



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Análisis de la interacción entre las subunidades
COX2A y COX2B de la citocromo *c* oxidasa
de *Toxoplasma gondii*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MVZ. VALENTÍN DE LA CRUZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

MÉXICO, D.F

OCTUBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio 324-N del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen.

Durante la realización de este trabajo recibí el apoyo de una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 194077.

Este trabajo fue apoyado por el del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No. 56619, y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del donativo IN217108.

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

Agradezco a los miembros del comité tutorial, a la Dra. Adela Rodríguez Romero, al Dr. Georges Dreyfus Cortés y al Dr. Diego González Halphen. Por sus críticas, sugerencias e instrucción para este trabajo.

A los miembros del jurado de examen, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. Diego González Halphen, Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos y Dra. Adela Rodríguez Romero. Les agradezco por el tiempo que dedicaron a la lectura de este trabajo y por sus comentarios y sugerencias.

Agradezco también al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a México, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a mis Padres Carlos e Isabel, a mis queridos hermanos y a toda la familia Torres.

Agradezco de manera especial al Dr. Diego González Halphen por permitirme conocer y acercarme al mundo de las mitocondrias. Por su apoyo, su instrucción y sus conocimientos.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y la amistad que me brindan: Miriam, Araceli, Adelma, Lorena, Alexa, Elizabeth, Alejandra, Francisco, Alain, Héctor, Luis y Sergio. Y al señor Alfredo por su apoyo y ayuda en el laboratorio.

CONTENIDO

RESUMEN

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. El parásito *Toxoplasma gondii*
2. El ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*
3. La mitocondria
4. La cadena respiratoria mitocondrial
5. La citocromo c oxidasa
6. La subunidad 2 de la citocromo c oxidasa
7. Consideraciones evolutivas de COX2 de algas y apicomplejos
8. La subunidad COX2 de algas y apicomplejos
9. La subunidad COX2 de *Toxoplasma gondii*
10. Maquinaria de importación mitocondrial

ANTECEDENTES

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA

- 1-Amplificación de genes
- 2- Ligación de los genes amplificados
- 3-Transformación de bacterias
- 4-Sobreexpresión de proteínas
- 5-Transferencia de proteínas por la técnica de réplica tipo western en cámara semihúmeda
- 6-Producción del anticuerpo anti-COX2B de *T. gondii*
- 7-Solubilización de la proteína COX2B para ensayos de interacción
- 8-Purificación de las proteínas GST y GST-COX2A para ensayos de interacción
- 9-Ensayos de interacción

RESULTADOS

Análisis *in silico* de los genes y proteínas COX2A Y COX2B

- 1-Presencia de los genes COX2A y COX2B en apicomplejos algas y dinoflagelados
- 2-Secuencias de las subunidades COX2A y COX2B de apicomplejos y algas
- 3-Extensión de la subunidad COX2B de apicomplejos y algas
- 4-Interacción entre las subunidades COX2A y COX2B de *Toxoplasma gondii*
- 5-Presecuencias mitocondriales en apicomplejos

Producción del anticuerpo anti-COX2B de *Toxoplasma gondii*

- 6-Sobreexpresión de COX2B de *Toxoplasma gondii*
- 6.1-Obtención de la proteína COX2B recombinante de *Toxoplasma gondii* en condiciones solubles
- 6.2-Obtención de la secuencia de la proteína COX2B recombinante de *T. gondii* por espectrometría de masas
- 7-Obtención de COX2A recombinante de *Toxoplasma gondii*

7.1-Sobreexpresión y purificación de GST

8- Interacción de COX2B con COX2A

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICE

Artículo publicado:

The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*

RESUMEN

Se sabe que el gen *cox2* de las algas clorofíceas *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* se encuentra fragmentado en dos partes a las cuales se les denominó *cox2a* y *cox2b*. Además se encontró una secuencia en el extremo N-terminal de COX2A la cual probablemente funcione como presecuencia mitocondrial para internalizar a la COX2A hacia la matriz, también se encontró una extensión atípica en su extremo C-terminal y otra extensión atípica en el extremo N-terminal de COX2B. Se propuso que las extensiones en estas proteínas de las algas, estabilizan a ambas subunidades formando un heterodímero, para integrarse al complejo enzimático de la citocromo *c* oxidasa como una subunidad semejante a la subunidad COX2 típica.

La subunidad COX2A forma la parte hidrofóbica con dos cruces transmembranales que se insertan en la membrana interna mitocondrial y COX2B la parte soluble que contiene dos átomos de cobre de importancia para recibir los electrones provenientes del citocromo *c* soluble de la cadena respiratoria.

Posteriormente se observó que el gen *cox2* fragmentado también se encontraba en apicomplejos como *Toxoplasma gondii* (causante de la toxoplasmosis) y *Plasmodium falciparum* (causante de la malaria), y que también contaban con las extensiones identificadas en algas clorofíceas, lo cual tiene consideraciones evolutivas y de interés en salud pública dado el carácter de estos parásitos patógenos.

Revisando las bases de datos como el NCBI se siguen encontrando más secuencias de genes *cox2* fragmentados de otras algas de este mismo género, así como de otros apicomplejos y de dinoflagelados. Esto apoya la propuesta de que estos genes fragmentados migraron del genoma ancestral de un alga verde al genoma de un ancestro apicomplejo.

Actualmente hay evidencia bioquímica de la presencia heterodimérica de COX2A y COX2B en algas y en *T. gondii*. Sin embargo, aun no se ha analizado el papel que juegan dichas extensiones. En el presente trabajo abordamos el aspecto funcional de las extensiones a partir de estudios realizados con proteínas recombinantes de COX2A y COX2B de *Toxoplasma gondii*, lo cual nos permite analizar si las extensiones son o no necesarias para la interacción entre dichas subunidades.

ABREVIATURAS

COX2	subunidad dos de la citocromo c oxidasa
COX2A	subunidad dos A de la citocromo c oxidasa
COX2B	subunidad dos B de la citocromo c oxidasa
anti-COX2B	anticuerpo contra COX2B
anti-GST	anticuerpo contra GST
GST	glutati3n s transferasa
NCBI	del ingl3s National Center for Biotechnology Information (centro nacional para informaci3n biot3cnica)
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactopiranosido
EDTA	3cido etileno diamino tetrac3tico
MOPS	3cido 3-n-morfolino-propanosulf3nico
BCIP	sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
NBT	cloruro nitro-azul de tetrazolio
DMF	dimetilformamida
SDS	dodecilsulfato s3dico
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
TEMED	tetrametil etilendiamino
PBS	del ingl3s Phosphate Buffered Saline (amortoguardor de fosfatos salino)
TBS	del ingl3s Tris Buffered Saline (amortoguardor de Tris salino)
TTBS	del ingl3s Tris Tween Buffered Saline (amortoguardor de Tris Tween salino)

INTRODUCCIÓN

1. El parásito *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que pertenece al *phylum* de los apicomplejos. Este parásito produce abortos en mujeres embarazadas y daño en personas inmunosuprimidas (Black y Boothroyd, 2000). También afecta diversas especies animales. El gato juega un papel importante en la transmisión del parásito al humano. El parásito se transmite por vía transplacentaria y por consumo de carne y agua contaminada. Otras especies representativas de los apicomplejos incluyen al parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum* que afecta a individuos inmunosuprimidos, *Eimeria tenella* provoca coccidiosis en aves de corral, *Babesia sp.* causa la babesiosis y *Theileria parva* produce fiebre de la Costa Este en ganado.

2. El Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii*

Su ciclo se divide en dos partes; uno es el ciclo sexual exclusivo de los felinos y otro asexual que se lleva a cabo en diversas especies como bovinos, ovinos, caprinos, aves y humanos. El ciclo asexual consiste de dos estados de crecimiento dependiendo de la fase de infección, si es crónica o aguda. La fase aguda de la toxoplasmosis se define por la presencia de taquizoitos, una forma de rápido de crecimiento. La fase crónica se define por la presencia de bradizoitos formando quistes en el tejido. Los quistes se encuentran principalmente en sistema nervioso central y en tejido muscular. Al ingerir quistes por alimentos contaminados estos se rompen y liberan bradizoitos en el aparato digestivo, infectando el epitelio intestinal y diferenciándose al estado de taquizoito completando así el ciclo asexual (Black y Boothroyd, 2000). El ciclo sexual de *T. gondii* ocurre solo en el epitelio intestinal de felinos, produciendo esporozoitos dentro de oquistes en las heces. (Dzierszinski y col., 2004).

Hay tres estados infectivos de *T. gondii* : el de taquizoito (forma libre del parásito) y el de bradizoito (quiste tisular) dentro de lo que es el ciclo asexual. Y dentro del ciclo sexual el tercer estado infectivo, es el de esporozoito (en ooquistes). Los taquizoitos tienen un tamaño de 2µm x 6µm. Una vez que el parásito invade a la célula inicia la formación de una vacuola parasitófora que lo protege de los mecanismos de defensa de la célula. Los taquizoitos se multiplican asexualmente por división binaria repetidas veces hasta que se rompe la célula. Después de varias divisiones, los taquizoitos pasan al estado de bradizoito en forma de quistes tisulares. Estos quistes en el tejido permanecen dentro de la célula, su tamaño varía entre 5 a 70 µm y contienen varios cientos de bradizoitos. Los quistes se desarrollan en pulmones, hígado, riñones, cerebro, ojo, músculo esquelético y cardiaco principalmente. Tras la ingestión de quistes tisulares por el gato, la pared celular del quiste es degradada por enzimas proteolíticas del estómago e intestino delgado del gato liberando los bradizoitos. Algunos bradizoitos penetran hacia la lámina propia del intestino delgado y se multiplican como taquizoitos. *T. gondii* puede permanecer en el intestino y otros tejidos por meses incluso toda la vida. Los

ooquistes solo se encuentran en gatos domésticos y felinos silvestres, y pueden encontrarse en este estado después de la ingestión de taquizoitos, bradizoitos o esporozoitos. Tanto el gato como los hospederos pueden adquirir el parásito a través de tejido de animales infectados o comida y agua contaminados con ooquistes esporulados o por transmisión transplacentaria. Después de la ingestión los bradizoitos se liberan ya sea de quistes de tejido o esporozoitos de ooquistes penetrando al tejido intestinal, transformándose a taquizoitos, multiplicándose localmente, y diseminándose en el cuerpo por vía sanguínea. Después de varios ciclos de multiplicación los taquizoitos se transforman en bradizoitos en diversos tejidos. La infección durante el embarazo puede infectar al feto, por lo tanto la toxoplasmosis congénita en humanos, ovinos, y caprinos puede matar al feto (Dubey 2004). En la figura 1 se muestra un esquema del ciclo de *T. gondii*.

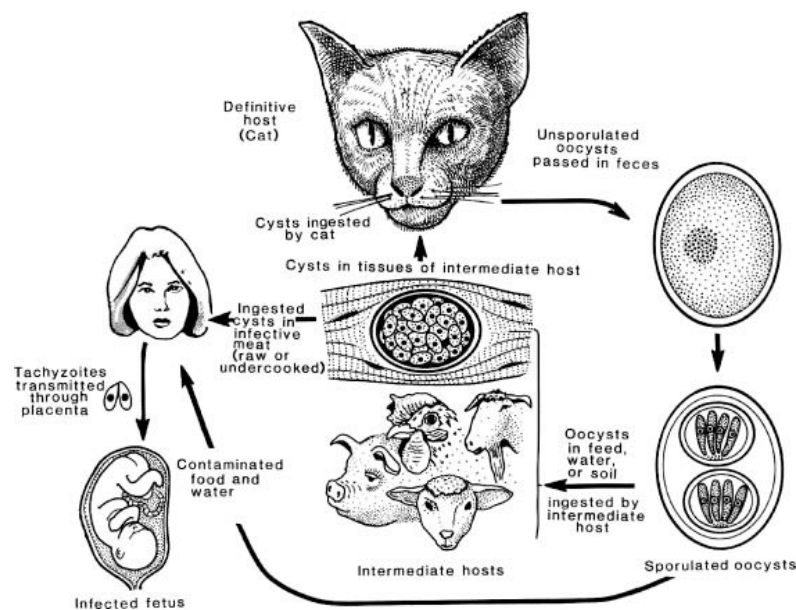


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Tomado de Dubey 2004)

3. La Mitocondria

La mitocondria cuenta con dos membranas, la membrana externa y la membrana interna donde residen los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Cuenta con dos espacios, el espacio intermembranal y una matriz mitocondrial donde se encuentran las enzimas para el ciclo de Krebs, la β -oxidación, la oxidación de aminoácidos, y también el DNA (del inglés deoxyribonucleic acid que significa ácido desoxirribonucleico) mitocondrial y los ribosomas (Frey y Mannella 2000) (Figura 2).

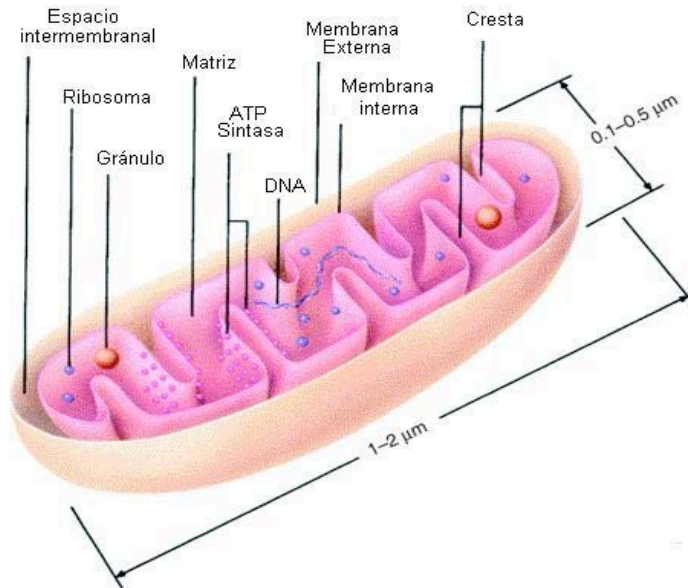


Figura 2. Estructura de la mitocondria donde se pueden ver las dos membranas y los dos espacios. (Tomado y modificado de Frey y Mannella 2000).

La mitocondria tiene su propio genoma y su propia maquinaria para sintetizar proteínas. Sin embargo la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas en el genoma nuclear, se sintetizan en el citosol y son importadas a la mitocondria. La función de la mitocondria es la síntesis de ATP (del inglés adenosine-5'-triphosphate) a partir del gradiente de protones formado en la cadena respiratoria. La mitocondria está involucrada en otros procesos, además de los ya mencionados como la biosíntesis de aminoácidos, vitaminas, cofactores, ácidos grasos, y grupos hierro-azufre. También esta involucrada en la muerte celular programada (Logan 2006).

De manera general en la mayoría de los organismos la producción de ATP en la mitocondria se lleva a cabo por la ATP sintetasa (Complejo V) y por cuatro complejos oxidoreductores: la NADH deshidrogenasa (Complejo I), la succinato deshidrogenasa (Complejo II), la citocromo *c* reductasa (Complejo III), y la citocromo *c* oxidasa (Complejo IV). Estos complejos embebidos en la membrana interna mitocondrial transfieren los electrones desde sustratos reductores hasta el oxígeno. Del complejo I se transfieren los electrones provenientes del NADH a la ubiquinona, una molécula lipofílica que difunde por la membrana interna mitocondrial. El complejo II transfiere los electrones provenientes del succinato a la ubiquinona. El complejo III transfiere los electrones desde el ubiquinol al citocromo *c* que es una pequeña proteína soluble que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. Finalmente el complejo IV capta a los electrones provenientes del citocromo *c* soluble y los utiliza en una reacción donde reduce el oxígeno molecular a agua. Solo tres de los cuatro complejos acoplan el transporte de electrones a la translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, generando así un gradiente de protones usado por el complejo V para la producción de ATP (Boekema y Braun 2007).

4. La Cadena Respiratoria Mitocondrial

La NADH ubiquinona: oxido-reductasa o complejo I, también llamado NADH deshidrogenasa, es la primera enzima de la cadena respiratoria en mitocondria y bacterias. Esta enzima cataliza la transferencia de dos electrones del nicotín adenin dinucleótido reducido (NADH) a la quinona, acoplado a la translocación de cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial, contribuyendo a la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP. La enzima contiene 45 subunidades en la mitocondria de vertebrados. En células procariotas esta enzima se constituye de 13 a 15 subunidades. Homólogos de todas las subunidades bacterianas del complejo I se encuentran en la enzima mitocondrial y también contienen los mismos componentes redox. Tanto el complejo bacteriano como el mitocondrial tienen una estructura en forma de "L", con el brazo hidrofóbico embebido en la membrana, y el brazo periférico extendiéndose hacia el interior de la matriz mitocondrial o hacia el citoplasma en el caso de bacterias. El dominio hidrofílico de la enzima contiene el mononucleótido de flavina (FMN), que es el aceptor del primer electrón proveniente del NADH, también contiene de 8 a 9 centros hierro-azufre (Fe-S), comprendiendo el centro catalítico de la enzima. En el brazo embebido en la membrana se encuentra la maquinaria para el bombeo de protones (Sazanov 2007).

El complejo II o succinato: ubiquinona-oxidoreductasa, también llamado succinato deshidrogenasa, participa en el ciclo de Krebs, y cataliza la oxidación de succinato a fumarato en la matriz mitocondrial. La oxidación del succinato está acoplada a la reducción de ubiquinona a ubiquinol en la membrana interna mitocondrial como parte de la cadena de transporte de electrones. Los electrones son transferidos del succinato a la ubiquinona a través de los diferentes grupos prostéticos, flavin adenin dinucleótido (FAD), los grupos [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S], y un citocromo tipo *b*. Esta enzima no transloca protones (Sun y col., 2005) y por lo tanto no contribuye a la formación del gradiente electroquímico.

El complejo III o citocromo *bc*₁, también llamado ubiquinol-citocromo *c* óxido reductasa transfiere los electrones desde la ubiquinona hasta el citocromo *c* soluble. Este transporte está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana interna. En mamíferos existen 11 subunidades, pero solo tres de ellas contienen los centros redox: el citocromo *b* (con 2 grupos hemo), la proteína Fe-S (que contiene un centro tipo Rieske) y un citocromo *c*₁. El complejo *bc*₁ cataliza la oxidación del ubiquinol (QH₂) y la reducción del citocromo *c* soluble en la cadena respiratoria mitocondrial. Esta enzima cataliza el paso de dos electrones desde el ubiquinol hasta dos citocromos tipo *c*, a través de un mecanismo conocido como ciclo Q. El primer electrón pasa por la proteína Fe-S de Rieske, la cual transfiere los electrones a un grupo hemo *c*₁ y de ahí al citocromo *c* soluble. El segundo electrón pasa del ubiquinol al citocromo *b* y de aquí a una quinona (Q) donde es reducida a ubiquinol por dos electrones y con la participación de dos protones (Crofts 2004).

