



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CLONACIÓN DE LOS cDNAs DE LOS GENES
petA Y *petD* QUE CODIFICAN PARA LA
APOCITOCROMO *f* Y LA SUBUNIDAD IV
DEL COMPLEJO *bf* DE *Euglena gracilis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS SANTILLÁN TORRES



Dirección: Dr. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Dra. ARIANE ATTEIA CARPENTIER

MÉXICO D. F.

OCTUBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM bajo la dirección conjunta del Dr. Diego González-Halphen (tutor responsable ante el posgrado) y de la Dra. Ariane Atteia Carpentier.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado parcialmente por NIH/Fogarty, USA (TW01176-01); CONACYT, México (27754N); DGAPA, México (IN202598). Durante los estudios de doctorado goce de una beca de DGAPA-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día_____

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Heliodoro Celis Sandoval	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Javier Placencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Jorge Ramírez Salcedo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Xóchitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos

A la Dra. Rocio Vargas Sanders (a quien desafortunadamente perdimos el pasado Noviembre de 2002) del Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM, a quien tuvé el privilegio de trabajar con tan amable persona y compartir con ella, el gusto de investigar en la nascente área del DNA antiguo, al DNA remanente en los restos de animales fosilizados y humanos prehispánicos, provenientes de zonas arqueológicas de México y que, con su recomendación, tuve la fortuna de realizar el trabajo experimental de mi tesis Doctoral en laboratorio del Dr. Diego González Halphen, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. Diego González Halphen, por su apoyo, confianza y amistad que tuvé de él para realizar mis estudios de posgrado.

por apoyar mis estudios de posgrado, desde un principio como amigo, me ha aconsejado y confiado parte del trabajo en su área investigación.

A la Dra. Ariane Atteia Carpentier, cuyo entusiasmo e interés en la investigación, encontré en ella, junto con el de Robert van Lis, la amistad y disposición para salvar algunas de las dificultades técnicas que se presentaron durante el desarrollo de mi trabajo.

Al grupo de trabajo del Dr. D. González Halphen con quien compartí en el laboratorio y en los seminarios semanales la alegría y preocupación que nos producían los resultados obtenidos en cada uno de nuestros proyectos de investigación; Adrián Reyes Prieto, Ariane Atteia Carpentier, Anaid Antaramian, Francisco Figueroa, Miriam Vázquez Acevedo, Lorena Morales, Robert van Lis, Soledad Funes, Valentin De La Cruz y Xochitl Pérez Martínez.

A Miriam Vázquez Acevedo por su incansable apoyo técnico en cada uno de los proyectos que se realizan en el laboratorio.

Al Señor Alfredo Octaviano García por su entusiasmo en mantener el laboratorio en orden y tener la cristalería siempre limpia y lista para realizar los diferentes ensayos experimentales, inclusive por su disponibilidad siempre solicita para ayudar al estudiante en sus labores de investigación.

A la Dra. Laura María Ongay Larios, Bióloga Guadalupe Códiz y Bióloga Dolores Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su apoyo técnico en la secuenciación de fragmentos de DNA y síntesis de oligodesoxinucleótidos.

Al Dr. J. d'Alayer del Institut Pasteur, Francia, por su apoyo técnico en la secuenciación de peptidos.

Al Dr. M. Gonzalo Claros, del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España, por el análisis de hidrofobicidad de la apocitocromo *f* y la subunidad IV de *Euglena gracilis*.

Al Dr. J. L. Popot del Institut de Biologie Physico-Chimique en el Centre National de la Recherche Scientifique Unité Prope de Recherche, por el obsequio de los antisueros anti subunidad IV y anticitocromo *b₆*,

Al Dr. Yves del Institut de Biologie Physico-Chimique en el Centre National de la Recherche Scientifique Unité Prope de Recherche, por su notificación acerca de las diferencias en el dominio de regulación de la expresión del citocromo *f* durante la preparación del manuscrito para su publicación (Artículo 1),

Al Dr. W. Krogmann de la Purdue University, USA, por sus comentarios al manuscrito para su publicación (Artículo 1)

A la Dra. Patricia Ponce Noyola, del Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, México por su interés y apoyo experimental en mi trabajo.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez del Instituto Nacional de Cardiología, México, por el obsequio de la cepa de colección de *Euglena gracilis* con la que se realizó este trabajo.

Al grupo de trabajo del Dr. Rafael Moreno Sánchez y al de la Dra. Erminia Loza de la facultad de Química, por las discusiones constructivas que se gestaban por los resultados expuestos durante los seminarios a los que fui invitado.

A la Señorita Leticia García Gutierrez de la Facultad de Química, por su excelente labor secretarial y apoyo al estudiante en las diferentes etapas del trámite de inscripción al posgrado.

Al Biólogo Gerardo Coello Coutiño, Bióloga Ana María Escalante Gonzalbo, Ingeniero Juan Manuel Barbosa Castillo, Ingeniera Ivett Rosas Arciniega, Francisco Pérez Eugenio y Sergio Rojas Hernandez de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su honorable dedicación en tener al día, la red de comunicaciones electronica para acceder a las diferentes instancias de información académica en el mundo.

Al Señor Arturo Franco Torres de la Unidad de Fotografía y Dibujo, por su apoyo técnico en el revelado y positivado de fotografías para su publicación.

A mi comité tutorial y a mi jurado de examen doctoral, por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de mi preparación académica.

A la UNAM, por darme la oportunidad de estudiar un posgrado y un espacio para continuar superandome profesionalmente.

A mi familia, por darme el apoyo y el amor de siempre y a quien DEDICO esta tesis:

**Vita, Felipe, Jorge, Norberto, Pilar, Marco Antonio,
Rosalba, Erika, Ulises, Daniel, Verónica, Isaí, Misael
e Itzel.**

Índice de Materias

	Página
Resumen	13
Introducción	14
El cloroplasto.....	14
Importación de proteínas al cloroplasto de <i>E. gracilis</i>	16
El complejo de citocromos <i>bf</i>	17
Los genes <i>pet</i> y biogénesis del complejo <i>bf</i>	24
El complejo <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	26
Hipótesis y Objetivo	27
Materiales y Métodos	28
Cultivo de <i>E. gracilis</i>	28
Obtención de cloroplastos de <i>E. gracilis</i>	28
Solubilización del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	29
Análisis de la proteína.....	30
-A) Electroforesis en geles azules nativos de poliacrilamida (BN-PAGE).....	30
-B) Gel de poliacrilamida desnaturalizante de Schägger y von Jagow.....	31
-C) Gel de poliacrilamida desnaturalizante de Laemmli.....	33
Estimación de la concentración de clorofila y proteína.....	34
Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.....	35
Tinción de los geles de poliacrilamida con plata.....	35
Tinción de los geles de poliacrilamida con TMBZ.....	36
Transferencia de las proteínas a membranas de polivinildifluoruro (Problot) para su secuenciación.....	36
Inmunoréplicas tipo Western.....	36
Extracción del DNA total.....	37
Extracción del RNA total.....	38

Extracción de plásmido.....	39
Estimación de la concentración de los ácidos nucleicos.....	39
Calidad de los ácidos nucleicos.....	40
Transferencia de los ácidos nucleicos a membranas de Hybond-N (réplicas tipo Southern y Northern).....	40
Clonación de los cDNAs de los genes <i>petA</i> y <i>petD</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	41
Transcripción reversa y PCR (RT-PCR).....	41
Purificación de los productos de la RT-PCR.....	43
Ligación de los productos de la RT-PCR.....	43
Obtención de las células competentes de <i>E. coli</i> para transformar con plásmidos.....	44
Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i>	44
Obtención de plásmidos y secuenciación.....	44
Obtención de sondas para hibridizaciones tipo Southern y Northern.....	45
Resultados	46
Identificación del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i> mediante geles nativos de poliacrilamida y SDS-PAGE de segunda dimensión.....	46
Solubilización del complejo de citocromos <i>bf</i> de las membranas del cloroplasto de <i>E. gracilis</i> y caracterización de sus subunidades polipeptídicas.....	48
Determinación de la estructura primaria del cDNA del gen <i>petA</i> que codifica al citocromo <i>f</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	50
Determinación de la estructura primaria del cDNA del gen <i>petD</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	58
Discusión	62

Identificación del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i> mediante geles nativos de poliacrilamida y SDS-PAGE de segunda dimensión.....	62
Determinación de la estructura primaria de los cDNAs de los genes <i>petA</i> y <i>petD</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	65
Determinación de la estructura primaria de los genes <i>petA</i> y <i>petD</i>	68
Importación de proteínas cloroplásticas codificadas por genes nucleares en <i>E. gracilis</i>	70
Conclusiones	74
Perspectivas	76
Referencias	77
Anexos	84

Artículo 1. En donde aparecen publicados los resultados obtenidos en esta tesis.

1.-Santillán-Torres, J. L., Atteia, A., Claros, M. G., and González-Halphen, D. (2003). Cytochrome *f* and subunit IV, two essential components of the photosynthetic *bf* complex typically encoded in the chloroplast genome, are nucleus-encoded in *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta. 1604:180-189.

Artículos 2 y 3. Artículos de revisión con temas relacionados con esta tesis.

2.-González-Halphen, D., Pérez-Martínez, X., Funes, S., Reyes-Prieto, A., y Santillán-Torres, J. L. (2003). La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. Mensaje Bioquímico. XXVII:201-220.

3.-Funes, S., Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acebedo, M., Van Lis, R., Reyes-Prieto, A., Santillán-Torres, J. L., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P., and González-Halphen, D. (2002). Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: perspectives for the allotopic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies. In : Recent Research Developments in Human Mitochondrial Myopathies. J. J. Garcia Trejo Ed. ISBN: 81-7736-139-2. Signpost. Research 37/661(2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India

Artículo 4. Artículo de revisión con tema no relacionado con esta tesis.

4.-Santillán Torres, J. L. (2000). El ADN antiguo y sus aplicaciones. Arqueología. 23:145-152.

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Importación de proteínas del citoplasma al cloroplasto en <i>E. gracilis</i>	17
Figura 2. Complejos proteicos fotosintéticos.....	18
Figura 3. Imagen cristalografica del complejo <i>bf</i>	20
Figura 4. Estructura cristalina del citocromo <i>f</i>	23
Figura 5. Secuencia de los oligodesoxinucleótidos para amplificar los cDNAs de los genes <i>petA</i> y <i>petD</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> del cloroplasto de <i>E. gracilis</i>	42
Figura 6. Perfil electroforetico del complejo <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i> en geles nativos azules.....	47
Figura 7. Perfil electroforetico de las subunidades proteicas del complejo <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	48
Figura 8. Secuencias N-terminales de los componentes polipeptidicos del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	49
Figura 9. Secuencia nucleotidica de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR con RNA total de <i>E. gracilis</i> y que presentan similitud con otros citocromos <i>f</i>	53
Figura 10. Secuencia nucleotidica del cDNA del gen <i>petA</i> de <i>E. gracilis</i>	54
Figura 11. Uso de codones de los genes <i>petA</i> y <i>petD</i> de <i>E. gracilis</i>	55
Figura 12. Secuencia deducida de residuos de aminoácidos de la presecuencia de la preapocitocromo <i>f</i> del complejo de citocromos <i>bf</i> de <i>E. gracilis</i>	56
Figura 13. Comparación de secuencias de diferentes citocromos <i>f</i>	57
Figura 14. Secuencia nucleotidica de los amplicones obtenidos	

mediante RT-PCR con RNA total de <i>E. gracilis</i> y que presentan similitud con subunidades IV.....	59
Figura 15. Secuencia nucleotidica del cDNA del gen <i>petD</i> de <i>E. gracilis</i>	60
Figura 16. Comparación de secuencias de diferentes subunidades IV.....	61
Figura 17. Modelos tridimensionales del citocromo <i>f</i> y de la subunidad IV con base en la estructura cristalina de los mismos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
Figura 18. Hibridizaciones tipo Northern.....	69

Abreviaturas

BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato de sodio.

BN-PAGE Electroforesis en geles nativos azules de poliacrilamida.

APS Persulfato de amonio.

ATP Adenosina trifosfato.

COX I Subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial.

cDNA Cadena complementaria de ácido desoxiribonucleico.

CTP Citidina trifosfato.

CN-PAGE Electroforesis en geles nativos incoloros de poliacrilamida.

CAPS Ácido-3-(cicloexilamino)-1-propanosulfonico.

CTAB Bromuro de cetil amonio.

DNA Ácido desoxiribonucleico.

DTT Ditioneitol.

DO Densidad óptica.

DEPC Dietilpirocarbonato.

EDTA Ácido etilenediaminotetracetico.

GTP Guanosina trifosfato.

MOPS Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfonico.

NBT Nitro azul tetrazolium.

PMSF

PTC Péptido de tránsito cloroplastico.

PCR Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

pb Pares de bases.

RNA Ácido ribonucleico.

RNA_m RNA mensajero

rRNA RNA ribosomal.

rpm revoluciones por minuto.

RT-PCR Transcripción inversa seguida de la PCR.

SDS Dodecil sulfato de amonio.

Tic Translocador de la membrana interna del cloroplasto.

Toc Translocador de la membrana externa del cloroplasto.

TTP Timidina trifosfato.

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino.

TMBZ 3,3',5,5'tetrametilbenzidina.

Tris Hidroximetilaminometano.

**Símbolos de una y tres letras
para los aminoácidos**

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

**Símbolos de una letra para las
bases de los ácidos nucleicos**

A	Adenina
G	Guanina
C	Citosina
T	Timina
U	Uracilo

INTRODUCCIÓN

El cloroplasto

El cloroplasto es el organelo de las plantas y algas en donde se lleva a cabo la fotosíntesis. Este organelo se originó de la asociación endosimbiótica entre una cianobacteria y un eucarionte no fotosintético ancestrales (Margulis, 1970). Los cloroplastos de las glaucofitas, algas rojas, algas verdes y plantas son los descendientes directos de esta asociación endosimbiótica primaria. La evidencia de que los cloroplastos provienen de una cianobacteria, es la similitud que muestran sus secuencias de DNA. Un segundo argumento a favor del origen de los cloroplastos por endosimbiosis primaria, es que ellos están rodeados por dos membranas. Sin embargo, existen cloroplastos que emergieron de la asociación endosimbiótica entre un alga verde ó roja y un eucarionte no fotosintético (endosimbiosis secundaria entre dos eucariontes). Estos cloroplastos se conocen como cloroplastos secundarios y se caracterizan por tener mas de dos membranas. Se piensa que en el caso de los euglenoides y de las chlorarachniotas, el cloroplasto emergió de un alga verde, mientras que en los dinoflagelados, apicomplejos, criptomonadas, algas cafés y diatomeas, el cloroplasto emergió de un alga roja (Cavalier-Smith, 2003; Palmer, 2003). Aunque hay evidencias que indican que los plástidos de los apicomplejos emergieron de un alga verde (Funes y col., 2002). En el caso del cloroplasto de *Euglena* y en los dinoflagelados, existe una tercera membrana que corresponde a la membrana vacuolar del huésped en donde el simbiote quedó atrapado, mientras que las membranas externa e interna corresponden a las del cloroplasto endosimbiote. También existen plástidos más complejos, como en las diatomeas y apicomplejos que tienen cuatro membranas (Gibbs, 1978; Waller y col., 1998).

E. gracilis es un protista de vida libre, que habita en arroyos de agua dulce y está estrechamente relacionado con los tripanosomátidos, como los patógenos humanos *Trypanosoma* y *Leishmania* (Gray, 1989; Yasuhira y Simpson, 1997; Tessier y col., 1997). Los tripanosomátidos tienen genes que codifican para proteínas que se encuentran recluidas en peroxisomas altamente especializados

llamados glicosomas, ausentes en todos los demás eucariontes, incluyendo a los euglenoides. Algunas de las proteínas de los tripanosomátidos son homólogas a proteínas que se encuentran en el cloroplasto ó en el citosol de plantas y algas, por lo que se ha propuesto que el ancestro de los tripanosomátidos pudo haber sido un organismo fotosintético (Hannaert y col., 2003).

Durante la simbiogénesis de la cianobacteria y su establecimiento como cloroplasto, la mayoría de los genes requeridos para sus funciones se transfirieron al núcleo de la célula hospedera. Con el tiempo, se desarrolló un sistema de reconocimiento y translocación para importar a través de la doble membrana del cloroplasto primario, a las proteínas ahora codificadas en el núcleo y sintetizadas en el citosol de la célula (May y Soll, 1999). La vía general de importación de proteínas al cloroplasto primario es postraducciona y la proteína que es importada se sintetiza como preproteína. La preproteína tiene una presecuencia N-terminal, llamada péptido de tránsito cloroplástico (PTC) que la dirige hasta su organelo blanco. El PTC es una extensión N-terminal de tamaño variable, entre 20 y 120 residuos de aminoácidos y en general carece de aminoácidos conservados. La región amino del PTC carece de residuos de glicina, prolina y de residuos con carga positiva, mientras que en el dominio carboxilo terminal se puede predecir la formación de una tira β -anfifílica en un ambiente hidrofóbico. La porción central entre estos dos dominios carece de residuos ácidos y es rica en residuos hidroxilados como serina y treonina (May y Soll, 1999). Sin importar su destino final en el cloroplasto, todas las proteínas precursoras conocidas se importan al organelo a través de los complejos Toc (translocador de la membrana externa del cloroplasto) y Tic (translocador de la membrana interna del cloroplasto). En principio, en un proceso irreversible dependiente de ATP y GTP, el PTC interactúa con el complejo Toc y se inserta en el canal de translocación de la membrana externa. Enseguida, al hacer contacto con el complejo Tic, en un proceso dependiente de ATP, la proteína precursora se introduce al estroma del cloroplasto. En el estroma, el PTC es removido por una peptidasa estromal. Las preproteínas que van al lumen tilacoidal tienen un PTC bipartito, con un dominio N-proximal que las dirige al estroma y un domino distal que las dirige a la

membrana tilacoidal (Howe y Merchant, 1993). En el lumen del cloroplasto, el PTC es removido por la peptidasa correspondiente. Algunos de los componentes de los complejos Toc y Tic han mostrado ser homólogos a proteínas del sistema de secreción de cianobacterias. Esto sugiere que el sistema de importación mediante un PTC evolucionó a través de modificaciones en los sistemas existentes de translocación membranal presentes en el endosimbionte primario, de tal forma que con la contribución de la célula hospedera, se indujo a que el transporte operara, ahora, en dirección inversa (van Dooren y col., 2001).

Importación de proteínas al cloroplasto de *E. gracilis*.

En *E. gracilis* los precursores de las proteínas cloroplásticas tienen presecuencias de aproximadamente 140 residuos de aminoácidos, cuyas secuencias no son conservadas (Sharif y col., 1989). Sin embargo, en los PTC se pueden predecir dos dominios para dirigir a las proteínas a través de las tres membranas que conforman al cloroplasto de este protista (van Dooren y col., 2001). El primero de ellos, en el extremo N-terminal, es semejante al péptido señal de las proteínas de secreción bacteriana y dirige de manera cotraduccional a la proteína hacia el retículo endoplásmico (figura 1). La proteína que se sintetiza *de novo* se ancla a la membrana mediante una secuencia hidrófoba ubicada en el segundo dominio de la presecuencia, el cual es semejante al PTC ortodoxo. La proteína anclada a vesículas del retículo endoplásmico es transportada al aparato de Golgi como una proteína integral de membrana. Los primeros 60 residuos de la proteína transportada se orientan hacia el lumen de las vesículas. El resto de la presecuencia, junto con la proteína madura, se orienta hacia el citoplasma. Las vesículas transportadoras desprendidas del aparato de Golgi se fusionan con la tercera membrana del cloroplasto, exponiendo al segundo dominio del PTC con la membrana externa del cloroplasto y posteriormente con la membrana interna, en donde interactúa con complejos de importación semejantes a los complejos Toc y Tic de plantas, respectivamente (van Dooren y col., 2001, Slávikova y col. 2005).

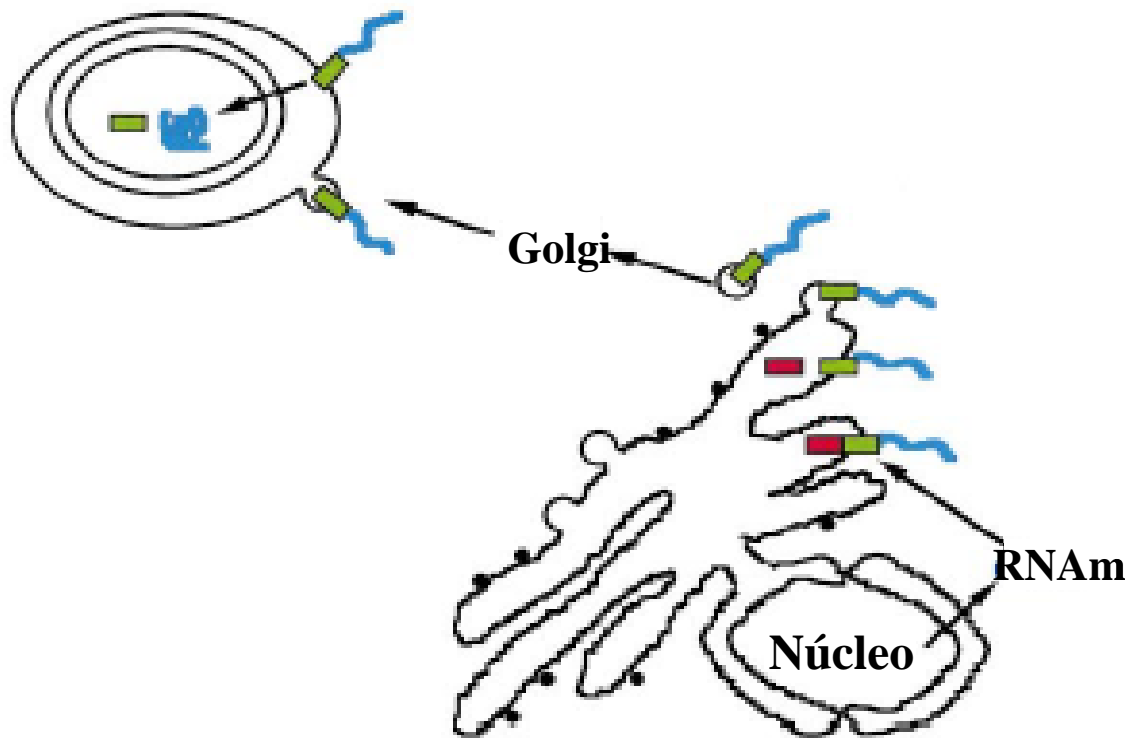


Figura1. La figura ilustra el transporte de proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo de *E. gracilis* hacia el organelo. En la presecuencia (en color rojo-verde) de las proteínas que se importan al cloroplasto hay una señal hidrofóbica cuya función es impedir que la proteína completa se transloque en el Retículo endoplásmico (RE). Una porción de la presecuencia se desprende (en rojo) en el RE, mientras que el resto de la proteína viaja como proteína integral de membrana hacia el aparato de Golgi donde se redirecciona hacia el cloroplasto. La región C-terminal de la proteína (en azul) permanece en el citosol. Después de la fusión con la membrana más externa del cloroplasto, las proteínas son translocadas en el estroma del mismo (Figura tomada de van Doren y col. 2001).

