.M. and Walker, J.E. (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 26-31.
- Pringsheim, E.G. (1955). *J. Protozool.* **2**: 137.
- Prochaska, J.L. and Fink, P.S. (1987). *J. Bioenerg. Biomern.* **19**: 143-166.
- Randolph-Anderson, B.L. Boynton, J.E., Gilham, N.W., Harris, E.H., Johnson, A.M., Dorthu, M.P. and Matagne, R.F. (1993). *Mol.Gen.Genet.* **236**: 235-244.
- Rieske, J.S., Hansen, R.E. and Zaugg, W.S. (1984). *J Biol. Chem.* **239**: 3017-3021.
- Round, F.E. (1980). *Biosystems.* **12**:61-69.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* 2nd Edition CSH.
- Saraste, M. (1984) *FEBS lett.* **166**: 367-372.
- Schagger, H., Link, T.A., Engel, W.D. and Von Jagow, G. (1986). *Methods Enzymol.* **126**: 224-237.
- Schatz, G. (1986) *EMBO J.* **5**:1343-1350.
- Shapleigh, J.P., Hosler, J.P., Tecklohon, M.M.J., Kim, Y., and Babcock, G T. (1992) *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 4786-90.
- Schneider, A., Martin, J. and Agabian, N. A. (1994). *Mol. and Cell. Biol.* **14**: 2317-2322.
- Sheeler, P., Moore, J., Cantor, M. and Granik, R. (1968). *Life Sci.*, **7**: 1045-1051.
- Simpson, L. (1986) *Int. Rev. Cytol.* **99**: 119-179.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N., Neupert, W. (1989) *Cell* **59**: 1061-1070.

- Southern, E.M. (1979) *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stern, D.B., Bang, A.G. and Thompson, W.F. (1986) *Curr. Genet.* **10**: 857-869.
- Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H. and Neupert, W. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**:10364-10371.
- Trumpower, B.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **268**: 11409-11412.
- Trumpower, B.L. and Gennis, R.B. (1994). *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 675-716.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizake, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996). *Science* **272**: 1136-1144.
- Varenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B. and Michelis, G. (1993). *Curr. Genet.* **24**: 241-247.
- van Loon, A.P.G.M. and Young, E.T. (1986) *EMBO. J.* **5**:161-165.
- von Heijne, G. (1986) *FEBS Lett.* **198**: 1-4.
- von Heijne, G., Steppuhn, J and Herrman, R.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**: 535-545.
- West, I.C., Mitchell, P. and Rich, P.R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* **933**: 35-41.
- Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrman, R.G. and Trebst, A. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 674-678.
- Wise, D.L. (1955). *J. Protozool.* **2**: 156.
- Wise, D.L. (1959) *J. Protozool.* **6**: 19.
- Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. (1997). *Science.* **277**: 60-66.
- Yang, X. and Trumpower, B.L. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**: 12282-12289.
- Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A.Y. (1990). *Biotech* **8**.
- Zischler, H., Geisert, H., von Haeseler, A. and Pääbo, S. (1995) *Nature* **378**: 489-492.

ANEXO I

MÉTODOS:

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

Purificación de las mitocondrias:

Se resuspendieron 20 g de células de *Polytomella* spp. (peso húmedo) en un amortiguador conteniendo sacarosa 320 mM, EDTA 4 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) y se rompieron con homogenizador de motor, se centrifugó a 2500 xg y se recuperaron las mitocondrias en el sobrenadante. Con una centrifugación de alta velocidad se sedimentaron las mitocondrias y se lavaron con el mismo amortiguador de acuerdo al protocolo descrito por Gutiérrez-Cirlos y col. (1994). Estas mitocondrias se utilizaron para purificar la citocromo c oxidasa.

Otro método de preparación de mitocondrias se utilizó para aislar el DNA mitocondrial. Las células rotas con el homogenizador se diluyeron en una solución al 12% de OptiPrep™ diseñado por **Nycomed** para aislamiento *in vitro* de partículas biológicas. Esta preparación se depositó en un gradiente discontinuo de la solución de OptiPrep™ de 25%, 30%, y 50% y se centrifugaron 2 horas a 23,500xg en un rotor SS34, la banda café con las mitocondrias enteras se recolectó y se incubó durante 20 minutos con DNAsa II (1 mg/ml) (figura 1).

Purificación del DNA mitocondrial:

Se resuspendieron las mitocondrias en un amortiguador que contenía Tris-HCl 10mM (pH 8.2), EDTA 10mM, NaCl 10 mM y Sarkosil 2% y se incubaron 12 horas a 4°C para lisar las mitocondrias de acuerdo al método descrito por Hudspeth y col. (1980). Se

extrajo dos veces con fenol saturado con Tris-HCl 2M (pH 8.0), una vez con fenol-cloroformo y 1 vez con cloroformo. Se precipitó con acetato de sodio 3 M y con 3 volúmenes de etanol al 100% a -20°C durante 2 horas. Se centrifugó, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua a una concentración final de 1 mg/ml (figura 1).

Digestión del DNA mitocondrial:

Se hizo una digestión total del DNA mitocondrial en las siguientes condiciones:

10 µg DNA mitocondrial

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

3 µl de *HindIII* (10 U/µl) de **Boehringer**

H₂O c.b.p. 50 µl finales. Se incubó 12 horas a 37°C

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

Preparación del vector para clonar los fragmentos del DNA mitocondrial:

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

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

2 µl de *HindIII* (10 U/µl) de **Boehringer**

H₂O c.b.p. 50 µl finales. Se incubó 12 horas a 37°C.

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

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

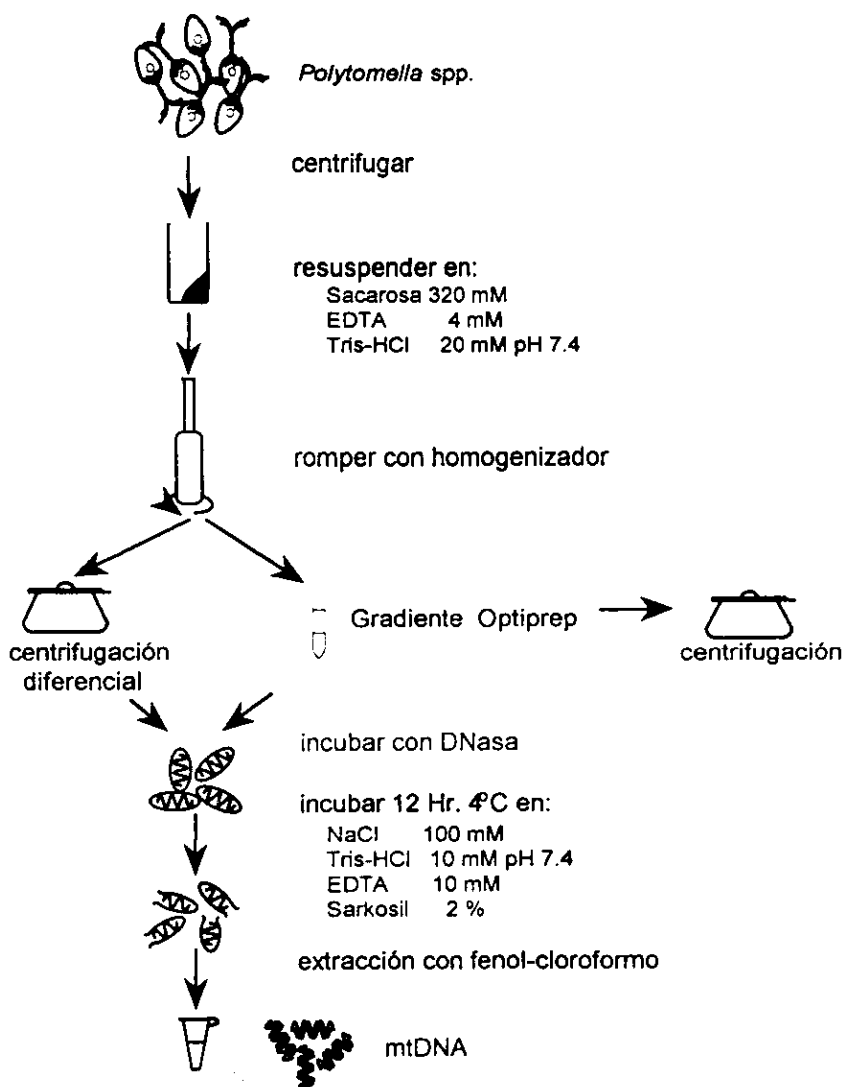


Figura 1: Preparación de mitocondrias y de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp.

Ligación, transformación y selección de las clonas positivas:

Ligación para cada DNA mitocondrial cortado con *HindIII*:

10 μ l del DNA mitocondrial cortado

1 μ l del vector cortado con la enzima correspondiente y defosforilado

1 μ l de amortiguador de Ligasa 10X de *Boehringer*.

1 μ l de T4 ligasa (1U/ μ l) de *Boehringer*.

H₂O c.b.p. 15 μ l Finales. Se incubó a 16°C toda la noche.

Transformación:

Se tomaron los 15 μ l de la mezcla anterior de ligación + 60 μ l de células competentes DH5a preparadas de acuerdo a una modificación al método de Hanahan (1983). Se incubaron 60 min en hielo, se dió un choque térmico a 42°C durante 2 min, se agregaron 450 μ l de LB, se incubó 30 min a 37°C, se centrifugó 1 seg, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 40 μ l de 2% X-Gal y 10 μ l de 800mM IPTG, se sembraron en cajas de LB ampicilina 100 μ g/ml y se incubaron toda la noche a 37°C (figura 2).