El último de los complejos de la cadena respiratoria es la citocromo *c* oxidasa o complejo IV localizado en la membrana interna mitocondrial y en la membrana de algunas bacterias. Este complejo cataliza la transferencia de electrones del citocromo *c* soluble al oxígeno molecular donde se reduce a agua, con la contribución de protones al gradiente en el espacio intermembranal (Maneg y col., 2004). Nos referiremos a esta enzima de manera más extensa en el punto siguiente debido a su importancia para este trabajo (Figura 3).

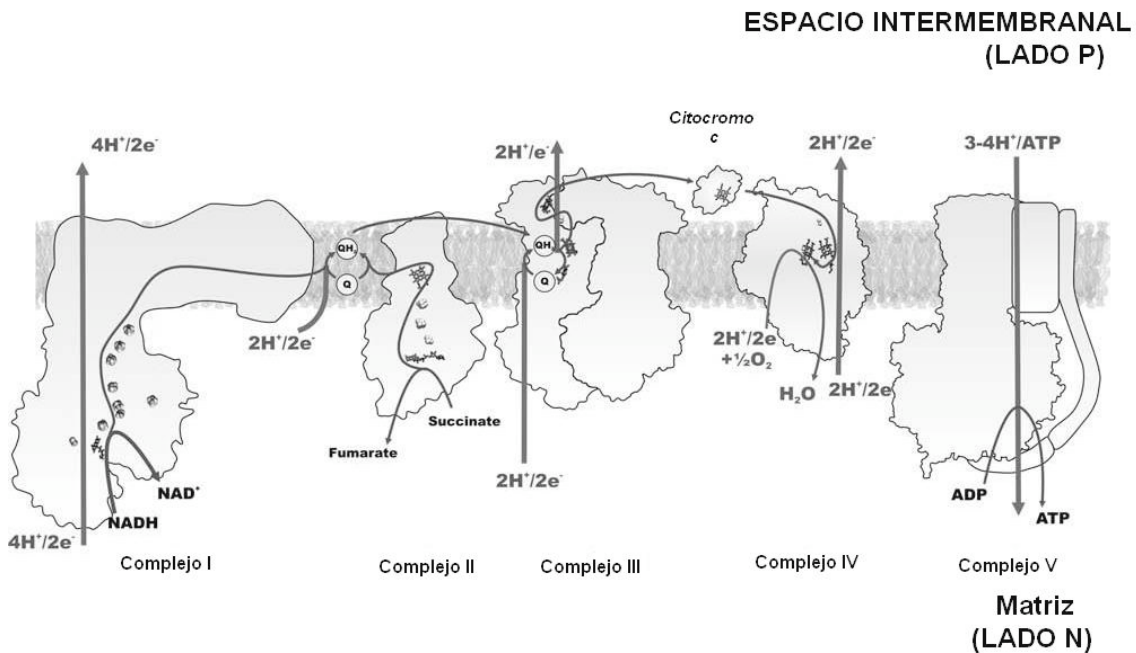


Figura 3. Esquema de la cadena respiratoria donde se observan los diferentes complejos. (Tomada y modificado de Belevich y Verkhovskiy 2008).

5. La citocromo *c* oxidasa

La citocromo *c* oxidasa de mamíferos contiene 13 subunidades y puede encontrarse como un dímero. Las subunidades I, II y III se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial y las demás subunidades están codificadas en el genoma nuclear (Carr y Winge 2003) (Figura 4).

La citocromo *c* oxidasa de bacteria solo tiene entre tres y cuatro subunidades. Las secuencias de las subunidades I, II, y III de bacterias son homólogas a las subunidades de la mitocondria, estas tres subunidades son la unidad mínima necesaria para que la enzima sea activa en la mitocondria (Belevich y Verkhovskiy 2008). La subunidad tres no contiene grupos prostéticos pero se piensa que podría estar involucrada en el ensamblaje y estabilidad entre la subunidad uno y dos (Fontanesi y col., 2006). Se sabe que la enzima es más activa como dímero que como monómero (Stanicová y col., 2007) (Figura 5).

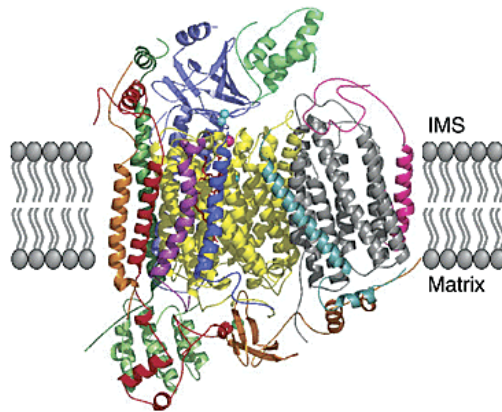


Figura 4. Estructura con las 13 subunidades de la citocromo c oxidasa de bovino (Tomado de Carr y Winge 2003).

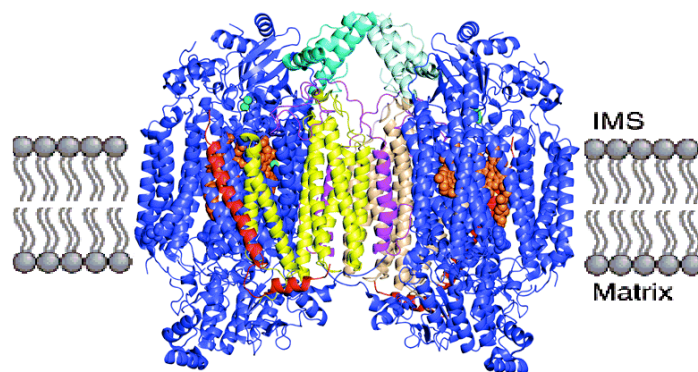
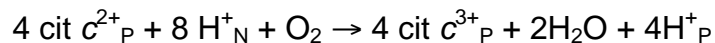


Figura 5. Dímero de la citocromo c oxidasa (Tomado y modificado de Stanicová y col., 2007)

La enzima ubicada en la membrana interna mitocondrial lleva a cabo la reducción del O_2 a agua, necesita 4 electrones que son suministrados uno por uno por el citocromo c desde del lado P de la membrana, y 4 protones provenientes desde el lado N de la membrana. La reacción de la citocromo c oxidasa se puede describir con la siguiente ecuación (Belevich y Verkhovsky 2008).



Los electrones provenientes del citocromo c soluble se transfieren a la subunidad II de la citocromo c oxidasa a un centro binuclear de cobre (Cu_A) posteriormente los electrones se transfieren a la subunidad I que contiene dos grupos hemo (hemo a, y hemo a_3) y un grupo cobre (Cu_B), (Iwata y col., 1995). El hemo a_3 y el Cu_B forman el centro binuclear Fe-Cu donde se lleva a cabo la reacción de reducción del oxígeno a agua tal y como se aprecia en la figura 6.

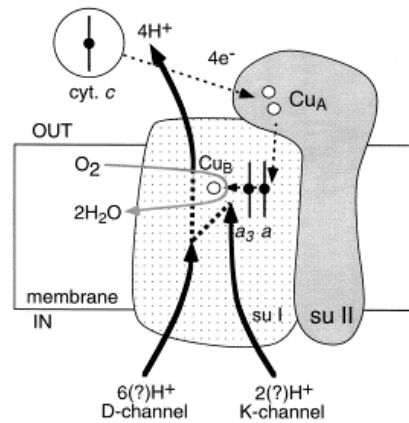


Figura 6. Esquema de la subunidad I y II de la citocromo c oxidasa, mostrando la ubicación de los grupos hemo a, y hemo a₃, el centro Cu_A y Cu_B en sus respectivas subunidades. Las líneas segmentadas muestran la ruta de los electrones y las flechas negras la ruta de los protones. (Tomado de Abramson 2001).

6. La subunidad 2 de la citocromo c oxidasa.

La subunidad 2 de la citocromo c oxidasa tiene una masa molecular de 27 kDa aproximadamente, tanto en mitocondrias como en bacterias (Belevich y Verkhovsky 2008). En *Paracoccus denitrificans* la subunidad dos comprende tres segmentos: un asa N-terminal (residuos 1-26), 2 cruces transmembranales tipo alfa-hélice, y un dominio globular C-terminal. El sitio de unión para los átomos de cobre (Cu_A 1 y Cu_A 2) en el dominio globular está formado por dos cisteínas, dos histidinas y una metionina (Figura 7) (Iwata y col., 1995). Los aminoácidos a donde se une el Cu_A se encuentran altamente conservados en diversas especies (Speno y col., 1995).

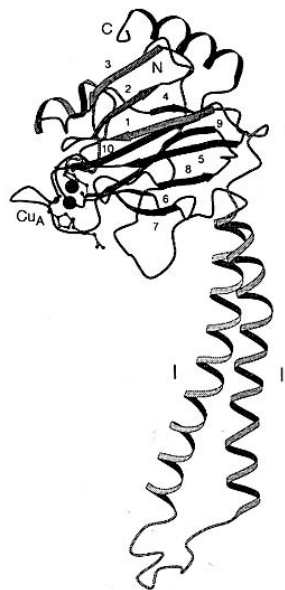


Figura 7. Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa de *Paracoccus denitrificans* (Tomado de Iwata y col., 1995).

7. Consideraciones evolutivas de COX2 de algas y apicomplejos.

Las algas y los apicomplejos se encuentran relacionados evolutivamente, para lo cual hay que explicar algunos aspectos. Por un lado, el parásito apicomplejo *Plasmodium falciparum* contiene un organelo llamado apicoplasto, nombre que deriva de los términos apicomplejo y plástido. El apicoplasto se considera un organelo homólogo al cloroplasto en plantas. Este organelo en *P. falciparum* contiene su propio genoma de 35 kb, el cual fue secuenciado por completo, llevando a sugerir que los apicomplejos adquirieron este genoma por un evento endosimbiótico con un alga verde o un alga roja (Wilson y col., 1996). También se encontró por experimentos de hibridación in situ, que *Toxoplasma gondii* contenía un genoma semejante en su apicoplasto (Kohler y col., 1997). Por otro lado se encontró que en las algas clorofíceas como *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* y en los parásitos apicomplejos como *P. falciparum* y *T. gondii* se encontraban presentes los genes fragmentados que codifican para la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COX2) (Pérez-Martínez y col., 2001. Funes y col., 2002). Entonces se propuso un evento endosimbiótico entre algas clorofíceas y apicomplejos donde los genes *cox2* fragmentados migraron del genoma del eucariote endosimbionte (un alga verde) al genoma del hospedero (el ancestro apicomplejo).

También se hipotetizó que los genes *cox2a* y *cox2b* de origen clorofíceo eventualmente reemplazaron la función del gen *cox2* mitocondrial del apicomplejo, lo que llevó a la desaparición de este último, dado que no existen genes *cox2* en los genomas mitocondriales de los apicomplejos secuenciados a la fecha. Con respecto a los demás genes de la citocromo c oxidasa se sabe que solo están presentes los genes que codifican para la subunidad I y III en el genoma mitocondrial de *P. falciparum*, en el caso de *T. gondii* aun no se cuenta con la secuencia del genoma mitocondrial. De lo anterior se concluyó que el ancestro que dio origen al apicoplasto fue un alga de la clase Chlorophyceae (Funes y col., 2002). Cabe hacer mención que aun está en debate si el origen del apicoplasto proviene de un alga verde o roja, y que existen evidencias para apoyar uno y otro origen evolutivo del organelo (Wilson y col., 1996. Kohler y col., 1997)

8. La subunidad COX2 de algas y apicomplejos.

Generalmente la subunidad COX2 se encuentra codificada en la mitocondria y está formada por un solo polipéptido. En el caso de las algas clorofíceas como *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* se encuentra codificada por dos genes en el núcleo, llamados *cox2a* y *cox2b*. El gen *cox2a* codifica para la proteína COX2A que corresponde a la porción N-terminal de una proteína COX2 típica, y el gen *cox2b* codifica para la proteína COX2B que corresponde a la porción C-terminal. La subunidad COX2A es la porción hidrofóbica de la proteína, contiene en el extremo N-terminal una presecuencia mitocondrial de 130 residuos la cual se piensa dirige a la subunidad hasta la matriz mitocondrial y se procesa cuando la preproteína ingresa a la mitocondria.

También tiene dos cruces transmembranales tipo alfa-hélice que son los que se insertan en la membrana interna mitocondrial; en el extremo C-terminal contiene una extensión atípica de aproximadamente 20 residuos. Tanto la presecuencia como la extensión no están presentes en la secuencia de una COX2 ortodoxa. COX2B es la parte soluble de la proteína la cual tiene una extensión en el extremo N-terminal de aproximadamente 40 residuos que tampoco se encuentra en la secuencia de una COX2 ortodoxa. La otra parte de la proteína contiene el sitio de unión para dos átomos de Cu, dicho sitio se encuentra conservado entre las COX2 conocidas. Se propuso un modelo en el que la extensión C-terminal de COX2A sirve para interaccionar con la extensión N-terminal de COX2B para formar un heterodímero estable, además dichas extensiones contienen aminoácidos cargados lo cual podría favorecer dicha interacción. El modelo propuesto se muestra en la figura 8 (Pérez-Martínez y col., 2001).

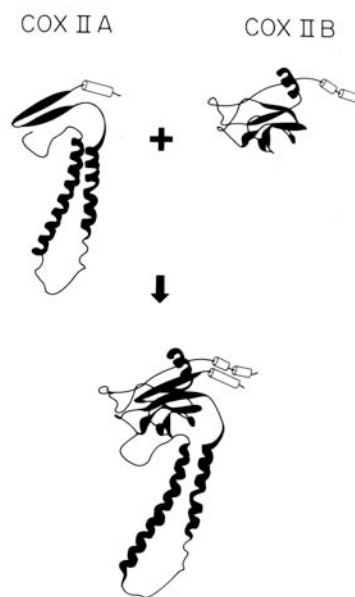


Figura 8. Modelo de interacción de COX2A y COX2B del alga *Chlamydomonas* (Tomado de Pérez-Martínez y col., 2001).

9. La subunidad COX2 de *Toxoplasma gondii*.

A partir del genoma completo de *Plasmodium falciparum* y el conocimiento parcial del genoma de *Toxoplasma gondii* se observó que en los parásitos apicomplejos también se encontraban los genes *cox2* fragmentados y que también presentaban extensiones semejantes a las de las algas (Funes y col., 2002). Recientemente en nuestro laboratorio se demostró la presencia de las subunidades COX2A y COX2B en mitocondrias de *Toxoplasma gondii*, identificando a COX2A como una proteína de 23.8 kDa y a COX2B como una proteína de 13.2 kDa (Morales-Sainz y col., 2008). No hay estudios sobre la función o estructura de la subunidad dos de la citocromo c oxidasa de parásitos apicomplejos. Pero existe referencia sobre la sensibilidad por cianuro de la citocromo c oxidasa de *Toxoplasma gondii* en estado de taquizoito (Vercesi y col., 1998).

10. Maquinaria de importación mitocondrial

Aproximadamente más del 90% de las proteínas mitocondriales conocidas están codificadas en el núcleo y sintetizadas en el citosol y posteriormente son importadas a la mitocondria. Dado que las proteínas mitocondriales importadas desde el núcleo deben atravesar varios espacios en la mitocondria, estas preproteínas han adquirido secuencias internas y presecuencias para translocarse en la mitocondria. Se sabe que la mayoría de las preproteínas mitocondriales son sintetizadas con una presecuencia en el extremo N-terminal la cual contiene aminoácidos cargados positivamente. Al mismo tiempo la mitocondria ha desarrollado una maquinaria que reconoce a estas preproteínas. Por ejemplo el complejo TOM (del inglés translocase of the outer membrane) se encuentra en la membrana externa mitocondrial y se compone de varias proteínas, entre ellas esta una proteína en forma de barril-beta que funciona como canal, Tom40 que funciona como receptor y Tom70 que reconoce señales internas dentro de las preproteínas importadas. Otra proteína llamada Tom20 reconoce presecuencias del extremo N-terminal de las preproteínas. En la membrana interna mitocondrial se encuentra el complejo TIM23 (del inglés translocase of the inner membrane) el cual consta de varias subunidades y transloca a las preproteínas hasta la matriz mitocondrial reconociendo secuencias del extremo N-terminal, y el complejo TIM22 que reconoce señales internas para importar proteínas acarreadoras (Bohnert y col., 2007). La presecuencia de una proteína que se ha importado normalmente es cortada por una proteasa que se encuentra en la matriz mitocondrial (Rehling y col., 2003). (Figura 9).

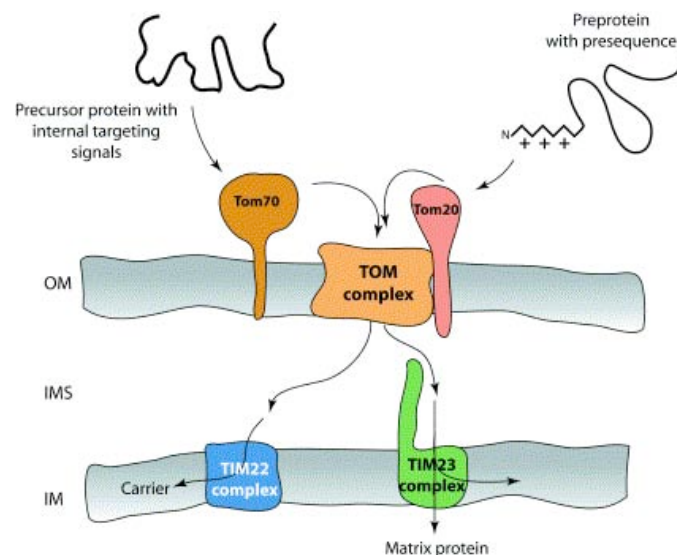


Figura 9. Modelo que muestra la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales. Se observa el complejo TOM, la proteína Tom70 y Tom20 insertadas en la membrana externa mitocondrial (OM). Así como las proteínas TIM22 y TIM23 dentro de la membrana interna mitocondrial (IM). También se aprecia con las flechas la ruta que siguen las preproteínas que contienen una secuencia interna (precursor protein with internal targeting signals) y las que tienen una presecuencia (preprotein with presequence), pasando por el espacio intermembranal (IMS) hasta llegar a la matriz mitocondrial (matrix protein) (Tomado de Rehling y col., 2003).