El complejo de citocromos *bf*.

En la membrana tilacoidal se encuentran varios complejos proteicos involucrados en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP durante la fotosíntesis (figura 2). Uno de estos transportadores de electrones es el complejo de citocromos *bf*, también llamado *b₆f*.

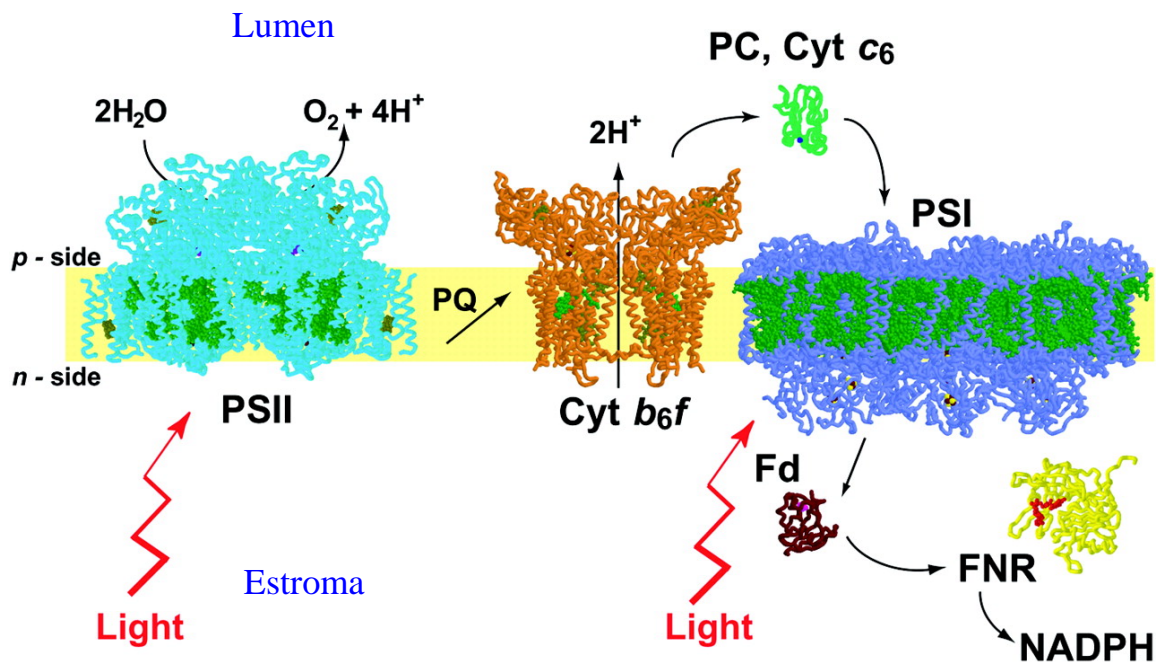


Figura 2. Complejos de proteínas membranales responsables del transporte de electrones y translocación de protones (H^+) en la fotosíntesis oxigénica. PSII, fotosistema II; Cyt b_6f , complejo de citocromos b_f ; PSI, fotosistema I. Proteínas solubles transportadoras de electrones: PC, plastocianina; Cyt c_6 , citocromo c_6 ; Fd, ferredoxina; FNR; ferredoxina $NADP^+$ reductasa. Moléculas receptoras de electrones: PQ, plastoquinona liposoluble; $NADPH$, nicotinamida adenín dinucleótido fosfato en su forma reducida. Lumen, lado positivo (p); estroma, lado negativo (n). (Figura tomada de Kurisu y col., 2003).

El complejo bf realiza el transporte de electrones del plastoquinol a la plastocianina, entre el fotosistema II y el fotosistema I. El paso de electrones por este complejo está acoplado a la translocación de protones de un lado al otro de la membrana tilacoidal, lo que genera y mantiene un gradiente electroquímico que es utilizado para la síntesis de ATP por la CF_0-F_1 ATP sintasa. Igualmente, en la membrana interna de la mitocondria encontramos al complejo bc_1 , similar al bf , que participa en el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa. Con las particularidades correspondientes (Cramer y col., 2005; Iwata y col., 1998), el mecanismo por el cual los complejos bf y bc_1 transportan los electrones puede explicarse mediante el ciclo Q, delineado por primera vez en la teoría quimio-osmótica de Peter Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961). La teoría postula que la

oxidación del plastoquinol y la reducción de la plastoquinona se realiza en dos sitios distintos del complejo proteico, en los lados positivo (lumen) y negativo (estroma) de la membrana, en los sitios Q_o y Q_i respectivamente. La oxidación del plastoquinol en el sitio Q_o involucra la transferencia de electrones a la cadena de alto potencial (proteína de Rieske, citocromo f y la plastocianina) y a la cadena bajo potencial (Hemo b_p , hemo b_n y la plastoquinona en el sitio Q_i). La oxidación del plastoquinol libera dos protones en el lumen de la membrana tilacoidal y la reducción de la plastoquinona en el sitio Q_i captura dos protones del estroma del cloroplasto (Cramer y col., 2005).

De acuerdo a estudios con el microscopio electrónico para observar la forma y tamaño de las partículas individuales del complejo bf con tinción negativa y mediante el análisis bioquímico tales como la cromatografía en FPLC Seperosa y la electroforesis en geles nativos azules, aportaron evidencias que nos indican que la forma más abundante en su estado natural de este complejo es predominantemente un dímero (Huang y col., 1994). Se encontró que el dímero es mucho más estable que el monómero, siendo igualmente el dímero 5 veces más activo en el transporte de electrones *in vitro* que el monómero. Las imágenes a nivel atómico del complejo de citocromos bf de la cianobacteria *Mastigocladus laminosus* (figura 3) a 3.0 Å de resolución (Kurusu y col., 2003) y del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* a 3.1 Å de resolución (Stroebele y col., 2003), confirman sin lugar a dudas la naturaleza dimerica del complejo bf . Por otra parte, estudios anteriores habían generado modelos con resolución atómica de la región soluble del citocromo f del nabo (Martinez y col., 1994), de *C. reinhardtii* (Berry y col., 1997), de la cianobacteria *Phormidium laminosum* (Carrel y col., 1999) y del dominio extramembranal de la proteína hierro-azufre de la espinaca (Carrel y col., 1997). Así también, ya conocíamos las imágenes cristalográficas del dímero del complejo de citocromos bc_1 de la mitocondria de bovino (Xia y col., 1997; Iwata y col.1998), del pollo (Zhang y col., 1998) y de la levadura (Hunte y col., 2000).

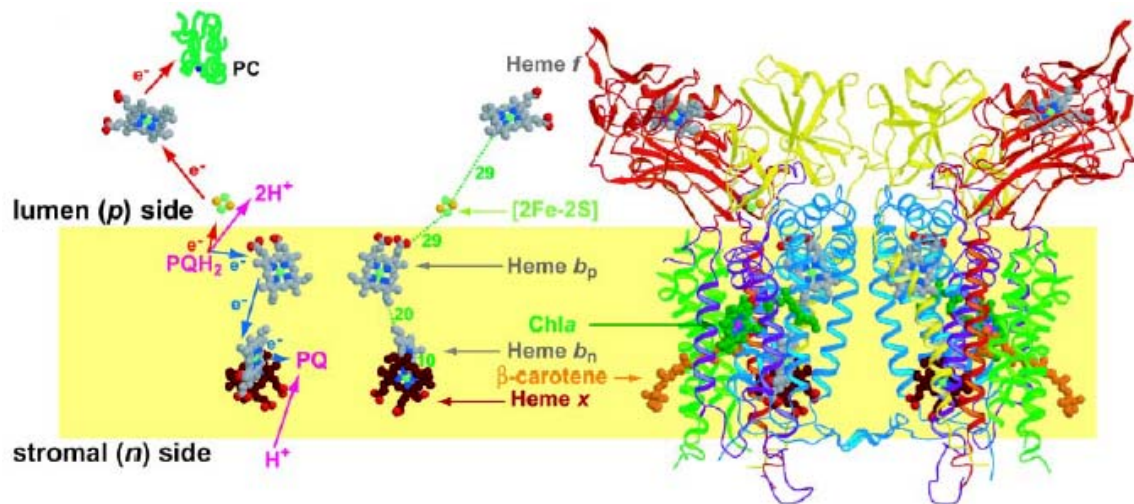


Figura 3. Modelo cristalográfico del complejo *bf* en su forma dimérica a 3 Å de resolución. Del lado izquierdo se muestra la vía de transferencia de los electrones (e^-) y de los protones (H^+) a través de los grupos redox del complejo *bf*. A la derecha se muestran las subunidades que conforman al complejo. El citocromo b_6 está en azul, con tres grupos hemo, hemo b_p , hemo b_n y el hemo x . El citocromo f en rojo, con un grupo hemo tipo c . La proteína de Rieske en amarillo, con un grupo prostético redox $[2Fe-2S]$. La subunidad IV en púrpura. Las subunidades PetG, PetL, PetM y PetN en verde. La bicapa membranal se muestra como una barra amarilla. Lumen, lado positivo (p); estroma, lado negativo (n). La unidad monomérica contiene 13 hélices transmembranales, cuatro en el citocromo b_6 (hélices A a D), tres en la subunidad IV (hélices E y G) y cada una de las subunidades restantes presentan una sola hélice transmembranal (Figura tomada de Kurisu y col., 2003).

Los monómeros de 110 kD de los complejos *bf* de *M. Laminosus* (Cramer y col., 2004) y de *C. reinhardtii* (Stroebel y col., 2003) están constituidos por ocho subunidades polipeptídicas transmembranales. Cuatro de ellas tienen una masa molecular menor a 5 kD (PetG, 4.047 kD, PetL, 3.530 kD; PetM, 3.841 kD y PetN, 3.304 kD), los cuales no tienen homologos con el complejo bc_1 mitocondrial. La función de éstas cuatro subunidades es desconocida, aunque se ha sugerido que podrían actuar como un soporte estructural, ó bien, servir como guías para el ensamble de las demas subunidades del complejo (Cramer y col., 2004). El complejo *bf* presenta una subunidad de 17.528 kD, conocida como subunidad IV (Cramer y col., 2004), con tres hélices transmembranales (E a G), la cual es homóloga a las correspondientes hélices del extremo C-terminal del citocromo b del complejo bc_1 de la mitocondria (Widger y col., 1984). Además, el monómero del complejo *bf* presenta una molécula de clorofila a entre las hélices F y G de la

subunidad IV y una molécula de β -caroteno entre las hélices de las subunidades PetL y PetM, cuya función aun está por determinar. En el caso de la espinaca, en preparaciones altamente purificadas del complejo *bf* se encontró una subunidad adicional con actividad de ferredoxina-NADP⁺ oxidorreductasa (Zhang y col., 2001). Tanto el complejo *bc*₁ mitocondrial como el complejo *bf* tienen tres subunidades con grupos prostéticos redox. Un grupo [2Fe-2S] en la proteína de Rieske (19.295 kD) de ambos complejos, un grupo hemo tipo *c* unido covalentemente en el citocromo *f* (32.270 kD) y en el citocromo *c*₁, y dos grupos hemo ligados de forma no covalente en los citocromos *b*₆ (24.710 kD) y *b*, de bajo y alto potencial, en los lados positivo (hemo *b*_p) y negativo (hemo *b*_n) de la membrana.

Las imágenes cristalográficas de los complejos *bf* de *M. laminosus* y de *C. reinhardtii* mostraron un tercer grupo hemo localizado cerca del grupo hemo *b*_n en el citocromo *b*₆, del lado del estroma. El nuevo hemo no parece pertenecer a las familias de hemos conocidos, por lo que se le nombró hemo *x* (Kurisu y col., 2003) ó hemo *c*_i (Stroebel y col., 2003). El hemo *x* está ligado covalentemente por un enlace tioéter a la cisteína Cys35 en la hélice A del citocromo *b*₆. La Cys35 no es parte de una secuencia característica de los citocromos tipo *c* (-Cys-X-Y-Cys-His-), en donde el hemo se une a dos Cys con enlace tioéter y a un ligando ortogonal con una histidina. El sexto enlace de coordinación del Fe en el hemo *x* no interacciona con las cadenas laterales de la proteína, si no que está unida a una molécula de agua. El agua está unida por un puente de hidrógeno a una cadena lateral de propionato del hemo *b*_n y a una amida de la glicina Gly38. Se infiere que el hemo *x* es una característica universal de los complejos *bf* porque sus sitios de unión están bien conservados en todas las secuencias obtenidas para los citocromos *b*₆ de dichos complejos (Cramer y col., 1994a). Se ha propuesto que el hemo *x* esta involucrado en la reducción de la quinona en el sitio Q_i (Alric y col., 2005, de Vitry y col. 2004, Zhang y col., 2004) y quizá también esté involucrado en la vía cíclica del transporte de electrones, conectándose con la ferredoxina y la FNR (Zhang y col., 2004). Sin embargo, su participación en ambos procesos aún no es del todo clara. La substitución de la Cys35 por Valina en *Chlamydomonas* la

incapacita para crecer en forma fotoautotrófica y además muestra la pérdida de todas las demás subunidades del complejo *bf*, probablemente por su incapacidad para ensamblarse en un complejo activo (de Vitry y col. 2004). El citocromo b_6 tiene cuatro hélices transmembranales (A a la D) y son equivalentes en estructura y función con las correspondientes cuatro primeras hélices transmembranales del dominio N-terminal del citocromo *b* mitocondrial con 8 hélices transmembranales, de la A a la H (Widger y col., 1984). En este último, se encuentran dos residuos de histidina en cada uno de los lados positivo (lado p) y negativo (lado n) de las hélices transmembranales B y D, que coordinan a los dos grupos hemo. Estos dos residuos de histidina en el citocromo *b* mitocondrial, están separados por 13 residuos de aminoácidos en las hélices transmembranales B y D, sin embargo, en el citocromo b_6 del cloroplasto, las dos histidinas están separadas por 13 residuos en la hélice B y por 14 residuos en la hélice D. Aún existe controversia acerca del origen de los citocromos b_6 y *b*, es decir, si el citocromo b_6 se originó por la escisión de un citocromo *b* ancestral, o bien, si el citocromo *b* se formó por la fusión de dos polipéptidos independientes. Experimentalmente (Kuras y col., 1998) cuando se cortó el citocromo *b* del complejo bc_1 de la bacteria púrpura *Rhodobacter sphaeroides* y se añadió un residuo de aminoácido extra entre la His198 y la fenilalanina Phe199, extendiendo con esto los ligandos de histidina para los dos hemos *b* en la hélice D, las dos proteínas modificadas se ensamblaron y funcionaron correctamente, permitiendo con ello el crecimiento autotrófico de las cepas transformadas. En el caso de *Bacillus subtilis*, el citocromo *b* es una entidad dual (Yu y col., 1995), ya que el dominio de unión de los grupos hemo *b* es similar al citocromo b_6 y el dominio de oxidación del plastoquinol (equivalente a la subunidad IV) corresponde al extremo N-terminal del citocromo *c*.

En los complejos *bf* y bc_1 , la proteína de Rieske y el citocromo f/c_1 forman la vía de alto potencial, mientras que los dos hemos del citocromo b_6/b forman la vía de bajo potencial. Asimismo, en el cloroplasto, cerca del lumen del tilacoide, la subunidad IV, junto con la proteína de Rieske y el citocromo b_6 , participan en la formación del dominio de oxidación del plastoquinol, sitio Q_o (Doyle y col, 1989, Li

y col., 1991) y sobre el lado del estroma, se predice un dominio de reducción de la plastoquinona, sitio Q_i .

El modelo atómico del citocromo *f* muestra una estructura predominantemente β y una cadena de 5 moléculas de agua, que se extiende de la histidina 25 (His25) con dirección hacia el lumen (figura 4). Se ha propuesto que la cadena de cinco moléculas de agua funciona como un simple elemento estructural (Chi y col., 2000), o bien como una vía de expulsión de protones del sitio Q_o hacia el lumen del tilacoide, contribuyendo con ello a la formación del gradiente de protones (Sainz y col., 2000). La estructura también muestra un dominio rico en residuos de lisina, a través de la cual probablemente interactúa con la plastocianina (Cramer y col., 1996).

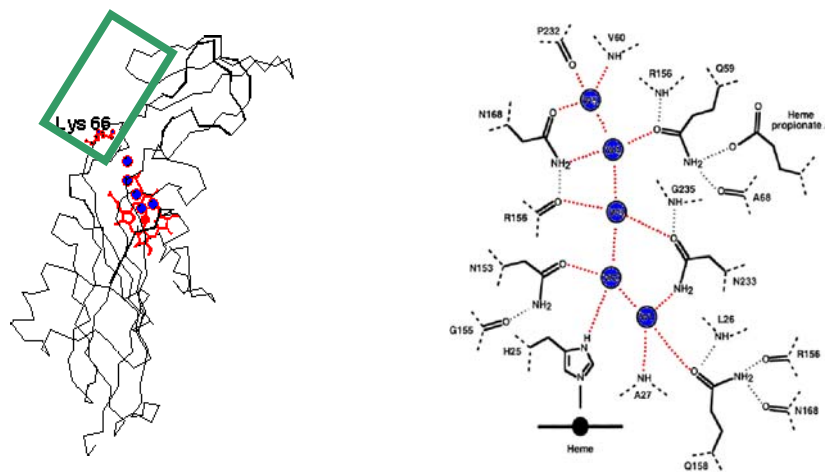


Figura 4. Estructura cristalina del citocromo *f* del complejo de citocromos *bf* de nabo. Con esferas azules se muestran a cinco moléculas de agua atrapadas en la red de varios residuos de aminoácidos por enlaces puente de hidrógeno. En el cuadro verde se muestra el dominio rico en residuos de lisina

La proteína hierro-azufre del complejo *bf* del cloroplasto es homóloga a la proteína hierro- azufre del complejo *bc₁* de la mitocondria (Hauska y col., 1988). El análisis cristalográfico de la región soluble de estas proteínas, reveló que presentan una estructura tridimensional semejante, sugiriendo que el transporte de electrones en los complejos *bc₁* y *bf* se realiza mediante un mecanismo similar (Carrel y col., 1997). De hecho, algunos inhibidores afectan igualmente a ambos

complejos, específicamente los inhibidores en el dominio de oxidación del plastoquinol, como la estigmatelina ó el MOA-estilbeno (Breyton, 2000). Por otro lado, el citocromo *f* y el citocromo *c₁* no son homólogos, aún cuando tienen la misma función en ambos complejos (Hauska y col., 1988; Malkin, 1992). Probablemente se trata de un caso claro de evolución convergente, donde proteínas de distinto origen evolutivo realizan la misma función (proteínas análogas).

Los genes *pet* y biogénesis del complejo *bf*.

No todos los genes que codifican para las ocho subunidades que conforman al complejo de citocromos *bf* se encuentran en el genoma del cloroplasto. En el caso de plantas y algas los genes que codifican al citocromo *f* (*petA*), al citocromo *b₆* (*petB*), a la subunidad IV (*petD*), así como a las subunidades pequeñas PetG (*petG*) y PetL (*petL*) se encuentran en el genoma de cloroplasto (Büschlen y col., 1991; Wollman, 1998). En el caso de la subunidad PetN, su gen (*petN*) se puede encontrar en el genoma nuclear como en el genoma del cloroplasto, en *Chlamydomonas* (Zito y col., 2002) y en plantas (Kahlau y col., 2006, Kim y col., 2006), respectivamente. Mientras que los genes para las proteínas hierro-azufre de Rieske (*petC*) y PetM (*petM*), hasta ahora solo se han encontrado en el genoma nuclear de plantas y algas (Wollman, 1998). En el caso de *E. gracilis*, que es el organismo de interés en éste trabajo, los genes que codifican para las proteínas del citocromo *b₆* y PetG, son los únicos que se encuentran en el genoma de 143,170 pb de sus cloroplastos (Hallick y col., 1993), por lo que probablemente las seis subunidades restantes (citocromo *f*, subunidad IV, la proteína hierro-azufre de Rieske, PetL, PetM y PetN) , ó sus equivalentes, deberán ser importadas del citoplasma al cloroplasto para su ensamble en la membrana tilacoidal y formar al complejo de citocromos *bf*. De acuerdo a los estudios realizados con mutantes nucleares del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Choquet y col., 2002), en donde la acumulación de los citocromos *b₆* y *f* ocurre en más del 50% de los niveles silvestres, mientras que la proteína hierro-azufre de Rieske es indetectable, se ha propuesto que el ensamble del complejo

de citocromos *bf* se realiza mediante un proceso secuencial que involucra la acumulación sucesiva y ordenada de sus subunidades. En un primer paso se acumulan y ensamblan las subunidades que están codificadas en el genoma del cloroplasto y en un segundo paso, se incorporan las subunidades que están codificadas en el genoma nuclear. La propuesta anterior se ve fortalecida con las aportaciones obtenidas con mutantes de *C. reinhardtii* afectadas con ablaciones de los genes *petA*, *petB*, *petD* ó *petG*, en donde se ha observado que se impide la acumulación del juego completo de las subunidades del complejo, mientras que en mutantes afectadas en el gen *petL* aún se puede detectar el 50% de los niveles silvestres del complejo de citocromos *bf* funcional. Sin embargo en ésta última mutante el complejo *bf* es más inestable, pues la proteína de Rieske es más susceptible a ser disociado del complejo.