Se seleccionaron las colonias blancas, se crecieron y se purificó el plásmido mediante la técnica de mini-preparación (Zhou y col. 1990), una vez identificadas las colonias positivas, se guardaron en glicerol al 50% y se purificó el plásmido en columnas de *Quiagen*.

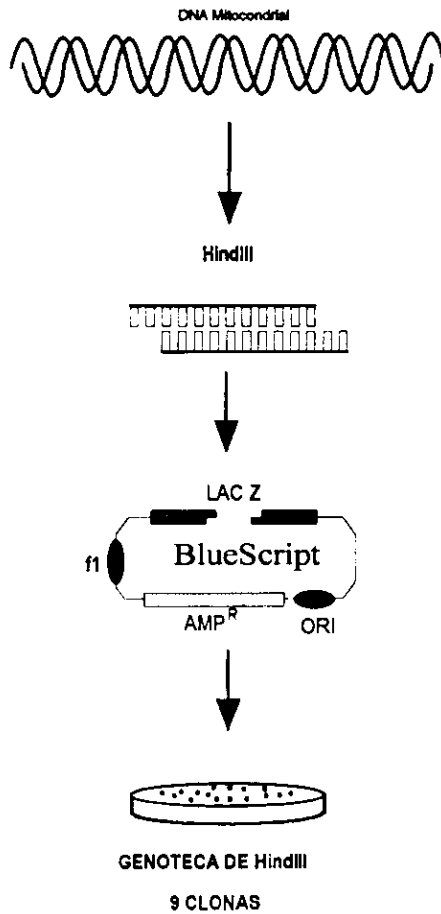


Figura 2: Construcción de la genoteca mitocondrial de *Polytomella* spp.

Marcaje de sonda mediante biotilación (Gibco BRL):

100 ng DNA en 8 μ l de H₂O

20 μ l de 2.5 X amortiguador para cebadores al azar, hervir 10 min y enfriar 10 min en hielo.

5 μ l de 10X mezcla de dNTPs

1 μ l de fragmento Klenow

H₂O c.b.p. 50 μ l finales, centrifugar 30 seg, incubar 1 hora a 37°C. Parar la reacción con 5 μ l de amortiguador para parar la reacción. Añadir la sonda a la solución de prehibridación con la membrana de nylon.

Marcaje de las sonda con P³² mediante cebadores al azar (random primer)

Hervir 25 ng de DNA en 20 μ l de H₂O durante 10 min y enfriar en hielo 10 min. Centrifugar 30 seg.

Agregar:

2 μ l dATP *Boehringer*

2 μ l dGTP “

2 μ l dTTP “

15 μ l amortiguador de mezcla con los cebadores al azar

5 μ l dCTP P³² *Dupont*

H₂O c.b.p. 50 μ l finales, agitar en el vortex, añadir 1 μ l de fragmento Klenow (*Boehringer*), incubar 1 hora a temperatura ambiente, añadir 5 μ l de amortiguador para parar la reacción y 150 μ l de H₂O, centrifugar en una columna de Sephadex G50 de centrifugación rápida (*Boehringer*) durante 3 min. Hervir nuevamente 10 min y enfriar en hielo 10 min. Agregar la sonda a la solución de prehibridación.

Solución de hibridación:

	Final	100 ml
SSC 20X	6X	30 ml
Denhardtts 50X	5X	10 ml
Tris 2M pH 8	20 mM	0.5 ml
EDTA 0.5 M	2 mM	0.4 ml
SDS 20%	0.2%	1 ml
DNA Esperma de salmón (10mg/ml)	<u>1 ml</u>	(hervir 10' y enfriar 10' antes de añadir)
H ₂ O c.b.p. 100 ml		57.1 ml

Clonación del gen del citocromo *b* de *Polytomella* spp.:

Obtuvimos 9 clonas diferentes en la genoteca mitocondrial de las cuales se purificaron los plásmidos y se hizo una hibridación de gota (dotblott) en una membrana de nylon. La membrana se entrecruzó con dos pulsos en un "UV Stratalinker" y se hibridó con el producto de PCR biotinilado del fragmento de 800 nt del citocromo *b*, obtenido previamente en el laboratorio.

Se hibridó durante toda la noche a 55°C y se lavó la membrana a 55°C 5X SSC + 0.5% SDS durante 30', 2X SSC + 0.5% SDS durante 30', y finalmente dos lavados con 0.1X SSC + 1% SDS 15' cada uno.

La clona 9 nos dió una señal positiva, por lo que la secuenciamos y encontramos 1214 nucleótidos, que muestran en un extremo 183 nt antes de la metionina inicial del gen del citocromo *b*, el cual se puede traducir hasta el aa 343, por lo que faltaban aún alrededor de 120 pb (40 aa) para completar la secuencia del gen.

Obtención del extremo carboxilo del citocromo *b*:

Para encontrar el extremo carboxilo del gen se diseñó un oligodesoxinucleótido de 20 bases en el nucleótido 1100 de la secuencia de la clona 9H y se amplificó mediante PCR con 5 decámeros al azar utilizando como molde 1 mg de DNA mitocondrial de *Polytomella* spp. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: 10 min a 94°C; 50 ciclos: 45 seg a 94°C, 45 seg a 50°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. (Figura 3)

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%, 100 V y se transfirió a una membrana de nylon como se describió anteriormente. Se hibridó toda la noche a 55°C, con la clona 9H marcada radiactivamente con los cebadores al azar. La membrana se lavó a 55°C con 2X SSC + 1% SDS 15' y dos veces con 0.1X SSC + 1% SDS 15'. Los productos de PCR que dieron una señal positiva se clonaron y se secuenciaron, de esta manera se obtuvo la secuencia del gen correspondiente al extremo carboxilo de la proteína.

Con la secuencia completa se diseñaron oligodesoxinucleótidos específicos para amplificar el gen completo del citocromo *b* de *Polytomella* spp, el gen se clonó y se secuenció en su totalidad para verificar la ausencia de errores creados por la Taq polimerasa durante la reacción de PCR (Figura 4).

Desoxioligonucleótidos específicos

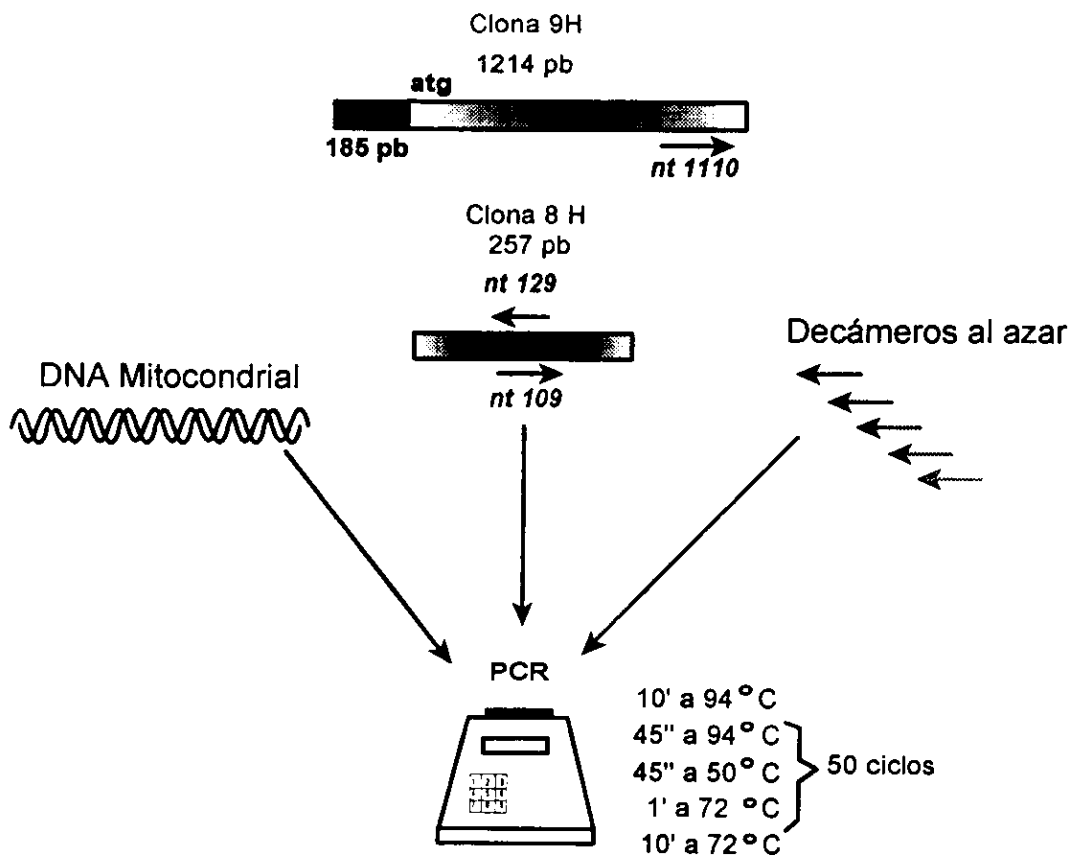


Figura 3: PCR utilizando un desoxioligodesoxinucleótido específico y cinco decámeros al azar, empleado para localizar la secuencia faltante del citocromo *b*.