ANTECEDENTES

Solo en organismos como las algas *Polytomella sp.* *Chlamydomonas reinhardtii* y en apicomplejos tales como *Toxoplasma gondii*, se encuentran los genes *cox2* fragmentados formando lo que conocemos como los genes *cox2a* y *cox2b*, cuyos productos de síntesis forman un heterodímero estable. Además se sabe que COX2A cuenta con una presecuencia mitocondrial además de una extensión en el extremo C-terminal. En cuanto a COX2B, ésta cuenta con una extensión en su extremo N-terminal. (Pérez-Martínez y col., 2001. Funes y col., 2002. Morales-Sainz y col., 2008).

Aun no hay información sobre el papel que juegan las extensiones presentes en las proteínas COX2A y COX2B de estos organismos, o si participan en la formación de un heterodímero estructuralmente estable en *Toxoplasma gondii*. Dicho sitio de interacción no está presente en subunidades COX2 ortodoxas y podría llegar a ser un eventual blanco terapéutico, si se consigue desestabilizar la interacción entre COX2A y COX2B.

HIPÓTESIS

Las extensiones de las subunidades COX2A y COX2B estabilizan la interacción entre ambos polipéptidos para formar una subunidad COX2 heterodimérica en la citocromo c oxidasa de *Toxoplasma gondii*.

OBJETIVOS

De manera general estamos interesados en saber si las extensiones C-terminal de la subunidad COX2A y N-terminal de la subunidad COX2B son necesarias para la formación de un heterodímero entre ambas subunidades.

Para tratar de satisfacer nuestro objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Hacer un análisis in silico con las secuencias primarias de las proteínas COX2A y COX2B.

2. Sobreexpresar la subunidad COX2B recombinante de *Toxoplasma gondii*.

Llevaremos a cabo esto amplificando el gen *cox2b* desde una genoteca de cDNA de *Toxoplasma gondii*, clonando el gen en un vector de sobreexpresión en un sistema bacteriano para obtener la proteína recombinante.

3. Hacer anticuerpos anti-COX2B de *Toxoplasma gondii*.

Una vez purificada la COX2B se harán anticuerpos anti-COX2B para poder inmunodetectar a la subunidad COX2B en ensayos tipo western.

4. Sobreexpresar la subunidad COX2A recombinante de *Toxoplasma gondii*.

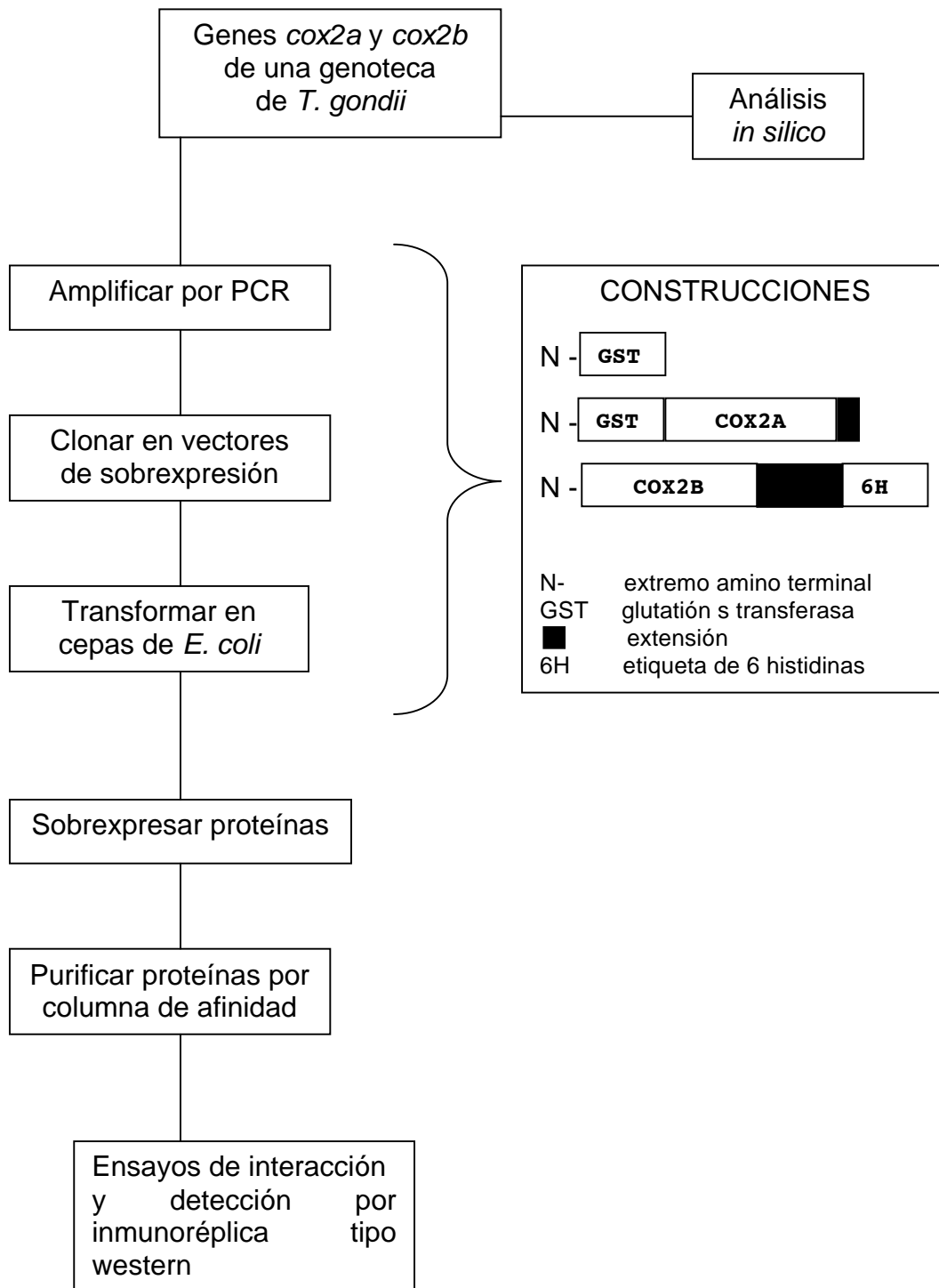
a)- Amplificaremos un fragmento del gen *cox2a* a partir de la genoteca de cDNA de *Toxoplasma gondii* y lo clonaremos en un vector que incluye a la proteína de fusión GST (glutación S-transferasa), para posteriormente sobreexpresar y purificar la proteína. Dicho gen amplificado no incluirá la secuencia que corresponde a los dos cruces transmembranales de la proteína nativa COX2A.

b)- Sobreexpresar a la GST sin COX2A con la finalidad de utilizarlo en los ensayos de interacción como control carente de la extensión.

5. Hacer ensayos de interacción entre las proteínas COX2A Y COX2B.

Una vez obtenidas las proteínas COX2A y COX2B haremos ensayos de interacción y las detectaremos con los anticuerpos por medio de inmunoréplica tipo western.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

1-Amplificación de genes.

Soluciones utilizados:

-TAE 10X (1L)

Trizma base 48.4 g
Ácido acético 11.42 ml
EDTA 20 ml
pH 8.0

-Geles de agarosa

Agarosa 1% 2 g
TAE 200 ml

-Bromuro de etidio

1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua.

El gen *cox2b* se clonó en los sitios de restricción *BamHI* y *KpnI* y el gen *cox2a* en los sitios *BamHI* y *EcoRI*. Se utilizaron los siguientes cebadores:

-gen *cox2b* Fw. 5' CGCGGATCCGATGTTTTCCGGTCCTTCTGGAAC 3'
-gen *cox2b* Re. 5' CGGGGTACCTCAGTCTTTGTACCACTTCTTTGC 3'
-gen *cox2a* Fw. 5' CGCGGATCCTACATGCTCGACGAA 3'
-gen *cox2a* Re. 5' CCGGAATTCCTACTCCTCGTCGTC 3'

Los genes se amplificaron por la técnica de la PCR (del inglés polimerase chain reaction que significa reacción en cadena de la polimerasa). En un volumen de 50 μ l se utilizó lo siguiente: DNA complementario (cDNA) de una genoteca de *T. gondii* a razón de 1 μ g; 5 unidades de Taq DNA polimerasa marca Qiagen; 1x del amortiguador de la enzima; 200 ng de cada oligonucleótido; una concentración de 10 mM de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs); una concentración de 2 mM de $MgCl_2$; se completó el volumen requerido con agua. Para la PCR los parámetros utilizados fueron los siguientes:

	95°C	5 minutos	(desnaturalización inicial)
50 ciclos	{	94°C	45 segundos (desnaturalización)
		60°C	1 minuto (alineamiento)
		72°C	1 minuto (extensión)
	72°C	10 minutos	(extensión final)

El producto de la PCR se analizó en geles de agarosa al 1% con amortiguador TAE. Se agregó 1 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 μ g / μ l antes de que el gel polimerizara.

2-Ligación de los genes amplificados

Vectores utilizados:



Figura 10. Mapa del vector de sobreexpresión pQE-30, que muestra de entre varias características los sitios de restricción (MCS), el sitio que codifica para la etiqueta de histidinas (6xHis) y el sitio donde se encuentra el gen de resistencia a ampicilina (Ampicilin).

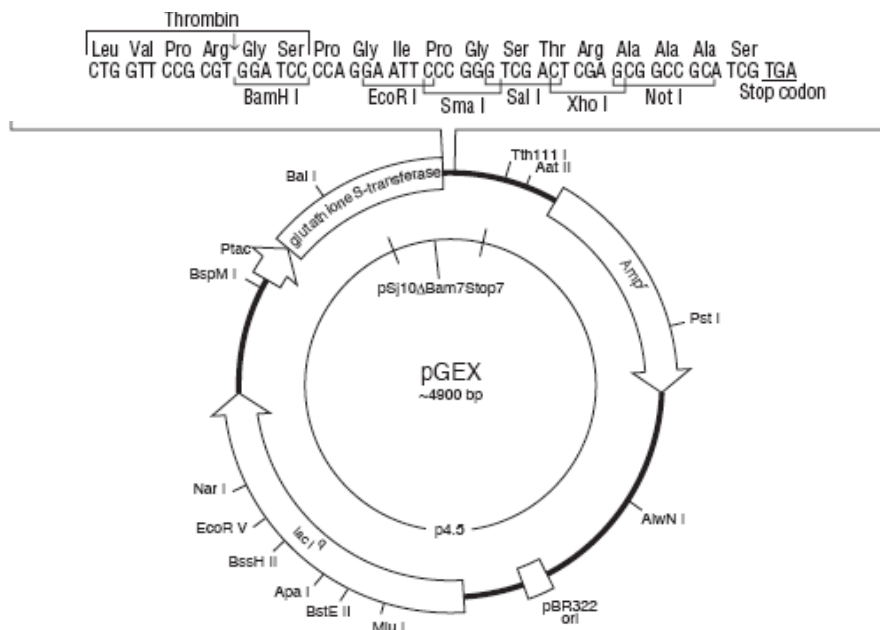


Figura 11. Mapa del vector de sobreexpresión pGEX-4T-2, que muestra de entre varias características los sitios de restricción (*BamHI* - *NotI*), el sitio que codifica para la GST (glutathione S transferase), y el sitio donde se encuentra el gen de resistencia a ampicilina (Amp).

De manera general para ligar los genes amplificados al vector de sobreexpresión se utilizaron entre 20 y 40 ng del vector linealizado y entre 20 y 120 ng del inserto digerido previamente con enzimas de restricción, el amortiguador de la enzima se utilizó a 1x. Se utilizó DNA ligasa T4 (Marca Roche) a razón de una unidad, toda la reacción se llevo a un volumen de 20 μ l con agua. Se incubó por 3 horas a 25° C.

Vectores de sobreexpresión

Se utilizó para el gen *cox2b* el vector de sobreexpresión pQE-30 de la marca QIAGEN (Figura 10) que contiene una región nucleotídica que codifica para una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína sobreexpresada. Para el gen *cox2a* se utilizó el vector pGEX-4T-2 de la marca Amersham Biosciences (Figura 11) que contiene la secuencia del gen que codifica para la proteína de fusión glutatión s transferasa (GST) en el extremo N-terminal. Ambos vectores tienen el gen de resistencia a ampicilina. Y ambos son inducibles por IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosido).

3-Transformación de bacterias

Soluciones utilizadas:

Amortiguador I

	Para 45 ml	Concentración final
1M de CH ₃ COOK	1.35 ml	30 mM
1M de MnCl ₂	2.25 ml	50 mM
1M de RbCl	4.50 ml	100 mM
1M de CaCl ₂	0.45 ml	10 mM
Glicerol	5.40 ml	12%
Agua	31.0 ml	

Amortiguador II

	Para 5 ml	Concentración final
1M de MOPS pH. 7	50 µl	10 mM
1M de CaCl ₂	375 µl	75 mM
1M de RbCl	50 µl	10mM
Glicerol	600 µl	12%
Agua	3.93 ml	

-Medio de cultivo LB 1Lt.

NaCl 1.0%	10g
Triptona 1.0%	10g
Extracto de levadura 0.5%	5g

-Medio de cultivo LB 1Lt para cajas de Petri

NaCl 1.0%	10g
Triptona 1.0%	10g
Extracto de levadura 0.5%	5g
Agar 1.5%	15g

Para transformar se mezcló toda la reacción de la ligasa (20 µl) con 50 µl de células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1blue que contiene un gen de resistencia a tetraciclina; se incubó 30 minutos en hielo, posteriormente 2 minutos a 42°C y 2 minutos más en hielo, se agregaron 200 µl de medio LB y se incubó por una hora a 37° C. Finalmente se sembró en cajas de Petri con medio Luria Bertani (LB) con 25 µg/ml de tetraciclina y 100 µg/ml de ampicilina.

Preparación de células competentes (cultivo 100 ml)

Se colocó un cultivo de bacterias *E. coli* XL1blue en medio LB con tetraciclina (25 µg/ml) toda la noche hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.06, se centrifugó a 27,000xg por 10 minutos en un rotor SS34. La pastilla se resuspendió en 40 ml del amortiguador I, se incubó 2 horas en hielo, se volvió a centrifugar, la pastilla se resuspendió en 4 ml del amortiguador II y se incubó una hora en hielo, se hicieron alícuotas de 200 µl, se congelaron en nitrógeno líquido por 10 minutos y se guardaron a -70° C.

4-Sobreexpresión de proteínas

Todas las construcciones se sobreexpresaron de la misma forma. Se colocó un cultivo de 200 ml toda la noche a 37°C en presencia de antibióticos (tetraciclina 25 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.06 y se procedió a inducir el cultivo. Como agente inductor se utilizó IPTG. Las condiciones de inducción variaron entre las diferentes construcciones como muestra la siguiente tabla.

	IPTG (mM)	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
COX2B pQE-30	1	4	37
COX2B pQE-30	0.1	6	25
COX2A pGEX-4T-2	0.15	5	25

La sobreexpresión de la proteína COX2B se realizó en presencia de 1 mM de CuCl₂ (Kelly y col. 1993) con la idea de que se pudiese insertar in vivo el centro diatómico de cobre propio de la subunidad COX2 de la citocromo oxidasa. Una vez finalizado el tiempo de sobreexpresión se centrifugó el cultivo a 12000xg en un rotor SS34 y se solubilizó la pastilla en un amortiguador de fosfatos.

Para corroborar el patrón de sobreexpresión observado en el gel de acrilamida transferimos dicho gel a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) para detectar a las proteínas con anticuerpos. Dicha técnica se detalla más adelante; esta metodología también se utilizó para detectar a las proteínas quiméricas GST-COX2A y COX2B en los ensayos de interacción.

5-Transferencia de proteínas por la técnica de western blot en cámara semihúmeda.

Soluciones utilizadas:

-Amortiguador salino de Tris (TBS)

20 mM de Tris-HCl pH 7.5

0.5 M de NaCl

-Amortiguador salino de Tris y Tween (TTBS)

20 mM de Tris-HCl pH 7.5

0.5 M de NaCl

0.05% de Tween-20

-Solución de Magnesio

0.1 M de NaHCO₃,

1 mM de MgCl₂

pH 9.8

-Solución de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)

BCIP 30 mg

DMF 4 ml

-Solución de cloruro nitro-azul de tetrazolio (NBT)

NBT 60 mg

DMF 2.8 ml

Agua 1.2 ml

-Amortiguador para el cátodo

300 mM de ácido ε-amino-n-caproico 39.4 g/l pH 8.5

0.05% SDS 0.5 g/l

-Amortiguador para el ánodo

150 mM de Tris 18.2 g/l

50 mM de Tricina 9 g/l

Metanol 20% 200 ml/l

-Anticuerpos utilizados

-Anti-COX2B de proteína recombinante de *Toxoplasma gondii* hecho en conejo.

-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).

-Anti-Glutatión s transferasa de *Schistosoma japonicum* (Calbiochem).

Para la mayoría de los geles que se transfirieron para poder inmunodetectar las proteínas COX2B, GST-COX2A y GST se utilizó la misma técnica que a continuación se describe. Una vez que corrió el gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente que contiene el amortiguador del cátodo así como 3 papeles filtro whatman del tamaño del gel y en el amortiguador del ánodo se colocaron tres papeles whatman y la membrana de nitrocelulosa. Se colocan en la

cámara de transferencia en orden de abajo hacia arriba primero tres papeles whatman, la membrana, el gel y otros tres papeles whatman. Se transfiere de 1 a 3 horas a 1 mA/cm² de membrana.

Después se lavaron las membranas con TBS por 5 minutos dos veces y se bloquearon con 3% de gelatina en TBS por 5 horas, se volvieron a lavar por 5 minutos dos veces con TTBS. Se colocó el anticuerpo anti-COX2B a una dilución de 1:100000 en una solución de 1% de gelatina en TTBS y se incubó por 5 horas. Luego se lavó la membrana por 5 minutos dos veces con TTBS. Se colocó el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (de Sigma) a una dilución 1:3000 en una solución de 1% de gelatina en TTBS, se incubó por 5 horas y se lavó dos veces con TTBS por 5 minutos. Para revelar se agregó a la membrana 20 ml de una solución de magnesio y posteriormente 200 µl de solución NBT y 200 µl de solución BCIP, se colocaron en agitación y se esperó hasta visualizar las bandas (Hawkes y col., 1981. Towbin y col., 1979).