La síntesis e inserción a la membrana tilacoidal de las subunidades codificadas en el genoma del cloroplasto del complejo de citocromos *bf*, se realiza de forma cotraduccional en los ribosomas adheridos a esta membrana (Wollman, 1998). Así también, las modificaciones que pueden sufrir cada una de las subunidades, como son: el procesamiento del petido señal o la adición de cofactores, ocurren en los estadios tempranos de su biogénesis a través de complejos proteicos especializados localizados en el lumen de la membrana tilacoidal. Por otra parte, se ha concluido que la síntesis de las subunidades está regulada a nivel postraducciona l y traducciona l. En *C. reinhardtii* la síntesis del citocromo *b₆* y de la subunidad IV ocurre independientemente de la presencia o ausencia del resto de las subunidades del complejo, sin embargo, son más susceptibles a ser degradados proteolíticamente en ausencia de alguna de las subunidades, por lo que sus vidas medias se acortan considerablemente con respecto a la forma silvestre. El citocromo *f* presenta un comportamiento diferente pues presenta la misma resistencia a la degradación proteolítica en presencia o ausencia de las demas subunidades del complejo, pero su síntesis disminuye a un 10% con respecto a la cepa silvestre en ausencia del citocromo *b₆* o de la subunidad IV. Los estudios realizados con mutantes de *C. reinhardtii* afectadas en la región 5' no traducible del RNAm y en la region C-terminal del citocromo *f*, han

proporcionado evidencias de que la síntesis del citocromo *f* está regulada mediante un proceso de autorregulación en el inicio de la traducción de su RNAm y que la autorregulación estaría dada por la interacción de la región C-terminal del citocromo *f* no ensamblado con la región 5' no traducible de su RNAm (Choquet y col., 2003).

El complejo *bf* de *E. gracilis*.

Antes del presente trabajo el complejo *bf* del cloroplasto en *E. gracilis* no había sido caracterizado. Sin embargo en la década de los años 70s, analizando las membranas tilacoidales del cloroplasto de *Euglena* se registró un espectro de absorción con un pico a 554.5 nm (Kitaoka y col. 1989), característico de la presencia de un citocromo *f* (Pierre y col., 1995). Igualmente, se caracterizó la secuencia amino terminal de un citocromo 552 presente en el cloroplasto (Pettigrew, 1974). Este último citocromo se caracteriza por ser soluble y poseer un grupo hemo tipo *c*. En su momento se propuso que este citocromo podía tener la función de la plastocianina. Esta última es una proteína característica de plantas superiores y algas verdes y que aun no ha sido caracterizada en *E. gracilis* (Kitaoka y col., 1989).

HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes sabemos que el complejo de citocromos *bf* de los cloroplastos de plantas y algas está constituido por ocho subunidades proteicas y que algunas de ellas pueden estar codificadas en el genoma nuclear ó en el genoma del cloroplasto. Específicamente, en el genoma del cloroplasto de plantas y algas se encuentran los genes *petA*, *petD*, *petB*, *petG* y *petL* que codifican para las subunidades proteicas citocromo *f*, subunidad IV, citocromo *b*, PetG y PetL, respectivamente. Sin embargo en el genoma del cloroplasto de *E. gracilis* únicamente encontramos a los genes *petB* y *petG*, por lo que se planteó la hipótesis de que “en éste organismo debería existir un complejo de proteínas y de grupos redox similar a los complejos *bf* descritos en plantas y algas, de ser cierto, el resto de las subunidades deberían estar codificadas por genes nucleares”.

OBJETIVOS

Con base en la hipótesis anterior y por la semejanza que guardan la subunidad IV y el citocromo *f* (en cuanto a su actividad en el transporte de electrones) con la región C-terminal del citocromo *b* y el citocromo *c₁* del complejo de citocromos *bc₁* mitocondrial, nos planteamos los siguientes objetivos:

- a) Comprobar la presencia de un complejo de citocromos *bf* en el cloroplasto de *E. gracilis* mediante la identificación del citocromo *f* y de la subunidad IV.
- b) Determinar la estructura primaria del citocromo *f* (*petA*) y la subunidad IV (*petD*) del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *E. gracilis*.

E. gracilis tipo Z se cultivó en 2 litros de medio de Hunter modificado (Moreno-Sánchez y Raya, 1987) durante 4 días bajo iluminación continua en matraces de 4 litros a 25°C. El medio de cultivo estaba constituido de: glutamato 34 mM, malato 15 mM, CaCO₃ 0.02%, MgSO₄ 0.05%, (NH₄)₂HPO₄ 0.02%, KH₂PO₄ 0.08%, ZnSO₄ 0.009%, MnSO₄ 0.008%, Na₂MoO₄ 0.002 %, CoCl₂ 0.00016 %, CuSO₄%, H₃BO₄ 0.00028%, NaI 0.000012%, FeCl₃ 0.0005%, disulfuro de tiamina 0.01%, clorhidrato de piridoxina 0.001% y cianocobalamina 0.005%. El pH se ajustó a 3.5 con KOH y se esterilizó durante 15 min a 15 libras de presión. Las tres vitaminas se añadieron justo antes de sembrar, pasándolas previamente a través de un filtro Millipore de 0.22 µm. Las células se cosecharon a 3000 rpm en el rotor GSA (Sorvall), centrifugando durante 10 min a 4°C.

Obtención de cloroplastos de *E. gracilis*.

Todas las soluciones y amortiguadores que se emplearon para la obtención de los cloroplastos de *E. gracilis* y la solubilización del complejo de citocromos *bf*, contenían PMSF 0.2mM, benzamidina 1mM y ácido amino caproico 5 mM. Los cloroplastos se obtuvieron de acuerdo a Manning y col. (1971). Las células, obtenidas a partir de 6 litros de medio de cultivo, se lavaron con 200 ml de agua destilada estéril, centrifugando a 3000 rpm en un rotor GSA (Sorvall) durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 30 ml de amortiguador STE (sacarosa 0.37 M-Tris HCl 10 mM-EDTA 50 mM, pH 7.6) en un tubo Falcon de 50 ml. Se añadieron dos terceras partes del volumen de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo se agitó manualmente por dos minutos para romper las células. Inmediatamente la preparación se centrifugó 10 min a 4500 rpm en el rotor GSA (Sorvall). La pastilla se resuspendió en 250 ml de STE y se dejó 10 min en reposo. Se decantó la fase superior (3/4 de la suspensión) a través de varias capas de gaza. El filtrado resultante se centrifugó a 4500 rpm por 10 min en el mismo rotor. La pastilla se resuspendió en 20 ml de STE y se añadieron 40 ml de sacarosa 2.2

M. Se centrifugó 30 min a 10000 rpm en el rotor SW40 de Beckman. La banda superior se recuperó y se resuspendió en 2 volúmenes de STE. La pastilla se resuspendió en 20 ml de STE y se añadieron 40 ml de sacarosa 2.2 M, centrifugando a 4500 rpm durante 10 min en el rotor SW40 de Beckman. Finalmente, la pastilla resultante se resuspendió en un volumen mínimo de STE.

Solubilización del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

La solubilización de los cloroplastos para aislar al complejo de citocromos *bf* se realizó de acuerdo al método propuesto por Hurt y Hauska (1981). Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. Las membranas de los cloroplastos se resuspendieron en 20 ml del amortiguador TS (Tricina–NaOH 20 mM, sacarosa 0.2 M, pH 8.0) y se centrifugaron a 10000 rpm en el rotor SS34 (Sorvall) durante 10 min. La pastilla resultante se resuspendió con el amortiguador TS a una concentración de 1.0 mg/ml de clorofila. Se añadió un volumen igual de amortiguador TSC (Tricina-NaOH 20 mM, sacarosa 0.2M, sulfato de amonio 0.8M, colato de sodio 0.5 %, y octil glucósido 60 mM, pH 8.0). La mezcla se incubó 30 min a 4°C y se centrifugó a 16000 rpm en el rotor SS34 (Sorvall). Al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio para alcanzar una saturación creciente del 40%, 45% y 55% en cada paso. Después de cada adición la suspensión se agitó 10 minutos y se centrifugó a 16,000 rpm en el rotor SS34 de Sorvall durante 10 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en el amortiguador TST (Tris-succinato 30 mM, Triton X-100 0.2%, pH 6.5). La solución se dializó 3 horas contra 2 litros del amortiguador TST, con un cambio del amortiguador. La preparación se depositó sobre un gradiente continuo de sacarosa (10% a 30%) en el amortiguador TST y se centrifugó por 20 horas a 40000 rpm en un rotor de columpio SW-40 (Beckman). De cada gradiente de densidad se recuperó una banda café rojiza que migró en la parte superior del mismo y que contenía al complejo *bf* aislado.

Análisis de las proteínas

El complejo de citocromos *bf* de las membranas del cloroplasto se identificó en geles azules nativos formados con un gradiente de poliacrilamida del 6% al 13% (Schägger y von Jagow, 1991). La separación de los componentes polipeptídicos se llevó a cabo en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 13% de poliacrilamida de acuerdo a Laemmli (1970) o bien de acuerdo con Schägger y von Jagow (1987). La identificación de las hemoproteínas del complejo en el gel (citocromo *f* y citocromo *b₆*), se llevó a cabo con la tinción de TMBZ (tetrametil benzidina) de acuerdo a Thomas y col. (1976). Además, el citocromo *b₆* y la subunidad IV se identificaron con anticuerpos anti-*b₆* y anti-subunidad IV de *C. reinhardtii*, en inmunoréplicas tipo Western. Posteriormente, las proteínas del complejo *bf* se caracterizaron secuenciando sus extremos amino terminales mediante la degradación de Edman automatizada, realizada por el Dr. J. d'Alayer en el Laboratorio de Microsecuenciación de Proteínas, en el Instituto Pasteur, en París (Francia).

A) Electroforesis en geles azules nativos de poliacrilamida (BN-PAGE).

Condiciones de electroforesis

Se llevaron a cabo en un aparato vertical para geles de poliacrilamida de 1.6 mm de grosor con una longitud de 14 cm a 4-7°C (Schägger y von Jagow, 1991). El gel se precurrió 30 minutos a 100 V antes de cargar la muestra. Una vez cargada la muestra, se mantuvo el voltaje a 100 V hasta que ésta entró al gel, y posteriormente se continuó la corrida durante toda la noche a 200 V constantes, impidiendo que el máximo de intensidad de corriente superara los 15 mA.

Soluciones para PAGE nativo.

Amortiguador del cátodo:

Tricina 50 mM, Bis-tris 15 mM, pH 7.0 (4°C). Para BN-PAGE, se utilizó Serva blue G 0.02%. Para el gel nativo incoloro (CN-PAGE) no se añadió colorante.

Amortiguador del ánodo:

Bistris-HCl 50 mM, pH 7.0 (pH ajustado a 4°C)

Mezcla A-B (Acrilamida-bisacrilamida):

48 g de acrilamida y 1.5 g de bisacrilamida en 100 ml de solución.

Amortiguador del gel 3X:

Bistris-HCl 150 mM, pH 7.0 (4°C), ácido épsilon-amino-caproico 1.5 M (para CN-PAGE se utiliza dodecil maltósido 0.03%, para BN-PAGE no se agrega detergente).

Preparación de la muestra.

Las membranas cloroplásticas (500 µg de proteína) se solubilizaron con 5 µl de dodecil maltósido al 10% y 40 µl de ácido amino caproico 750 mM en Bistris-HCl (pH 7.0) 50 mM.

Preparación del gradiente del gel.

Componente	gel separador		gel concentrador
	13%	6%	4%
Glicerol	3.6 g	-	-
Mezcla A-B	4.7 ml	2.5 ml	0.6 ml
Amortiguador del gel 3X	6.0 ml	7.0 ml	2.5 ml
H ₂ O	6.7 ml	11.4 ml	4.3 ml
TEMED	6.0 µl	9.0 µl	6.0 µl
APS 10% (solución acuosa de persulfato de amonio)	60.0 µl	90.0 µl	60.0 µl

B) Gel de poliacrilamida desnaturalizante de Schägger y von Jagow (1987).

Amortiguador del ánodo

Tris-HCl 0.2 M, ajustar a pH 8.9

Amortiguador del cátodo

Tris 0.1 M

Tricina 0.1 M

pH 8.25

SDS 0.1 %

Amortiguador del gel

Tris-HCl 3.0M, pH 8.45.

SDS 0.3%

Mezcla Acrilamida-Bisacrilamida (A-B)

Acrilamida 48 %

Bisacrilamida 1.5 %

Aplicación de la muestra

Las muestras se incuban dos minutos en baño maría en:

SDS 4%

Glicerol (W/V) 12%

Tris-HCl 50 mM (pH 8.0)

Serva Blue G 0.01%

Condiciones de electroforesis.

Se llevó a cabo a voltaje constante de 50 volts durante toda la noche.

Preparación del gel.

Componentes	gel separador 13%	gel concentrador
Mezcla A-B	6.1 ml	1.0 ml
Amortiguador del gel	10.0 ml	3.1 ml
Glicerol	4.0 g	-
H ₂ O	10.0 ml	8.4 ml
TEMED	15 µl	7.0 µl
APS 10%	150 µl	70 µl

C) Gel de poliacrilamida desnaturizante de Laemmli (1970).

Preparación del gel

Componentes	gel separador	gel concentrador
Acrilamida al 30%/		
Bisacrilamida 0.8%	13.3 ml	2.5ml
Tris-HCl 3M, pH 8.8	4.2 ml	-
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	-	3.75 ml
Agua bidestilada	15.7 ml	8.65 ml
TEMED	20 µl	20 µl
APS 10%	100 µl	100 µl

Condiciones de migración.

El amortiguador de migración: Tris-HCl 0.05 M, glicina 0.38 M (pH 8.3) a 25°C. En el amortiguador del cátodo se agregó SDS a una concentración final de 0.1%. La fuente de poder se ajustó a 18 mA por 20 h.

Preparación de las muestras.

Las muestras (100 a 200 µg de proteína) se solubilizaron en SDS 5%, sacarosa 30 %, azul de bromofenol y se sumergieron en baño maría por un minuto antes de cargar en el gel. Cuando los geles se tiñeron con TMBZ, a las muestra se les agregó 40 µl de DTT 0.5 M.

Estimación de la concentración de clorofila y proteína.

Las membranas tilacoidales (10 µl) se trataron con acetona al 80% (3 ml) y la concentración de clorofila se estimó de acuerdo a la siguiente relación: $26 \times \text{D.O } 652 \times 300 = \mu\text{g de clorofila}$. La proteína se estimó considerando que en las membranas el contenido de clorofila representa una quinta parte de las proteínas totales, por lo que el resultado anterior se multiplicó por cinco (Atteia y col., 1992).

Estimación de la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Markwell (1978).

Solucion A

Na ₂ CO ₃	al 2%
NaOH	al 0.4%
Tartrato de Sodio	al 0.16%
SDS	al 1%

Solucion B

CuSO ₄ .5H ₂ O	al 4%
--------------------------------------	-------

Solucion C

Mezclar 100 volúmenes de A + 1 volumen de B

Solucion D

Mezclar 1 volumen de reactivo de Folin + 1 volumen de H₂O

La muestra se ajustó a 1 ml con H₂O. Se adicionaron 3 ml de la solución C y se mezcló vigorosamente. Se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 0.3 ml de la solución D y se mezcló inmediatamente. Se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. Se hizo una curva patrón con albúmina de suero bovino de 10 a 100 µg.

Tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida se tiñeron 4 horas con la solución de azul de Coomassie R250 al 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10% y se destiñeron hasta observar bandas nítidas con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5%.

Tinción de los geles de poliacrilamida con plata

El gel se fijó por 12 horas en etanol 30%, ácido acético 10% y se lavó tres veces durante 20 min en etanol al 25% y dos veces con agua bidestilada durante 10 min. Inmediatamente después, se sumergió 2 minutos en tiosulfato de sodio 2.5 mM y se lavó dos veces con agua bidestilada durante 5 min. El gel se sumergió en la oscuridad (la solución es sensible a la luz) durante 30 min en 100 ml de nitrato de plata al 0.2% con 80 µl de formaldehído al 37% preparado al momento de usar. El gel se lavó dos veces durante 1 min en agua bidestilada y se reveló con 100 ml de una solución de carbonato de sodio al 3% con 50 µl de formaldehído 37% y 8 µl de tiosulfato de sodio 250 mM, también preparado al momento de usar. La reacción se terminó añadiendo 10 ml de ácido acético glacial y lavando con agua bidestilada.

Tinción de los geles de poliacrilamida con TMBZ.

Las hemoproteínas se detectaron de forma específica en el gel de poliacrilamida como se describió anteriormente (Atteia y col., 1992) con 3, 3',5,5' tetrametilbenzidina (TMBZ). El gel se incubó en la solución de TMBZ (TMBZ 45 mM en metanol al 30%, acetato de sodio 175 mM a pH 5.0) por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Las hemoproteínas y los hemos libres se tiñeron de color azul al agregar agua oxigenada (H₂O₂) a una concentración final de 30 mM. La coloración fue visible en 15 minutos y se intensificó con el tiempo (1/2 hora) después de la adición del H₂O₂.

Transferencia de las proteínas a membranas de polivinildifluoruro (Problott) para su secuenciación.

El gel de poliacrilamida se colocó en el amortiguador de transferencia CAPS [Caps-NaOH 10 mM (pH 11.0), metanol 10%]. La membrana Problott (polivinildifluoruro) del tamaño del gel se sumergió en metanol absoluto y después en el amortiguador CAPS. El gel, junto con la membrana Problott, la esponja y el papel filtro se colocaron en la rejilla de la cámara de transferencia. Se transfirió por dos horas y treinta minutos a 400 mA a 4°C. Posteriormente, la membrana Problott se sumergió en agua bidestilada y se tiñó 5 min con azul de Coomassie R250 al 0.1% en metanol al 50%. La membrana se destiñó con solución fijadora (metanol al 50%, ácido acético al 10%) y se lavó con agua bidestilada. La membrana se secó a temperatura ambiente y se cortaron las bandas de la proteína de interés. Las bandas se enviaron secas a temperatura ambiente al laboratorio donde se obtuvieron las secuencias N-terminales.

Inmunorélicas tipo Western.

Las proteínas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de Immobilon (la cual se sumergió previamente en metanol absoluto) con el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%, SDS

al 0.1% sin ajustar pH). La electrotransferencia se llevó a cabo a 400 mA por 2.5 h a 4°C. La membrana se lavó dos veces durante 5 min con el amortiguador TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5) y se incubó toda la noche con el amortiguador TBS conteniendo 3% de gelatina. La membrana se lavó dos veces durante 5 min con el amortiguador TTBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Tween 20 al 0.05%, pH 7.5) y se incubó con el primer anticuerpo (dilución 1:2000 del anticuerpo anti-citocromo *b₆* ó anti-subunidad IV de *C. reinhardtii*) con el amortiguador TTBS con 1% de gelatina durante toda la noche a temperatura ambiente. La membrana se lavó dos veces durante 5 min con el amortiguador TTBS y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo, 1:3000) en TTBS con 1% de gelatina a temperatura ambiente por 5 h. La membrana se lavó dos veces durante 5 min con el amortiguador TTBS y se incubó (agitando) en 100 ml de NaHCO₃ 0.1M, MgCl₂ 1 mM (pH 8.0). Inmediatamente después, se agregó 1 ml de BCIP* (30 mg en 4 ml de dimetilformamida) y 1 ml de NBT* (60 mg en 2.8 ml de dimetilformamida y 1.2 ml de H₂O) aproximadamente 5 min (ó hasta la aparición de las bandas teñidas de proteína). La reacción se detuvo lavando la membrana con agua desionizada en abundancia.

BCIP es 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol fosfato de sodio.

NBT es Azul de Tetrazolio.

*Es recomendable preparar las soluciones frescas justo antes de utilizarlas. El sobrante se puede guardar a 4°C en la oscuridad y es estable durante una o dos semanas únicamente.

Extracción del DNA total.

La extracción del DNA total de *E. gracilis* se realizó de acuerdo a Aldrich y Cullis (1993). A una pastilla de células obtenida de 100 ml de cultivo de *E. gracilis*, se añadió 7 ml de amortiguador de extracción EB*, se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por 4 h. Se hizo una extracción con un volumen igual de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se mezcló por 5 min y se centrifugó por 10 min a temperatura ambiente a 14000 rpm en un rotor SS34 (Sorvall). La fase superior se transfirió a un tubo nuevo. El DNA se precipitó con 2/3 de volumen de isopropanol (100 %) mezclando 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a

temperatura ambiente por 10 min a 14000 rpm. La pastilla se lavó dos veces con el amortiguador de lavado (etanol al 76%, acetato de amonio 10 mM). La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 3 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 1 mM [pH 8.0], EDTA 0.1 mM). Se añadió 0.3 ml de RNAsa (10mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Se añadió 2 ml de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló y se incubó a –20°C por 20 min. Se centrifugó a 14000 rpm en una centrífuga de mesa (Eppendorf) durante 10 min a temperatura ambiente. La pastilla se lavó dos veces con 5 ml de etanol al 70%. Se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen mínimo de TE.

* EB es CTAB, Bromuro de Cetil Amonio, al 2%, PVP, Polivinilpirridona 40000, al 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM [pH 8.0], 2-mercaptoetanol al 2%. Preparar la solución EB sin CTAB, PVP y β-mercaptoetanol, esterilizar a 15 lb por 15 min. Cuando se necesita, se añade el CTAB al 2% (w/v), PVP al 2% (w/v) y el β-mercaptoetanol al 2%. La solución se calienta a 65°C para disolver el CTAB y el PVP.

Extracción del RNA total.

La extracción del RNA total de *E. gracilis* se realizó de acuerdo a Sokolovsky et al.(1990). Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especifique lo contrario. Las células que se obtuvieron de 25 ml de medio de cultivo se rompieron con 3 ml de amortiguador de lisis (NaCl 0.6 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 100 mM [pH 8.0] SDS al 4%) y 3 ml de fenol saturado con Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0). Se agitó durante 20 min a 100 rpm y se centrifugó 10 min a 10000 rpm en el rotor SS34 de Sorvall. La fase superior se transfirió a un volumen igual de fenol saturado y se mezcló. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. A la fase superior se le añadieron 0.75 volúmenes (2.25 ml) de LiCl 8.0 M y se incubó a 4°C toda la noche. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm y la pastilla se resuspendió en 0.3 ml de agua desionizada con 0.03 ml de acetato de sodio 3.0 M (pH 5.2) y 0.75 ml de etanol. Se incubó a –70°C por 30 min y se centrifugó 10 min a 10000 rpm en la microcentrifuga. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%. La pastilla se secó y se disolvió en agua desionizada estéril tratada con DEPC (dietilpolicarbonato). La solución de RNA se almacenó a –70°C.

Extracción de plásmido.