Amplificación por PCR

DNA mitocondrial de *Polytomella*

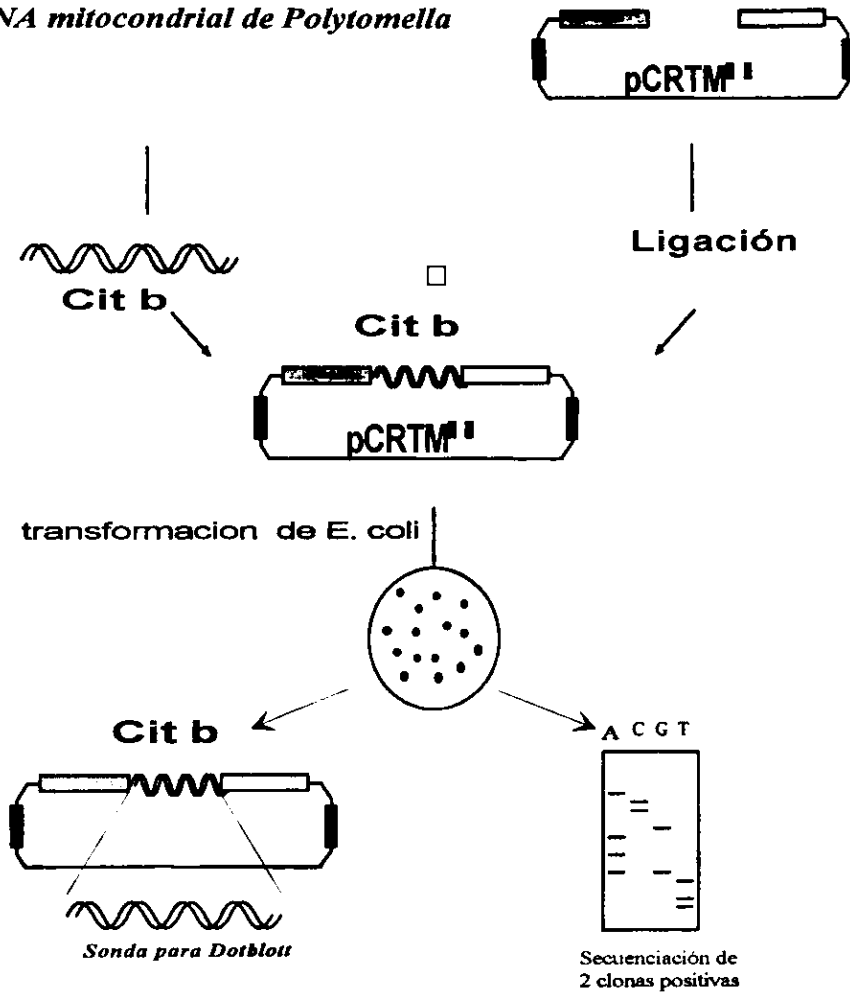


Figura 4: Clonación y secuenciación del citocromo *b* de *Polytomella* spp.

Amplificación del gen del citocromo *b* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se obtuvo el gen del citocromo *b* de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante una amplificación por PCR utilizando como templado DNA total de *C. reinhardtii*, con oligodesoxinucleótidos diseñados con base en la secuencia reportada del genoma mitocondrial en los nucleótidos 450-470 con la siguiente secuencia: 5'AGAACATGTGCCCGTTGGGT3' y otro en el 1750-1730 con la siguiente secuencia: 5'TTGGTGCTGTATGGCTAGGT3' en las siguientes condiciones de PCR:

1 µg de DNA total de *Chlamydomonas reinhardtii*

200 ng de cada oligodesoxinucleótido

1 mM de MgCl₂

1 µl de Taq polimerasa 1U/µl (Boehringer)

1 mM de dNTPs

5 µl de amortiguador 10X.

50 µl volumen final

Se llevaron a cabo los siguientes ciclos: 5 min a 94°C; 50 ciclos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 50°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C, de esta manera se amplifica el gen completo y un poco más hacia cada extremo. El producto de PCR se clonó en el plásmido pCRTM^{II} siguiendo el protocolo que sugiere el proveedor de *Invitrogen* y se secuenció (figura 5).

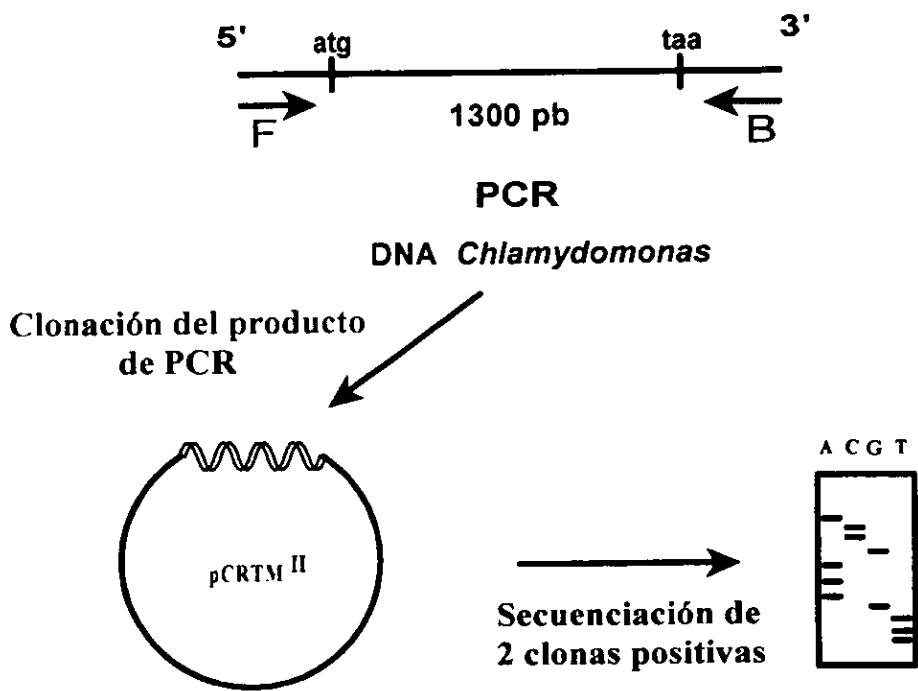


Figura 5: Clonación y secuenciación del citocromo *b* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Construcción de las mutantes del citocromo *b* A36S y W114Y de *Chlamydomonas reinhardtii*, mediante mutagénesis dirigida:

A partir del gen del citocromo *b* de *Chlamydomonas reinhardtii* clonado en el pCRTM^{II} se hizo mutagénesis dirigida por PCR para obtener las mutantes A36S, W114Y para lo cual se diseñaron los siguientes oligodesoxinucleótidos:

oligodesoxinucleótidos S

S

AGC ATC ATA CCA GAT AGA GAA CCA CCG

oligodesoxinucleótidos Y

Y

CAA GAT AAC GAC AGT ACT GAT CCA GAC G

En negritas y subrayado se muestran los cambios en nucleótidos para generar la serina y la tirosina respectivamente.

Estos oligodesoxinucleótidos se utilizaron en las siguientes condiciones de PCR para generar los fragmentos con los cambios:

1 µg del plásmido con el **citocromo *b*** de *C. reinhardtii*

200 ng de cada oligodesoxinucleótido (el **S**, el **Y** + el oligodesoxinucleótido en el nt 1750 del genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*).

1 mM de MgCl₂

1 µl de Taq polimerasa 1U/µl (Boehringer)

1 mM de dNTPs

5 µl de amortiguador 10X.

H₂O c b.p. 50 µl finales y los siguientes ciclos 5 min a 94°C; 25 ciclos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 50°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Utilizando el oligodesoxinucleótido con el cambio a serina se espera un producto de PCR de 180 nucleótidos y utilizando el oligodesoxinucleótido del cambio a tirosina se espera un producto de 423 nucleótidos. estos productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa de 1% a 100 V, se cortaron las bandas y se extrajeron de la agarosa mediante la técnica de "geneclean" de acuerdo al protocolo del proveedor (**Bio 101**).

Estos productos de PCR se utilizan como oligodesoxinucleótidos para una segunda reacción de PCR con el oligodesoxinucleótido en nucleótido 450 para amplificar el gen del citocromo **b** completo nuevamente pero ahora con los cambios deseados en las misma condiciones del primer PCR (figura 6). Los productos de PCR se clonaron nuevamente en el plásmido pCRTM^{II} y se secuenciaron para verificar que los nuevos productos de PCR no tuvieran errores y se encontraran los cambios de A36S y W114Y.

Construcción de la doble mutante A36S, W114Y :

En el mapa de restricción del citocromo **b** de *Chlamydomonas reinhardtii* se buscaron sitios de restricción que aparecieran dos veces en el gen y que uno de ellos se encontrara entre el aminoácido 36 y el aminoácido 114; tal fue el caso para la enzima Accl. Se realizaron las siguientes digestiones:

1 µg del plásmido correspondiente S36, Y114

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

2 µl de Accl (1 U/µl) de **Boehringer**

H₂O c.b.p. 50 µl finales. Se incubó 12 horas a 37°C

Esta digestión genera una fragmento que contiene el plásmido y una parte del gen incluyendo el aminoácido 36 y otro fragmento pequeño que contiene el aminoácido 114. El plásmido con el cambio de S36 y el plásmido con la Y114 se digirieron con Accl, del plásmido con la S36 se purificó el fragmento que contiene el plásmido y el fragmento que incluye la posición 36, del plásmido Y114 se purificó el fragmento

pequeño que incluye la posición Y114, posteriormente se ligaron ambos fragmentos toda la noche a 16 °C, con la siguiente mezcla:

20 ng de plásmido que incluye la S36
20 ng del fragmento pequeño con la Y114
1 µl de T4 ligasa (1U/ µl) de **Boehringer**
1 µl de amortiguador 10X
H₂O c.b.p. 10 µl finales.

Se transformaron bacterias como se describió anteriormente y se seleccionaron las colonias positivas, se purificó el plásmido de 4 clonas y se secuenciaron para verificar que tuvieran los cambios deseados (figura 7).