Para detectar la proteína COX2B sobreexpresada se utilizó un método diferente, en el cual los pasos de incubación y lavado son los mismos, pero en lugar de usar gelatina se utilizó leche deslactosada al 5%. Se reveló por quimioluminiscencia con un paquete de la marca Pierce y un anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano que detecta la etiqueta de histidinas, se utilizó luminol y peróxido que se mezclan en una relación 1:1. se incubó la membrana de nitrocelulosa con esta mezcla y posteriormente se revela en una placa radiográfica.

6-Producción del anticuerpo anti-COX2B de *T. gondii*

Soluciones utilizadas:

-Amortiguador de fosfatos

50 mM de NaH₂PO₄

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución con inhibidor de proteasas

100 mM de PMSF

1 ml de Isopropanol

-Amortiguador de guanidina

6 M de Hidrocloruro de guanidina

50 mM de NaH₂PO₄

500 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución de lavado

6 M de clorhidrato de guanidina

50mM de NaH₂PO₄

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución de elución

100 mM de imdazol

6 M de clorhidrato de guanidina

50mM de NaH₂PO₄

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Amortiguador salino de Tris (TBS)

20 mM de Tris-HCl pH 7.5

0.5 M de NaCl

-Amortiguador de TRIS

20mM de Tris pH 6.8

-Geles de Laemmli de acrilamida al12% de 1.5 mm de espesor

	Separador	Concentrador
Agua	2.7 ml	3.55 ml
Acrilamida 30%	3 ml	0.5 ml
Tris 2 M	1.5 ml (pH 8.8)	325 µl (pH6.8)
SDS 10%	150 µl	50 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl

-Acrilamida 30%

Acrilamida 30 g

Bisacrilamida 0.8 g

En 100 ml de agua

-Amortiguador para el gel separador

Tris base 18.17 g

SDS 10% 4 ml

pH 8.8 con 12N HCl

En 100 ml de agua

-Amortiguador para el gel concentrador

Tris base 6.06 g

SDS 10% 4 ml

pH 6.8 con 12N HCl

En 100 ml de agua

-Amortiguador de corrida

TRIS 6 g

Glicina 28.8 g

SDS 10% 20 ml

En 2 l de agua

-Amortiguador de corrida para gel azul

TRIS	3 g
Glicina	14.4 g
Azul de Serva	25 mg
SDS 0.05%	20 ml

En 1 l de agua

-Solución digestora

SDS 10%
Glicerol 30%
Tris-HCl 100 mM pH 6.8
Azul de bromofenol 0.3%
Mercaptoetanol 4%

-Resina utilizada

Resina de níquel unida a sefarosa de la marca Amersham Biosciences.

Producción de la proteína.

Posterior a la sobreexpresión se rompieron las células en un sonicador con una intensidad del 50% a una potencia de tres Watts por un minuto repitiendo este paso 4 veces. Se centrifugó a 17000xg 20 minutos para separar la fracción soluble de la pastilla. Se cargaron las fracciones a un gel de Laemmli del 12% de acrilamida y se encontró a la totalidad de la proteína en la fracción insoluble. Por tanto, la pastilla se incubó toda la noche a 4°C en un amortiguador de fosfatos con clorhidrato de guanidina 6 M, se centrifugó la muestra a 17000xg y el sobrenadante se incubó en agitación por 2 horas a 4°C con la resina de níquel-Sefarosa (Amersham), después se cargó la muestra unida a la resina a una columna de vidrio para cromatografía. Se le agregó a la columna el amortiguador de lavado, posteriormente el amortiguador de eluido, y se obtuvo a la proteína COX2B parcialmente pura. A los amortiguadores de lavado y eluido se les agregó 6 M de guanidina.

Se tomaron varias alícuotas de 100 µl de la proteína pura y se precipitaron con metanol-cloroformo para retirar la guanidina y se cargaron a un gel de 12% de acrilamida con el sistema de Laemmli (Laemmli 1970) y se corrieron con un amortiguador para gel azul nativo. Posteriormente se cortaron las bandas correspondientes a la proteína COX2B y se maceraron en un mortero con 2 ml de amortiguador de TRIS. Se hicieron 4 alícuotas de 400 µl y se conservaron a -70°C.

Producción del anticuerpo.

Cada alícuota de 400 µl se utilizó como una dosis y cada dosis se preparó con 1 ml de adyuvante de Freund de la marca Sigma (Freund y col., 1942)

incubando por 1 hora 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una primera inyección con adyuvante completo de Freund en un conejo y posteriormente tres refuerzos con adyuvante incompleto de Freund en un intervalo de 22 días. Al final se obtuvo el suero de conejo el cual se precipitó con sulfato de amonio al 40%, se centrifugó a 10000 rpm (12000xg) 30 minutos, la pastilla se disolvió con 2 ml de un amortiguador de TBS y se hicieron alícuotas de 200 μ l y se conservaron a -70°C. Una vez que se obtuvo el anticuerpo anti-COX2B se utilizó a una dilución 1:100,000 para los ensayos de Western blot.

7-Solubilización de la proteína COX2B para ensayos de interacción

Para obtener una proteína COX2B soluble después de ser purificada se retiró la guanidina de la proteína por medio de diálisis en presencia de 0.5% de lauril maltosido. Se colocó la proteína en una bolsa de diálisis con un poro que permite el paso de proteínas de 3500 de masa molecular. La bolsa de diálisis se dejó en agitación con un amortiguador de fosfatos con 5 M de clorhidrato de guanidina, se fue cambiando cada hora en orden decreciente la concentración a 4, 3, 2 y 1 M de guanidina hasta intercambiar con el amortiguador libre de guanidina, pero conteniendo 0.05% de lauril maltósido.

8-Purificación de las proteínas GST y GST-COX2A para ensayos de interacción

Posterior a la sobreexpresión de GST y GST-COX2A se rompieron las células en un sonicador con una intensidad del 50% a una potencia de tres Watts por un minuto repitiendo este paso 4 veces. Se centrifugó a 17000xg 20 minutos en un rotor de la marca Fiber-Lite F21-8x50 para separar la fracción soluble de la pastilla. Se cargaron las fracciones a un gel de Laemmli del 12% de acrilamida, se observó en ambas un 70% aproximadamente de la proteína sobreexpresada en la fracción insoluble y un 30% en la fracción soluble, el cual se incubó en agitación por 2 horas a 4°C con la resina de glutatión-agarosa, después se paso la muestra a una columna de vidrio para cromatografía. Se le agregó a la columna el amortiguador de lavado, posteriormente el amortiguador de eluido, y se obtuvo a la proteína GST pura. Como ya se explicó, la proteína GST-COX2A no se obtuvo pura por este método, ya que dicha proteína recombinante nunca se unió a la resina. Por esta razón utilizamos los extractos crudos para los ensayos de interacción como se explica enseguida.

9-Ensayos de interacción

Soluciones utilizadas:

-Amortiguador de interacción

20 mM de glutatión reducido

0.5% de lauril maltosido

50 mM de NaH_2PO_4

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución de lavado

0.5% de lauril maltosido

50mM de NaH_2PO_4

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución de elusión

0.5% de laurel maltosido

20 y 100 mM de imdazol

50mM de NaH_2PO_4

300 mM de NaCl

pH 7.8

-Solución de remoción (100 ml)

2% SDS	20 ml
6.25 mM de Tris-HCl, pH 6.8	12.5 ml
100 mM de 2-mercaptoetanol	0.7 ml

-Resina utilizada

Resina de níquel unida a sefarosa de la marca Amersham Biosciences.

Después de que se purificó y se removió a la guanidina de la proteína COX2B se incubó con las proteínas quiméricas de GST y GST-COX2A, de estas dos últimas se utilizó el extracto crudo. Para los ensayos de interacción se utilizaron 1.89 mg de la proteína COX2B, 116 mg del extracto crudo de la proteína GST y 110 mg del extracto crudo de la proteína GST-COX2A. En el ensayo de interacción se utilizó el mismo amortiguador que se utilizó para solubilizar a la proteína COX2B. Después de 30 minutos a temperatura ambiente se cargaron las proteínas a una columna de afinidad, posteriormente se pasó el amortiguador de lavado colectando tres fracciones de 1.5 ml, seguido de esto se paso por la columna el amortiguador de elución colectando las tres primeras fracciones de 1.5 ml a una concentración de 20 mM de imidazol y otras seis fracciones de 1.5 ml a una concentración de 100 mM de imidazol. Las fracciones se corrieron en un gel de acrilamida de Laemmli del 12% y se transfirieron para ser detectadas con el anticuerpo anti-GST y anti-COX2B.

La transferencia de proteínas se explica aquí mismo en la metodología en el punto cinco. Pero para reutilizar la misma membrana con otro anticuerpo se trató a la membrana con una solución de remoción por 30 minutos a una temperatura de 60°C en agitación y posteriormente se trató a la membrana de la misma forma tal como se describe en el punto cinco.

RESULTADOS

Análisis *in silico* de los genes y proteínas COX2A Y COX2B.

1-Presencia de los genes COX2A y COX2B en apicomplejos, algas y dinoflagelados.

Además de las secuencias ya reportadas se han encontrado otras de algas y dinoflagelados que corresponden a los genes *cox2a* y *cox2b*. Solo las proteínas COX2A y COX2B de *Polytomella sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Toxoplasma gondii* se han caracterizado bioquímicamente (Pérez-Martínez y col., 2001, Morales-Sainz y col., 2008). Los otros genes *cox2* fragmentados se han encontrado en la secuencia total o parcial del genoma nuclear de algas, apicomplejos y dinoflagelados, y otros genes los hemos detectado por las secuencias EST (del inglés expression sequence tags) encontradas en las bases de datos como el NCBI (National Center for Biothecnology Information) (Tabla 1).

	<i>cox2a</i>	<i>cox2b</i>
APICOMPLEJOS		
<i>Toxoplasma gondii</i>	√	√
<i>Plasmodium falciparum</i>	√	√
<i>Plasmodium berghei</i>	√	√
<i>Plasmodium chabaudi</i>	√	√
<i>Plasmodium yoelii</i>	√	√
<i>Neospora caninum</i>	√	√
<i>Theileria parva</i>	√	√
<i>Theileria annulata</i>	√	x
<i>Eimeria tenella</i>	√	x
<i>Sarcocystis falcatula</i>	x	√
ALGAS		
<i>Polytomella sp.</i>	√	√
<i>Polytomella parva.</i>	√	√
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	√	√
<i>Chlamydomonas incerta</i>	√	√
<i>Haematococcus pluvialis</i>	√	√
DINOFLAGELADOS		
<i>Karlodinium micrum</i>	√	√
<i>Karenia brevis</i>	√	√
<i>Ostreococcus tauri</i>	√	√
<i>Oxyrrhis marina</i>	√	√
<i>Perkinsus marinus</i>	√	x
<i>Alexandrium tamarense</i>	x	√

Tabla 1. Organismos donde se han encontrado los genes *cox2a* y *cox2b*. (√) indica presencia y el (x) que el gene no ha sido aún identificado. (Tomado y modificado de Morales-Sainz y col., 2008).

2-Secuencias de las subunidades COX2A y COX2B de apicomplejos y algas.

La identidad entre las subunidades maduras COX2A de apicomplejos es de 45% con una similitud del 18%. Con la presecuencia la identidad es de 21% y una similitud del 10% (Figura 12). Los alineamientos se realizaron con las secuencias de *T. gondii*, *P. falciparum*, *T. parva* y *N. caninum*. Los alineamientos en este trabajo se realizaron con el programa Clustal w.

La secuencia de la proteína madura de los apicomplejos alineados con la proteína COX2A de *Polytomella sp.* y *C. reinhardii* sin la presecuencia dan una identidad del 16% y una similitud del 12%. La identidad y la similitud disminuyen cuando se alinean estas mismas secuencias incluyendo también la presecuencia. En el caso de *T. gondii* su presecuencia es la de mayor tamaño con respecto a los demás apicomplejos e incluso con las de algas. En cuanto a la extensión del C-terminal de COX2A es extremadamente corta o incluso nula en apicomplejos con respecto a la de algas (Figura 13).

```

          10      20      30      40      50      60
COX2A_Tg  MLAYFAASRELAVVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASSPCSLFFGSRLYPIRSCCGRP
COX2A_Nc  -----
COX2A_Pf  -----
COX2A_Thp MLTYSGITRR-----LFQSSLLKNTKFQTPQSHFG--ILYPN-----

Prim.cons. ML2Y2222R2LAVVFCVGTTLPENIFL2S22L2222222P2S2F2GS2LYP2RSCCGRP

          70      80      90      100     110     120
COX2A_Tg  AGFPAKIVYPFLSAHTFPKMPLSSSLFRPYGHLFHQFPRRFFSSAQ---RGDYSLMLPR
COX2A_Nc  -----MVPLYTSLF--PYGQLLNHIFGRFLSLSRP---RVDYSLMLSR
COX2A_Pf  -----MFKFNSKLYIGLRNINQIINKKNVNYIKPNVLGNMPPFKYKE
COX2A_Thp -----HEISQR---HIFTSRLLLFTTKKEPEANNSTSESSSVNMKNQKQFTHVSE
          :.      * :      .      .      .      .
Prim.cons. AGFPAKIVY222S22TFP2MFPL4SSLF3PYG4L444IP4RF4SSS4P22RGDYSLMLS2

          130     140     150     160     170     180
COX2A_Tg  HFSSTASSVTKPPQKTDAPAKHDE-HDSHHGTNNFYH-MPSHHSPSRHHLNPDGTMRDLT
COX2A_Nc  HFSSTSS-VTKPP-KTDAAAQHGEHGDHSHHTNNTFYH-MPSYHSASRHHHLNPDGTMRLT
COX2A_Pf  FATVNKSDHSDKIKKTNNAHTKNNHEHESHTKGFYHHIDHHHGDPRAHLNEDGTRKPEY
COX2A_Thp TFGPGKYRGTGLPKPVGQPEDLPS--IEFGKPTGMYNFVRHQHGDPRDHLREDGRFKEKY
          :      .      .      .      .      .      .      .      .      .
Prim.cons. HFSSTKS3VTKPPKTDAPA4H4E2HDSHH4TN2FYH2MP2HH2D2RHHLN2DGTM24L2

          190     200     210     220     230     240
COX2A_Tg  TAETFHWEHAEAETPAQQIVSVNGRKMVKGVETRDLVELFLVHQKNIPFWPRMRMNVWGN
COX2A_Nc  TAETFHWEHAEAETPAQQIVSVNGRKMVKGVETRDLVELFLVHQKNMPFWPRMRMNVWGN
COX2A_Pf  DFNNFHWDDYDANTPKQNIIVVNGQKMIKGETKPMYELFNVSQQNIPFWARTRLNVWGN
COX2A_Thp ATDGFHWYDAYTDVDPKQRRITIVNGEAMVLGVETRPMEELFGVEQTNVPPFYHRRRLNLWGD
          : *** . :. * * . *** . * * * : : * * * * * : * * * : * * : * * :
Prim.cons. TAETFHWE2AEAETP2QQIV2VNGRKMVKGVETR222ELFLVHQKNIPFWPRMR2NVWGN

          250     260     270     280     290     300
COX2A_Tg  HDLLMKAEFLLFWTPTFTITWSLAIPMFTLLYMLDEAVYAAMTVKVIQRQWYWIYEVESPV
COX2A_Nc  HDLLMKAEFVFFWTPTFTIWSLAIPVFTLLYMLDEAVNAAMTVKVIQRQWYWIYEV----
COX2A_Pf  YNMVLKVEFLFFWIPTLIIIFSLAIPCFTMLYMLDEIVHTTMTVKVIQRQWYWIYEVESPP
COX2A_Thp HKNALRAEFCFFWIPTFTIIFSLAIPCYTMLYMLDESIVTMTVKVIHQWYVWYEVESPP
          :. :. * * * * * : * * * * * : * * * * * * : * * * * * : * * * * *
Prim.cons. HDLL2KAEFLLFW2PTFTI2SLAIPCFT2LYMLDEAVY22MTVKVIQRQWYWIYEVESPP

COX2A_Tg  DDEE---
COX2A_Nc  -----
COX2A_Pf  DDDDNHE
COX2A_Thp V-----

Prim.cons. DD22NHE