El método usado para la extracción de plásmidos fue el descrito por la casa comercial Qiagen. Las células de *Escherichia coli* se crecieron en 25 ml de medio LB (Bacto triptona al 1% (w/v), extracto de levadura al 0.5 % (w/v), NaCl al 1% (w/v)) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) a 37°C por 12 h. Las células se cosecharon centrifugando a 4°C a 2500 rpm en un rotor SS34 (Sorvall). La pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1. Se añadieron 4 ml de amortiguador P2. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 4 ml del amortiguador P3 frío y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó por 15 min a 10000 rpm en el mismo rotor. El sobrenadante se aplicó a la columna de Qiagen previamente equilibrada con 4 ml de amortiguador QBT. La columna se lavó dos veces con 10 ml de amortiguador QC. El DNA se eluyó con 5 ml de amortiguador QF. El DNA se precipitó con 0.7 volúmenes (3.5 ml) de isopropanol al 100%. Se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos. La pastilla se lavó con 5 ml de etanol frío al 70% y se secó a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se resuspendió en un mínimo de volumen de agua desionizada estéril. Las preparaciones se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Estimación de la concentración de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (DNA y RNA) presentan un máximo de absorbancia (DO) a 260 nm. Una DO de 1.0 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para el DNA de cadena doble y 40 µg/ml para el DNA y el RNA de cadena sencilla. La relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) provee una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA y RNA tienen una relación de aproximadamente 1.8 y 2.0 respectivamente. Si hay contaminación con proteínas o fenol, la relación será significativamente menor a los valores anteriores. La estimación de la concentración de los ácidos nucleicos se realizó añadiendo 25 µl de la muestra a 475 µl de TE. Se mezcló y se midió las absorbancias a 260 y 280 nm. Esto corresponde a una dilución 20 X y la lectura de

la DO se puede convertir directamente a $\mu\text{g/ml}$ para la muestra original multiplicando por 1000. Por ejemplo, si la DO de la dilución es de 0.450, entonces la muestra original tendrá una concentración de $20 \times 50 \times 0.450 = 450 \mu\text{g/ml}$.

Calidad de los ácidos nucleicos.

La calidad del DNA se estimó por el patron de bandas en la electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris-Acetato 0.04M [pH 7.0] EDTA 0.001 M) teñidos con bromuro de etidio. Igualmente, la calidad del RNA se estimó en geles de agarosa con formaldehído (MOPS 0.024M, pH 7.0, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM [pH 8.0], conteniendo formaldehído 0.66 M). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio. Por lo general, se cargaron de $2\mu\text{l}$ a $5\mu\text{l}$ de cada muestra, junto con marcadores de tamaño molecular.

Transferencia de los ácidos nucleicos a membranas de Hybond-N (réplicas tipo Southern y Northern).

El gel (con DNA) se lavó con agua destilada y se sumergió en el amortiguador de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. El gel se lavó con agua destilada y se cubrió con el amortiguador de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M [pH 7.2], EDTA 0.001 M) por 30 minutos en las mismas condiciones anteriores. Evitando que se formaran burbujas, el gel se colocó sobre papel Whatman 3MM previamente humedecido con amortiguador de transferencia, SSC 10X (solución SSC 20X : NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M). Sobre el gel se colocó una membrana del mismo tamaño de Hybond-N previamente humedecido con el mismo amortiguador. Sobre la membrana se depositaron 2 hojas del mismo tamaño de papel Whatman 3MM previamente humedecidos con el mismo amortiguador y sobre ellos, se colocó una pila de papel absorbente. Finalmente se colocó una placa de vidrio junto con un peso de aproximadamente 0.5 Kg. Se dejó en estas condiciones por 12 horas para permitir la transferencia del DNA desde el gel a la membrana por capilaridad. La membrana se lavó durante 5 min en amortiguador SSPE 2X (Solución SSPE 20X:

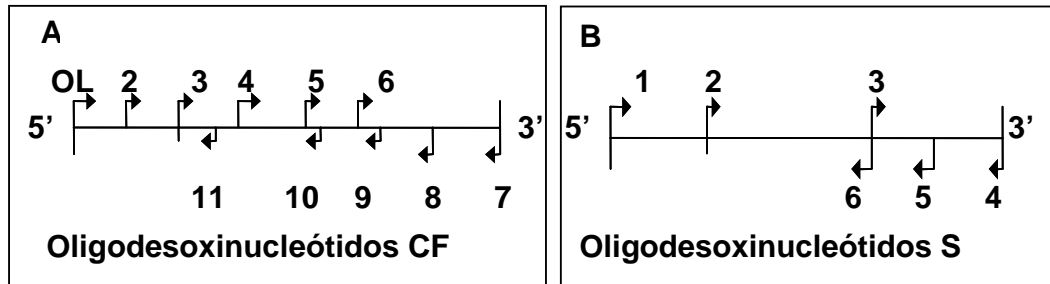
NaCl 3.6 M, fosfato de sodio 0.2M, EDTA 0.02M, [pH 7.7]). El exceso de amortiguador se eliminó colocando la membrana sobre papel Whatman 3 MM y el DNA se fijó a la membrana con dos ciclos de 0.12 jxcm² de radiación ultravioleta (UV) en el aparato "Spectrolinker" (Spectronics Corporation). De la misma forma el RNA se transfirió a la membrana Hybond-N, solo que se omitieron los pasos de lavado con agua destilada, desnaturalización y neutralización.

Clonación del cDNA de los genes *petA* y *petD* del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

Se realizaron PCRs (reacción en cadena de la DNA polimerasa [Mullis y Falloona , 1987]) usando como templado al cDNA sintetizado a partir de RNA total de *E. gracilis*. Con este fin, se sintetizaron una serie de oligodesoxinucleótidos con base en el uso de codones nuclear y diseñados con base en las secuencias amino terminales que se obtuvieron de las proteínas maduras del complejo *bf* de *E. gracilis* y de secuencias conservadas del citocromo *f* y la subunidad IV de varios organismos (figura 5). La síntesis de los oligodesoxinucleótidos y la secuenciación de los productos de cDNA amplificados, se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Transcripción reversa y PCR (RT-PCR).

La transcripción reversa de los RNAs mensajeros a cDNAs se realizó con el sistema comercial "SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR" de GIBCO BRL. La reacción se realizó con 8 µl de RNA total (5 µg), 1 µl de dNTP 10 mM y 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 µg/µl) y se incubó a 65°C por 5 min. La muestra se colocó en hielo un minuto y se añadieron 2 µl de amortiguador RT 10X, 4µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M, y 1 µl de inhibidor de RNAsa. Se incubó a 42°C durante 2 min y se añadió 1 µl (50 unidades) de SuperScript II RT, se mezcló y se incubó a 42°C por 1 h. La reacción se terminó incubando 15 min a 70°C.



Panel A

OL) Oligo L 5'-CACAAAGCTTCTTTCTGAGTGTCTATTTTTTTTC-3'

2CF) *Y P I F A Q Q A*
5'-TAT CCC ATC TTC GCC CAG CAA GC-3'

3CF) *R I V C A N C H*
5'-CG(C+T) ATT GTG TG(C+T) GCC AAC TG(C+T) CA-3'

4CF) *S K D T P N I L*
5'-AGC AAG GAC ACC CCG AAC ATT TTG-3'

5CF) *K K Y A E M T V*
5'-AAG AAG TAC GCT GAG ATG ACT G-3'

6CF) *N V G G F G Q G*
5'-AAC GT(G+T) GG(A+C) GGA TTC GGA CA(A+G) G-3'

7CF) 5'-CTGGAATTC(T)₂₄-3'

8CF) *R G P N Q L V*
5'-GCG GCC GGG GTT CTG GAG GAC-3'

9CF) *E F Q K K K L V*
5'-CTC GAA (C+T)TG CTT CTT CTT CAA (A+C)AC-3'

10CF) *Y I Q G R G R N*
5'-(G+A)TA AAT CTG GCC (T+G)CG GCC (T+G)CG (A+G)TT-3'

11CF) *V P G I V L I N*
5'-(G+A)AC GGG ACC (G+T)AT AAC AAG (G+A)AT (A+G)TT-3'

Panel B

1S) *H N Y Y G E P A*
5'-CAC AA(C+T) TA(C+T) TAC GGC GA(G+A) CC(C+T) GC-3'

2S) *P L E I L P E W*
5'-CC(C+T) CTG GA(G+A) ATC CTG CC(C+T) GAG TG-3'

3S) *W Y F F P T F N*
5'-G TAT TTC TTC CCC ACC TTC AAC-3'

4S) 5'-CTGGAATTC(T)₂₄-3'

5S) *E I F P V T I L*
5'-TC (A+G)AT GAA (A+G)GG (A+C)AC GGT GAT (G+C)AG-3'

6S) *N F T P F F Y W*
5'-GTT GAA GGT GGG GAA GAA ATA C-3'

Figura 5. Oligodesoxinucleótidos utilizados para amplificar los cDNAs de los genes *petA* (panel A) y *petD* (panel B) de *E. gracilis*. Las flechas indican la dirección de los oligodesoxinucleótidos. Con letras cursivas se representan los segmentos de las secuencias del citocromo *f* y de la subunidad IV que se tomaron como base para el diseño de los oligodesoxinucleótidos.

De las reacciones de transcripción reversa se tomaron alícuotas de 2 μ l para realizar las PCRs con los oligodesoxinucleótidos específicos anteriormente descritos para amplificar los cDNAs de los genes *petA* y *petD*. Las reacciones de PCR se realizaron con el sistema comercial de Qiagen. La mezcla de reacción contenía amortiguador de reacción 1X, desoxiribonucleótidos, dNTP (ATP, CTP, GTP, TTP) 0.2mM, MgCl₂ 2mM, un par de oligodesoxinucleótidos (con sentidos contrarios) 0.5 μ M, 2 μ l del cDNA y dos unidades de Taq DNA polimerasa. El termociclador se programó para dar un ciclo de 3 min a 94°C y 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% los cuales se tiñeron con bromuro de etidio.

Purificación de los productos de la RT-PCR.

Se utilizó el sistema comercial de Qiagen “QIA-quick Gel Extraction Kit”. Los fragmentos de agarosa (100 mg) que contenían los productos de PCR de interés, se disolvieron en 300 μ l de amortiguador QG y se incubaron 10 min a 50°C. Enseguida, la muestra se aplicó a una columna de “QIA-quick” y se centrifugó 1min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con 375 μ l cada uno de amortiguador PE, centrifugando un minuto a 12000 rpm. Se centrifugó un minuto más para eliminar el exceso del amortiguador PE. El DNA se recuperó de la columna eluyéndolo con dos extracciones de 50 μ l de agua desionizada y centrifugando por un minuto a 12000 rpm. Los productos se almacenaron a -20°C.

Ligación de los productos de la RT-PCR.

Los productos de PCR purificados se ligaron en el vector “pGEM-T Easy vector” de PROMEGA. La mezcla de ligación contenía: 5 μ l de amortiguador 2X, 1 μ l de vector (50 ng), 3 μ l del producto de PCR a ligar y 1 μ l de ligasa, todo en un volumen final de 10 μ l.

Obtención de células competentes de *E. coli* para transformar con plásmidos.

Células de *E. coli* DH5 α se crecieron toda la noche en 5 ml de medio LB por 12 horas (Inoue y col. 1990). Estas células se inocularon en 25 ml de medio SOB (bacto triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM [pH 6.8]) a 18°C a una DO₆₀₀ de 0.6. Inmediatamente después se incubaron en hielo por 10 min. Se centrifugó a 5000 rpm en el rotor GSA de Sorvall durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 80 ml de amortiguador TB frío (Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, ajustando el pH a 6.7 con KOH antes de añadir el MnCl₂) y se incubaron 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm en el rotor GSA de Sorvall por 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 20 ml de amortiguador TB y se añadió DMSO a una concentración final del 7%. Posteriormente, se colocaron en hielo durante 10 min, se hicieron alícuotas de 0.5 ml y se congelaron en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Transformación de células competentes de *E. coli*.

A una alícuota de 50 μ l de células competentes de *E. coli* DH5 α (descongeladas al momento de usar), se añadieron 5 μ l de mezcla de ligación y se dejaron en hielo por 30 min. Inmediatamente después, se añadieron 100 μ l de medio LB precalentado a 37°C y se sembró sobre una caja de Petri (precalentada a 37°C) con 25 ml medio LB y agar al 1.6% (w/v), suplementados con 40 μ l de X GAL al 2%, 10 μ l de IPTG 0.8M y ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml. Los cultivos se incubaron durante 12h a 37°C. Se recuperaron las colonias de color blanco.

Obtención de plásmidos y secuenciación.

Se obtuvieron los plásmidos de las colonias blancas y se cortaron con la enzima de restricción Eco RI (la mezcla de reacción contenía 3 μ l del plásmido, 3

μl de amortiguador 10X, 3 unidades de enzima de restricción en un volumen final de 30 μl). La reacción de restricción se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los plásmidos que mostraron la liberación del inserto con la enzima de restricción, se secuenciaron automáticamente en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, utilizando los oligodesoxinucleótidos universales.

Obtención de sondas para hibridaciones tipo Southern y Northern.

Se diseñaron dos sondas de las secuencias de cDNA del apocitocromo *f*, uno de 201 pb, obtenido con el par de desoxioligonucleótidos 5'-TTA CCT CTG AAG ATG TCG CCA TG-3' (hacia el extremo 3') y 5'-ACA AGT CAT CAA TGC TCA CAA GG-3' (hacia el extremo 5') que codifica a un segmento de la extensión N-terminal de la pre-apoproteína del citocromo *f*. También se utilizó una segunda sonda de 165 pb, obtenida con el par de deoxioligonucleótidos 4CF-10CF, que codifica a un segmento de la región madura de la apoproteína del citocromo *f*. Igualmente, se obtuvo un cebador de 131 pb que codifica un segmento de la región madura de la subunidad IV con el par de deoxioligonucleótidos 2S-6S. Las sondas se marcaron con [α -³²P]dCTP usando el sistema comercial Random Primer Labeling Kit de Gibco BRL.

RESULTADOS

Identificación del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis* mediante geles nativos de poliacrilamida y análisis de sus componentes por SDS-PAGE de segunda dimensión.

Los geles nativos incoloros (CN-PAGE) y azules (BN-PAGE), son una herramienta que nos permite aislar a los complejos proteicos en su estado oligomérico nativo (Schägger y von Jagow, 1991). Con el el objeto de valorar el mejor sistema de separación del complejo de citocromos *bf* en su estado oligomérico natural, se realizaron electroforesis utilizando ambos tipos de geles, nativos incoloros y azules con las membranas tilacoidales del cloroplasto de *E. gracilis* solubilizadas con dodecilmaltosido, que se caracteriza por ser un detergente neutro. La banda que formó el probable complejo de citocromos *bf* se identificó mediante la tinción de los grupos hemo con TMBZ. TMBZ es un reactivo que al ser oxidado con el sistema hemo-H₂O₂ precipita formando un complejo de color azul en las zonas del gel donde hay proteínas con grupos hemo unidos de forma covalente. En el caso del gel nativo incoloro, se revelaron dos bandas teñidas con TMBZ**identificadas con los caracteres I y II en la figura 6A. Probablemente, estas dos bandas representan las conformaciones monomérica y dimérica del complejo de citocromos *bf*. En el caso del gel nativo azul, la tinción con TMBZ reveló una sola banda indicada como III en la figura 6C. Las diferencias obtenidas entre ambas técnicas electroforéticas quizá se deben a que el colorante Serva Blue G probablemente estabiliza al complejo de citocromos *bf* en su forma dimérica. Enseguida, los componentes de cada una de los complejos se disociaron mediante electroforesis de segunda dimensión en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 13% (SDS-PAGE). La tinción con TMBZ (figura 6, panel D) de estos últimos geles reveló dos hemoproteínas indicadas como IIIA y IIIB, las cuales corresponden probablemente a los citocromos *f* y *b₆*, respectivamente. En éste mismo gel se aprecia una tercera

**Para hacer aparentes las bandas, después de la tinción con TMBZ, los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

hemoproteína indicada con un asterisco (*). Probablemente se trata de alguna hemoproteína desconocida o bien de una pequeña fracción de complejo *bf* monomérico. La tinción con plata de los mismos geles mostró una composición de 4 a 5 posibles subunidades polipeptídicas para los complejos nativos I y II (figura 6, panel B), mientras que el complejo III mostró una composición de 5 a 6 posibles subunidades polipeptídicas (figura 6, panel E). Se indican las bandas correspondientes a los probables citocromos *f* y *b₆* (por la tinción de sus grupos hemo con TMBZ) en la figura 6, panel B y panel E.

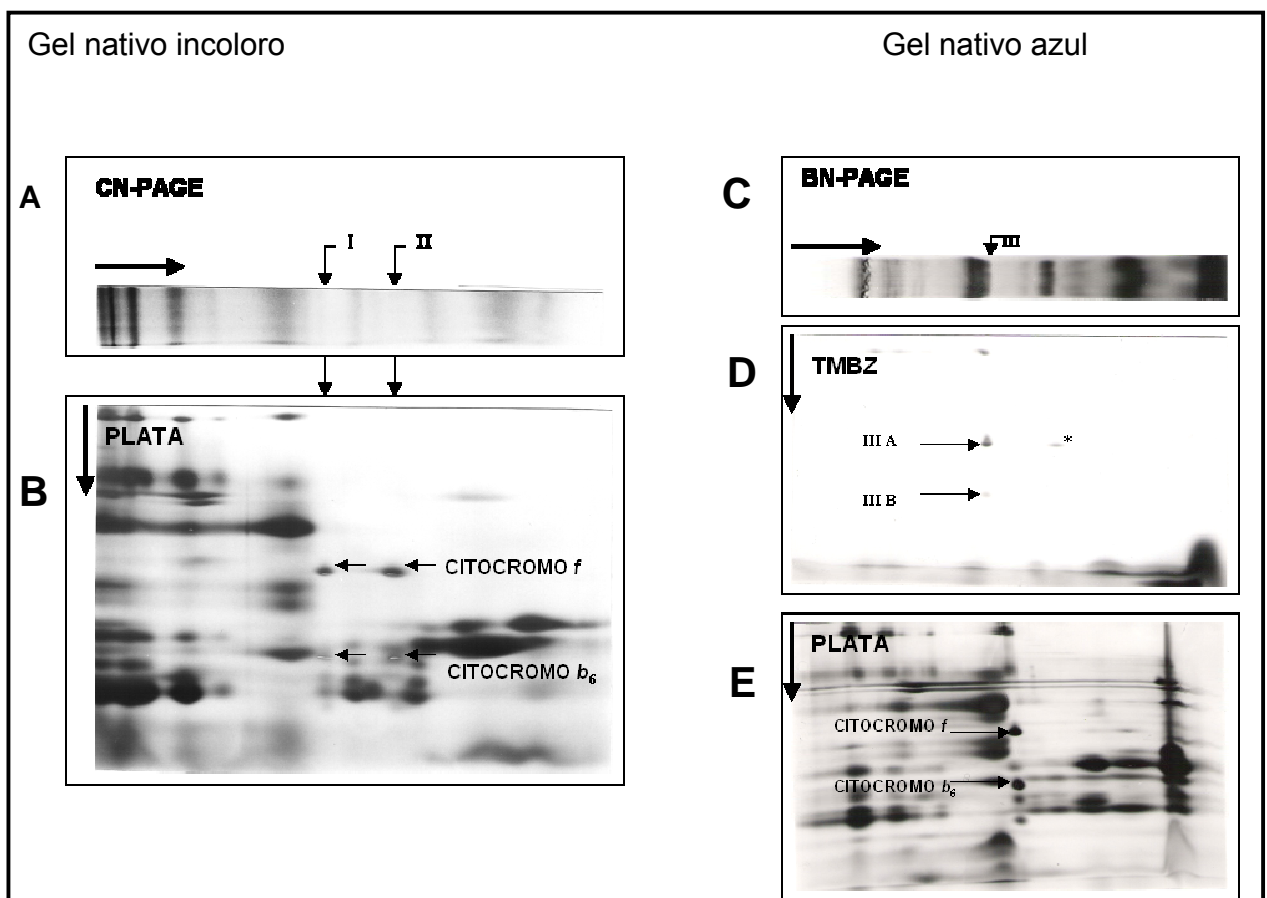


Figura 6. Identificación del complejo de citocromos *bf* en cloroplastos de *E. gracilis*. Electroforesis en geles del 6% al 13% de poliacrilamida nativos incoloro (CN-PAGE, panel A) y azul (BN-PAGE, panel C) de las membranas tilacoidales de *E. gracilis*. Paneles B, D y E, electroforesis SDS-PAGE de segunda dimensión. Paneles A y C, tinción con azul Coomassie. Paneles B y E, tinción con plata. Panel D, tinción con 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMBZ).

En general, el perfil polipeptídico de cada uno de los complejos descritos, es similar en cuanto al número polipéptidos con respecto a los complejos *bf* de

plantas y algas. Sin embargo, para la ulterior caracterización molecular del citocromo *f* y la subunidad IV, fue necesario establecer la metodología para obtener una preparación enriquecida del complejo de citocromos *bf* de *E.gracilis*.

Solubilización del complejo de citocromos *bf* de las membranas del cloroplasto de *E. gracilis* y caracterización de sus subunidades polipeptídicas.

El complejo de citocromos *bf* se solubilizó a partir de membranas de cloroplastos de *E. gracilis* adaptando una metodología ya descrita para la obtención del mismo complejo *bf* de cloroplastos de espinaca (Hurt y Hauska, 1981). Las membranas se solubilizaron con una mezcla de detergentes y el solubilizado se fraccionó secuencialmente con sulfato de amonio. Finalmente, el complejo *bf* se enriqueció en un gradiente de sacarosa, obteniéndose una banda café rojiza que migró en el extremo superior del gradiente de densidad. El gel de electroforesis en SDS-PAGE (figura 7A), teñido con azul de Coomassie, reveló la presencia de cinco subunidades del complejo.

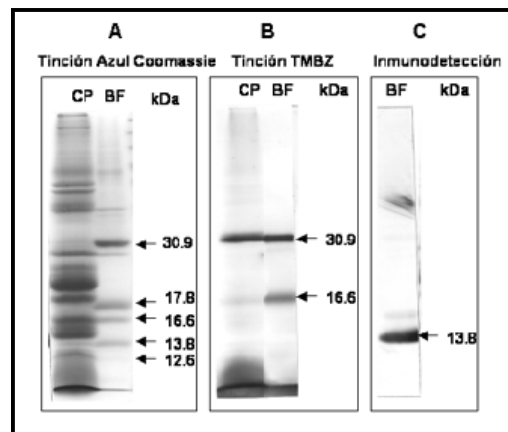


Figura 7. Identificación de las subunidades del complejo *bf* de cloroplastos de *E. gracilis*. Panel A, SDS-PAGE teñido con azul Coomassie. Panel B, SDS-PAGE teñido con 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMBZ). Panel C, Inmunodetección de la subunidad IV del complejo *bf* de *E. gracilis* mediante anticuerpos contra la subunidad IV del complejo *bf* de *C. reinhardtii*. CP, proteínas totales de las membranas tilacoidales; BF, fracción enriquecida del complejo de citocromos *bf*.