Transformación de la mutante *dum1* de *C. reinhardtii*:

El gen del citocromo **b** de las tres mutantes se purificó a partir de geles de agarosa y el fragmento de 1.3 kb se utilizó para bombardear por balística la mutante *dum1* de *C. reinhardtii* la cual carece de todo el citocromo **b** en el DNA mitocondrial (Figura 13, de los antecedentes), las cepas capaces de crecer en la obscuridad son aquellas en las que el gen del citocromo **b** se ha insertado en el genoma mitocondrial (figura 8). Esta parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de los Dres. J. Boynton y N. Gillham de la Universidad de Duke (California del Norte).

Se crecen 300 ml de cultivo de la cepa *dum 1*, en acetato y en la obscuridad, según el protocolo descrito por Randolph-Anderson y col. (1993). Se cubren los microproyectiles de tungsteno M10 con 10 µg del fragmento de DNA de 1.3 kb purificado de agarosa que contiene las diferentes construcciones del citocromo **b** (*crctyb* S36, *crctyb* Y114, *crctyb* S36Y114 y *psctyb*) a una concentración de 1 µg/µl; después de bombardear las células se plaquean en placas con medio HSHA y ampicilina y se crecen en la obscuridad, se verifica el crecimiento de colonias cada semana. Las posibles transformantes aparecen después de 4 a 8 semanas.

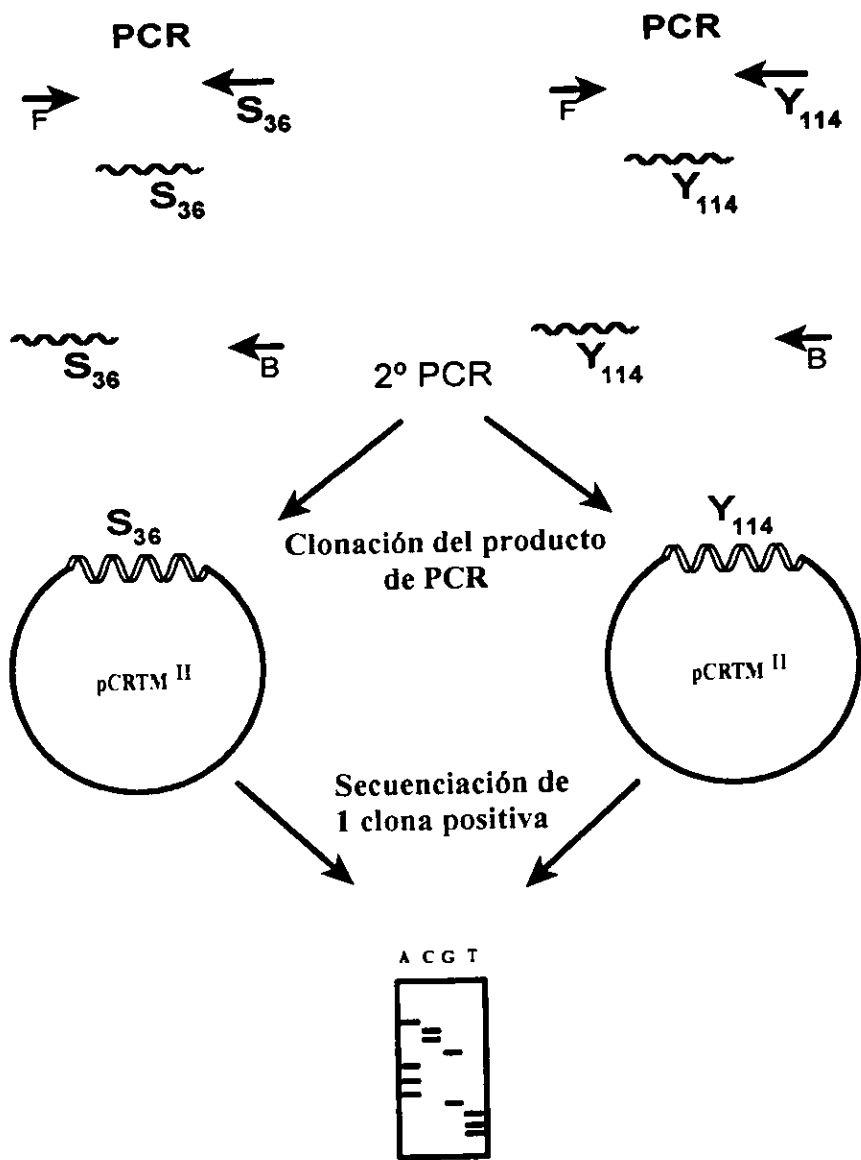


Figura 6: Construcción de las mutantes A36S y W114Y del citocromo *b* de *C. reinhardtii*.

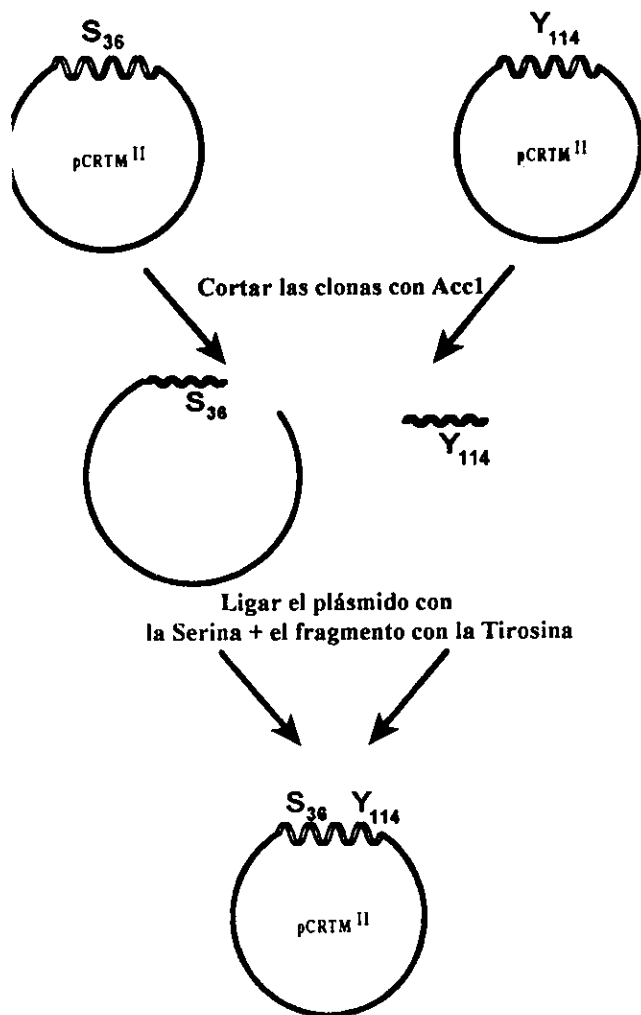


Figura 7: Construcción de la doble mutante del citocromo *b* de *C. reinhardtii* A36S,W114Y. Se digirieron los plásmidos con la S36 y la Y114 con la enzima de restricción *AccI*, se purificaron el plasmido que contiene la S36 y el fragmento que se genera que contiene la Y114 y se ligaron ambos.

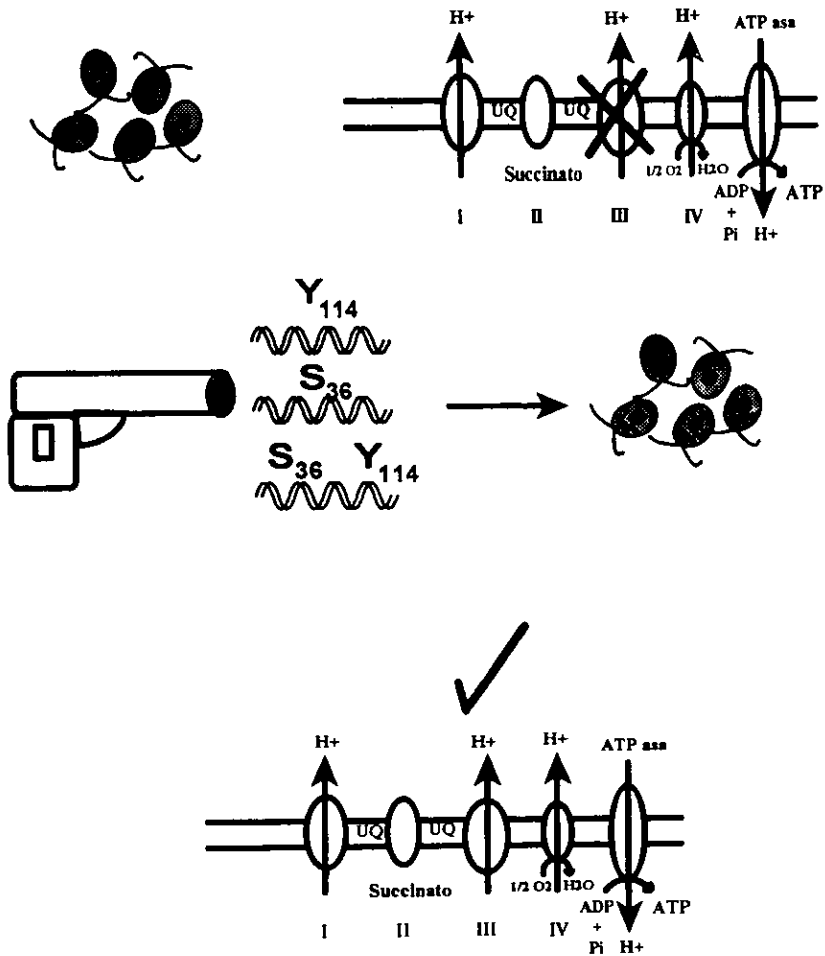


Figura 8: Transformación mediante balística de la mutante *dum1* con las construcciones A36S, W114Y y la doble mutante.