```

Figura 12. Alineamiento de la subunidad COX2A de apicomplejos con presecuencia (Tg, *Toxoplasma gondii*, Nc, *Neospora caninum*, Pf, *Plasmodium falciparum*, Thp, *Theileria parva*). Sombreado en gris corresponde a la presecuencia mitocondrial. Encerradas en cuadros en los extremos C-terminales se indican las extensiones.

```

          10      20      30      40      50      60
COX2A_Thp  MLTYSGIT-----RRLFOSS-----
COX2A_Pf   MFKFN-----SKLYIG-----
COX2A_Nc   -----
COX2A_Tg   MLAYFAASRELAVVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASSPCSLFFGSRLYPIRSCCGRP
COX2A_Poly MLAQRISS-----GNSLQCG-----
COX2A_Chlr MLRQSGLS-----ANKLFCSNLLQSQO----KE

Prim.cons.  MLA2SG4SRELAVVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASS3N2LFCGS2L2222SCCG22

          70      80      90      100     110     120
COX2A_Thp  ---LLKNTKFQTPQSHFGILYPNHEISQRHIFTSRLLLFTTKKEPEANNSTSEDESSSVNM
COX2A_Pf   ----LRNINQIINKKNVNIKPN-----VLGN--MPFKYKEFATVN--KSDHSDKIKK
COX2A_Nc   -----MVPLYTSLF--PYGQLLNHHPGRFLSLSRP--RVDYSLMLSR
COX2A_Tg   AGFPAKIVYPFLSAHTFPKMMLPSSSLFR--PYGHLFHQFPRRFFSSAQ--RGDYSLMLPR
COX2A_Poly --KYMWNAAQMGSKNIAITVSETVQASTAAPEVGAQFSFKEASAMASKQNIVVGSGLSLAS
COX2A_Chlr GNKLVWNAMLFSSKAEGSAVQOVVASEGVAQAVPQFSSEAAAAAIAKRRGLIGSGMSLAP

Prim.cons.  22KLL2NA5QF5SK55F55M6P35ASLFR3PYG62FS6FPA222AS2243R2D2SLSLAR

          130     140     150     160     170     180
COX2A_Thp  KNQKQFTHVSETFGPGKYRGTGLPKPVGPEDLPSIEFGKPTGMYNFVRHQHGDPRDHLR
COX2A_Pf   TNNNAHTKNNHEHES-----HTKGFYHHIDHHHGDPRAHLN
COX2A_Nc   HFSSTSS-VTKPP-KTDAAAQHGE-----HDSHHDNTNFFYHMPSYHSASRHHLN
COX2A_Tg   HFSSTASSVTKPPQKTDAPAKHDE-----HDSHHGTNFFYHMPSHHSPSRHHLN
COX2A_Poly RQTFSG-SFAASAPSGARAIAT-----QAEAKAQTTETSS-IKKFIKAAA AVVA
COX2A_Chlr SKPFAARGLTSAAKPAAAAAAG-----AAEAAQPADKYAGLKKVLKAAAALAA

Prim.cons.  H2S22A2SVTKP25322AAAA23E2PVGQPEDLP32E2HHPT2NYYH223HH3A3RAHLN

          190     200     210     220     230     240
COX2A_Thp  EDGRFKEKYATDG-FHWYDAYTDVDPK-QRRITIVNGEAMVLGVETRPMEELFGVEQTNVFP
COX2A_Pf   EDGTRKPEYDFNN-FHWDDYWANTPK-QNIVIVNGQKMIKGETKPMEYLFNVSQONIPF
COX2A_Nc   PDGTMRLTTAET-FHWEHAEAETPA-QQIVSVNGRKMVKGVETRDLVELFLVHQKNMPF
COX2A_Tg   PDGTMRDLTTAET-FHWEHAEAETPA-QQIVSVNGRKMVKGVETRDLVELFLVHQKNIPF
COX2A_Poly ALGLTAGTASAEAPVAWQLGFQDSATSQAQAAFDLHHDIFFLLNTVVLVVFYFLYHIATK
COX2A_Chlr ALGLTTTAAADSPQPWQLLFDQTATSTAQAMIDLHHDIFFLLITVVTLVVFYMMFQIITK
          *       :       *       :       .       .       :       .       :       :       *       .
Prim.cons.  3DGT226232AETPFHW23A2ADTP3SQ2IV2VNG2KM2KGVETR23VELF2VHQ2NIPF

          250     260     270     280     290     300
COX2A_Thp  YHRRRLNLWGDHKNALRAEFCFFWIPTFIIIFSLAIPCYTMLYMLDESIVY-TTMTVKVIGH
COX2A_Pf   WARTRLNVWGNYNMVLKVEFLFFWIPTLIIFSLAIPCFMPLYMLDEIVH-TTMTVKVIGR
COX2A_Nc   WPRMRMNWVGNHDLMLKAEFLFFWTPTFIIVSLAIPVFTLLYMLDEAVN-AAMTVKVIGR
COX2A_Tg   WPRMRMNWVGNHDLMLKAEFLFFWTPTFITWLSLAIPMFTLLYMLDEAVY-AAMTVKVIGR
COX2A_Poly FHYTKQALPEKLTHTHTAIEVIWTVIPTIIVVLI AIPSLTLVY AIDSHNDKPGTLTKVIGR
COX2A_Chlr FHYSKVLKPEKLTHTHTMEVIWTTIIPTLIVVMIAIPSLTLIYSLDQHTERPGTLTKIIGR
          :       :       .       *       :       **       *       :       *       :       *       :       *       :       *       :
Prim.cons.  WHR2R2NVWGNH2223KAEF2FFWIPTFII3S2AIP2FTLLYMLDE2VY233MTVKVIGR

          310     320     330
COX2A_Thp  QWYWVYEVESPPV-----
COX2A_Pf   QWYWIYEVESPPDDDDNHE-----
COX2A_Nc   QWYWIYEV-----
COX2A_Tg   QWYWIYEVESPV[DDEE]-----
COX2A_Poly QWYWSYEMHDHL[OHKLLDADRLVAIAEKTITK]
COX2A_Chlr QWYWSYEMHDHL[OHKLLDPDRLVGIAEKALVK]
          **** ** :
Prim.cons.  QWYWIYEVESP222KLLD3DRLV2IAEK222K

```

Continua pie de figura.

Figura 13. Alineamiento de la subunidad COX2A de apicomplejos con presecuencia (Tg, *Toxoplasma gondii.*, Nc, *Neospora caninum.*, Pf, *Plasmodium falciparum.*, Thp, *Theileria parva.*) y Algas cloroficeas (Poly, *Polytomella sp.*, Chlr, *Chlamydomonas reinhardtii.*). Sombreado en gris corresponde a la presecuencia mitocondrial. Encerrado en cuadro en el C-terminal se observan las extensiones.

Con respecto a la identidad de COX2B entre los apicomplejos *T. gondii*, *P. falciparum*, *T. parva* y *N. caninum* es de 77% y una similitud de 12%. Y de estos con respecto a algas (*Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii*) la identidad es del 52% y una similitud del 23% (Figura 14). Tomando en cuenta las secuencias de la proteína COX2B de estos apicomplejos y algas incluyendo las extensiones la identidad es de 32% con una similitud del 15% (Figura 15). El sitio donde se une el CuA es altamente conservado entre las algas y los apicomplejos. En realidad, es un sitio conservado en todos los organismos.

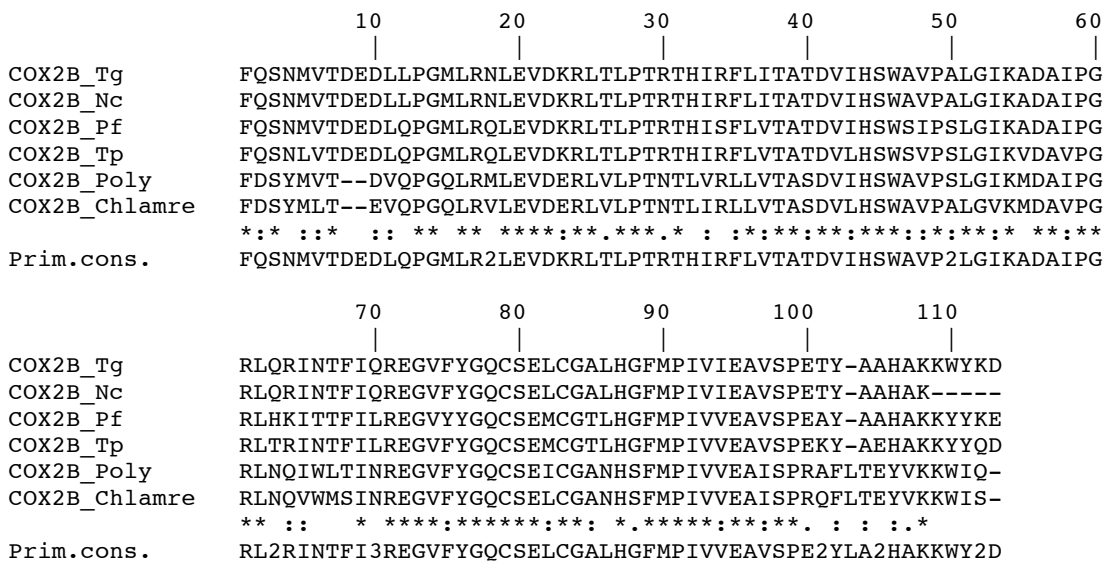


Figura 14. Alineamiento de la subunidad COX2B de apicomplejos sin extensiones (Tg, *Toxoplasma gondii.*, Nc, *Neospora caninum.*, Pf, *Plasmodium falciparum.*, Tha, *Theileria parva*) y algas cloroficeas (Poly, *Polytomella sp.*, Chlr, *Chlamydomonas reinhardtii.*) también sin extensiones.

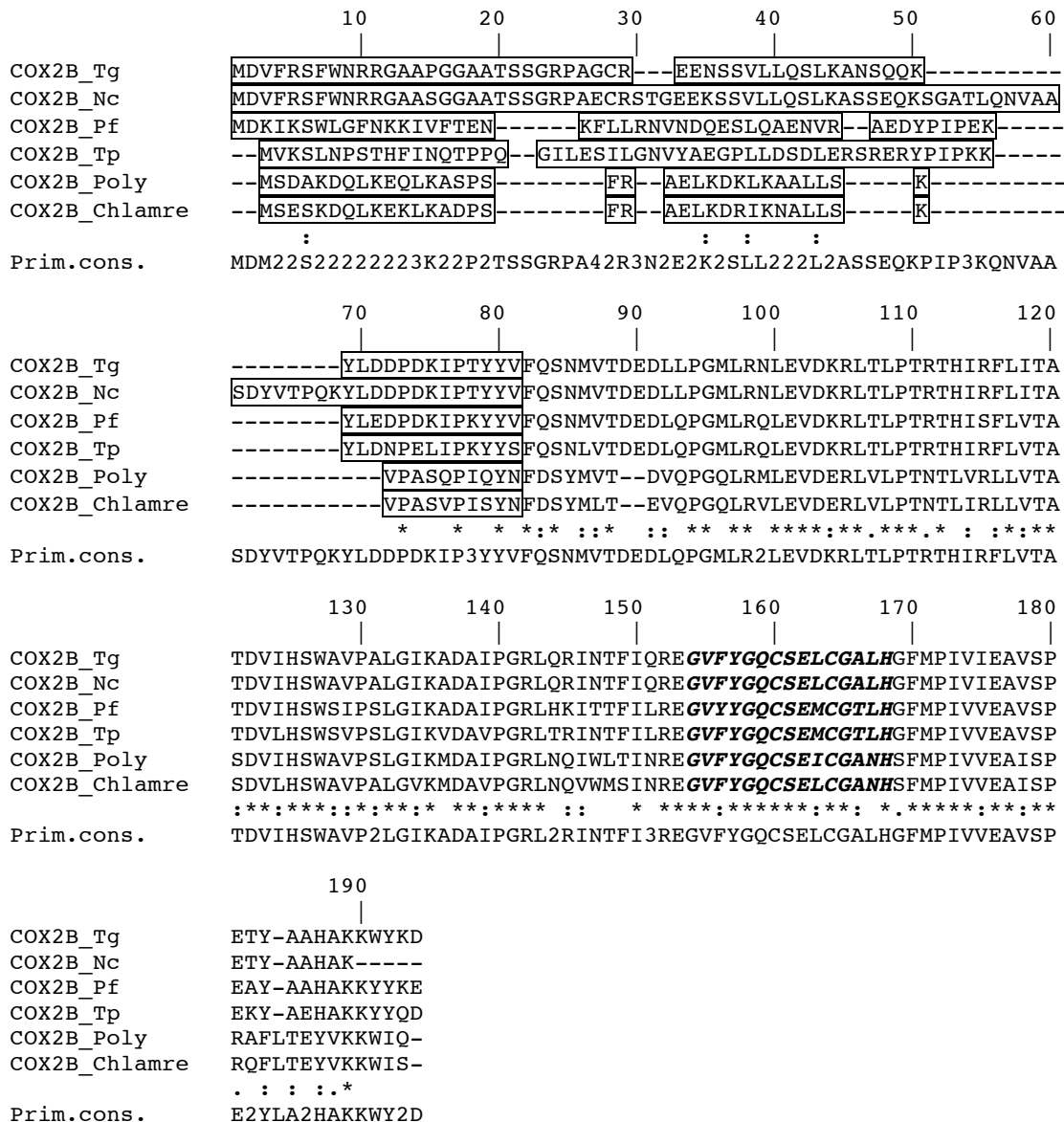


Figura 15. Alineamiento de la subunidad COX2B de apicomplejos (Tg, *Toxoplasma gondii*., Nc, *Neospora caninum*., Pf, *Plasmodium falciparum*., Tha, *Theileria parva*.) y algas clorofíceas (Poly, *Polytomella sp.*, Chlr, *Chlamydomonas reinhardtii*). Encerradas en cuadro se observan las extensiones N-terminal y en el extremo C-terminal en negritas y cursivas el sitio de unión a cobre.

Se puede apreciar que las extensiones de la subunidad COX2B varían mucho entre estas especies como veremos más adelante.

3-Extensión de la subunidad COX2B de apicomplejos y algas.

Un alineamiento de las extensiones COX2B de apicomplejos con algas nos da una identidad muy baja (4%) con una similitud del 8% (Figura 15). Pero a pesar de no ser tan similares dichas extensiones conservan una alta y muy parecida polaridad. Podemos observar en una gráfica de polaridad la similitud entre las extensiones de la subunidad COX2B utilizando las secuencias de *Polytomella sp.* y *Toxoplasma gondii* (Figura 16), se puede apreciar en los 100 aminoácidos del extremo N-terminal el aumento en la polaridad y una disminución en los 60 residuos del C-terminal. En ambas secuencias es muy similar el patrón de polaridad.

	10	20	30	40	50	60
COX2B_Tg	-MDVFRSFWNR-RGAAPGGAATSSGRPAGCR---	EENSSVLLQS-LKANSQOK-----				
COX2B_Nc	-MDVFRSFWNR-RGAASGGAATSSGRPACRSTGEEKSSVLLQS-	LKASSEQKSGATLQN				
COX2B_Poly	-----MSDA-KDQLKEQLKASPSFRAELK---	DKLKAALLS-----				
COX2B_Chlamre	-----MSES-KDQLKEKLKADPSFRAELK---	DRIKNALLS-----				
COX2B_Pf	-MDKIKSWLGF-NKKIVFTENKFLLRNVNDQ---	ESLQAENVRA-EDYPIPEK-----				
COX2B_Tp	MVKSLNPSTHFINQTPPQGILESILGNVYAEG--	PLLDSDLERSRERYPIPK-----				
Prim.cons.	MMDVFRS22N2I322222G222S23R3AE222TGEEL2S2LL3SR2K2P2PQKSGATLQN					
	70	80				
COX2B_Tg	-----YLDLDPDKIPTYYV					
COX2B_Nc	VAASDYVTPQKYLDLDPDKIPTYYV					
COX2B_Poly	-----KVPASQPIQYN					
COX2B_Chlamre	-----KVPASVPISYN					
COX2B_Pf	-----YLEDLDPDKIPKYYV					
COX2B_Tp	-----YLDNPELIPKYYS					
Prim.cons.	VAASDYVTPQKYLDLDPDKIP3YYV					

Figura 15. Alineamiento de las extensiones de la subunidad COX2B de apicomplejos (Tg, *Toxoplasma gondii.*, Nc, *Neospora caninum.*, Pf, *Plasmodium falciparum.*, Tha, *Theileria parva.*) y algas clorofíceas (Poly, *Polytomella sp.*, Chlr, *Chlamydomonas reinhardtii*).

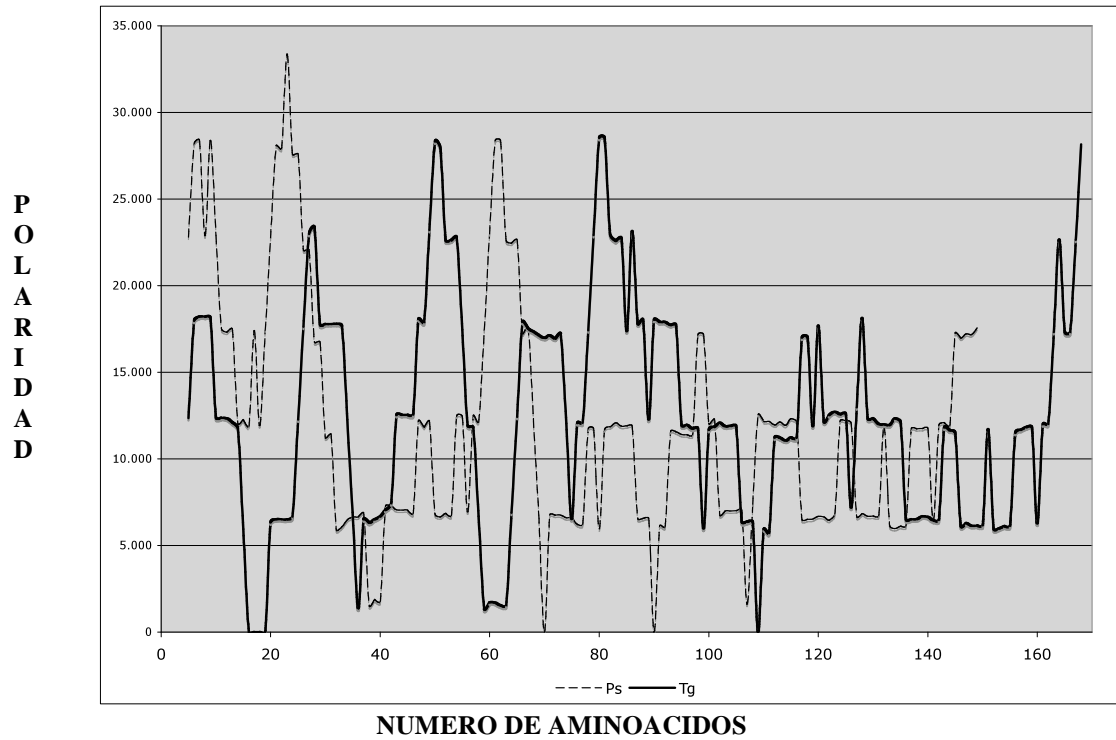
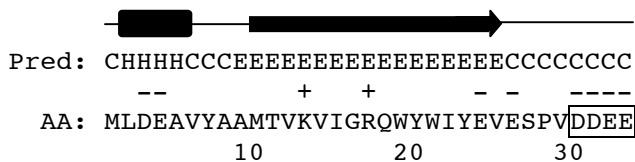


Figura 16. Gráfica de polaridad de las extensiones de la subunidad COX2B de *Polytomella sp* (Ps; línea punteada) y *Toxoplasma gondii* (Tg; línea continua). En el eje x se encuentra el número de aminoácidos empezando de izquierda a derecha por el N-terminal. En el eje y se encuentra la puntuación en la escala de polaridad.

4-Interacción entre las subunidades COX2A y COX2B de *Toxoplasma gondii*.