El complejo aislado exhibió una composición polipeptídica similar a la encontrada en los gels de segunda dimensión descritos en la sección anterior. Los

citocromos b_6 y f fueron identificados en geles similares teñidos con TMBZ (figura 7B). Ambos, citocromo b_6 y f , muestran un peso molecular aparente de 30.9 kDa y 16.6 kDa, respectivamente y que son muy similares a los reportados anteriormente para otros complejos de citocromos bf (Cramer y col., 2004; Pierre y col., 1995). Un tercer gel fue transferido a una membrana de nylon sobre la cual, mediante inmunoréplicas tipo Western y usando anticuerpos dirigidos contra la subunidad IV del complejo de citocromos bf de *C. reinhardtii*, se identificó a un polipéptido de 13.8 kDa como la subunidad IV del complejo bf de *E. gracilis* (figura 7C). Varios de los componentes polipeptídicos del complejo bf aislado se sometieron a degradación de Edman automatizada. La determinación de la secuencia de los extremos amino terminales y la posterior comparación de los mismos con el banco de datos, Swissprot, permitió la identificación inequívoca del citocromo f , del citocromo b_6 y de la subunidad IV (figura 8).

Banda (kDa)	Secuencia N-terminal	Subunidad
30.9	(S/Y) P I F A Q Q A (X/Y) E N P R E A T G R I V C A N C H	citocromo f
17.8	A Y G E G A N V F G K R K E T D Q F F E I S G D G W S G K L	subunidad del fotosistema II
16.6	S R V Y D W F E E R L E I Q A I A D D V S S K Y V P (P) H (V) N	citocromo b_6
13.8	N V M K K P D L S D P K L R A (K L A K) G M G H N Y Y G E P A W P N D L L Y M F P V C I L G T F A (X A)	subunidad IV
12.6	S G S G V R S A K K G G K A Q G G Q A G V G Y K G S T E P G	proteína no identificada

Los polipéptidos se sometieron a degradación de Edman. Los paréntesis y las X denotan identificación ambigua de ciertos residuos.

Figura 8. Secuencias N-terminal de los componentes polipeptídicos mayores del complejo bf aislado de *E. gracilis*.

Esta es la primera vez que se logró secuenciar al extremo amino terminal de una subunidad IV y del citocromo *b₆*, pues en otros sistemas como en *C. reinhardtii*, ambas subunidades presentan el extremo N-terminal bloqueado (Pierre y col., 1995). Las tres subunidades identificadas, junto con la proteína fierro-azufre tipo Rieske, son componentes constantes y esenciales de los complejos *bf* funcionales, sin embargo, la proteína fierro-azufre tipo Rieske no se identificó en la preparación analizada de *E. gracilis*. Probablemente en algún paso de la solubilización esta subunidad se disoció del complejo *bf*. Además, en la misma preparación, la banda de 17.8 kDa (número de acceso P83687) se identificó como una subunidad del fotosistema II, mientras que la banda de 12.6 Kd (número de acceso P83688) no mostró similitud significativa con ninguna de las proteínas depositadas en los bancos de datos. Queda por determinar si estos dos últimos polipéptidos son componentes reales ó únicamente contaminantes de la preparación analizada del complejo *bf* de *E. gracilis*.

Determinación de la estructura primaria del cDNA del gen *pet A* que codifica al citocromo *f* del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

Con base en la secuencia amino terminal del citocromo *f* de *Euglena* y en secuencias conservadas internas de los citocromos *f*, se diseñaron y construyeron una serie de oligodesoxinucleótidos de acuerdo al uso de codones nuclear del protista. Con ellos se llevaron a cabo amplificaciones con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando como templado a la primera cadena del cDNA sintetizado mediante transcripción reversa a partir de RNA total de *E. gracilis*. Cabe mencionar que los intentos realizados para amplificar al gene del citocromo *f*, utilizando como templado al DNA total de *E. gracilis*, no produjeron amplicones que tuvieran secuencias similares con las de los citocromos *f* depositadas en los bancos de datos. Desconocemos las causas que hacen difícil la amplificación del DNA genómico de este protista. No obstante, a medida que obtuvimos información de la secuencia del cDNA del gen *petA*, se diseñaron oligodesoxinucleótidos adicionales con los que se produjeron amplicones cuyas secuencias se

sobreponían unas con otras. Para amplificar el extremo 3', se utilizó el oligodesoxinucleótido poli-T. Para el extremo 5' se usó la secuencia líder corta que, mediante procesamiento alternativo en trans (*trans*-splicing¹) se une a los extremos 5' de un número indeterminado de RNA premensajeros que codifican a proteínas destinadas a los diferentes compartimentos celulares de *E. gracilis*, como el cloroplasto (Tessier y col., 1991). Se obtuvieron siete amplicones (figura 9) cuyas secuencias mostraron similitud con las de los citocromos *f* depositadas en el banco de datos, reconstruyéndose con ellos la secuencia completa de 1648 pares de bases (pb) del cDNA del gen *petA* de *E. gracilis* (número de acceso AF443625, figura 10). Esto permitió deducir la secuencia de 496 residuos de aminoácidos a partir del primer triplete ATG y hasta el triplete de término TGA (nucleótidos 1295 al 1297). El cDNA del gen *petA* mostró un extremo 3' no traducible (UTR-3') de 153 pb, en donde se identificó una probable señal de poliadenilación AATAAA (nucleótidos 1574 al 1579) (figura 10A). En *E. gracilis*, la sintasa de hidroximetilbilano es una proteína cloroplástica que está codificada en el núcleo y que también presenta un probable sitio de poliadenilación a 58 pb río arriba de la secuencia poli-A (Sharif y col., 1989). Otras secuencias publicadas para genes nucleares no parecen tener una señal típica de poliadenilación (Chan y col., 1990; Houlne y Schantz, 1987).

Con respecto al uso de codones, el cloroplasto de *E. gracilis* tiende a dejar de usar los tripletes terminados en citosina (C) y guanina (G), mientras que en el núcleo, así como en el gen *petA*, los tripletes terminados en adenina (A) son mínimamente utilizados. De acuerdo a lo anterior concluimos que el uso de codones del gene *petA* es nuclear, (figura 11).

De la secuencia amino terminal de la proteína madura del citocromo *f*, se dedujo que la preapocitocromo *f* de *E. gracilis* tiene una extensión N-terminal removible (PTC) de 149 residuos de aminoácidos, M₋₁₄₉ a A₋₁ (figura 12).

¹ Splicing (corte y empalme de los mensajes genéticos), proceso mediante el cual los intrones (secuencias no expresables) de un gen son removidos y sus exones (secuencias expresables) son empalmados para producir un transcrito maduro. *Trans*-splicing, se refiere al empalme de secuencias que no están codificadas en un mismo gen para producir a un transcrito maduro.

L-10CF f aagcttctttctgagtgctatatttttttcGTTACAAATGGCGAGCCTCCAAACGCCAGTCATGGTCGGAACGGTC

L-10CF f GTTGGATGTGTGGCGGGAGTGGTTGGTTTCTGGCCATGTCTTCCAATGCGGCCACGTCCCTCAGCGTGGCCCCA

L-10CF f GCGAGCACCTCCACGCAGATTATCGAAACCCCTCTGTTATCGCCCCACAATATCAAGGAAGTGTACCTCTGAA

L-10CF f GATGTCGCCATGGAGGCATCCAGACGGATTTTGTGAAAGTCGCCGAAATTTCTCTCCGGTTCAGGTCAGTCCG

L-10CF f TGGTCGATGATTTTCTCTGCCATGTTGGCGGTCCCCCTTGCTGCTGCTGCCATGTTTTTTCATGAAGAAGTCCACC

L-10CF f ACGGAGGAGCGTCGGCCCCCTTGTGAGCATTGATGACTTGTGTCGGTGGGAAAGAAGGCTGTGGTTGCTTCTGCA

L-10CF f GTGGTTGGAGCGGCAGCAGGCAGCGCAAATGCATATCCCATCTTCGCCAGCAAGCTTATGGGAACCCGCGAGAG

2CF-8CF6 f TATCCCATCTTCGCCAGCAAGCTTATGAGAACCCGCGAGAG

2CF-8CF7 r TTCGCCAGCAAGCTTATGAGAACCCGCGAGAG

2CF-8CF6 f GCCACCGGACGCATTGTGTGCGCCAACGGCATTGGCTTCCAAGCCACCAGGATGAGGTGCCTCAGGCAGTT

2CF-8CF7 r GCCACCGGACGCATTGTGTGCGCCAACGGCATTGGCTTCCAAGCCACCAGGATGAGGTGCCTCAGGCAGTT

L-10CF f GCCACCGGACGCATTGTGTGCGCCAACGGCATTGGCTTCCAAGCCACCAGGATGAGGTGCCTCAGGCAGTT

3CF-10CF f cgtattgtgtgcgccaactgccaTTGGCTTCCAAGCCACCAGGATGAGGTGCCTCAGGCAGTT

3CF-11CF f cgcattgtgtgcgccaactgtcaTTGGCTTCCAAGCCACCAGGATGAGGTGCCTCAGGCAGTT

2CF-8CF6 f CTGCCCGACCAGGTTTTCGAGGCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

2CF-8CF7 r CTGCCCGACCAGGTTTTCGAGGCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

L-10CF f CTGCCTGACCAGGTTTTCGAGGCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

L-10CF r GCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

3CF-10CF f CTGCCTGACCAGGTTTTCGAGGCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