Purificación del DNA total de *Polytomella* spp. o *C. reinhardtii*:

Se cosecharon 2 litros de células y se resuspendieron en amortiguador QTP que contiene: 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% Triton X100 y 1% SDS, se agregó 0.5 volumen de fenol y 0.5 volumen de cloroformo y un volumen de perlas de vidrio. Se agitó en el vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 10000 xg durante 5 minutos. La fase acuosa se extrajo nuevamente con cloroformo y se precipitó con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes de etanol al 100%. Se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm en la microfuga, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se resuspendió en agua. Este protocolo es una modificación del descrito por Hudspeth y col. (1980) para obtener DNA total de levadura.

Digestión del DNA total:

Una vez purificado el DNA se digirió con diferentes enzimas en las siguientes condiciones:

20 µg DNA

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

3 µl de enzima(10 U/µl) de *Boehringer*

H₂O c.b.p. 50 µl finales. Se incubó 12 horas a 37°C

Obtención y marcaje de sondas:

El Dr. Jeffrey Palmer (Universidad de Indiana) nos envió una alícuota de un producto de PCR de 600 nucleótidos representando un fragmento del gen COX2 mitocondrial de soya. Este producto se clonó en el vector pCRTM^{II}. El fragmento se secuenció y se comprobó que era el fragmento esperado por lo que se purificó y se marcó radiativamente con cebadores al azar como se describió anteriormente.

Titulación del DNA total de *Polytomella* spp.

Se pusieron diferentes concentraciones de DNA total de *Polytomella* spp. 1, 10, 25, 40, 60 y 100 mg en gota en un nylon, el cual se hibridó con la sonda de soya y en ninguna concentración se encontró hibridación en condiciones de baja severidad (2X SSC + 0.5% SDS a temperatura ambiente durante 15 min.)

Purificación de la citocromo c oxidasa

En el laboratorio se purificó la citocromo c oxidasa de *Polytomella* spp. y se obtuvo una fracción pura con 7 subunidades (Vázquez-Acevedo, Pérez-Martínez y González-Halphen, resultados no publicados). Empleando esta fracción enriquecida de la citocromo c oxidasa, se inmunoidentificó una subunidad de aproximadamente 14 kDa utilizando un anticuerpo contra la subunidad II de *Saccharomyces cerevisiae* y se secuenció el extremo amino terminal de este polipéptido.

Las secuencias que se obtuvieron fueron las siguientes:

Extremo amino-terminal: **EAPVAWQLGFQDSATSQAQA**

Secuencia interna: **XMDAIPGLNQUIWLTINREG**

A partir de estas secuencias se diseñaron tres oligodesoxinucleótidos de avance y tres reversos (figura 9) utilizando el uso mitocondrial de codones reportado para el gen *COX1* de *Polytomella* spp (Antaramián y col. 1996):

F1 gargcyccwgtwgcycyggcarttrggwtt

F2 cargayaxyxcyacwagycargcycargc

F3 ttgcarttrggwttycargayagrxcyac

B1 tgrttyaarcgwccwgggratrgcrtccat

B2 ccytcrcgrttratwgtyaaccaaatygtg

B3 gtyaaccaaatygtgrttyaarcgwccwgg

código: w= a+t, r=a+g, y= c+t

Búsqueda por PCR:

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo con dos concentraciones de magnesio (1 y 2 mM), 0.5mg de DNA total y 200 ng de cada oligodesoxinucleótido, utilizando las nueve combinaciones posibles.

Las reacciones se llevaron a cabo haciendo "*PCR en descenso*" (Touchdown PCR) (figura 10) utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización de 5 min a 94°C; 2 ciclos por cada grado de temperatura de: 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C hasta 30°C, 1 min a 72°C; luego se hicieron 40 ciclos en la mismas condiciones a una temperatura de apareamiento de 45°C y se hizo una extensión final de 10 min a 72°C (Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. ,1995).

Posteriormente se hizo un PCR anidado con los oligodesoxinucleótidos más internos es decir el F2 y el B1, con 1 mM de MgCl₂, 1ml del primer PCR y se amplificó por 50 ciclos a una temperatura de apareamiento de 50°C (figura 10). Las bandas que se obtuvieron se clonaron en PCRTM^{II}, y se secuenciaron. Tres de los productos de PCR contenían la misma secuencia parcial del gen COX2 de *Polytomella* spp.

Análisis mediante la técnica de tipo *Southern*:

El DNA total de ambas especies (10 mg) se digirió con diferentes enzimas y se corrieron en un gel al 1 % de agarosa a 25 V, durante 3 horas y posteriormente durante 4 horas a 50 V, el gel se desnaturalizó durante 1 hora con 1 M de NaOH + 1.5 M de NaCl, se neutralizó 1 hora con 1 M Tris pH 8.0 + 1.5 M de NaCl y se transfirió por capilaridad en una solución 10X SSC a membranas de nylon (*Southern*, 1979). En cada gel se utilizó como control positivo aproximadamente 10 ng del producto de PCR que contiene parte del gen COX2 de *Polytomella* spp.

Hibridación con el producto de PCR que contiene parte del gen COX2:

El producto de PCR de 300 nt se marcó radioactivamente mediante la técnica de PCR de la siguiente manera: 5 ml de CTP-³²P, 1 ml del plásmido, 200 ng de cada oligodesoxinucleótido F2 y B1, 1 mM de MgCl₂ en las siguientes condiciones de PCR: 5 min a 94°C; 50 ciclos : 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR marcado radioactivamente se purificó en una columna de Quick Spin Sephadex G-50 (*Boehringer*), se hirvió durante 10 min y se añadió a las membranas de nylon transferidas; la hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 60°C. Los lavados se hicieron en las siguientes condiciones: 15' con 2X SSC +1% SDS, 20' con 0.2X SSC + 1% SDS a 60°C.

La digestión del DNA total de *Polytomella* spp. con la enzima de restricción *Pst*I, así como en la doble digestión de esta enzima con *Hind*III dio una señal en una banda de aproximadamente 2 kb. Por otro lado la hibridación tipo Southern del DNA total de *C. reinhardtii* se llevó a cabo toda la noche a 60°C, y la membrana se lavó 15' con 2X SSC + 0.5% SDS. La digestión con *Kpn*I del DNA total de *C. reinhardtii* dio una señal positiva de aproximadamente 4 kb, esta banda es muy grande para intentar clonarla por lo que se están haciendo transferencia tipo Southern con digestiones dobles para obtener un fragmento más pequeño que de una señal positiva para poder construir un minibanco.

Secuencia amino terminal de la subunidad II

EAPVAWQLGFQDSATSQAQA



Secuencia de una región interna de la subunidad II

XMDAIPGLNQIWLTINREG

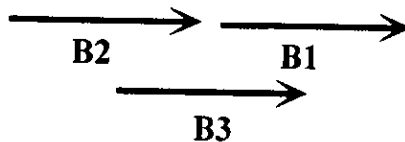
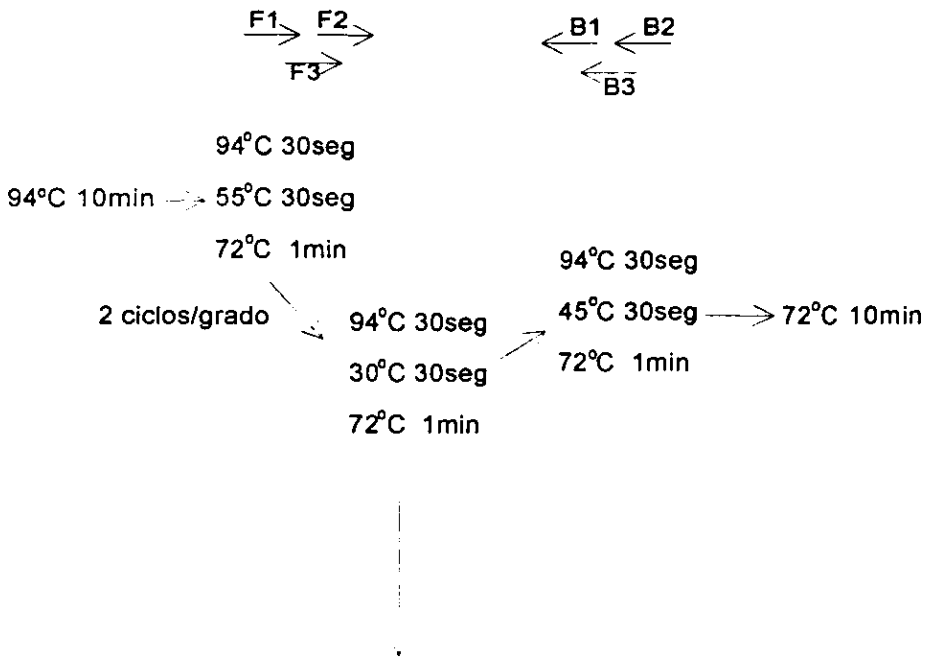


Figura 9: Oligodesoxinucleótidos diseñados para amplificar COX2 basados en la secuencia de la proteína.