En un análisis de la estructura secundaria de la parte que clonamos de la subunidad COX2A (33 aminoácidos) observamos que la parte central de la secuencia corresponde a una estructura beta-plegada y que la secuencia tiene predominantemente cargas negativas. Incluso los cuatro aminoácidos del extremo C-terminal que son los pertenecientes a la extensión de COX2A están cargados negativamente. Con respecto a la extensión de COX2B observamos que se predicen varias hélices alfa y que la carga predominante de ésta extensión es positiva (Figura 17).

-COX2A C-terminal



-Extensión COX2B.

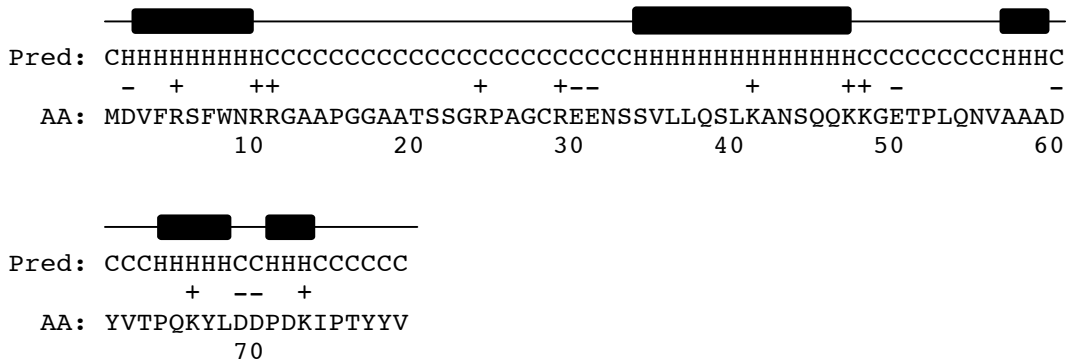


Figura 17. Predicción de estructura de las extensiones de las subunidades COX2A y COX2B de *T. gondii*. Los rectángulos negros corresponden a hélices tipo alfa y las flechas en color negro a hojas tipo beta. También se esquematizan los aminoácidos cargados positiva (+) y negativamente (-). Los aminoácidos encerrados en cuadro son los que corresponden a la extensión de COX2A.

Dado lo anterior podemos observar que posiblemente la parte que no corresponde en secuencia a la extensión de COX2A pero que tiene varias cargas negativas podría ser de importancia para su interacción con la extensión de COX2B.

5-Presecuencias mitocondriales de apicomplejos.

La subunidad COX2A de *Toxoplasma gondii* tiene una masa molecular de 23.8 kDa (Morales-Sainz y col. 2007). La masa de la proteína precursora es de 34.4 kDa tomando en cuenta la presecuencia mitocondrial que es de 174 aminoácidos. Observamos que al alinear la secuencia de la subunidad COX2A de *T. gondii* con la de *Neospora caninum* (otro apicomplejo) la identidad es del 60% (Figura 18). Incluso hay una gran similitud entre las presecuencias (sombreado en gris en la figura 28). Los 79 residuos del N-terminal (Met1-Lys79) de *T. gondii* no se encuentran en la presecuencia de *N. caninum*. Calculamos una masa molecular teórica de 25.8 kDa para la COX2A madura de *T. gondii* sin tomar en cuenta los 79 residuos. Esta masa molecular es cercana a la ya reportada. Posiblemente estos 79 residuos no se encuentran en la preproteína o son eliminados en el proceso.

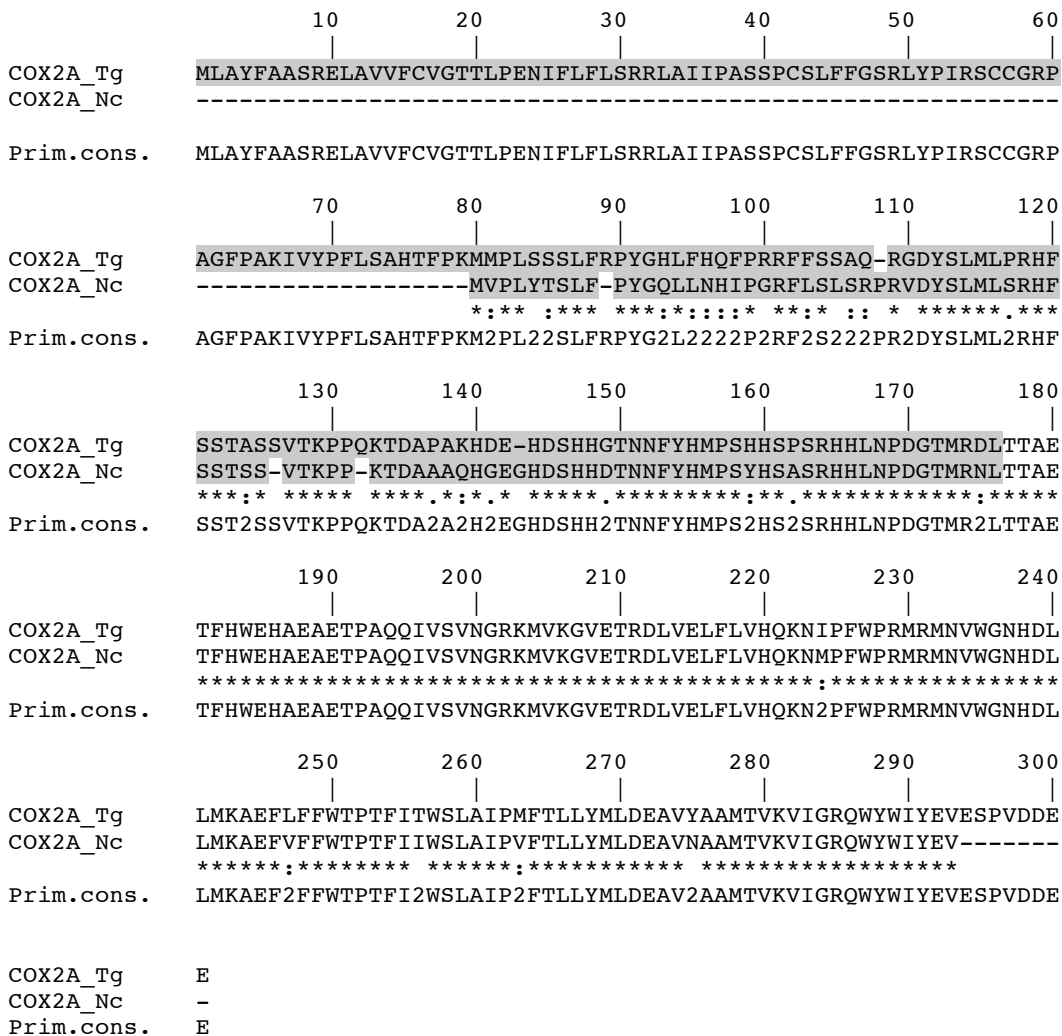


Figura 18. Alineamiento de la subunidad COX2A de *T. gondii* (COX2A_Tg) y *N. caninum* (COX2A_Nc). La parte sombreada corresponde a la presecuencia mitocondrial.

Para obtener un análisis más amplio sobre la presecuencia analizamos los 79 aminoácidos del N-terminal que solo se encuentran en la subunidad COX2A de *T. gondii* y que no se encuentran en la presecuencia de *N. caninum* (aminoácidos subrayados en la figura 19). Se intentó conocer si estos 79 aminoácidos se relacionan con presecuencias mitocondriales de apicomplejos utilizando un programa (PlasMit) específico para predicción de péptidos mitocondriales de *P. falciparum*. El programa predijo un 99% de probabilidad que estos 79 residuos no pertenecen a la mitocondria de *P. falciparum*, y los otros 96 aminoácidos de la presecuencia que si alinean con la de *N. caninum* analizados con el mismo programa predicen con un 91% de probabilidad que si pertenecen a mitocondria de *P. falciparum*.

Se llevó a cabo un análisis de estructura secundaria con la presecuencia completa de COX2A de *T. gondii* (174 aa). Se encontraron varias regiones que forman hélices tipo alfa (rectangulos negros de la figura 19). De particular interés fue una región alfa hélice que tiene varios residuos con carga positiva, lo cual es característico en presecuencias mitocondriales (Roise y col. 1988), dicha región se encuentra entre los residuos Ser84 y Gln107 (rectángulo en gris de la figura 19). Aunado a que esta región se encuentra dentro de la predicción de péptidos mitocondriales en el programa PlasMit, se propone como una presecuencia mitocondrial para COX2A de *T. gondii* a partir de la Met80 (parte de la secuencia no subrayada en la figura 19) con un sitio de corte predicho por el programa MITOPROT en Val126 (residuo encerrado en cuadro en la figura 19). Esto daría lugar a partir de Val126 como proteína madura a una masa molecular para la subunidad COX2A de 20.3 kDa, cercano al reportado por Morales y col. (23.8 kDa). Por lo tanto la presecuencia propuesta a partir de Met80 es eliminada al momento de internalizarse en la mitocondria en *T. gondii*, por lo que ya no se encontrarían en la proteína madura. Como a la fecha no ha sido posible secuenciar el extremo N-terminal de esta proteína, no conocemos todavía si nuestra hipótesis es correcta.

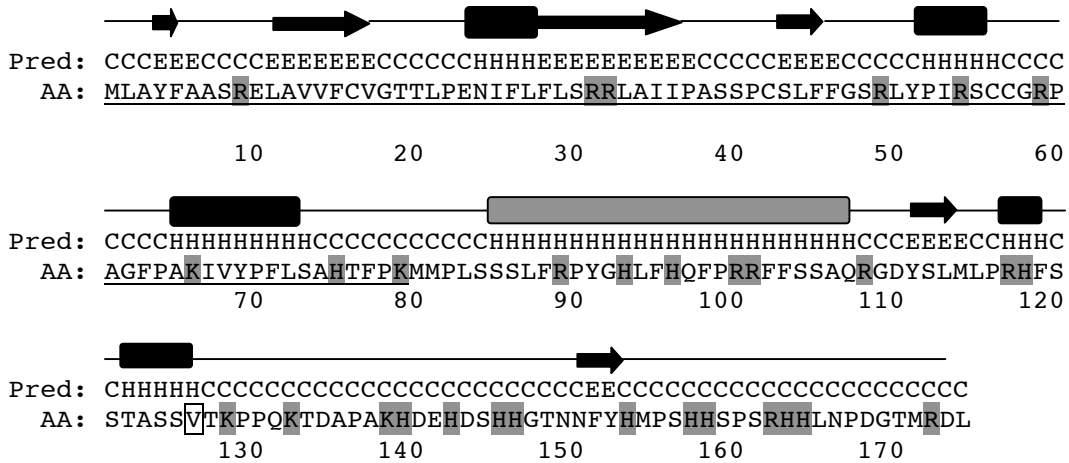


Figura 19. Predicción de estructura secundaria de la extensión COX2A de *T. gondii*. Las barras negras son las hélices tipo alfa, y las flechas las beta plegables. Los 79 aminoácidos subrayados son los que no aparecen en la secuencia de la extensión de COX2A de *N. caninum*. Los aminoácidos con carga positiva están sombreados en gris. (El sitio de corte fue predicho con el programa MITOPROT).

La región entre Met1-Lys79 podría formar también parte de la presecuencia, o incluso no traducirse en *T. gondii* tomando en cuenta la carencia de ésta en *N. caninum*, además de no presentar sitios de corte en la predicción.

Producción del anticuerpo anti-COX2B de *Toxoplasma gondii*.

6-Sobreexpresión de COX2B de *Toxoplasma gondii*.

Para obtener un anticuerpo anti-COX2B se amplificó el gen *cox2b* a partir de una biblioteca de cDNA de *T. gondii*, se clonó el gen en un vector de sobreexpresión (pQ-E30) que codifica a una etiqueta de histidinas, se sobreexpresó en un sistema bacteriano por cuatro horas con IPTG, se lisaron las bacterias y se purificó la proteína recombinante. La sobreexpresión se realizó en presencia de cobre pensando en que sería necesario para el sitio CuA propio de la parte hidrofóbica de la subunidad 2 (Figura 20).

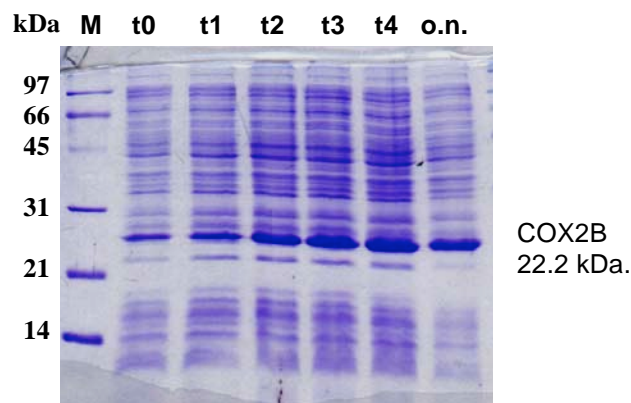


Figura 20. Gel de acrilamida del 12% que muestra los extractos crudos de la sobreexpresión de la proteína COX2B. Tiempos de una hora (t0 al t4), y el cultivo de toda la noche (o.n.).

Para detectar a la proteína COX2B sobreexpresada se utilizó un anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa (Figura 21).

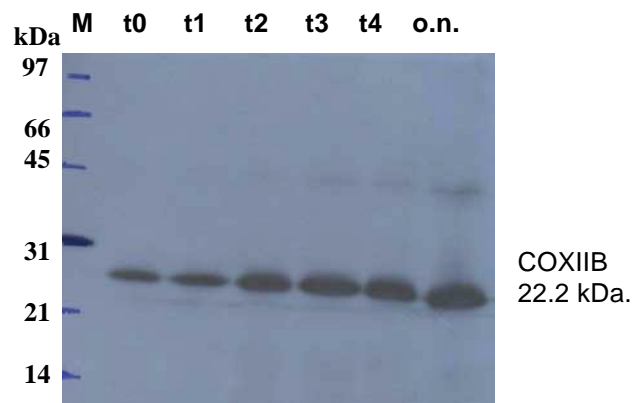


Figura 21. Placa radiográfica de una inmunoréplica tipo western de la sobreexpresión de COX2B. Tiempos de una hora (t0 al t4), el cultivo de toda la noche (o.n.). Detectado con peroxidasa acoplada a anticuerpo anti-histidinas y revelado por quimioluminiscencia.

Obtuvimos a la proteína en la fracción insoluble (Figura 22), probablemente en cuerpos de inclusión. Por lo tanto se trataron a las células lisadas con clorhidrato de guanidina para solubilizar a la proteína. La proteína se purificó en

una columna de níquel que por afinidad se une selectivamente a las histidinas extra. Posteriormente se cargó a la fracción enriquecida de la proteína en un gel de acrilamida (panel A de la figura 23) y se cortaron las bandas de la proteína COX2B directamente del gel, se maseraron y se inyectaron a un conejo para producir el anticuerpo anti-COX2B. Una vez obtenido el anticuerpo lo probamos contra la misma proteína recombinante por la técnica de inmunorélicas tipo western (panel B de la figura 23).

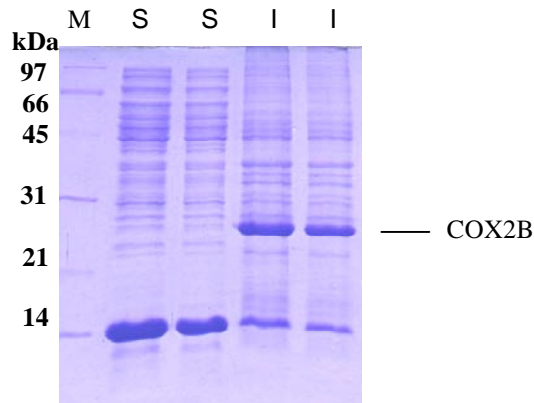


Figura 22. Gel de acrilamida del 12% donde se muestra la fracción soluble (S) y fracción insoluble (I). Se aprecia la COX2B en la fracción insoluble entre la banda de 21 y 31 kDa.

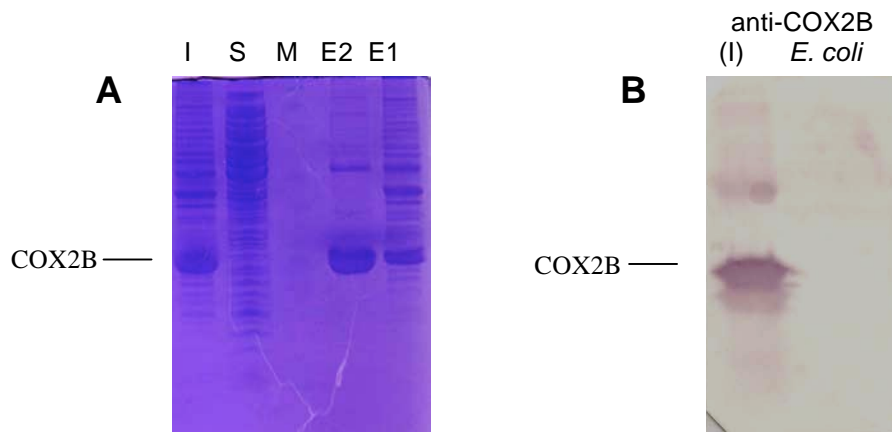


Figura 23. Panel A: gel de acrilamida del 12% donde se muestra la fracción soluble (S) e insoluble (I) del extracto crudo de la sobreexpresión de COX2B, el marcador (M) y la fracción del eluido 1 y 2 (E1, E2) de la purificación de COX2B en columna de afinidad a níquel. En E2 se aprecia la COX2B parcialmente pura. Panel B: Inmunoréplica tipo western mostrando la fracción insoluble (I) del extracto crudo de la sobreexpresión de COX2B marcada con el anticuerpo anti-COX2B, y en el segundo carril el extracto de la bacteria (*E. coli*) no transformada. En la fracción insoluble se aprecia una banda de mayor intensidad que corresponde a la reacción con el anticuerpo, y en el otro carril no se ve la marca del anticuerpo anti-COX2B cuando se utiliza *E. coli* no transformada como control.

6.1-Obtención de la proteína COX2B recombinante de *Toxoplasma gondii* en condiciones solubles.

Dado que la proteína COX2B se obtuvo en la fracción insoluble con las condiciones utilizadas, se procedió a hacer una variación en la temperatura de crecimiento de la bacteria y en la concentración de IPTG tratando de obtener a la proteína soluble. Se probaron diferentes temperaturas y concentraciones de IPTG (Tabla 2).