3CF-11CF f CTGCCTGACCAGGTTTTCGAGGCAGTCACCAAGGTTCCCTTCTCTGGACCATCTGCCTTCTCCAACGTCGTGGAC

2CF-8CF6 f CCCTCGACCCTGGTTGGCAGTGTACCTTTGCTGGCACACAGCCCGTGGGTTTCATCCAGGAGAGCGGAGTCCCT

2CF-8CF7 r CCCTCGACCCTGGTTGGCAGTGTACCTTTGCTGGCACACAGCCCGTGGGTTTCGTCAGGAGAGCGGAGTCCCT

L-10CF f CCCTCAACCGTGG-TGGCAGTGTACCTTTGCTGGC

L-10CF r CCCTCATCCGTTGGTGGCAGTGTTCCTTTGCTGGCACACAGCCCGTGGGTTTCATCCAGGAGAGCGGAGTCCCT

3CF-10CF f CCCTCAACCGTGGTTGGCAGTGTACCTTTGCTGGCACACAGCCCGTGGGTTTCATCCAGGAGAGCGGAGTCCCT

3CF-11CF f CCCTCAACCGTGGTTGGCAGTGTACCTTTGCTGGCACACAGCCCGTGGGTTTCATCCAGGAGAGCGGAGTCCCT

2CF-8CF6 f GTGTCTCAGGCTCTGGTGGACATTGCAACTCCCGGAACCCAGACACGGTCTTCAAGGCAACCATCAAGGTCCCC

2CF-8CF7 f AAGGTCCCC

2CF-8CF7 r GTGTCTCAGGCTCTGGTGGACATTGCAACTCCCGGAACCCAGACACGGTCTTCAAGGCAACCAACCAAGGTCCCC

L-10CF r GTGTCTCAGGCTCTGGTGGACATTGCAACTCCCGGAACCCAGACACGGTCTTCAAGGCAACCATCAAGGTCCCC

3CF-10CF f GTGTCTCAGGCTCTGGTGGACATTGCAACTCCCGGAACCCAGACACGGTCTTCAAGGCAACCATCAAGGTCCCC

3CF-11CF f GTGTCTCAGGCTCTGGTGGACATTGCAACTCCCGGAACCCAGACACGGTCTTCAAGGCAACCATCAAGGTCCCC

2CF-8CF6 f TATGACGAGTCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

2CF-8CF7 f TATGACGAGTCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

2CF-8CF7 r TATGACGAGTCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

L-10CF r TACGATGAATCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

3CF-10CF f TACGATGAATCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

3CF-11CF f TACGATGAATCTTTGAAGCAGGTGGCCGGCAATGGGCGCGCAGCCCCCTGAAAGTGGCGCTGTCTGATTCTG

2CF-8CF6 f CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

2CF-8CF7 f CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

2CF-8CF7 r CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

L-10CF r CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

3CF-10CF f CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

3CF-11CF f CCGGAGGGCTTCCGCTGGCACCCCGGAGCGCATCCCTGAGAAGATGAAAGAGGAGATCAACGGCCTTCAGTTC

2CF-8CF6 f ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACATTTTGGTTGTTGGGCTGTCCCCGGCAAGAAGTACGCTGAGATGACT

2CF-8CF7 f ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACATTTTGGTTGTTGGGCTGTCCCCGGCAAGAAGTACGCTGAGATGACT

2CF-8CF7 r ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACATTTTGGTTGTTGGGCTGTCCCCGGCAAAAAAGTACGCTGAGATGACT

L-10CF r ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACATTTTGGTTGTTGGGCTGTCCCCGGCAAGAAGTACGCTGAGATGACT

3CF-10CF f ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACATTTTGGTTGTTGGGCTGTCCCCGGCAAGAAGTACGCTGAGATGACT

3CF-11CF f ATCCAGTACAGCAAGGACACCCCGAACatccttgttatcgggtcccgtc

5CF-7CF8 f aagaagtacgctgagatgact

5CF-7CF8 r aagaagtacgctgagatgact

5CF-7CF12 f aagaagtacgctgagatgact

5CF-7CF12 r aagaagtacgctgagatgact

```

2CF-8CF6 f GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
2CF-8CF7 f GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
2CF-8CF7 r GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
L-10CF r GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
3CF-10CF f GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
5CF-7CF8 f GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
5CF-7CF8 r GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
5CF-7CF12 f GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC
5CF-7CF12 r GTGGCCCTCCTGTCCCCTGACCCGAGGGTGGACAAGAAGGCGGAGTTCGGCACCTTGCCGATTTATGTCGGTGGC

2CF-8CF6 f AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA
2CF-8CF7 f AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA
2CF-8CF7 r AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAA
L-10CF r aattgcccgcggttagattat
3CF-10CF f aaccgcccgcgcccagattat
5CF-7CF8 f AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA
5CF-7CF8 r AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA
5CF-7CF12 f AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA
5CF-7CF12 r AACCGTGGCCGAGGCCAGTTGTATCCCACTGGTGAAGAAGCAACAACAACATCTACAACGTGGAGCACTCCGGA

2CF-8CF6 f AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC
2CF-8CF7 f AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC
5CF-7CF8 f AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC
5CF-7CF8 r AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC
5CF-7CF12 f AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC
5CF-7CF12 r AAGATTGCCGACATCCAGCTGAATGAGAAGAAGCGCATTACACCGTGGCCGTGCAGCAGAAGGACGGCGAGATC

2CF-8CF6 f ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC
2CF-8CF7 f ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC
5CF-7CF8 f ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC
5CF-7CF8 r ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC
5CF-7CF12 f ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC
5CF-7CF12 r ATCAATGAGGACTTGCCTGCTGGAGCGGAGCTGATTGTGAAGGTTGGCGATGTTGTTGAGGCCGGCCAGGCCATC

2CF-8CF6 f TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCG-----
2CF-8CF7 f TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCG-----
5CF-7CF8 f TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCGCGTGCAG
5CF-7CF8 r TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCGCGTGCAG
5CF-7CF12 f TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCGCGTGCAG
5CF-7CF12 r TCCACCAACCCCAACGTCGGCGGCTTCGGCCAGGCCGAGTCCGAGATCGTCCTCCAGAACCCCGGCCGCGTGCAG

5CF-7CF8 f GCCTTCTCTTCTTCTCTCTTCAACCGTCTCGGACCCAGACCCTGCTGgttttgaagaagaagcaattcgag
5CF-7CF8 r GCCTTCTCTTCTTCTCTCTTCAACCGTCTCGGACCCAGACCCTGCTGgttttgaagaagaagcaattcgag
5CF-7CF12 f GCCTTCTCTTCTTCTCTCTTCAACCGTCTCGGACCCAGACCCTGCTGGTGGTGAAGAAGAAGCAGTACGAGCAG
5CF-7CF12 r GCCTTCTCTTCTTCTCTCTTCAACCGTCTCGGACCCAGACCCTGCTGGTGGTGAAGAAGAAGCAGTACGAGCAG

5CF-7CF12 f GTGCAGCTGTCCGAGATGAACTTCTGAGGGTGGGGTTCGCTCGCCTGTGCCCTTGACCGTACCCGGGGGAGCAG
5CF-7CF12 r GTGCAGCTGTCCGAGATGAACTTCTGAGGGTGGGGTTCGCTCGCCTGTGCCCTTGACCGTACCCGGGGG AGCAG

5CF-7CF12 f GCACCTTTTCGCGGATGAGCCGCTGAAAATAAAGGAAGCCCGGTTCTTTTCTGTAAACAGGACTGCTTCTACA
5CF-7CF12 r GCACCTTTTCGCGGATGAGCCGCTGAAAATAAAGGAAGCCCGGTTCTTTTCTGTAAACAGGACTGCTTCTACA

5CF-7CF12 f ACCTGGTGTGGCTGTCTATTGTGCaAAAAAAAAAAAAA
5CF-7CF12 r ACCTG TGCT GCTGTCTATTGTGCaAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR con RNA total de *E. gracilis* y que presentan similitud con otros citocromos *f*. Del lado izquierdo se muestra el nombre del amplicon que corresponde con el del par de desoxiligonucleotidos con que fue amplificado. El desoxiligonucleótido hacia el extremo 3' se indica con la letra f y el desoxiligonucleótido hacia el extremo 5' se indica con la letra r. Los caracteres en minúscula y en cursiva, indican la secuencia de los oligodesoxinucleótidos empleados.

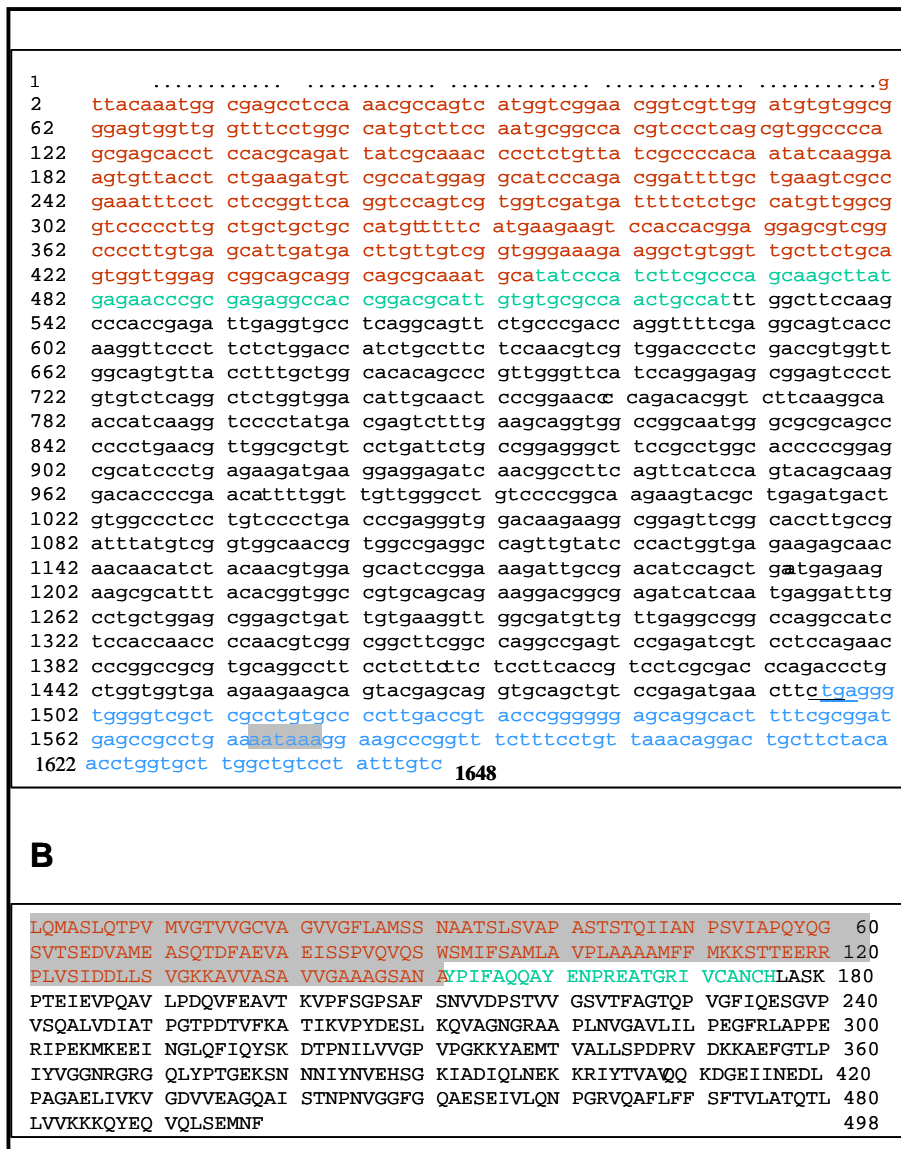


Figura 10. Panel A, secuencia de nucleótidos del cDNA del gen *petA* que codifica para la preapocitocromo *f* del complejo de citocromos *bf* de cloroplastos de *E. gracilis*. La secuencia sombreada es probablemente una señal de poliadenilación y la secuencia subrayada muestra el codón de término de la traducción. La secuencia en caracteres rojos codifica para la presecuencia de la apocitocromo *f*. La secuencia en caracteres verdes codifica el inicio de la apocitocromo *f* y corresponde con la secuencia amino terminal que se obtuvo mediante la degradación de Edman de la proteína madura. La secuencia no traducible del extremo 3' se muestra en caracteres azules. Panel B, secuencia deducida de residuos de aminoácidos de la preapocitocromo *f* del complejo de citocromos *bf* de cloroplastos de *E. gracilis*. La presecuencia del preapocitocromo *f* aparece sombreada y en caracteres rojos. La secuencia madura de la apocitocromo *f* se muestra en caracteres negros junto a la de caracteres verdes, que corresponde a la secuencia amino terminal que se obtuvo mediante la degradación de Edman de la proteína madura.

	N	f	S	Cl		N	f	S	Cl
UUA	0.9	2.0	0.0	55.5	UUU	9.3	6.0	5.7	60.2
CUA	0.9	0.0	0.0	6.5	UCU	12.9	20.0	17.2	26.7
AUA	0.4	0.0	0.0	32.2	UAU	9.7	10.0	17.2	30.8
GUA	1.8	0.0	5.7	18.9	UGU	3.0	2.0	0.0	8.4
UCA	5.5	2.0	5.7	16.2	CUU	8.5	6.0	17.2	19.0
CCA	11.0	10.0	34.5	10.7	CCU	12.9	14.0	57.5	21.3
ACA	11.4	2.0	17.2	21.0	CAU	6.3	2.0	0.0	19.3
GCA	17.8	26.1	23.0	17.8	CGU	8.6	4.0	11.5	15.0
UAA	0.9	0.0	5.7	3.0	AUU	18.3	26.1	28.7	49.1
CAA	9.6	10.0	0.0	25.1	ACU	12.7	6.0	17.2	22.0
AAA	9.1	0.0	5.7	69.8	AAU	8.8	10.0	11.5	46.8
GAA	13.9	8.0	0.0	38.2	AGU	4.2	4.0	5.7	14.5
UGA	0.7	2.0	0.0	0.3	GUU	24.0	38.1	23.0	35.4
CGA	5.2	4.0	0.0	7.2	GCU	25.9	26.1	34.5	27.6
AGA	2.5	0.0	0.0	8.8	GAU	22.6	12.0	5.7	30.6
GGA	13.9	24.0	17.2	24.6	GGU	18.4	6.0	28.7	32.8
	N	f	S	Cl		N	f	S	Cl
UUC	26.2	38.1	57.5	7.8	UUG	16.7	18.0	23.0	18.3
UCC	19.0	26.1	5.7	3.6	UCG	5.2	6.0	0.0	5.2
UAC	22.7	12.0	5.7	5.1	UAG	0.2	0.0	0.0	0.7
UGC	11.4	4.0	5.7	2.7	UGG	12.9	2.0	23.0	14.3
CUC	12.5	12.0	5.7	0.5	CUG	32.2	26.1	74.7	1.0
CCC	22.6	32.1	11.5	2.4	CCG	8.7	14.0	0.0	2.3
CAC	12.2	2.0	0.0	2.5	CAG	30.9	50.1	11.5	3.7
CGC	18.8	12.0	17.2	3.4	CGG	8.4	2.0	11.5	0.9
AUC	29.0	28.1	28.7	5.0	AUG	25.2	22.0	34.5	22.1
ACC	22.9	34.1	17.2	2.1	ACG	9.1	14.0	0.0	4.8
AAC	28.6	32.0	46.0	9.5	AAG	54.1	50.1	40.2	11.7
AGC	15.7	16.0	11.5	2.4	AGG	3.8	2.0	0.0	4.8
GUC	22.4	36.1	28.7	2.5	GUG	42.5	48.1	28.7	3.6
GCC	36.6	40.1	23.0	3.2	GCG	11.4	18.0	11.5	4.8
GAC	36.7	20.0	23.0	6.2	GAG	46.7	52.1	40.2	8.3
GGC	29.1	40.0	23.0	4.8	GGG	13.5	8.0	0.0	4.5

Figura 11. Uso de codones de *Euglena gracilis* para los genes *petA* y *petD* que codifican para la preapocitocromo *f* y la presubunidad IV del complejo de citocromos *bf*. N, núcleo; f, citocromo *f*, S, subunidad IV; Cl, cloroplasto.

Esta extensión N-terminal es similar en tamaño a los PTC que presentan otras proteínas precursoras cloroplásticas codificadas en el núcleo de *E. gracilis*, que generalmente tienen un tamaño de 134 a 141 residuos. Estos PTC, al igual que en plantas (cuyos PTC son de 20 a 120 residuos), no constituyen secuencias canónicas conservadas (Chan y col., 1990; Kishore y col., 1993).

Se ha observado que los PTC de las preproteínas tilacoidales del cloroplasto de *E. gracilis*, a diferencia de las de plantas, presentan tres dominios hidrofóbicos; el primero, descrito únicamente en *E. gracilis*, es un dominio de reconocimiento a la membrana del retículo endoplásmico. Esta región está seguida por un dominio de reconocimiento para la membrana del cloroplasto y por un tercer dominio de reconocimiento para la membrana tilacoidal (Inagaki y col.,

2000). Las presecuencias de las preproteínas estromales presentan únicamente los dos primeros dominios (Sulli y col.,1999). En el caso de la extensión N-terminal del preapocitocromo *f* de *E. gracilis* se predijeron mediante programas de cómputo (SPORT prediction; Emanuelsson y col., 1999; Emanuelsson y col., 2000; Nielsen y col., 1997) tres dominios delimitados por tres sitios de corte de probables peptidasas de procesamiento:

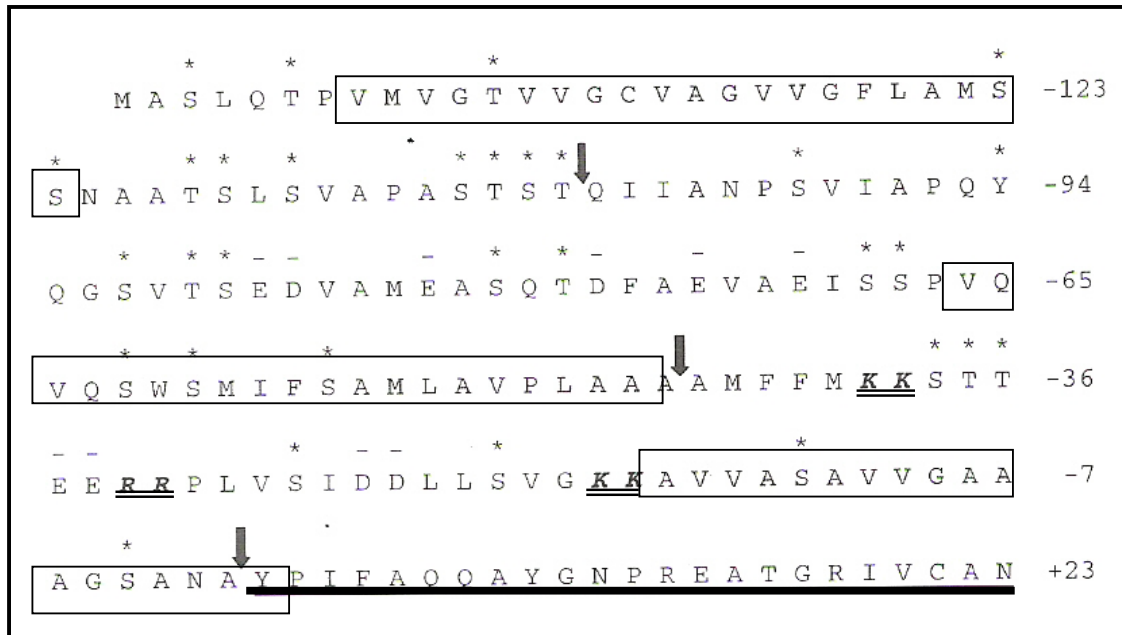


Figura 12. Secuencia deducida de residuos de aminoácidos del PTC de la preapocitocromo *f* del complejo *bf* de *E. gracilis*. Las flechas indican los sitios predichos de corte de peptidasas. Los asteriscos indican a residuos hidroxilados, el signo menos a residuos ácidos y con letra cursiva y subrayados con doble línea a residuos básicos. La secuencia de la proteína madura del citocromo *f* obtenida mediante la degradación de Edman se muestra subrayada con una línea negra. Los residuos encerrados en cuadros son dominios hidrofóbicos. La numeración positiva empieza a partir del primer residuo de la proteína madura y la negativa denota la presecuencia.

una peptidasa señal entre los residuos T₋₁₀₇ y Q₋₁₀₆, una peptidasa de procesamiento estromal entre los residuos A₋₄₆ y A₋₄₅ y un sitio de corte conservado Ala-X-Ala, residuos A₋₃ a A₋₁, para la peptidasa de procesamiento tilacoidal (Inagaki y col., 2000; Smeekens y col., 1986; von Heijne y col., 1989). Los tres dominios identificados presentan regiones hidrofóbicas (residuos V₋₁₄₂ a S₋₁₂₂, V₋₆₆ a A₋₄₆ y A₋₁₇ a Y₊₁) y entre ellas hay numerosos residuos hidroxilados, además de residuos ácidos y básicos, como se ha observado en otras proteínas precursoras cloroplásticas codificadas en el núcleo de *E. gracilis*

muestran a residuos conservados en los apocitocromos *f* de plantas, algas y cianobacterias involucrados en la unión de la cadena de cinco moléculas de agua (figura 4). Como se indicó en la introducción, esta cadena de moléculas de agua puede actuar como componente estructural (Chi y col., 2000) o como un posible cable conductor de protones. Se ha propuesto que el complejo de citocromos *bf* puede expulsar a los protones a través de estas cadenas de agua durante su funcionamiento (Sainz y col., 2000). Además, la comparación de secuencias revela que en el apocitocromo *f* de *E. gracilis* hay 62 residuos de aminoácidos adicionales, que al ser comparada con las secuencias disponibles en el banco de proteínas, no mostró parecido con ninguna de ellas. Esta inserción es de carácter hidrofóbico, con solo 6 residuos cargados, 3 residuos de ácido aspártico (D64, D96 y D104), uno de ácido glutámico (E85) y dos de lisina (K50 y K108), por lo que en su medio natural deberá estar resguardado del ambiente hidrofílico del lumen tilacoidal, lo cual hace suponer que deberá estar alejado del sitio de interacción con la plastocianina, en donde el ambiente es de carácter hidrofílico, rico en residuos de lisina (ver figura 4), lo que hace suponer que podría jugar un papel meramente estructural.

Determinación de la estructura primaria del cDNA del gen *petD* del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

Con base en la secuencia del extremo amino terminal de la proteína madura de la subunidad IV del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis* y de secuencias conservadas internas, se construyeron oligodesoxinucleótidos para realizar amplificaciones mediante la PCR (figura 5, panel B). Para obtener información de la región 3' se utilizó el oligodesoxinucleótido poli-T y para extremo 5' al oligo L. Usando cDNA de *E. gracilis* como templado, se obtuvieron tres amplicones que se sobrepusieron unos a otros (figura 14) y cuyas secuencias exhibieron similitud con los genes *petD* de cloroplastos encontrados en las bases de datos. Se reconstruyó una secuencia parcial de 697 pb del cDNA del gen *petD* de *E. gracilis* (número de acceso AY216719, figura 15). A diferencia del gene

petA, el RNA mensajero del gen *petD* no exhibe en su extremo 3' una señal típica de poliadenilación.

1S-5S f	<i>aactatta</i> cgggcgagcctgctTGAGAGTGC GTTGGAGCGGC GTTCAAGCTCTGTTGTGATGAACAATGTTATGAAG
1S-5S f	AAGCCTGATTGTCTGACCCAAAGCTGCGGGCCAAGCTGGCCAAGGGAATGGGCCGCAACTATTATGGTGAGCCA
1S-5S f	GCGTGGCCTAATGACCTCCTGTACATGTTCCCTGTTTGCATTCTTGGAACTTTGCTGCAATTGTGGGTCTGGCT
1S-5S f	GTCATGCAGCCAACCTCCAACCTGGTGAGCCTGCAAAACCTTTTCGCTACACCACTGGAGATCTTGCCCTGAGTGGTAT
3S-4S R	
3S-4S F	<i>g</i> tat
2S-4S R	
2S-4S F	<i>cccctggagatcctg</i> cctgagtGAT
	<i>cccctggagatcctg</i> cctgagtGAT
1S-5S f	TTCTTCCCCACCTTCAACCTGCTGCGCGTGATCCCCAACAAAGCTGCTGGGTGACTGTCCATGGCAGCCGTCCT
3S-4S R	<i>ttcttccccaccttcaaac</i> CTGCTGCGCGTGATCCCCAACAAAGCTGCTGGGTGACTGTCCATGGCAGCCGTCCT
3S-4S F	<i>ttcttccccaccttcaaac</i> CTGCTGCGCGTGATCCCCAACAAAGCTGCTGGGTGACTGTCCATGGCAGCCGTCCT
2S-4S R	TTCTTCCCCACCTTCAACCTGCTGCGCGTGATCCCCAACAAAGCTGCTGGGTGACTGTCCATGGCAGCCGTCCT
2S-4S F	TT.TTCCCCACCTTCAACCTGCTGCGCGTGATCCCCAACAAAGCTGCTGGGTGACTGTCCATGGCAGCCGTCCT
1S-5S f	<i>GCTGGTctgatcaccg</i> ttcccttcattga
3S-4S R	GCTGGTCTGATCACAGTCCCTTTTCATTGAGAAGCTCAACAAATCCAGAACCCTTTCCGTCGCCCTGTGGCCACA
3S-4S F	GCTGGTCTGATCACAGTCCCTTTTCATTGAGAAGCTCAACAAATCCAGAACCCTTTCCGTCGCCCTGTGGCCACA
2S-4S R	GCCTGTCTGATGACAGTCCCTTTTCATTGAGAAGCTCAACAAATCCAGAACCCTTTCCGTCGCCCTGTGGCCACA
2S-4S F	GCCTGTCTGATGACAGTCCCTTTTCATTGAGAAGCTCAACAAATCCAGAACCCTTTCCGTCGCCCTGTGGCCACA
3S-4S R	AGCGTGTTCCTTTTGGGCACTGTTGTGCGTATCTGGCTTGGCATTGGAGCAACCCTGCCAATTGACAAGGCTATC
3S-4S F	AGCGTGTTCCTTTTGGGCACTGTTGTGCGTATCTGGCTTGGCATTGGAGCAACCCTGCCAATTGACAAGGCTATC
2S-4S R	AGCGTGTTCCTTTTGGGCACTGTTGTGCGTATCTGGCTTGGCATTGGAGCAACCCTGCCAATTGACAAGGCTATC
2S-4S F	AGCGTGTTCCTTTTGGGCACTGTTGTGCGTATCTGGCTTGGCATTGGAGCAACCCTGCCAATTGACAAGGCTATC
3S-4S R	TCTCTGGGCTTCTGGTAAAGTGC GTTATACCTGACCGAGGGCCTTTTTATGGTGGGTCTCCCTGCTTGGTTGGAC
3S-4S F	TCT.TGGGCTT.TGGTAAAGTGC GTTATACCTGACCGAGGGCCTTTTTATGGTGGGTCTCCCTGCTTGGTTGGAC
2S-4S R	TCTCTGGGCTTCTGGTAAAGTGC GTTATGCCTGACCGAGGGCCTTTTTATGGTGGGTCTCCCGCTCGGTTGGAC
2S-4S F	TCT.TGGGCTT.TGGTAAAGTGC GTTATGCCTGACCGAGGGCCTTTTTATGGTGGGTCTCCCGCTCGGTTGGAC
3S-4S R	AAAGGGCCTCAGGTGACCAACAATCGCTTGGAAAGTGC GTTT-CCATTTCCAGGCTCCAAGACTCATGGAACCCCT
3S-4S F	AAAGGGCCTCAGGTGACCAACAATCGCTTGGAAAGTGC GTTT-CCATTTCCAGGCTCCAAGACTCATGGAACCCCT
2S-4S R	AAAGGGCCTCAGGTGACCAACAATCGCTTGGAAAGTGC GTTTTCCATTTCCAGGCTCCAAGACTCATGGAACCCCT
2S-4S F	AAAGGGCCTCAGGTGACCAACAATCGCTTGGAAAGTGC GTTTTCCATTTCCAGGCTCCAAGACTCATGGAACCCCT
3S-4S R	GTTAGCCAGACGTTCCGTTGGCGCTGTAGCTCGTTGAACTTCaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
3S-4S F	GTTAGCCAGACGTTCCGTTGGCGCTGTAGCTCGTTGAACTTCaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2S-4S R	GTTAGCCAGACGTTCCCGTGGCGGTGTAGCTTGTGAACTTCaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2S-4S F	GTTAGCCAGACGTTCCGTTGGCGCTGTAGCTTGTGAACTTCaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 14. Secuencia de nucleótidos de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR con RNA total de *E. gracilis* y que presentaron similitud con otras subunidades IV. Los caracteres en minúscula y en cursiva, indican la secuencia de los oligodesoxinucleótidos empleados.

A

```
1                                     T
2  GAGAGTGCCT TGGAGCGGCG TTCAAGCTCT GTTGTGATGA ACAATGTTAT GAAGAAGCCT GATTTGTCTG
72  ACCCAAAGCT GCGGGCCAAG CTGGCCAAGG GAATGGGCCG CAACTATTAT GGTGAGCCAG CGTGGCCTAA
142 TGACCTCCTG TACATGTTCC CTGTTGTCAT TCTTGAACC TTTGCTGCAA TTGTGGGTCT GGCTGTCATG
212 CAGCCAATC CAACTGGTGA GCCTGCAAAC CCTTTCGCTA CACCACTGGA GATCTTGCCCT GAGTGGTATT
282 TCTTCCCAC CTTCAACCTG CTGCGCGTGA TCCCAACAA GCTGCTGGGT GTACTGTCCA TGGCAGCCGT
352 CCCTGCTGGT CTGATCACAG TCCCTTTCAT TGAGAACGTC AACAAATTCC AGAACCCTTT CCGTCGCCCT
422 GTGGCCACAA GCGTGTTCCT TTTGGGCACT GTTGTGCTA TCTGGCTTGG CATGGAGCA ACCCTGCCAA
492 TTGACAAGGC TATCTCTCTG GGCTTCTGGT AAAGTGCCTT ATACCTGACC GAGGGCCTTT TTATGGTGGG
562 TCTCCCTGCT TGGTTGGACA AAGGCCTCA GGTGACCAAC AATCGCTTGG AAGTGCCTTT TCCATTCCA
632 GGCTCCAAGA CTCATGGAAC CCCTGTTAGC CAGACGTTCC GTGGGCGCTG TAGCTCGTTG AACTTC
```

B