PCR en descenso



PCR anidado

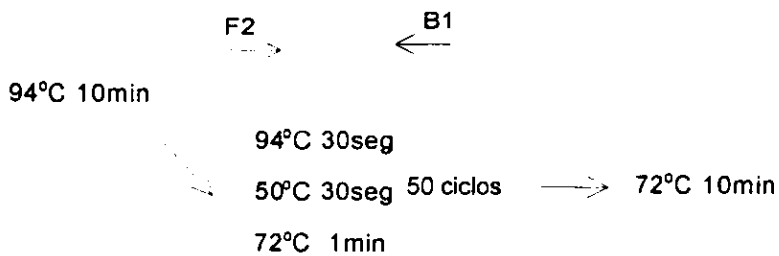


Figura 10: Esquematización de las técnicas de PCR utilizadas "PCR en descenso" y "PCR anidado"

Construcción de un minibanco de *Pst*I:

Se digirieron 60 μ g de DNA total de *Polytomella* spp. y se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Se purificó la región alrededor de 2 kb centrifugando el pedazo de agarosa a través de fibra de vidrio empacada en un tubo Eppendorf de 0.6 ml previamente perforado y recolectando el líquido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. El líquido se precipita con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y 3 volúmenes de etanol al 100%, se incubó 1 hora a -70°C , se centrifugó durante 10' y el precipitado se lavó con etanol al 70%.

Por otro lado se cortaron 10 mg del plásmido *BlueScript* con *Pst*I durante toda la noche, se desfosforiló con la fosfatasa de camarón (*Boehringer*) 1 hora a 37°C y se corrió en un gel de agarosa al 1% de donde se purificó la banda de la misma manera que el DNA total.

Se hizo una ligación durante toda la noche a 16°C , utilizando 20 ng de la banda de 2 kb del DNA total de *Polytomella* spp., 50 ng del plásmido y 1 μ l de T4 ligasa (1U, *Boehringer*) en un total de 10 μ l. El total de la ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 α de *E. coli*, las cuales se plaquearon en cajas de LB (amp 100 μ g/ml) con X-gal e IPTG para poder seleccionar las colonias blancas que contienen el inserto (figura 11).

Se aislaron alrededor de 60 colonias blancas las cuales se crecieron en parche y se transfirieron a membranas de nylon para hibridar nuevamente en las mismas condiciones usadas para la hibridación de la transferencia tipo Southern del DNA total. De estas clonas se escogieron 6 que dieron una señal positiva sobresaliendo la clona 1, se purificaron los plásmidos de estas clonas y se digirieron con *Pst*I. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se transfirieron nuevamente mediante la técnica de Southern a un nylon y se hibridó el nylon en las mismas condiciones.

Se amplificó por PCR utilizando los oligodesoxinucleótidos F2 y B1 en las mismas condiciones descritas anteriormente, utilizando como molde el DNA del plásmido de la clona 1 y la clona 6 para verificar si estas clonas son realmente positivas.

Secuenciación:

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

Cuando así lo requirió el protocolo, se desnaturalizó el DNA de la siguiente manera:

A 2-5 µg de DNA del plásmido, se le agregan 6 µl de NaOH 1 M y la cantidad de H₂O suficiente para 30 µl finales. Esta mezcla se incubó durante 5' a temperatura ambiente. A 30 µl de la mezcla anterior, se le agregaron 3 µl de acetato de amonio 2 M y 70 µl de etanol al 100%. Se mezcló y se incubó 30' a -70°C. La mezcla se centrifugó 10' a 15000 rpm en una centrifuga Eppendorf, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar, el precipitado se resuspendió en 5 µl de agua. Se prosiguió con el protocolo del proveedor.

Traducción y análisis comparativos de las secuencias:

Todas las traducciones y los análisis comparativos se hicieron con el programa GCG (Wisconsin) y con la base de datos del Gen Bank de 1997.

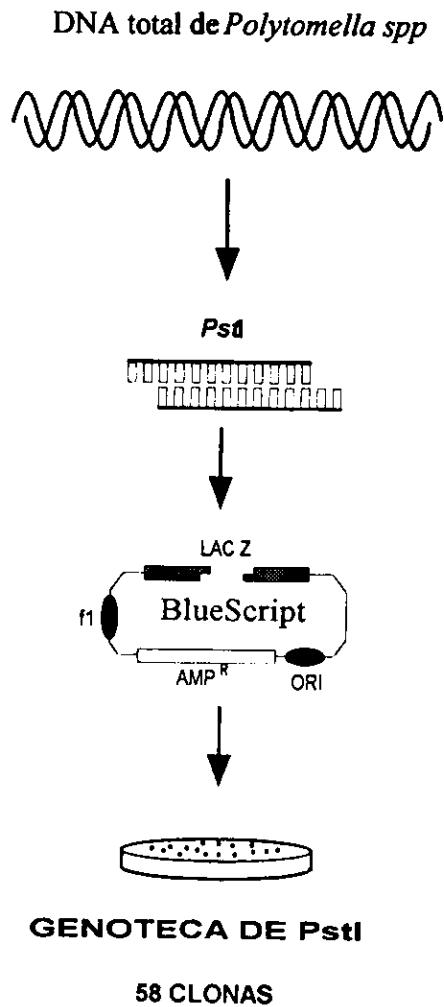


Figura 11: Construcción de un minibanco de DNA total de *Polytomella spp.*, digerido con la enzima *PstI*, los fragmentos de alrededor de 2kb se clonaron en el vector *BlueScript* (*Gibco*).

ANEXO II

Abreviaturas

A	Angström
ADP	Adenosín-5-difosfato
ATP	Adenosín-5-trifosfato
dATP	deoxi-adenosín-5-trifosfato
ddATP	dideoxi-adenosín-5-trifosfato
ATPasa	Adenosín trifosfatasa
BSA	Albúmina de suero bovino
c.b.p.	cuanto basta para
CTP	Citosín-5-trifosfato
dCTP	deoxi-citosín-5-trifosfato
ddCTP	dideoxi-citosín-5-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxioligonucleótidos de trifosfato
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
GTP	Guanosín-5-trifosfato
dGTP	deoxi- Guanosín-5-trifosfato
ddGTP	dideoxi- Guanosín-5-trifosfato
kDa	Kilodaltones
kb	Kitobases
LB	Luria Broth, medio para crecer <i>E. coli</i>
µg	microgramos
µM	micromolar
mM	milimolar
µm	micrómetros
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	cloruro de Sodio
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
SDS	Detergente dodecil sulfato de sodio
SME	Amortiguador (sacarosa 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1mM)
TBE	Amortiguador (Tris-Borato-EDTA)
TBS	Amortiguador (Tris HCL 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M)
TE	Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5
TEMED	N, N, N, N'-tetrametil etilenamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
TTP	timidín-5-trifosfato
dTTP	deoxi-timidín-5-trifosfato
ddTTP	dideoxi-timidín-5-trifosfato

Reprinted from

BBA

*Biochimica
et Biophysica Acta*

Biochimica et Biophysica Acta 1273 (1995) 118–202

Short sequence-paper

The deduced primary structure of subunit I from cytochrome *c* oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*¹

Anaid Antaramian^a, Roberto Coria^b, Jorge Ramírez^b, Diego González-Halphen^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., Apdo. Postal 70245, México, C. P. 045100, México.
^bDepartamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México City, México.

Received 9 October 1995; revised 4 December 1995; accepted 4 December 1995



Short sequence-paper

The deduced primary structure of subunit I from cytochrome *c* oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*¹

Anaid Antaramian^a, Roberto Coria^b, Jorge Ramírez^b, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., Apartado Postal 70-244, México, C.P. 045100, México

^b Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., México, C.P. México

Received 9 October 1995; revised 4 December 1995; accepted 4 December 1995

Abstract

We cloned and sequenced the mitochondrial gene encoding subunit I of cytochrome *c* oxidase (*coxI*) of *Polytomella* spp., a colorless alga related to *Chlamydomonas*. The purpose was to explore whether homology between the two species also exists at the level of a mitochondrial enzyme. The gene is 1512 bp long and contains no introns. The translated protein sequence exhibits 73.8% identity with its *Chlamydomonas reinhardtii* counterpart. The data obtained support the hypothesis that the separation of the colorless alga from the *Chlamydomonas* lineage was a late event in evolution, that occurred after the endosymbiotic process that gave rise to mitochondria.

Keywords: Mitochondrion; Cytochrome *c* oxidase; (*Polytomella*); (*Chlamydomonas*); (Chlorophyceae)

The genus *Polytomella* [1,2] has been classified as a colorless quadriflagellate of the family Chlamydomonadaceae [3,4]. *Polytomella* most likely lost its cell wall and its photosynthetic apparatus [5], therefore it is colorless and naked. Nevertheless, it shares several functional and structural features with the genus *Chlamydomonas* [4,6]. *Polytomella* exhibits large and highly organized mitochondria [7] with a classical electron transport chain [8]. We have chosen this colorless alga to study the mitochondrial respiratory chain components, which have been difficult to characterize in *Chlamydomonas reinhardtii* because of contamination with thylakoid components [9,10]. A highly active *bc₁* complex from *Polytomella* spp. has been purified and characterized [11]. The genus *Polytomella* is thought to have evolved from a *Chlamydomonas*-like precursor by losing the cell wall and functional chloroplasts [12]. Molecular evidence supporting the close relationship

between *Polytomella agilis* and *C. reinhardtii* has been provided from the nuclear encoded beta-tubulin genes [13], and the 18 S rDNA sequences [14]; moreover, both species exhibit a similar codon usage bias, lacking the use of triplets whose third position is an A [13]. Since the *C. reinhardtii* mitochondrial DNA (mtDNA) has been fully sequenced [15–19] we thought it was of interest to characterize a mitochondrial gene from *Polytomella* spp. We chose the highly-conserved *coxI* gene, which encodes the large subunit of cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1) [20] present in all mtDNAs characterized to date. To our knowledge, this is the first report of a mitochondrial gene sequenced from this colorless alga.