Temperatura	Concentración mM de IPTG				
37°C	0.1	0.3	0.5	0.8	1
30°C	0.1	0.3	0.5	0.8	1
28°C	0.1	0.3	0.5	0.8	1
25°C	0.1 *	0.3	0.5	0.8	1

Tabla 2. Se muestra en la columna izquierda las diferentes temperaturas de sobreexpresión y en las demás columnas las diferentes concentraciones de IPTG con las que se sobreexpresa la proteína COX2B. La condición en la que se obtuvo máxima sobreexpresión esta marcada con un asterisco.

La proteína COX2B se obtuvo nuevamente en la fracción insoluble utilizando una concentración muy baja de IPTG, diferente de la ya obtenida para generar el anticuerpo anti-COXIIB. Esta nueva condición tenía una concentración de 0.1 mM de IPTG y una temperatura de 25°C con un tiempo de inducción de 6 horas (figura 24).

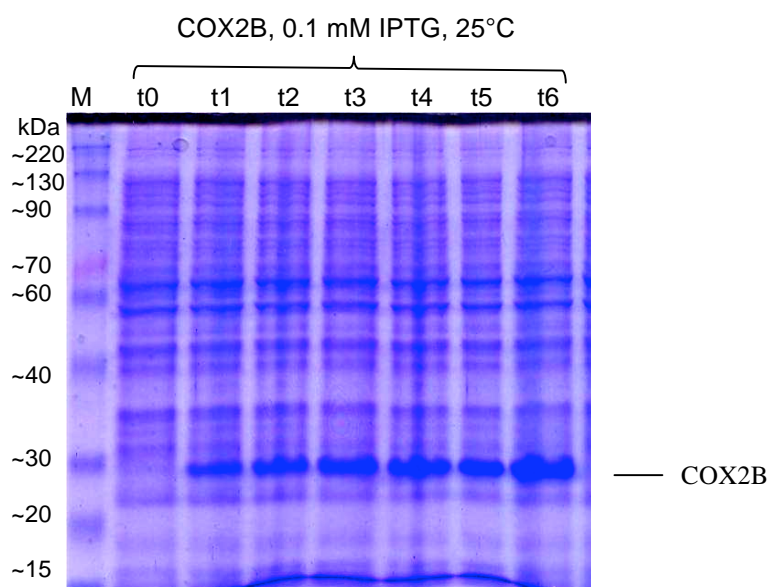


Figura 24. Gel de acrilamida del 12% donde se muestran las fracciones del extracto total de la lisis de bacterias de la sobreexpresión de COX2B a una menor concentración de IPTG. El nuevo parámetro se observa en la parte superior de la figura. Se observan los tiempos (t0-t6) con una hora de diferencia entre cada uno.

Dado que no se obtuvo a la proteína COX2B en condiciones solubles durante la sobreexpresión, se intentó purificar en presencia de clorhidrato de guanidina 6 M. Así que sobreexpresando a 25°C, con 0.1 mM de IPTG por un tiempo de 4 horas y solubilizando con 6 M de guanidina, se hizo diálisis hasta retirar la guanidina. Después de varios intentos para obtener a la proteína soluble obtuvimos una condición favorable, adicionando 0.5% de L-maltosido al amortiguador al momento de retirar la guanidina por diálisis (Figura 25).

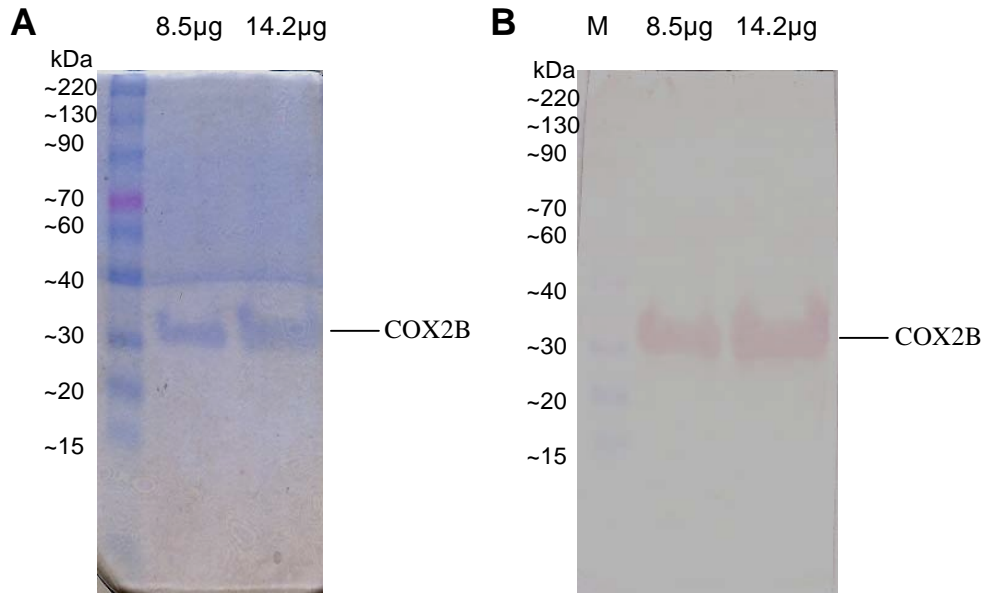


Figura 25. Panel A: Gel de acrilamida donde se muestra a la proteína COX2B pura y libre de guanidina. Panel B: Inmuno-réplica tipo western donde se muestran las bandas de reacción que corresponden al anticuerpo anti-COX2B detectando a la proteína COX2B. En ambos paneles se muestra en la parte superior las concentraciones de proteína por carril.

6.2-Obtención de la secuencia de la proteína COX2B recombinante de *T. gondii* por espectrometría de masas.

Con el fin de asegurar la expresión de la proteína deseada, se obtuvo la secuencia de COX2B recombinante de *T. gondii* por espectrometría de masas, la cual nos arrojó varios fragmentos (Figura 26).

///EENSSVLLQSLK

///YLDDPDK

///IPTYYVFQSNMVTDEDLLPGMLR

///FLITATDVIHSWAVPALGIK

MRGSHHHHHHGSDFRFRSFWNRRGAAPGGAATSSGRPAGCR///EENSSVLLQSLK///
ANSQQKKGETPLQNVAADYVTPQK///YLDDPDK///IPTYYVFQSNMVTDEDLLPGML
R///NLEVDKRLTLPTRTHIR///FLITATDVIHSWAVPALGIKADAIPGRLQRINTFIQREGV
GYGQCSELGALHGFMPIVIEAVSPETYAAHAKKWKD

Figura 26. Secuencia de COX2B recombinante de *T. gondii* obtenida por espectrometría de masas. Con tres líneas diagonales (///), subrayados se indican los fragmentos obtenidos.

7-Obtención de COX2A recombinante de *Toxoplasma gondii*.

La proteína COX2A de *T. gondii* corresponde a la parte hidrofóbica de una COX2 ortodoxa. La extensión del extremo C-terminal es muy corta, de tan solo solo cuatro aminoácidos, y en algas esta extensión es de 20 aminoácidos.

Amplificamos la parte del gen *cox2a* (Figura 27) que codifica los últimos 33 aminoácidos del extremo C-terminal de la subunidad COX2A, con el objeto de eliminar los dos cruces transmembranales y poder obtener una proteína soluble. Pensamos que parte de estos 33 aminoácidos que están fuera de dichos cruces son los que participan de manera importante en la interacción con la extensión de COX2B.

Clonamos la secuencia del gen COX2A correspondientes a los 33 aminoácidos del extremo C-terminal en un vector que contiene la secuencia de la proteína de fusión GST, sustituyendo así a los cruces transmembranales por la GST. La construcción resultó en una proteína quimérica con la GST en el extremo N-terminal y la extensión de COX2A en el extremo C-terminal (GST-COX2A). La expresión de la proteína le confiere solubilidad a toda la construcción y sirve también para poder purificar a la proteína quimérica GST-COX2A además de contar con un anticuerpo comercial (anti-GST) para poder inmunodetectarla.

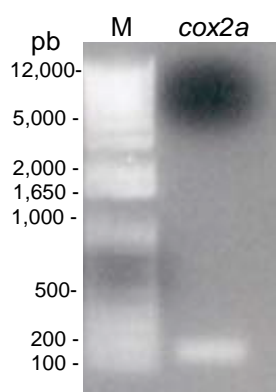


Figura 27. Gel de agarosa al 1% donde se muestra el gen *cox2a* amplificado por la técnica de la PCR. El gen corre a la altura de la banda del marcador de 100 pb.

Una vez que amplificamos el gen, lo sobreexpresamos y obtuvimos aproximadamente el 30% en la fracción soluble y el 70% en la fracción insoluble (Figura 28).

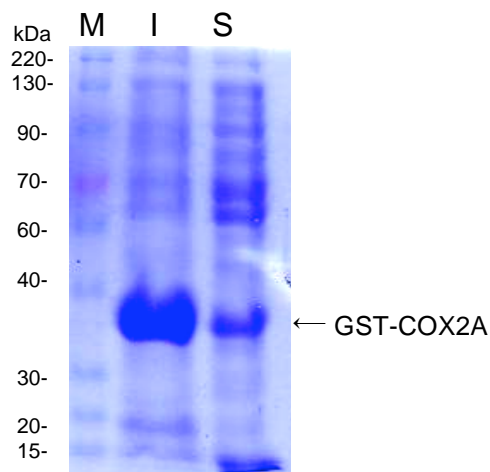


Figura 28. Gel de acrilamida al 12% que muestra la sobreexpresión de GST-COX2A. Marcador (M), fracción insoluble (I) y fracción soluble (S).

Después se inmunodetectó a la COX2A con el anticuerpo anti-GST en extractos totales (Figura 29).

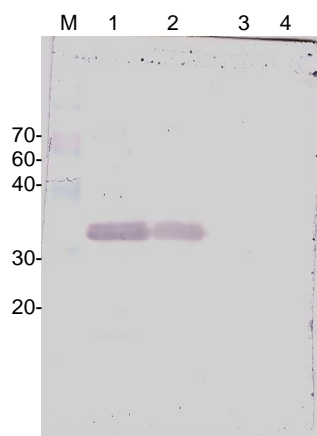


Figura 29. Inmunoréplica tipo western donde se muestran los extractos totales. Marcador (M), GST-COX2A con IPTG, GST-COX2A sin IPTG, XL1 Blue con IPTG, XL1 Blue sin IPTG.

Posteriormente se intentó purificar a la proteína a partir de la fracción soluble, pero se encontró que la proteína quimérica recombinante no se une a la columna de glutatión. En contraste la GST sin la parte de COX2A en las mismas condiciones se une a la columna y se puede purificar satisfactoriamente. Pensamos que el inserto de 33 aminoácidos de COX2A interfiere con la GST evitando unirse a la columna de glutatión.

Se probaron varias condiciones para purificar a la proteína GST-COX2A. Se intentó purificar a la proteína en condiciones desnaturizantes con diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina desde 6M hasta 3M y 2M sin obtener una fracción pura. Se purificó a la GST a una concentración de 1M de guanidina pero la eficiencia de purificación disminuye aproximadamente en un 90%, hicimos lo mismo para GST-COX2A sin obtener proteína pura. Se intentó purificar a la proteína en presencia de la resina de glutatión-agarosa y 6M de

guanidina y dializar hasta retirar la guanidina, esto mismo se repitió con resina de otra marca sin obtener resultados favorables. También probamos solubilizar a la proteína con 1% de Tritón X-100 y L-maltósido al 0.3% por separado tratando de darle cierta flexibilidad a la proteína y que pudiera unirse a su ligando en la resina sin obtener proteína pura. De manera general en estos intentos la proteína se agregaba impidiendo la purificación, y en otros casos simplemente no se unía a la columna. En otro intento para obtener proteína COX2A pura clonamos el mismo gen COX2A en otro vector de la misma serie pGEX, el 2T, el cual tiene los mismos sitios de restricción con un sitio múltiple de clonación más reducido a diferencia del 4T tratando de evitar parte de la región del sitio múltiple de clonación que se traduce, pensando en que esto pudiera ayudar a la estructura de la construcción GST-COX2A al momento de traducirse y poder purificarla. Dicha nueva construcción la sobreexpresamos en las mismas condiciones que la anterior construcción, y utilizamos la parte soluble (30% aproximadamente) pero tampoco obtuvimos una fracción pura. Con esta misma construcción tomamos la fracción insoluble que es de aproximadamente el 70% y la solubilizamos con 6M de guanidina y la dializamos hasta quitar la guanidina en presencia de 0.5% de L-maltósido. A diferencia de otros intentos, la proteína no se precipitó teniendo así una fracción solubilizada libre de guanidina. Sin embargo esta proteína tampoco se unió a la columna de glutatión.

Después de varios intentos tratando de purificar a la GST-COX2A decidimos hacer ensayos de interacción con el extracto total de ésta y con COX2B ya purificada y en condiciones solubles.

7.1-Sobreexpresión y purificación de GST.

Sobreexpresamos a la GST para utilizarla como control. También de esta proteína aproximadamente el 70% es insoluble y el 30% soluble. Utilizamos la fracción soluble para purificar la proteína en una columna de afinidad que contiene glutatión reducido (Figura 30).

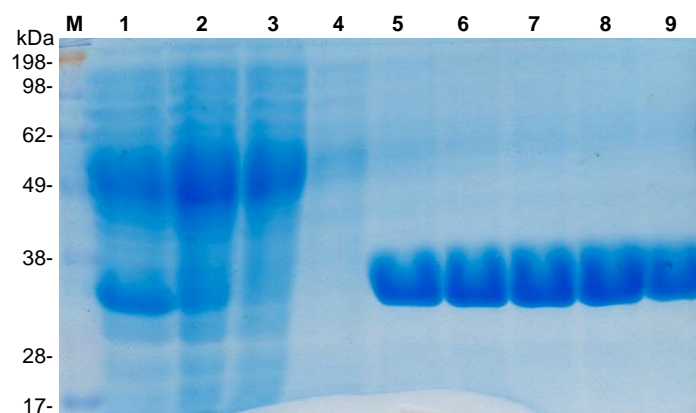


Figura 30. Gel de acrilamida al 12% donde se muestra la purificación de GST. Marcador (M). Extracto total (1), sobrenadante que no se pega a la resina (2), Lavados con PBS (3-4) y elución con 10 mM de glutatión reducido (5-9).

8-Interacción de COX2B con COX2A.

Para los ensayos de interacción se utilizó a la proteína COX2B pura en condiciones solubles después de tratarla con clorhidrato de guanidina. De la proteína GST-COX2A se utilizó la fracción soluble del extracto total, y para mostrar que la unión es específica se utilizó la proteína GST de extractos totales.

Se colocó a las proteínas GST y GST-COX2A en las mismas condiciones que la COX2B, en 0.5% de L-maltósido y en amortiguador de fosfatos. Y pensando en que la extensión de COX2A interfiere con el sitio activo de la GST, al medio se le adicionó una concentración elevada (20 mM) de glutatión reducido para saturar el sitio activo de la GST-COX2A y posiblemente liberar y proveerle cierta flexibilidad a la extensión de COX2A y facilitar su interacción con COX2B. Se incubó a la proteína COX2B con GST-COX2A y como control se incubó a la proteína COX2B con GST. Posteriormente los extractos totales se cargaron a una columna de Ni-sefarosa para unir a la proteína COX2B, después se lavó la columna con una solución de lavado (L1-L3 de la figura 31), y luego se eluyó a diferentes concentraciones de imidazol (E1-E9 de la figura 31). Si existiera interacción entre las proteínas COX2B y GST-COX2A deberían eluir en la misma fracción mientras que en el control solo debería eluir COX2B. Las fracciones obtenidas se corrieron en un gel desnaturalizante de Laemmli, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se marcó primero con el anticuerpo anti-GST. Para marcar con el anticuerpo anti-COX2B se utilizaron las mismas membranas, y para esto se lavarón con una solución de remoción para poder reutilizar dichas membranas, posteriormente se trataron a las membranas de manera usual para poder incubar el anticuerpo anti-COX2B. Esto con la intención de apreciar en la misma membrana la presencia o ausencia en una misma fracción a las dos proteínas identificadas con los dos diferentes anticuerpos, y debido a que es un gel desnaturalizante veríamos en distinto peso a las proteínas pero de haber interacción aparecerían en una misma fracción. Sugiriendo así la interacción entre ambas subunidades COX2A y COX2B.

Lo anterior se puede apreciar en la figura 31. En el panel A se observa la marca con el anticuerpo anti-GST localizando a la proteína GST-COX2A en las fracciones de eluido E3 y E4, en la misma membrana se detecta a la proteína COX2B con el anticuerpo anti-COX2B (panel B de la figura 31), la fracción E4 es la de mayor concentración de imidazol y en esta fracción coinciden la presencia de COX2A y COX2B quiméricas. En el control se obtuvo a la proteína GST en la fracción E1 y E2 (panel C de la figura 31) que contienen una baja concentración de imidazol y poca presencia de COX2B, y en las fracciones donde es más abundante la proteína COX2B la proteína GST ya no aparece (panel D de la figura 31).