```
1  ESALERRSSS VVMNNVMKKP DLSDPKLRAK LAKGMGRNYY GEPAWPNDLL
51  YMFPVCILGT FAAIVGLAVM QPTPTGEPAN PFATPLEILP EWYFFPTFNL
101 LRVIPNKLGG VLSMAAVPAG LITVFFIENV NKFQNPFRFP VATSVFLLGT
151 VVAIWLIGIGA TLPIDKAISL GFW*
```

Figura 15. Panel A, secuencia de nucleótidos del cDNA del gen *petD* que codifica para la subunidad IV del complejo de citocromos *bf* de cloroplastos de *E. gracilis*. La secuencia subrayada muestra el codon de termino de la traducción. Panel B, secuencia deducida parcial de residuos de aminoácidos de la presubunidad IV del complejo de citocromos *bf* de cloroplastos de *E. gracilis*. La presecuencia parcial de la presubunidad IV aparece sombreada.

La secuencia deducida de aminoácidos predice una preproteína parcial de la subunidad IV de *E. gracilis* de 173 residuos (figura 15, panel B) y de forma similar al gen *petA*, el uso de codones del gen *petD* es nuclear, pues es claramente diferente al uso de codones de los genes cloroplásticos (figura 11). La secuencia amino terminal de la proteína madura de la subunidad IV de *E. gracilis*, obtenida por secuenciación directa del polipéptido, nos permitió deducir la secuencia de 159 residuos de la subunidad madura, la cual es homóloga a otras subunidades IV conocidas (figura 16). Sin embargo, únicamente se logró obtener la secuencia parcial de 15 residuos de aminoácidos para la presecuencia cloroplástica de la proteína de la subunidad IV. En la secuencia deducida de la preproteína de la subunidad IV hay un residuo inconsistente (Arginina 23) con respecto a la secuencia de la proteína madura obtenida mediante la degradación de Edman (R₂₃ en lugar de H₂₃, señalada con una flecha de color negro, figura 16). Puesto que no

Discusión

Identificación del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis* mediante geles nativos de poliacrilamida y SDS-PAGE de segunda dimensión.

Los complejos de citocromos *bf* en plantas, algas y cianobacterias están constituidos por 8 subunidades proteicas y que están codificadas por genes que pueden estar en el núcleo ó en el genoma del cloroplasto (Choquet y col., 2002). Así tenemos que en el genoma del cloroplasto de plantas y algas, en donde se ha caracterizado este complejo, se encuentran invariablemente los genes *petA*, *petD*, *petB*, *petG* y *petL* que codifican, respectivamente, para las subunidades proteicas citocromo *f*, subunidad IV, citocromo *b*, PetG y PetL. Sin embargo, en el genoma circular de 143.170 kpb del cloroplasto de *E. gracilis*, únicamente encontramos a los genes *petB* y *petG* (Hallick y col., 1993). Por lo que se planteó como objetivo investigar la probabilidad de que en *E. gracilis* existe un complejo de citocromos *bf* y, por lo tanto, los genes *petA* y *petD* deberían estar en el núcleo. Para ello se obtuvieron cloroplastos de *E. gracilis*, se solubilizaron y se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida. De una segunda preparación de membranas tilacoidales se obtuvo una fracción enriquecida del complejo de citocromos *bf*, la cual se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las subunidades proteicas, identificadas con éstos sistemas, se caracterizaron sin ambigüedades mediante la secuenciación de sus extremos amino terminales. A partir de estas secuencias y de secuencias reportadas para otros genes *petA* y *petD*, se diseñaron oligodesoxinucleótidos para amplificar mediante la RT-PCR los cDNAs de los genes correspondientes de *E. gracilis*. Tomando en cuenta el uso de codones, así como la adquisición de una presecuencia similar a otras proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo, concluimos que *E. gracilis* presenta un complejo *bf* con un juego de citocromos similar a los reportados en plantas algas y cianobacterias, y que sus genes *petA* y *petD* están en el núcleo.

La electroforesis en geles nativos azules ó incoloros de poliacrilamida (BN-PAGE y CN-PAGE respectivamente), permite separar directamente de las membranas biológicas solubilizadas con un detergente no-iónico, a los complejos proteicos en su estado oligomérico nativo para la posterior identificación de las subunidades que los componen (Schägger y von Jagow, 1991). La movilidad de las proteínas en el BN-PAGE es afectada por la unión de cargas negativas del colorante azul de Coomassie, por lo que aún las proteínas básicas que unen a este colorante migran hacia el ánodo. La CN-PAGE utiliza los mismos amortiguadores y condiciones de electroforesis que la BN-PAGE, pero en ausencia del colorante. En este caso la movilidad electroforética depende de la carga intrínseca de las proteínas y únicamente aquellas con punto isoelectrico inferior a pH 7.0 migran hacia el ánodo. Estas observaciones nos pueden explicar las diferencias en los resultados que se obtuvieron al separar al complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis* sobre geles nativos azules e incoloros. Al modificar la carga de las proteínas membranales con el azul de Coomassie, la movilidad electroforética de las mismas se vió afectada. Al estabilizar los complejos proteicos con el colorante, se reveló una sola banda con tetrametil benzidina (TMBZ), en los geles nativos azules. En las condiciones electroforéticas de los geles nativos incoloros, el complejo *bf* quizá es más inestable, de tal forma que se observan dos bandas al revelar a los grupos hemo con TMBZ. La electroforesis de segunda dimensión en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) teñidas con plata, reveló un perfil de las subunidades polipeptídicas que conforman al complejo *bf* de *E. gracilis* similar en número a las de los complejos *bf* de plantas (Hurt y Hauska, 1981), algas (Wynn y col., 1988) y cianobacterias (Zhang y col., 2003). Se revelaron dos hemoproteínas con la tinción de TMBZ, correspondientes a los citocromos *f* y *b₆*. Igualmente, el complejo *bf* parcialmente purificado de *E. gracilis*, mostró un perfil electroforético similar a los obtenidos con los geles de segunda dimensión. Nuevamente los citocromos *f* y *b₆* se tiñeron con TMBZ y la subunidad de 16.6 kDa (figura 7) fue blanco de reconocimiento de los anticuerpos dirigidos contra el citocromo *b₆* de *C. reinhardtii* (datos no mostrados). En un segundo análisis inmunoquímico, mediante anticuerpos dirigidos contra la

subunidad IV de *C. reinhardtii*, la banda de 13.8 kDa se identificó como la subunidad IV del complejo *bf* de *E. gracilis* (figura 7). Finalmente, las secuencias amino terminal de cinco de las subunidades del complejo *bf* de *E. gracilis*, permitieron identificar inequívocamente a tres subunidades del complejo, a saber: el citocromo *f*, el citocromo *b₆* y a la subunidad IV. El citocromo *b₆* y la subunidad IV del complejo *bf* de *E. gracilis* fueron susceptibles a la degradación de Edman. Esto contrasta con lo que sucede en plantas y algas, en donde a excepción del citocromo *f*, la proteína de Rieske y PetM, las demás subunidades (citocromo *b₆*, subunidad IV, PetG, PetL y PetN) se encuentran bloqueadas, por lo que no es posible secuenciar sus extremos amino terminales (Pierre y col., 1995; Whitelegge y col., 2002). Dos de las secuencias amino terminales no mostraron similitud con ninguna de las subunidades clásicas descritas para los complejos *bf*, de hecho, una de ellas (12.6 kDa, figura 6) no mostró similitud con ninguna de las proteínas depositadas en los bancos de secuencias. El polipéptido de 17.8 kDa presentó similitud con una de las subunidades del fotosistema II. Sin embargo, con la simple falta de similitud con las subunidades clásicas de los complejos *bf* conocidos, no podemos descartar el hecho de que estos dos polipéptidos puedan ser parte integral del complejo *bf* de *E. gracilis*, por lo que una caracterización más exhaustiva descartará o confirmará este hecho. Cabe hacer notar aquí, sin embargo, que estas bandas comigran con el complejo *bf* en dos condiciones distintas: en geles nativos azules y en los gradientes de sacarosa. En general, es difícil encontrar a los mismos contaminantes asociados a un complejo aislado por dos métodos distintos. Hipotetizamos que estos polipéptidos podrían ser componentes genuinos del complejo. Esto implicaría una asociación *in vivo* entre el complejo *bf* y el fotosistema II, lo cual queda por ser demostrado. Una última observación del análisis de secuencias amino terminales de las subunidades del complejo *bf* de *E. gracilis*, fue que en la preparación obtenida no se encontró a la proteína hierro-azufre tipo Rieske. Esta subunidad es un componente indispensable en el complejo de citocromos *bf* y esencial para la actividad transportadora de electrones. Su ausencia puede deberse a la disociación y/o degradación de la proteína de Rieske durante la solubilización del complejo. Una

deslipidación ocasionada por los detergentes empleados podría haber ocasionado su separación del complejo, tal como sucede en otros sistemas (Breyton y col., 1997; Huang y col., 1994). De hecho, la pérdida de la proteína de Rieske es una de las dificultades que se presenta al aislar al complejo de citocromos *bf* de cualquier sistema. Por lo mismo, la adición de lípidos o el uso de bajas concentraciones de detergente fue esencial para la obtención de cristales del complejo de citocromos *bf* de la cianobacteria *Mastigocladus laminosus* (Zhang y col., 2003) y del alga *C. reinhardtii* (Stroebel y col., 2003).

Determinación de la estructura primaria de los cDNAs de los genes *pet A* y *petD* del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*.

En *E. gracilis*, un número indeterminado de RNA mensajeros citoplásmicos adquieren mediante *trans*-splicing en su extremo 5', secuencias líderes cortas (oligo-L) relacionadas entre sí (Tessier y col., 1991). Entre ellos se han descrito a mensajeros que codifican a polipéptidos que son importados al interior del cloroplasto, como la SSU, subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Chan y col., 1990). Se ha demostrado que el *trans*-splicing ocurre antes del *cis*-splicing del primer intrón del RNA premensajero, mientras que la poliadenilación ocurre después del *cis*-splicing del último intrón del RNA pre-mensajero (Canaday y col., 2001). Estas características de algunos RNAs mensajeros maduros de *E. gracilis* se tomaron en cuenta en este trabajo para amplificar mediante la RT-PCR los cDNAs de los genes *petA* y *petD*, que codifican a la pre-apocitocromo *f* y a la pre-subunidad IV del complejo de citocromos *bf*. Es decir, para obtener información del extremo 5' del cDNA del gene *petA*, se utilizó como sonda de amplificación a la secuencia líder corta (oligo-L) y para el extremo 3' al oligodesoxinucleótido poli-T. En el caso del cDNA del gen *petD*, los intentos realizados para amplificar su extremo 5' con el oligo-L no fructificaron, quizá porque el RNA mensajero para la subunidad IV carece de este oligo-líder en su extremo 3' tal como se ha descrito para el mensajero de la proteína nuclear fibrillarina (Russell y col., 2005). También es posible que el RNA mensajero sí

contenga dicho oligo-líder, pero con una secuencia distinta a la consenso. Sin embargo, se obtuvo la secuencia del cDNA del gene *petD* que codifica para la región madura de la subunidad IV y la secuencia completa del cDNA del gene *petA* que codifica para la preapocitocromo *f* de *E. gracilis*.

El gene *petA* de *E. gracilis* indudablemente codifica para un citocromo *f* típico, es decir, la comparación de la secuencia deducida de la apoproteína con los citocromos *f* de *C. subcaudata*, *C. vulgaris*, *B. rapa* y *P. laminosum* mostró un 52% de identidad ó más entre cada uno de ellos, sugiriendo que la proteína está altamente conservada aún en especies no relacionadas estrechamente entre sí (figura 13). Igualmente, la subunidad IV del complejo *bf* de *E. gracilis* presenta una secuencia altamente conservada con respecto a otras subunidades IV, aún con especies lejanamente relacionadas, como plantas y cianobacterias (figura 16). Además, el apocitocromo *f* de *E. gracilis* presenta un dominio de unión para el grupo hemo típico para otros citocromos *f*, $Y_1X_{(19)}CANCH_{25}$; dos dominios ricos en residuos básicos que contribuyen a la interacción con la plastocianina soluble en la region luminal de la membrana tilacoidal (residuos K_{120} a R_{127} y K_{249} a R_{251}); un dominio de anclaje a la membrana (residuos V_{313} a V_{332}); y finalmente, también se encuentran los residuos de aminoácidos involucrados en la unión por puentes de hidrógeno a una cadena de cinco moléculas de agua (figura 4). Sin embargo, el citocromo *f* de *E. gracilis* presenta características singulares que lo diferencian de otros citocromos *f*. El citocromo tiene una inserción única de 62 residuos que lo hace más grande que los demás citocromos *f*. Ésta inserción no presenta similitud con ninguna de las proteínas en los bancos de datos. Cuando se modeló al citocromo *f* de *E. gracilis* sobre la imagen cristalina del citocromo *f* de *C. reinhardtii*, la inserción de 62 residuos de aminoácidos, en el primero, se encontró que está muy alejado del dominio rico en residuos de lisina (ver figura 4 y figura 17), por lo que es muy improbable que afecte el sitio de interacción con la plastocianina y como se mencionó anteriormente, la inserción es de carácter hidrofóbico, lo cual la haría ser resguardado del ambiente hidrofílico del lumen tilacoidal con el resto de la estructura, por lo que probablemente su papel es

meramente estructural. Además, el pre-apocitocromo *f* presenta un péptido de tránsito de naturaleza tripartita que lo dirige al cloroplasto y que lo capacita para

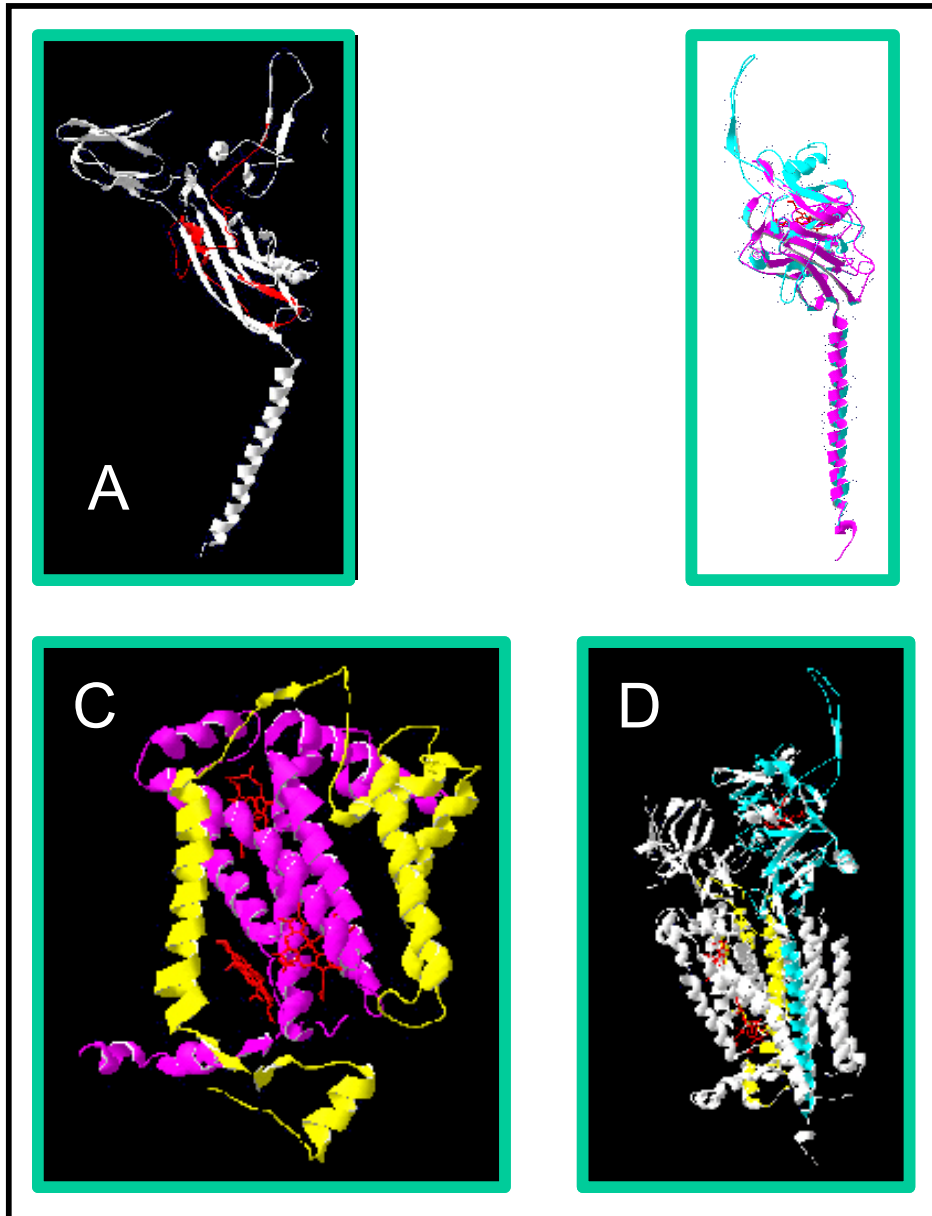


Figura 17. La subunidad IV y el citocromo *f* de *Euglena gracilis* modelados con base en la estructura cristalina del complejo de citocromos de *Chlamydomonas reinhardtii*. Panel A, citocromo *f* de *E. gracilis*, en rojo la inserción de 62 residuos de aminoácidos, la flecha indica el probable dominio de residuos de lisina. Panel B, citocromos *f* de *E. gracilis* en azul y de *C. reinhardtii* en rosa. Panel C, subunidades IV de *E. gracilis* en amarillo y de *C. reinhardtii* en rosa. Panel D, complejo de citocromos *b₆f* de *C. reinhardtii* en blanco y, respectivamente, en azul y amarillo el citocromo *f* y la subunidad IV de *E. gracilis*.

ser translocado a través de las tres membranas que rodean al cloroplasto, lo cual es típico para otras proteínas cloroplásticas cuyos genes se encuentran localizados en el núcleo de *E. gracilis* (van Dooren y col., 2001).

Los cDNAs de los genes *petA* y *petD* tienen un uso de codones nuclear y únicamente el gene *petA* tiene en su extremo 3' una posible señal de poliadenilación. En conclusión, los resultados arrojan evidencias claras de que los genes *petA* y *petD*, migraron exitosamente del cloroplasto al núcleo, de tal forma que la expresión de ambos genes se pudo comprobar detectando a sus RNAs mensajeros con pruebas específicas mediante hibridaciones tipo Northern (figura 18) así como sus productos proteicos mediante la secuenciación sus extremos amino terminales (figura 8).

Determinación de la estructura primaria de los genes *petA* y *petD*

Con el fin de obtener fragmentos de DNA que pudieran contener información acerca de la estructura primaria de los genes *petA* y *petB*, se realizaron hibridaciones tipo Southern, empleando como sondas a fragmentos derivadas de los cDNAs de los genes *petA* y *petD* y como blancos, al DNA total de *E. gracilis* cortado con diferentes enzimas de restricción. Los ensayos de hibridación se llevaron a cabo, a alta y a baja astringencia (menor y mayor concentración de sales, respectivamente, es decir a mayor concentración de sales se permite un mejor recocimiento de las secuencias complementarias) y a temperaturas que variaron de 55°C a 65°C. En todas las condiciones ensayadas se obtuvieron hibridaciones inespecíficas de un número indeterminado de productos de restricción, de tal forma que no fue posible distinguir bandas únicas que pudieran representar a los genes *petA* y *petD* (datos no mostrados) y tener la oportunidad de conocer la estructura de los genes *petA* y *petD*. En *E. gracilis* se ha documentado que la expresión de los genes nucleares es de naturaleza postranscripcional (Keller y col., 1991; Kishore y Schwartzbach, 1992) y además los genes pueden contener intrones con bordes convencionales (GT....AG), intrones con bordes no convencionales e intrones con bordes convencionales y no

convencionales, ejemplos de cada uno de ellos los podemos encontrar respectivamente en el gene de la gama tubulina y la gliceraldeido 3 fosfato deshidrogenasa (Canaday y col., 2001; Henze y col., 1995), de la 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (Tessier y col., 1992) y en los genes para la alfa tubulina, beta tubulina (Canaday y col., 2001) y fibrillarina (Russell y col., 2005). Igualmente, los tamaños de los intrones pueden variar de 43 pb a 5000 pb.

Las hibridaciones tipo Northern mostraron una sola banda al utilizar como sonda a un fragmento del cDNA del gen *petA* (figura 18). En los carriles 2 y 3 se observa, en ambos casos, una banda de 1.7 kb, usando, respectivamente, un fragmento de 201 pb de la extensión N-terminal o uno de 165 pb de la región interna de la apoproteína madura del citocromo *f*. Este resultado es consistente con los 1648 pb obtenidos para el cDNA del gen *petD* de *E. gracilis*. En el caso de la subunidad IV, las hibridaciones tipo Northern mostraron dos bandas (figura 17, carril 1), una de 0.6 kb y otra de 1.0 kb. Esta última es consistente con la secuencia parcial de 697 pb obtenida para el cDNA del gen *petD*.

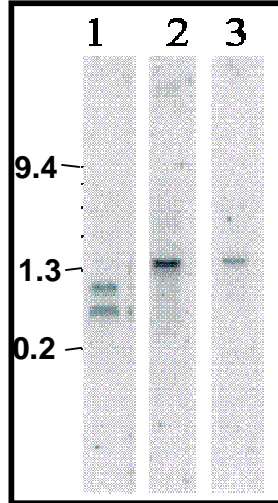


Figura 18. Hibridaciones Northern. Se fraccionaron 15 μ g de RNA total de *E. gracilis* sobre un gel desnaturizante de agarosa al 1% conteniendo 0.66% de formaldehido y transferido a una membrana de nylon. Las sondas utilizadas fueron un fragmento de 131 pb del cDNA del gen *petD* (carril1), un fragmento de 201 pb de la extensión N-terminal (carril 2) y uno de 165 pb de la región interna de la apoproteína madura del citocromo *f* (carril 3). Los marcadores están indicados en el lado izquierdo de las figuras en kb.

La presencia de dos bandas se puede deber a la degradación del mensajero de mayor tamaño, a la existencia de isoformas, o a diferentes productos generados por el procesamiento alternativo del RNA. Se concluyó que los tamaños de los RNAm de ambos genes, *petA* y *petD*, determinados mediante hibridaciones tipo Northern son consistentes con las estructuras primarias de sus cDNAs.

Importación de proteínas cloroplásticas codificadas por genes nucleares en *E. gracilis*.

A diferencia de los preapocitocromos *f* de plantas y algas, que están codificados en el genoma del cloroplasto con una extensión amino terminal de aproximadamente 35 residuos de aminoácidos (Tyagi y Herrmann, 1986), el preapocitocromo *f* de *E. gracilis* tiene una extensión amino terminal de 149 residuos, rica en aminoácidos hidroxilados, que la hace similar a otras pre-proteínas cloroplásticas de *Euglena* codificadas en el núcleo. Aunque este PTC no muestra similitud en su secuencia primaria con otros péptidos, en él se pudieron predecir tres dominios hidrofóbicos delimitados por residuos cargados. El primer dominio muestra características estructurales similares al péptido señal bacteriano. Este primer dominio puede ser reconocido co-traduccionalmente por la membrana del retículo endoplásmico y ser dirigido en vesículas membranales hacia el aparato de Golgi y finalmente ser transportada hacia el cloroplasto. Mediante el segundo dominio la proteína puede ser translocada al interior del cloroplasto, para que con la tercera señalización se dirija y ancle a la membrana tilacoidal. Además, el pre-apocitocromo *f* de *E. gracilis* contiene en su extremo C-terminal un sitio de corte Ala-X-Ala para la proteasa de procesamiento del tilacoide. En el fragmento de la presecuencia de 15 residuos que se obtuvo para la subunidad IV, no se encontró el motivo Ala-X-Ala, sin embargo, se hipotetiza que la subunidad IV deberá ser sintetizada y dirigida al cloroplasto de manera similar como sucedería para el apocitocromo *f* de *E. gracilis*.

La hipótesis del endosimbionte que explica el origen de los cloroplastos y las mitocondrias, implica que durante la evolución de estos organelos ocurrió una transferencia masiva de genes hacia el núcleo celular (Gray, 1989). Ahí los genes

adquirieron y/o modificaron la información genética necesaria para dirigir a la proteína correspondiente al organelo, salvando las barreras físicas naturales correspondientes. En el caso de la mitocondria se ha documentado que únicamente las proteínas completamente desnaturalizadas son importadas con éxito al interior del organelo (Eilers y Schatz, 1986) y éstas deben tener una determinada hidrofobicidad (Claros y col., 1995, Pérez-Martínez y col., 2000; Pérez-Martínez y col., 2001). La hidrofobicidad de un segmento de 60 a 80 residuos de aminoácidos de una cadena polipeptídica con el promedio más alto de hidrofobicidad (*meso H*), junto con la hidrofobicidad máxima de los posibles segmentos transmembranales, son útiles indicadores de que la proteína pueda ser importada al interior del organelo. Al comparar la hidrofobicidad promedio más alta del citocromo *f* de *E. gracilis*, con la de los citocromos *f* codificados en el cloroplasto, el primero mostró una reducción notable de sus niveles de hidrofobicidad con respecto a los demás. Igualmente, para la subunidad IV se observó una disminución en sus niveles de hidrofobicidad (Santillán y col., 2003). Podemos concluir que los cambios fundamentales que sufrieron los genes *petA* y *petD* al migrar del cloroplasto al núcleo fueron los siguientes: i) un cambio en el uso de codones, ii) la adquisición de una secuencia que codifica para un péptido de tránsito al cloroplasto, iii) una disminución en la hidrofobicidad promedio de las proteínas que codifican dichos genes, iv) la adquisición de señales de poliadenilación y v) en el caso del citocromo *f* la inserción de 62 residuos de aminoácidos, así como “señalizaciones” de trans-splicing y vi) quizá la adquisición de intrones en los genes de ambas subunidades. Se ha hipotetizado que estas modificaciones además de la adquisición de señales de expresión, promotores y señalizaciones de terminación, son indispensables para que dicha migración génica sea exitosa y para que los productos proteícos correspondientes puedan ser importados hasta el organelo blanco (cloroplasto ó mitocondria) e introducirse en él hasta el compartimento correspondiente (Funes y col., 2002; González-Halphen y col., 2003; Santillán-Torres y col., 2003; Daley y Whelan, 2005).

Por otra parte, en el alga *C. reinhardtii*, se ha documentado que el ensamble del complejo de citocromos *bf* ocurre de manera secuencial con la acumulación

estequiométrica de las subunidades que lo conforman (Choquet y Wollman, 2002; Wollman, 1998), es decir, para la integración de las subunidades codificadas en el genoma nuclear (proteína hierro azufre de Rieske, PetM y PetN) debe existir una pre-estructura del complejo *bf* con las subunidades codificadas en el genoma del cloroplasto (citocromo *f*, citocromo *b₆*, subunidad IV, PetG y Pet L). Igualmente se ha documentado que la síntesis del citocromo *b₆* y de la subunidad IV ocurre independientemente de la presencia o ausencia del resto de las subunidades del complejo, mientras que la síntesis del citocromo *f* disminuye considerablemente con respecto a la cepa silvestre en ausencia del citocromo *b₆* o de la subunidad IV. Además los estudios realizados en mutantes de *C. reinhardtii* afectadas en la región 5' no traducible del RNAm (Choquet y col., 1998) y en la región C-terminal (Choquet y col., 2003) del citocromo *f*, han proporcionado evidencias de que la síntesis del citocromo *f* está regulada mediante un proceso de autorregulación en el inicio de la traducción de su RNAm y que la autorregulación estaría dada por la interacción de la región C-terminal del citocromo *f* no ensamblado con la región 5' no traducible de su RNAm. Se ha observado que existen residuos de aminoácidos conservados en todos los citocromos *f* estudiados (en plantas, algas y cianobacterias) que participan en la formación de un dominio represor de la traducción, a saber la Gln 297 en la hélice transmembranal y la serie de residuos Lys-Gln-Phe-Glu en las posiciones 305 a 308 en la extensión estromal del citocromo *f* de *C. reinhardtii* (Choquet y col., 2003). Estos residuos los podemos encontrar en la secuencia deducida del citocromo *f* de *E. gracilis* reportada en este trabajo, en las posiciones Gln 327 en la hélice transmembranal y en los residuos Lys-Gln-Tyr-Glu en las posiciones 335 a 338 en la región estromal. Cabe resaltar que el cambio de secuencia en la posición Phe 307 en *C. reinhardtii* y Tyr 335 en *E. gracilis* es una variación frecuente, de tal suerte que el cambio es por Val en los citocromos *f* de cianobacterias (Choquet y col., 2003). Es importante recordar que el citocromo *f* de *C. reinhardtii* está codificado en el genoma del cloroplasto, mientras que el citocromo *f* de *E. gracilis* está codificado en el genoma nuclear, por lo que nos preguntamos: ¿La síntesis del citocromo *f* en *E. gracilis* está regulado bajo las mismas condiciones a como lo es para el citocromo *f* de *C.*