Strains and plasmids. *Polytomella* spp. (198.80, E.G. Pringsheim, algae collection from the University of Göttingen, Germany) was stored and maintained under the register number CDBB-951 at the Microbiological Collection of the Department of Biotechnology, CINVESTAV del IPN, México. The alga was grown in the medium described by Wise [3] supplemented with vitamins B₁ (0.06 mg/l) and B₁₂ (0.08 mg/l) [21]. *Escherichia coli* DH5 α was used to amplify recombinant plasmids. PTZ18R phagemid (Pharmacia) was used for subcloning and sequencing.

MtDNA isolation. Mitochondria from *Polytomella* spp.

Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; PCR, polymerase chain reaction.

* Corresponding author. Fax: +52 5 6225611; e-mail: dhalphen@ficsun1.fisiol.unam.mx

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL, GenBank Data Libraries under the accession number U31972

prepared as described by Gutiérrez-Carlos et al. [11], were treated for 15 min with 1 mg/ml DNase II at room temperature, and centrifuged 15 min at 14500 × g. Mitochondria were incubated for 12 h at 4°C in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.2), 2% Sarkosil, 10 mM EDTA and 100 mM NaCl [22]. This mixture was centrifuged at 14500 × g and the supernatant was extracted twice with 2 M Tris-HCl (pH 8.0)-saturated phenol, twice with phenol-chloroform and once with chloroform.

Construction of mtDNA libraries. mtDNA from *Polytomella* spp. (10 µg) was digested separately with the restriction enzymes *Eco*RI, *Bam*HI, and *Hind*III, and ligated into the pTZ18R vector. Standard recombinant DNA techniques were carried out as described by Sambrook et al. [23]. Transformed *E. coli* DH5α cells were plated on ampicillin-I.B. and recombinant plasmids were selected by loss of β-galactosidase activity.

PCR amplification and sequencing of *coxI* gene. mtDNA (1 µg) from *Polytomella* spp. was used as template for

amplification by PCR in the presence of 2 mM MgCl₂ and 200 ng of each of the following degenerate deoxyoligonucleotides, synthesized on an Applied Biosystems model 381 A DNA synthesizer. The forward probe 5'-CAC GGT GGA TCC ATG CTA TTG TTC + T) ATG GTA ATG CC -3' was designed based on the highly conserved sequence GHIIIMLIEMVMP, corresponding to residues 60-71 in *C. reinhardtii* cytochrome *c* oxidase subunit I. The backward probe 5'-ATA ATC GGA TCC (A + GCG (A + GCG TGG CAT (A + GCC AAC CAA ACC -3' was designed based on the highly conserved sequence towards the carboxy-terminus region of cytochrome *c* oxidase subunit I (GLAGMPRRMFY), corresponding to residues 428-439 in *C. reinhardtii*. A *Bam*HI site was included in both deoxyoligonucleotides to facilitate further cloning. For PCR amplification, samples were denatured for 12 min at 94°C, and subjected to 50 cycles of 30 s denaturation at 94°C, 45 s annealing at 55°C and 2 min extension at 72°C. A final extension for 12 min at 72°C

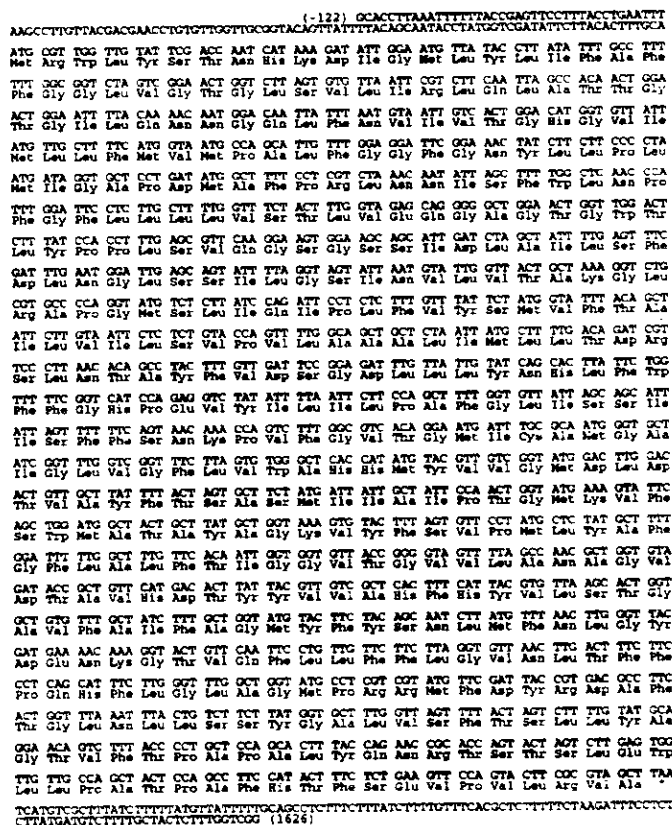


Fig. 1. Nucleotide sequence of cytochrome *c* oxidase subunit I from *Polytomella* spp. Start and stop codons of the *coxI* gene are underlined.

was carried out. The same conditions of PCR were used to amplify the 1.1 kb product, using as template the 14 different plasmids from the mtDNA-*HindIII* library. Clone H1 from the *HindIII* library was completely sequenced (3.1kb), using the kit Seq Ver 2 from USB, based on the method of Sanger et al. [24].

Southern analysis. The 1.1 kb PCR product was transferred to a nylon membrane and hybridized with the biotinylated probe of *coxI* gene from *C. reinhardtii* (a fragment from stock P-85 from *C. reinhardtii* CC-125) kindly provided by Dr. Elizabeth H. Harris (Chlamydomonas Genetics Center, Department of Botany, Duke University). The hybridization was carried out at 55°C, and the nylon membrane was washed twice with 5 × SSC containing 0.5% SDS, and once with 1 × SSC containing 1% SDS at the same temperature, and exposed overnight with a XR-OMAT-AR Kodak film.

Sequence analysis. Sequences were analyzed using the GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI). Alignments were carried out with the Pileup program [25] using sequences in the Swissprot data bank. Cladograms were constructed with the program Evolutionary Analysis (GCG package), and distances were corrected according to Kimura [26]. The terms similarity and homology are used as suggested by Reece et al. [27].

Characterization of the *coxI* gene from *Polytomella* spp.

Two degenerate deoxyoligonucleotides were designed based on highly conserved regions of the *coxI* gene. With these probes, a PCR-amplification product of 1.1 kb was obtained using mtDNA from *Polytomella* spp. as a template. Three mtDNA libraries were constructed and screened by PCR-mediated amplification, and a clone (1H) that gave rise to a product of 1.1 kb was identified in the *HindIII* library. The two 1.1 kb products gave positive hybridization with the *coxI* gene biotinylated probe from *C. reinhardtii* (data supplied for review but not shown). Clone 1H from *Polytomella* spp. was completely sequenced; it contained three ORFs. The middle ORF was identified as the full length *coxI* gene. The partial sequences of the genes flanking the *coxI* gene allowed the preliminary identification of a gene homologous to L4 (fragment 4 of the large subunit of rRNA), and in the same orientation than the *coxI* gene, a fragment homologous to *naif4* (a gene encoding for subunit 4 of NADH-ubiquinone reductase) of the linear mtDNA from *C. reinhardtii*. The presence of a gene homologous to L4 suggests that the ribosomal RNA genes may also be fragmented and scrambled in the mtDNA of *Polytomella* spp., sharing this peculiar pattern with other Chlamydomonadales [28].

The DNA sequence of the *coxI* gene from *Polytomella* spp. is illustrated in Fig. 1, it shows a continuous open reading frame (ORF) of 1512 base pairs in its full length. As in *C. reinhardtii*, the gene is not interrupted by intervening sequences, in contrast to homologous genes from *Podospira anserina* [29] and fungi [30–32]. Nucleotide

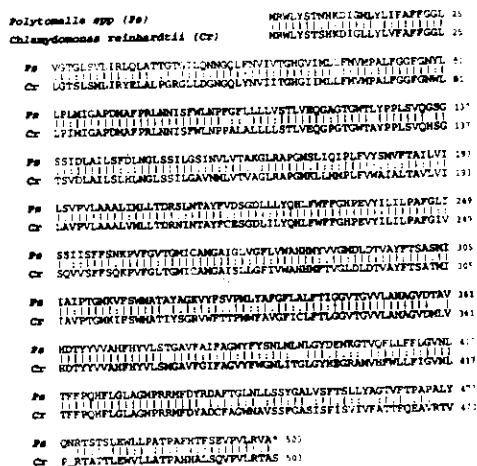


Fig. 2. Sequence alignment of the predicted cytochrome c oxidase subunit I gene from *Polytomella* spp. (P) with that from *C. reinhardtii* (C). Numbering refers to the *Polytomella* spp. sequence. Amino acid identities are indicated by (○); conserved amino acids by colons (:) and semi-conserved residues by periods (·).

sequence comparison of *coxI* genes from *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii* revealed 68.7% identity within the open reading frame.

Translation of the DNA sequence predicts a protein of 503 residues with a molecular mass of 54781 Da. The alignment of the amino acid sequences of cytochrome c oxidase subunit I from *Polytomella* and *C. reinhardtii* [33] (Fig. 2) revealed an identity of 73.8% and a similarity of 87.9%. The similarity between the two subunits I of the cytochrome c oxidase is extremely high, and extends over the complete sequence. The predicted apoprotein of subunit I of cytochrome c oxidase from *Polytomella* spp. contains the 6 invariant histidine residues (H60, H235, H284, H285, H370, H372) that are known to be the ligands for heme *a*, and the Cu_B-heme *a*₃ binuclear center [34]. Its hydropathy profile is similar to those of cytochrome c oxidase subunit I from other organisms, and fits the current model of 12 transmembrane helices [35,36]. Fig. 3 shows a cladogram generated from cytochrome oxidase subunit I sequences. The result obtained showed that *Polytomella* spp. *coxI* sequence clearly affiliates with its *C. reinhardtii* homolog.

A comparison of the pattern of codon utilization for cytochrome c oxidase subunit I of *Polytomella* spp. with that of *C. reinhardtii*, is shown in Fig. 4. As in *Chlamydomonas*, a significant bias is found in each codon family; nevertheless 7 codons that are not used in *C. reinhardtii*, are used in *Polytomella* spp. *coxI* gene: UUA (L), CUC (L), GUG (V), ACA (T), GCA (A), AAU (N) and GGA (G). As in *C. reinhardtii*, among the 'absent' codons is

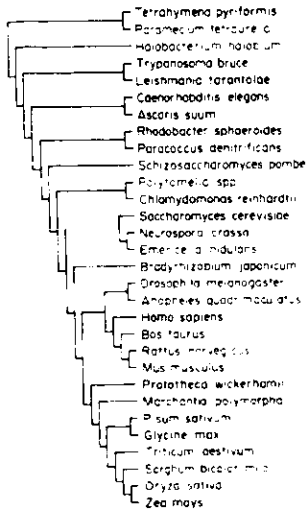


Fig. 3. Phylogenetic analysis of cytochrome c oxidase subunit I sequence. To construct the cladogram, the amino acid sequences of cytochrome c oxidase subunit I were compared among different organisms (SWISS SPROT data bank), including the one of *Polytomella* spp. obtained in this study.

CGG, which in plant mitochondria codes for W rather than R [37,38]. Interestingly, in the 15.8 kb mtDNA of *C. reinhardtii* only 3 tRNA genes (for W, Q and M) have been detected; therefore, at least 17 to 20 tRNAs have to be imported from the cytoplasm to support intra-mitochondrial protein synthesis [19]. The presence of a more balanced mitochondrial codon usage in *Polytomella* spp. in contrast with the extreme codon bias of *C. reinhardtii*, leads us to hypothesize that a more larger genome, encod-

ing more than three tRNA genes, will be found in *Polytomella* spp.

This work describes the cloning and sequencing of a new gene of the *coxI* family, and to our knowledge, the first mitochondrial gene sequenced from the colorless alga *Polytomella* spp. The data obtained supports the hypothesis of Round [12], which states that the separation of the colorless alga such as *Polytomella* from the *Chlamydomonas* lineage was a late event in evolution, that took place long after the endosymbiotic process that gave rise to mitochondria. The high similarity of the mitochondrial *coxI* sequences, the clustering of *Polytomella* and *Chlamydomonas* in the constructed phylogenetic tree, the presence of a similar mitochondrial codon usage, and the suggested presence of fragmented and scrambled ribosomal RNA genes in *Polytomella*, strongly support the idea of a common mitochondrial ancestor for both species. We conclude that the genus *Polytomella* is a unique model to use in the study of the mitochondrial respiratory complexes in the Chlamydomonadales, and to understand the process and evolutionary significance of secondary loss of organelles among protists.

The authors gratefully acknowledge the kind help of Dr. Elizabeth H. Harris (Duke University) in sending us the *coxI* gene probe from *C. reinhardtii*. We are indebted to Dr. Jovita Martínez (CINVESTAV del IPN) for maintaining the *Polytomella* spp. strain in her collection, and to Ana María Escalante and Gerardo Coello (Unidad de Cómputo, IFC, UNAM) for their help in setting up the molecular biology related programs. The authors acknowledge the technical expertise of Dr. Laura Ongay (Unidad de Biología Molecular, IFC, UNAM) in the synthesis of *coxI* deoxyoligonucleotides. We are grateful to Miriam Vázquez-Acevedo for technical assistance, and to Drs. M. Gavilanes, C. Gómez-Lojero, A. Gómez-Puyou, E. Gutiérrez-Cirlos, D.W. Krogmann, and A. Lazcano for helpful discussions and critical review of the manuscript. We also thank Dr. Michael Melkonian (Universität zu Köln) for valuable suggestions. This work was supported by grant 1371-N9206 from CONACyT, Mexico, and by grant IN-204595 from DGAPA, UNAM.

References

- [1] Aragao, H. (1910) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2: 42–57
- [2] Pringsheim, E.G. (1955) J. Protozool. 2: 137–145.
- [3] Wise, D.L. (1959) J. Protozool. 6: 19–23.
- [4] Melkonian, M. (1990) in Handbook of Protozoista (Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J., eds.), pp. 608–616. Johns & Bartlett, Boston.
- [5] Prentis, H.R. and Melkonian, M. (1984) Pl. Syst. Evol. 146: 57–74
- [6] Mann, K.R. and Stewart, K.D. (1984) in Systematics of the Green Algae (Irvine, D.E.G. and John, D.M., eds.), pp. 29–72. Academic Press, London
- [7] Burton, M.D. and Moore, J. (1974) J. Ultrastruc. Res. 48: 414–419.
- [8] Lloyd, D. and Chance, B. (1968) Biochem. J. 107: 829–837.
- [9] Arieta, A. (1993) C. R. Acad. Sci. Ser. III-Vie 317: 11–19.

		2nd										
		U	C	A	G							
U	Phe	24	12	Ser	8	8	Tyr	12	6	Cys	0	1
	Phe	21	28	Ser	2	0	Tyr	11	10	Ser	1	4
	Leu	16	0	Ser	0	0	Stop	1	1	Stop	0	0
	Leu	26	49	Ser	0	0	Stop	0	0	Tyr	8	14
C	Leu	28	1	Pro	8	3	His	8	2	Arg	8	10
	Leu	6	0	Pro	1	1	His	3	18	Arg	2	3
	Leu	5	18	Pro	13	19	Gln	5	8	Arg	0	0
A	Leu	3	4	Pro	0	0	Gln	6	1	Arg	0	0
	His	24	24	Thr	21	23	Asn	10	0	Ser	13	9
G	His	3	8	Thr	8	10	Asn	18	14	Ser	18	12
	His	2	0	Thr	7	0	Lys	6	4	Arg	0	0
	Met	22	22	Thr	0	0	Lys	0	0	Arg	0	0
G	Val	18	9	Ala	30	31	Asp	10	8	Gly	28	45
	Val	9	13	Ala	7	15	Asp	4	6	Gly	2	4
	Val	12	25	Ala	10	0	Glu	2	0	Gly	16	9
	Val	6	0	Ala	8	0	Glu	3	7	Gly	2	0

Fig. 4. Codon usage of the mtDNA sequences of *coxI* from *Polytomella* spp. (this study) and from *C. reinhardtii* [33]. Boxes indicate conspicuous differences in the codon usage.

- [10] Attia, A., De Vitry, C., Pierre, Y., and Popot, J.L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 226–234.
- [11] Gutiérrez-Cirlos, E.B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R., and González-Halphen, D. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9147–9154.
- [12] Round, F.E. (1980) *Biosystems* 12, 61–69.
- [13] Conner, T.W., Thompson, M.D., and Sillow, C. (1989) *Gene* 84, 345–358.
- [14] Melkonian, M. and Surek, B. (1995) *Bull. Soc. Zool. Fr.* 120, in press.
- [15] Klück, U. and Neuhaus, H. (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 462–469.
- [16] Ma, D.P., Yang, Y.W., King, T.Y., and Hasnain, S.E. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15, 357–359.
- [17] Michaelis, G., Vahrenholz, C., and Pratje, E. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223, 211–216.
- [18] Boer, P.H. and Gray, M.W. (1991) *Curr. Genet.* 19, 309–312.
- [19] Vahrenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B., and Michaelis, G. (1993) *Curr. Genet.* 24, 241–247.
- [20] Capaldi, R.A. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 569–596.
- [21] Cantor, M.H. and Burton, M.D. (1975) *J. Protozool.* 22, 135–139.
- [22] Hudspeth, M.E.S., Shumard, D.S., Tatti, K.M., and Grossman, L.L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 610, 221–228.
- [23] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- [24] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- [25] Devereux, J., Haeblerl, P., and Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387–395.
- [26] Kimura, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge.
- [27] Reeck, G.R., De Haen, C., Teller, D.C., Doolittle, R.F., Fitch, W.M., Dickerson, R.E., Chambon, P., McLachlan, A.D., Margoliash, E., Jukes, T.H., and Zuckerkand, E. (1987) *Cell* 50, 667.
- [28] Denovan-Wright, E.M. and Lee, R.W. (1994) *J. Mol. Biol.* 241, 298–311.
- [29] Cummings, D.J., Michel, F., and McNally, K.L. (1989) *Curr. Genet.* 16, 381–406.
- [30] Bonitz, S.G., Gorrizi, G., Thalenfeld, B.E., and Tzagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11927–11941.
- [31] Hardy, C.M. and Clark-Walker, G.D. (1991) *Curr. Genet.* 20, 99–114.
- [32] Tian, G.L., Michel, F., Macadre, C., and Lazowska, J. (1993) *Gene* 124, 153–163.
- [33] Vahrenholz, C., Pratje, E., Michaelis, G., and Dujon, B. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 201, 213–224.
- [34] Tsukahara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, I., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* 269, 1069–1074.
- [35] Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Hill, J., Lemieux, L., Ma, J., Georgiou, C., Fetter, J., Shapleigh, J.P., Tecklenburg, M.M.J., Babcock, G.T., and Gennis, R.B. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 121–136.
- [36] Brown, S., Moody, A.J., Mitchell, R., and Rob, P.R. (1993) *FEBS Lett.* 316, 216–223.
- [37] Gray, M.W. and Boer, P.H. (1988) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 319, 135–147.
- [38] Fox, T.D. and Leaver, C.J. (1981) *Cell* 26, 315–323.