reinhardtii? En general, la respuesta a ésta pregunta ampliaría los conocimientos para una comprensión sólida de los procesos bioquímicos involucrados en la biogénesis de los complejos de citocromos *bf* en los diferentes sistemas: plantas, algas y cianobacterias.

Conclusiones

En este trabajo se reporta por primera vez el perfil electroforético de las subunidades que conforman al complejo de citocromos *bf* del cloroplasto de *E. gracilis*. En él se caracterizó sin ambigüedades, al obtener las secuencias N-terminales, a tres de las subunidades clásicas que se encuentran en todos los complejos *bf* hasta ahora estudiados, el citocromo *f*, la subunidad IV y el citocromo *b₆*. En el complejo *bf* de *E. gracilis* no se encontró a la proteína fierro-azufre de Rieske, que es otra subunidad clásica de los complejos *bf* presente en todos los sistemas estudiados, incluyendo a las plantas, algas y cianobacterias. Esta carencia quizá se debió a las concentraciones y al sistema de detergentes empleados durante la solubilización del complejo. El complejo *bf* analizado de *E. gracilis* mostró dos subunidades que no muestra similitud con ninguna de las subunidades de los complejos *bf* reportados. Estas dos subunidades podrían ser simples contaminantes del complejo *bf* analizado o también podrían ser dos componentes nuevos, propios de *Euglena*, que por primera vez fueron identificados. Igualmente, en este trabajo se reporta la secuencia de los cDNAs de los genes de la subunidad IV (*petD*) y del citocromo *f* (*petA*). El cDNA del gene del citocromo *f* fue posible amplificarlo mediante la PCR utilizando el Oligo-Líder (Oligo-L), una secuencia corta que adquieren mediante trans-splicing un número indeterminado de mensajeros codificados en el núcleo de *E. gracilis* y cuyas proteínas correspondientes son distribuidas a los diferentes compartimentos celulares, entre los que se encuentra el cloroplasto. Además, ambos genes secuenciados mostraron tener un uso de codones nuclear. Por otra parte, la secuencia deducida del apocitocromo *f* mostró características singulares con respecto a las conocidas con anterioridad, estas son: primero, presenta una inserción única de 62 residuos que no se encuentra en otros citocromos *f*; y segundo, presenta un péptido de tránsito al cloroplasto de naturaleza tripartita, que es típico para otras proteínas cloroplásticas que están codificadas en el núcleo. El PTC las capacita para ser transportadas a través de las tres membranas que rodean al cloroplasto de *E. gracilis*. Los resultados anteriores arrojan evidencias convincentes de que, durante la historia evolutiva del cloroplasto de *E. gracilis*, los

genes *petA* y *petD* migraron del organelo al núcleo. Esta es la primera vez que se describen a genes *petA* y *petD* localizados en el núcleo. Aunque los genes *petA* y *petD* se encuentran tradicionalmente en el genoma del cloroplasto, con el presente trabajo hemos demostrado que, en algunos organismos como en el protista *E. gracilis*, estos genes han sido capaces de relocalizarse en el núcleo de una manera funcional.

Perspectivas

Sabemos que los complejos de citocromos *bf* en plantas y algas están constituidos por 8 subunidades proteicas y cuyos genes se pueden encontrar en el genoma nuclear ó en el genoma del cloroplasto. En el caso del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis* únicamente dos de las subunidades (citocromo *b₆* y PetG) están codificadas por genes cloroplásticos (*petB* y *petG*). Por tal motivo en el presente trabajo tratamos de contestar a la pregunta: ¿En *E. gracilis* existe un arreglo de citocromos *bf* semejante a los previamente descritos para otros sistemas? A la que ahora podemos contestar de forma afirmativa, con base en las evidencias mostradas con 1) el perfil proteico obtenido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de una fracción enriquecida de dicho complejo, 2) mediante la secuenciación de los extremos amino terminales de éstas subunidades proteicas, con lo que se demostró la presencia de subunidades características para otros complejos *bf*, como son el citocromo *f*, el citocromo *b₆* y la subunidad IV y 3) con la estructura primaria de los cDNAs de los genes *petA* y *petD* que respectivamente codifican para la apocitocromo *f* y la subunidad IV y cuyas características sugieren, sin lugar a dudas, que ambos genes se encuentran en el genoma nuclear, a diferencia de que en plantas y algas, ambos genes se encuentran en el genoma del cloroplasto. Sin embargo, falta por aclarar si dos de las subunidades que aparecen en el perfil proteico de la fracción enriquecida del complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*, son parte ó no de éste complejo. Igualmente, falta por caracterizar a la proteína hierro azufre de Rieske en el complejo de citocromos *bf* de *E. gracilis*. La proteína hierro azufre de Rieske es una subunidad característica e indispensable para la actividad normal de los complejos *bf* durante el transporte de electrones en la fotosíntesis, por lo que no dudamos que ésta subunidad también forma parte del complejo de citocromos *bf* en *E. gracilis*, por lo que su caracterización es importante en dicho complejo. Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo brindan la oportunidad de ampliar los conocimientos para una mejor comprensión de los procesos bioquímicos involucrados en la biogénesis de los complejos *bf* en los diferentes sistemas: plantas algas y cianobacterias.

Referencias

1. Aldrich, J., and Cullis, A. (1993). RAPD analysis in Flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq1 DNA Polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:128-141.
2. Alric, J., Pierre, Y., Picot, D., Lavergne, J., and Rappaport, F. (2005). Spectral and redox characterization of the heme c_i of the cytochrome b_6f complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:15860-15865.
3. Atteia, A., de Vitry, C., Pierre, Y., Popot, J.-L. (1992). Identification of mitochondrial proteins in membrane preparations from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 267:226-234. Breyton, C. (2000). The cytochrome bf complex: structural studies and comparison with the bc_1 complex. *Biochem. Biophys. Acta.* 1459:467-474.
4. Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J. P., and Popot, J. L. (1997). Dimer to monomer conversion of the cytochrome b_6f complex. Causes and consequences. *J. Biol. Chem.* 272:21892-21900.
5. Buschlen, S., Choquet, Y., Kuras, R., and Wollman, F. A. (1991). Nucleotide sequences of the continuous and separated *petA*, *petB* and *petD* chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS.* 284: 257-262.
6. Canaday, J., Tessier, L. H., Imbault, P., and Paulua, F. (2001). Analysis of *Euglena gracilis*- β - and γ -tubulin genes: introns and pre-mRNA maturation. *Mol. Genet. Genomics.* 265:153-160.
7. Carrel, C. J., Schlarb, B. G., Bendall, D. S., Howe, C. J., Cramer, W. A., and Smith, J. L. (1999). Structure of the cytochrome f soluble domain from *Phormidium laminosus*: Convergent evolution of the membrane-bound c-type cytochromes from respiratory and photosynthetic bc complexes. *Biochemistry.* 38:9590-9599.
8. Carrel, C. J., Zhang, H., Cramer, W. A., and Smith, J. L. (1997). Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure.* 5:1613-1625.
9. Cavalier-Smith, T. (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos. Trans.R. Soc. Lond. B. Biol..Sci.* 358: 109-133.
10. Chan, R. L., Keller, M., Canaday, J., Weil, J. H., and Imbault, P. (1990). Eight small subunits of *Euglena* ribulose 1-5 bisphosphate carboxylase/oxygenase are translated from a large mRNA as a polyprotein. *EMBO J.* 9:333-338.
11. Chi, Y. I., Huang, L. S., Zhang, Z., Fernández-Velasco, J. G., and Berry, E. A. (2000). X-ray structure of a truncated form of cytochrome f from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem.* 39:7689-7701.
12. Choquet Y., Stern D. B., Wostrikoff K., Kuras R., Girard-Bascou J., and Wollman F. A. (1998). Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4380-4385.
13. Choquet Y., and Wollman F.A. (2002). Translational regulation as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Letters.* 529:39-42.
14. Choquet Y., Zito F., Wostrikoff K., and Wollman F.A. (2003). Cytochrome f translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell.* 15: 1443-1454.
15. Claros, M.G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J. L., and Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The

- case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* 228:762-771.
16. Cramer, W. A., Martinez, S. E., Huang, D., Huang, G. S., Tae, G. S., Everly, R.M., Heymann, J. B., Cheng, R. H., Baker, T. S., and Smith, J. L., (1994). Structural aspects of the cytochrome *bf* complex; structure of the lumen-side domain of cytochrome *f*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:31-47.
 17. Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E., Smith, J. L. (1996). Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome *bf* complex of oxygenic photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:477-508.
 18. Cramer, W. A., Yan, J., Zhang, H., Kurisu, G., and Smith, J. L. (2005). Structure of the cytochrome *b₆f* complex: new prosthetic groups, Q-space, and the "hors d'oeuvres hypothesis" for assembly of the complex. *Photosynthesis Research.* 85:133-144.
 19. Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Smith, J. L. (2004). Evolution of photosynthesis: Time-independent structure of the cytochrome *b₆f* complex. *Biochemistry.* 43:5921-5929.
 20. Daley D.O., and Whelan J. (2005). Why genes persist in organelle genomes. *Genome Biology.* 6:110-115.
 21. de Vitry, C., Desbois, A., Redeker, V., Zito, F., Wollman, F. A. (2004). Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome *b₆*. *Biochemistry.* 43:3956-3968.
 22. Doyle, M. P., Li, L. B., Yu, L., Yu, C. A. (1989). Identification of a Mr=17,000 protein as the plastoquinone-binding protein in the cytochrome *b₆-f* complex from spinach chloroplast. *J. Biol. Chem.* 264:1387-1392.
 23. Eilers, M., and Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature.* 322:228-232.
 24. Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999). Chloro P, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8:978-984.
 25. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300:1005-1016.
 26. Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallon S., Herion P., King, M. P., González-Halphen, D. (2002a). A green algal apicoplast ancestor. *Science.* 298:2155.
 27. Funes, S., Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acebedo, M., Van Lis, R., Reyes-Prieto, A., Santillán-Torres, J. L., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P., and González-Halphen, D. (2002b). Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: perspectives for the allotopic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies. In : *Recent Research Developments in Human Mitochondrial Myopathies.* J. J. Garcia Trejo Ed. ISBN: 81-7736-139-2. Signpost. Research 37/661(2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India
 28. Gibbs, S. P. (1978). The chloroplast of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* 56:2883-2889.
 29. González-Halphen, D., Pérez-Martínez, X., Funes, S., Reyes-Prieto, A., y Santillán-Torres, J. L. (2003). La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. *Mensaje Bioquímico.* XXVII:201-220.
 30. Gray, M. W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genetics.* 5:294-299
 31. Hallick, R. B., Hong, L., Drayer, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B.,

- Spielmann, A., and Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* 21:3537-3544.
32. Hannaert, V., Saavedra, E., Duffieux, F., Szikora, J. P., Rigden, D. J., Michels, P. A. M., and Opperdoes, F. R. (2003). Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Plant PNAS.* 100:1067-1071.
 33. Hauska, G., Nitschke, W., and Herrmann, R. G. (1988). Amino acid identities in the three redox center-carrying polypeptides of cytochrome *bc1/bf* complexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20:211-228.
 34. Henze, K., Badr, A., Wettern, M., Cerff, R., and Martin, W. (1995). A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9122-9126.
 35. Houlne, G., and Schantz, R. (1987). Molecular analysis of the transcripts encoding the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein in *Euglena gracilis*: unusual size of the mRNA. *Curr. Genet.* 12:611-616.
 36. Howe G., and Merchant S. (1993). Maturation of thylakoid lumen proteins proceeds post-translationally through an intermediate in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:*90-1862-1866.
 37. Huang, D., Everly, R. M., Cheng, R. H., Heymann, J. B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T. S., and Cramer, W. A. (1994). Characterization of the chloroplast cytochrome *bf* complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry.* 33:4401-4409.
 38. Hunte, C., Koepke, J., Lange C., Roßmanith, T., and Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc₁* complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure.*8:669-684.
 39. Hurt, E., and Hauska, G. (1981). A cytochrome *f/b6* complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 177:591-599.
 40. Inagaki, J., Fujita, Y., Hase, T., and Yamamoto, Y. (2000). Protein translocation within chloroplast is similar in *Euglena* and higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277:436-442.
 41. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96:23-28.
 42. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11 subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc₁* complex. *Science.* 281:64-71.
 43. Kahlau, S., Aspinall, S., Gray, J. C., and Bock, R. (2006). Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *J. Mol. Evol.* 63:194-207.
 44. Keller, M., Chan R.L., Tessier L. H., Weil J.H., and Imbault P. (1991). Post transcriptional regulation by light of the biosynthesis of *Euglena* ribulose 1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit. *Plant Mol. Biol.* 17:73-82.
 45. Kim, J. S., Jung, J. D., Lee, J. A., Park, H. W., Oh, K. H., Jeong, W. J., Choi, D. W., Liu, J. R., and Choi, K. Y. (2006). Complete sequence and organization of the cucumber (*Cucumis L. cv. Baekmibaekdadagi*) chloroplast genome. *Plant Cell Rep.* 25:334-340.
 46. Kishore, R., Muchhal, U. S., Schwartzbach, S. D. (1993). The presequence of *Euglena* LHCP II, a cytoplasmically synthesized chloroplast protein, contains a functional endoplasmic reticulum-targeting domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:11845-11849.
 47. Kishore, R., and Schwartzbach, S. D. (1992). Translational control of the synthesis of the *Euglena* light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein of photosystem II.

- Plant Sci. 85:79-89.
48. Kitaoka, S., Nakano, N., Miyatake, K., and Yokota, A. (1989). Chapter 1. Enzymes and their functional location. En: *The Biology of Euglena*, Edited by Dennis E. Buetow. Vol. IV. Subcellular Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press, Inc.
 49. Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Crofts, A. R. (1998). Steps toward constructing a cytochrome *b₆f* complex in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*: An example of the structural plasticity of a membrane cytochrome. *Biochemistry*. 37:16280-16288.
 50. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003). Structure of the cytochrome *bf* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*. 302:1009-1014.
 51. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the heat of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
 52. Li, L. B., Zou, Y. P., Yu, L., and Yu, C. A. (1991). The catalytic role of subunit IV of the cytochrome *b₆-f* complex from spinach chloroplast. *Bioch. Biophys. Acta*. 1057:215-222.
 53. Manning, J. E., Wolstenholme, D. R., Ryan, R. S., Hunter, J. A., and Richards, O. C. (1971). Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 68:1169-1173.
 54. Margulis, L. (1970). *The origin of Eucaryotic cells*. Yale University Press. New Haven, USA.
 55. Martinez, S. E., Huang, D., Szczepaniak, A., Cramer, W. A., and Smith, J. L. (1994). Crystal structure of chloroplast cytochrome *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure*. 2:95-105.
 56. Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E., (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87:206-210.
 57. Malkin, R. (1992). Cytochrome *bc₁* and *bf* complexes of photosynthetic membranes. *Photosynth. Res*. 33:121-136.
 58. May, T., and Soll, J. (1999). Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS. Letters*: 452:52-56.
 59. Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature*. 191:144-148.
 60. Moreira, D., Guyader, H. L., and Philippe, H. (2000). The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature*. 405:69-72.
 61. Moreno-Sánchez, R., and Raya, J. C. (1987). Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci*. 48:151-157.
 62. Mukai, K., Yoshida, M., Toyosaki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S., and Matsubara, H. (1989a). An atypical heme-binding structure of cytochrome *c₁* of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *Eur. J. Biochem*. 178:649-656.
 63. Mukai, K., Wakabayashi, S., and Matsubara, H. (1989b). Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding *Euglena gracilis* cytochrome *c₁*. *J. Biochem*. 106:479-482.
 64. Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350.
 65. Nielsen, H., Engelbrech, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*. 10:1-6.
 66. Palmer, J. D. (2003). The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and whodunit. *J. Phycol*. 39: 4-11.

67. Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acebedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P., González-Halphen, D. (2000). Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome *c* oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae. *J. Biol. Chem.* 275:30144-30152.
68. Pérez-Martínez, X., Antaramian A., Vázquez-Acebedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer J., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P., González-Halphen, D. (2001). Subunit II of cytochrome *c* oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J. Biol. Chem.* 276:11302-11309.
69. Pettigrew, G. W. (1974). The purification and amino acid sequence of cytochrome *c*-552 from *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 139: 449-459.
70. Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D., and Popot, J. L., (1995). Purification and characterization of the cytochrome *bf* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 270:29342-29349.
71. Russell A.G., Watanabe Y., Charette J. M., and Gray M. W. (2005). Unusual features of fibrillarin cDNA and gene structure in *Euglena gracilis*: evolutionary conservation of core proteins and structural predictions for methylation-guide box C/D snoRNPs throughout the domain Eucarya. *Nucleic Acids Research.* 9:2781-2791.
72. Sainz, G., Carrel, C. J., Ponamarev, M. V., Soriano, G. M., Cramer, W. A., and Smith, J. L. (2000). Interruption of the internal water chain of cytochrome *f* impairs photosynthetic function. *Biochemistry.* 39:9164-9173.
73. Santillán-Torres, J. L., Atteia, A., Claros, M. G., and González-Halphen, D. (2003). Cytochrome *f* and subunit IV, two essential components of the photosynthetic *bf* complex typically encoded in the chloroplast genome, are nucleus-encoded in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1604:180-189.
74. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
75. Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199:223-231.
76. Sharif, A. L., Smith, A. G., Abell, C. (1989). Isolation and characterisation of a cDNA clone for a chlorophyll synthesis enzyme from *Euglena gracilis*. The chloroplast enzyme hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is synthesized with a very long transit peptide in *Euglena*. *Eur. J. Biochem.* 184:353-359.
77. Sláviková, S., Vacula, R., Fang, Z., Ehara, T., Osafune, T., and Schwartzbach, S. D. (2005). Homologous and heterologous reconstitution of golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplast of *Euglena*. *J. Cell Sci.* 118:1651-1661.
78. Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K., and Weisbeek, P. (1986). The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell.* 46:365-375.
79. Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., and Russo, V. E. A. (1990). Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newslett.* 37:41-43.
80. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (2003). An atypical haem in the cytochrome *bf* complex. *Nature.* 426:413-418.
81. Sulli, C., Fang, Z. W., Muchhal, U., and Schwartzbach, S. D. (1999). Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to golgi to

- chloroplast transport vesicles. *J. Biol. Chem.* 274:457-463.
82. Tessier, L. H., Keller M., Chan, R. L., Fournier, R., Weil, J. H., and Imbault P.(1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to premature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10:2621-2625.
 83. Tessier, L. H., Chan, R. L., Keller M., Weil, J. H., and Imbault P.(1992). The *Euglena gracilis* rbcS gene contains introns with unusual borders. *FEBS.* 304:252-255.
 84. Tessier, L. H., van der Speck, H., Gualberto, J. M., and Grienenberg, J. M. (1997). The *cox 1* gene from *Euglena gracilis*: a protist mitochondrial gene without introns and genetic code modifications. *Curr. Genet.* 31:208-213.
 85. Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W. (1976). An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75:168-176.
 86. Tyagi, A. K., and Herrmann, R. G. (1986). Location and nucleotide sequence of the pre-apocytochrome *f* gene on the *Oenothera hookeri* plastid chromosome (Euoenothera plastome I). *Curr. Genet.* 10:481-486.
 87. Van Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T., and McFadden, G. I. (2001). Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1541:34-53.
 88. von Heijne, G., Stepphuhu, J., and Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.
 89. Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., and McFadden, G.I. (1998). Nuclear- encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12352-12357.
 90. Whitelegge, J. P., Zhang, H., Aguilera, R., Taylor, R. M., and Cramer, W. A. (2002). Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS+) of an oligomeric membrane protein. Cytochrome *bf* complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Mol. Cell. Proteomics* 1:816-827.
 91. Widger, W. R., Cramer, W. A., Herrmann R. G., and Trebst, A. (1984). Sequence homology and structural similarity between cytochrome *b* of mitochondrial complex III and the chloroplast *b6-f* complex: position of the cytochrome *b* hemes in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:674-678.
 92. Wollman F. A. (1998). The structure, function and biogenesis of cytochrome *b₆f* complexes. In "The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas. Eds. Rochaix J. D., Goldschmidt-Clermont M., and Merchant S. Kluwer Academic Publisher, Netherlands. p: 459-476.
 93. Wynn, R. M., Bertsch, J., Bruce, B. D., and Malkin, R. (1988). Green algal cytochrome *bf* complexes: isolation and characterization from *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 935:115-122.
 94. Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome *bc₁* complex from bovine Herat mitochondria. *Science.* 277:60-66.
 95. Yasuhira, S. and Simpson, L. (1997). Phylogenetic affinity of *Euglena gracilis* and kinetoplastids using cytochrome oxidase I and hsp60. *J. Mol. Evol.* 44:341-347.
 96. Yu, J., Hederstedt, L., and Piggot, P. J. (1995). The cytochrome *bc* complex (menaquinone:cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. *J. Bacteriology.* 177:6751-6760.
 97. Zhang, H., Primak, A., Cape, J., Bowman, M. K., Kramer, D. M., and Cramer, W. A.

- (2004). Characterization of the high-spin heme-x in the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis. *Biochemistry*. 43:16329-16336.
98. Zhang, H., Kurisu, G., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003). A defined protein-detergent-lipid complex for crystallization of integral membrane proteins: The cytochrome bf complex of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:5160-5163.
99. Zhang, H., Whitelegge, J. P., and Cramer, W. A. (2001). Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome bf complex. *J. Biol. Chem.* 276:38159-3816
100. Zhang, Z. L., Huang, L. S., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S.-H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 . *Nature*. 392:677-684.
101. Zito, F., Vinh, J., Popot, J. L., and Finazzi, G. (2002). Chimeric fusions of subunit IV and PetL in the b_6f complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 277:12446-12455.