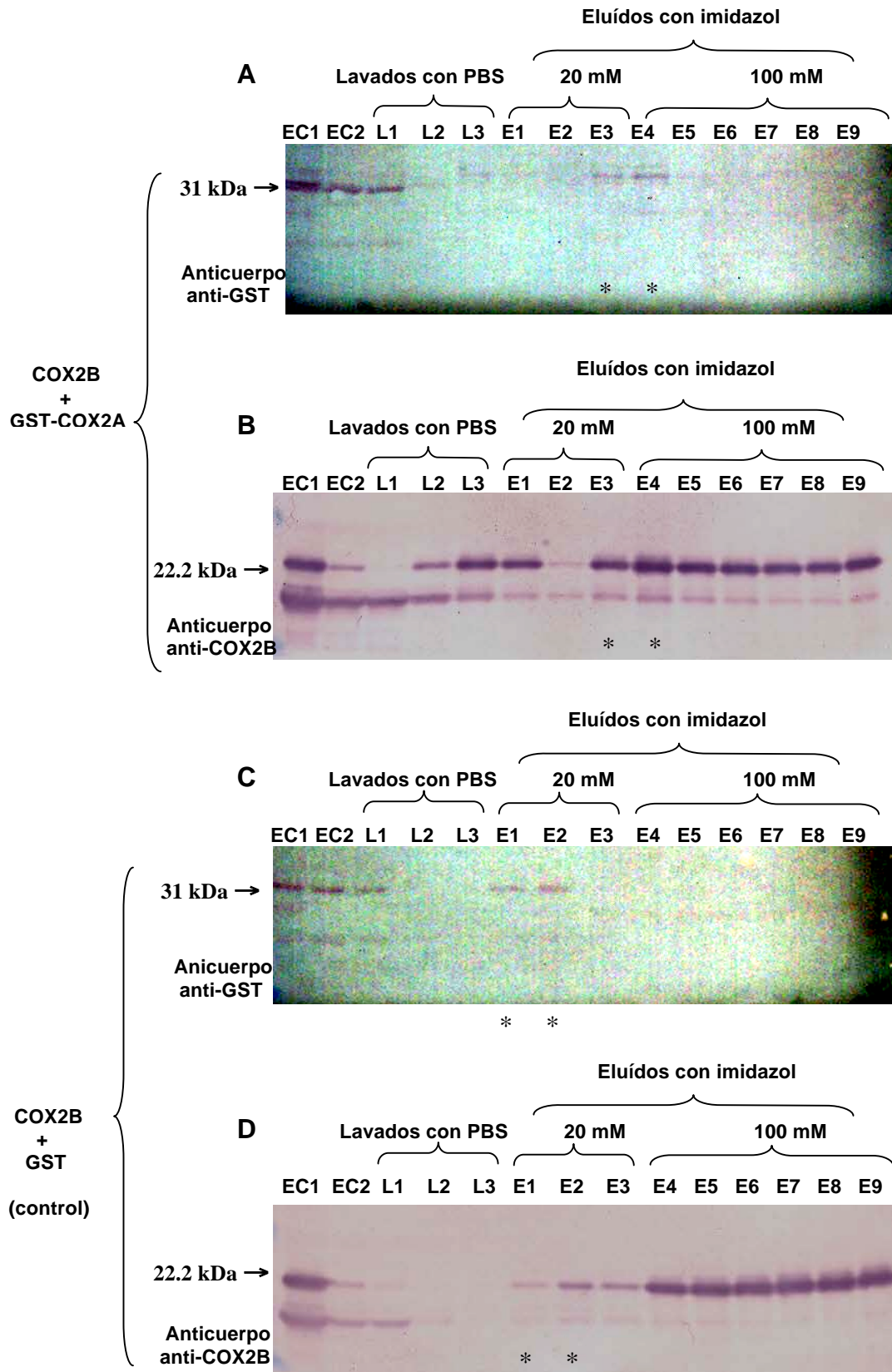


Figura 31. Inmunoréplica tipo western donde se muestra la interacción entre COX2B con GST-COX2A y COX2B con GST, purificadas en columna de Ni-sefarosa. En las figuras se observa el extracto total (EC1), el extracto después de pasar por la columna (EC2), los lavados (L1-L3) y los eluidos a diferentes concentraciones de imidazol (E1-E9). Los asteriscos señalan la fracción en que se encuentran GST y COX2A al mismo tiempo que COX2B. Se colocó el anti-GST primero y se reutilizó la membrana para colocar el anti-COX2B.

DISCUSIÓN

Los parásitos apicomplejos como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* adquirieron por un proceso endosimbiótico con una alga verde o roja un organelo llamado plástido, el cual se conoce como apicoplasto (Wilson y col., 1996. Kohler y col., 1997). Al encontrarse el gen *cox2* fragmentado en algas clorofíceas y posteriormente en apicomplejos (Pérez-Martínez y col., 2001. Funes y col., 2002), se propuso que los genes *cox2* migraron del genoma del eucariote endosimbionte ancestral de un alga verde, al genoma del hospedero, un ancestro apicomplejo. Estos genes fragmentados de origen clorofita reemplazaron al gen *cox2* mitocondrial del apicomplejo. Por lo mismo, se propuso que el ancestro que dio origen al apicoplasto fue un alga de la clase clorofícea.

En este trabajo, encontramos más genes fragmentados *cox2a* y *cox2b* en la base de datos (NCBI), tanto en algas clorofíceas, como en apicomplejos y dinoflagelados. Estos dos últimos pertenecen al grupo de los alveolados. Lo anterior apoya la idea de que la migración de los genes fragmentados de algas a apicomplejos y dinoflagelados sucedió como un evento de transferencia horizontal. De manera más reciente se encontró a un microorganismo llamado *Chromera velia* con características ultraestructurales de un alveolado y filogenéticamente relacionado con apicomplejos, que además cuenta con un plástido fotosintético (Moore y col. 2008). Sería interesante saber si este organismo también cuenta con genes *cox2* fragmentados.

La búsqueda de estos genes en la base de datos presupone que los productos peptídicos correspondientes se encuentran presentes de manera física en las mitocondrias de dichos organismos y que no son solo vestigios genéticos. La única evidencia bioquímica de que las subunidades COX2A y COX2B están presentes en la mitocondria se ha realizado en estas algas verdes (Pérez-Martínez y col., 2001) y muy recientemente en el apicomplejo *T. gondii* (Morales Sainz y col. 2008). Se sabe de presencia de proteínas COX2 heterodiméricas tanto en las algas como en *T. gondii* (Pérez-Martínez y col., 2001; Morales Sainz y col. 2008). Lo que no se sabe es como es que se estabiliza estructuralmente el heterodímero de COX2A y COX2B para que sea funcional. En el caso de COX2A de algas se conocen los aminoácidos que forman la presecuencia mitocondrial, ya que se han secuenciado las proteínas maduras. Sin embargo en el caso de *T. gondii* no se ha podido secuenciar el extremo N-terminal de la proteína COX2A madura, por lo tanto se desconoce como es que se procesa su presecuencia (Morales Sainz y col. 2008).

Para complementar este trabajo se realizó un análisis *in silico* que nos ha permitido observar que la presecuencia de COX2A en *T. gondii* es de mayor longitud con respecto a las de algas y a las de los otros apicomplejos. En este trabajo predecimos un sitio de corte para la presecuencia de COX2A de *T. gondii*, el cual nos da una masa molecular de la proteína madura aproximada a la observada en mitocondrias de *T. gondii*. Esto podría ser confirmado cuando se obtenga la secuencia del extremo N-terminal de la proteína COX2A de *T. gondii*.

Continuando con el análisis *in silico* observamos que la extensión C-terminal de COX2A de las algas es relativamente grande, mientras que en los apicomplejos es muy corta o incluso nula (4 a 5 residuos únicamente). Por otra parte, la extensión N-terminal de COX2B es de mayor tamaño en *T. gondii* con respecto a la de otros apicomplejos y a las algas. Esto nos hace suponer que la extensión de COX2B juega un papel importante en la interacción entre COX2A y COX2B. Al alinear la extensión de COX2B de *T. gondii* con la de *Polytomella* sp. observamos que la similitud es baja, pero que comparten gráficas de polaridad muy parecidas, implicando una función similar en ambas. La extensión de COX2A en *T. gondii* es de cuatro aminoácidos, muy corta, sin embargo contiene varias cargas negativas que pudieran ser importantes para la interacción entre las dos subunidades. También analizamos la estructura secundaria de los 33 aminoácidos que utilizamos para hacer la construcción GST-COX2A de *T. gondii* y observamos la presencia de varios residuos cargados y la presencia de una región beta-plegada. Esta región está presente después del cruce transmembranal, por lo que estaría expuesta hacia el espacio intermembranal mitocondrial. Pensamos que también podría participar en la interacción con la subunidad COX2B.

Por otro lado la obtención del anticuerpo anti-COX2B de *T. gondii* fue importante para poder inmunodetectar a la proteína recombinante COX2B en un trabajo relacionado con éste. Sin embargo, para los ensayos de interacción *in vitro* necesitábamos una proteína recombinante soluble y estructuralmente estable. La proteína sobreexpresada se localizó consistentemente en cuerpos de inclusión, y fue necesario utilizar clorhidrato de guanidina para solubilizarla. Logramos eliminar la guanidina de la proteína COX2B pura y tenerla en condiciones solubles para los ensayos de interacción. Cabe señalar que una proteína que ha sido desnaturalizada con guanidina no necesariamente conserva el mismo plegamiento de su contraparte nativa (Singh y Panda 2005).

Con respecto a la proteína quimérica GST-COX2A, a pesar de sobreexpresarse parcialmente en los sobrenadantes, fue imposible de purificar. Hipotetizamos que la adición del fragmento de la proteína COX2A bloquea el sitio de interacción de la enzima con el glutatión. Por lo tanto decidimos utilizar el extracto crudo de GST-COX2A para los ensayos de interacción. Nuestra estrategia fue incubar a las proteínas COX2B y GST-COX2A, permitir su posible interacción, y purificarlas uniendo a la proteína COX2B a una columna de afinidad con níquel. Después, detectamos a las proteínas en los eluidos con sus respectivos anticuerpos. Observamos que COX2B y GST-COX2A migran juntas en la misma fracción donde se eluye con la máxima concentración de imidazol, sugiriendo una posible interacción entre ambas. Para los controles utilizamos ensayos de interacción entre COX2B y GST donde la única diferencia fue la presencia de GST recombinante, sin la extensión correspondiente a COX2A. Ahí observamos que en la fracción que eluye con mayor concentración de imidazol se encuentra únicamente a la subunidad COX2B. Este ensayo tiene varias consideraciones, por un lado la proteína COX2B reconstituída después de eliminar la guanidina puede no conservar su estructura nativa (Kohono y col. 1990). Otro factor es el posible impedimento estérico de la etiqueta de histidinas que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína COX2B.

Además la utilización de extractos crudos de GST-COX2A y GST resulta en una probabilidad más elevada de interacciones inespecíficas (Singh y Panda 2005).

Existen varias alternativas para darle continuidad a este trabajo. Una de ellas sería sobreexpresar las proteínas en un sistema eucariote, que permita la expresión de proteínas en el medio soluble como por ejemplo, utilizando sistemas de expresión en levadura, como *Pichia pastoris* o *Kluyveromyces lactis* (Li y col. 2007., Fleer y col. 1991). Otra posibilidad es utilizar el sistema TAP (del inglés tandem affinity purification) que permite la purificación de proteínas que se encuentran interaccionando (Puig y col., 2001). Otra modificación que podría hacerse en un futuro, es la de incluir un brazo flexible formado con residuos extras entre la proteína GST y la extensión de COX2A. También podría seguirse intentando sistemas de sobreexpresión bacterianos utilizando como vehículo una proteína mas soluble que GST, como por ejemplo los vectores de la serie pET (Edgerton y col. 2000). Otra opción para descartar una interacción inespecífica sería obtener una construcción de COX2B con la etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal. Y también contemplar como control una proteína diferente a GST.

CONCLUSIONES

Se logró expresar la proteína recombinante COX2B de *T. gondii* y generar anticuerpos convencionales contra ella. Dicho anticuerpos fueron utilizados para identificar la subunidad nativa en el parásito.

Se logró expresar a un fragmento de la proteína COX2A de *T. gondii* unida a la proteína GST.

La proteína recombinante GST-COX2A no pudo purificarse por métodos convencionales, probablemente porque el fragmento de COX2A impide estéricamente la unión de glutatión al sitio activo de GST.

Experimentos de unión entre las proteínas GST-COX2A y COX2B, sugieren una posible interacción entre ellas.

El plegamiento correcto de las proteínas COX2A y COX2B probablemente juega un papel fundamental para la interacción entre ambas subunidades.

El uso de herramientas *in silico* fue útil como un complemento al conocimiento de las proteínas COX2A y COX2B en diversos parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramson J., Svensson-Ek M., Byrne B. and Iwata S. (2001) Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544,1-9.
- Belevich I. and Verkhovsky M. I. (2008) Molecular Mechanism of Proton Translocation by Cytochrome c Oxidase. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1-29.
- Black M. and Boothroyd J. (2000) Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 607-623.
- Boekema E.J. and Braun H.P. (2007) Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 1-4.
- Bohnert M., Pfanner N. and van der Laan M. (2007) A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581, 2802-2810.
- Carr H. S. and Winge D. R. (2003) Assembly of Cytochrome c Oxidase within the Mitochondrion. *Accounts of Chemical Research*, 36, 309-316.
- Crofts A. R. (2004) The cytochrome bc₁ complex: Function in the Context of Structure. *Annu. Rev. Physiol*, 66, 689–733.
- Dubey. J.P. (2004) Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126, 57–72.
- Dzierszynski, F., Nishi, M., Ouko, L. and Roos, D.S. (2004) Dynamics of *Toxoplasma gondii* Differentiation. *Eukaryotic Cell*, 3, 992–1003.
- Edgerton M.D., Lars-Ole G., Boesen T.P. and Allet B. (2000) Expression of Chemokines in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, 138, 33-40.
- Fleer R, Chen XJ, Amellal N, Yeh P, Fournier A, Guinet F, Gault N, Faucher D, Folliard F, Fukuhara H, et al. (1991) High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, 107, 285-295.
- Fontanesi F., Soto I.C., Horn D. and Barrientos A. (2006) Assembly of mitochondrial cytochrome c oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal of Physiology Cell physiology*, 291, 1129-1147.
- Freund, J. and McDermott, K. (1942). Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 49, 548-553.
- Funes S, Davidson E., Reyes-Prieto A., Magallón S., Herion P., King M.P. and González-Halphen D. (2002) A Green Algal Apicoplast Ancestro. *Science*, 298, 2155.
- Frey T.G. and Mannella C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25,319-24.
- Hawkes R., Niday E. And Gordon J. (1981) A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry*, 119, 142-147.
- Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B. and Michel H. (1995) Structure at 2,8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376, 660-669.
- Kelly M., Lappalainen P., Talbo G., Haltia T., van der Oost J., and Saraste M. (1993) Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a

- binuclear purple copper center. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 16781-16787.
- Kohono T., Carmichael D.F., Sommer A. and Thompson R.C. (1990) Refolding of recombinant proteins. *Methods in Enzymology*, 185, 187-195.
- Köhler S., Delwiche C.F., Denny P.W., Tilney L.G., Webster P., Wilson R.J., Palmer J.D. and Roos D.S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, 275, 1485-1489.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685.
- Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142, 105-124.
- Logan D.C. (2006) The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1225–1243.
- Maneg O., Malatesta F., Ludwig B. and Drosou V. (2004) Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1655, 274-281.
- Morales-Sainz L., Escobar-Ramírez A., Cruz-Torres V., Reyes-Prieto A., Vázquez-Acevedo M., Lara-Martínez R., Jiménez-García L.F. and González-Halphen D. (2008) The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777, 202–210.
- Moore R. B., Oborník M., Janouskovec J., Chrudimsky T., Vancova M., Green D. H., Wright S. W., Davies N. W., Bolch Ch. J. S., Heimann K., Slapeta J, Hoegh-Guldberg O., Logsdon J. M. and Carter D. A. (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature*, 452, 959-963.
- Pérez-Martínez X., Antaramian A., Vázquez-Acevedo M., Funes S., Tolkunova E., d'Alayer J., Claros M.G., Davidson E., King M.P. and González-Halphen D. (2001) Subunit II of Cytochrome c Oxidase in Chlamydomonad Algae Is a Heterodimer Encoded by Two Independent Nuclear Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 11302–11309.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M. and Séraphin B. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*, 24, 218-229.
- Rehling P., Pfanner N. and Meisinger C. (2003) Insertion of Hydrophobic Membrane Proteins into the Inner Mitochondrial Membrane—A Guided Tour. *Journal of Molecular Biology*, 326, 639–657.
- Roise D., Theiler F., Horvath S.J., Tomich J.M., Richards J. H., Allison D.S. and Schatz G. (1988) Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO Journal*, 3, 649-653.
- Sazanov L.A. (2007) Respiratory Complex I: Mechanistic and Structural Insights Provided by the Crystal Structure of the Hydrophilic Domain. *Biochemistry*, 46, 2275-2288.
- Singh S.M. and Panda A. K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 303-310.
- Stanicová J., Sedlák E., Musatov A. and Robinson N.C. (2007) Differential Stability of Dimeric and Monomeric Cytochrome c Oxidase Exposed to Elevated Hydrostatic Pressure. *Biochemistry*, 46, 7146-7152.
- Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M. and Rao Z. (2005)

Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, 121, 1043–1057.

-Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 4350-4354.

-Vercesi A.E., Rodrigues C.O., Uyemura S.A., Zhong L. and Silvia N. J. Moreno S.N.J. (1998) Respiration and Oxidative Phosphorylation in the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 31040–31047.

-Wilson R.J., Denny P.W., Preiser P.R., Rangachari K., Roberts K., Roy A., Whyte A., Strath M., Moore D.J., Moore P.W. and Williamson D.H. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology*, 261, 155-172.

APÉNDICE

The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*

The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase of *Toxoplasma gondii*

Lorena Morales-Sainz^{a,1}, Adelma Escobar-Ramírez^{a,1}, Valentín Cruz-Torres^a,
Adrián Reyes-Prieto^a, Miriam Vázquez-Acevedo^a, Reyna Lara-Martínez^b,
Luis Felipe Jiménez-García^b, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México

^b Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Received 21 August 2007; received in revised form 6 October 2007; accepted 18 October 2007

Available online 5 November 2007

Abstract

Two genes encoding cytochrome *c* oxidase subunits, *Cox2a* and *Cox2b*, are present in the nuclear genomes of apicomplexan parasites and show sequence similarity to corresponding genes in chlorophycean algae. We explored the presence of COX2A and COX2B subunits in the cytochrome *c* oxidase of *Toxoplasma gondii*. Antibodies were raised against a synthetic peptide containing a 14-residue fragment of the COX2A polypeptide and against a hexa-histidine-tagged recombinant COX2B protein. Two distinct immunochemical stainings localized the COX2A and COX2B proteins in the parasite's mitochondria. A mitochondria-enriched fraction exhibited cyanide-sensitive oxygen uptake in the presence of succinate. *T. gondii* mitochondria were solubilized and subjected to Blue Native Electrophoresis followed by second dimension electrophoresis. Selected protein spots from the 2D gels were subjected to mass spectrometry analysis and polypeptides of mitochondrial complexes III, IV and V were identified. Subunits COX2A and COX2B were detected immunochemically and found to co-migrate with complex IV; therefore, they are subunits of the parasite's cytochrome *c* oxidase. The apparent molecular mass of the *T. gondii* mature COX2A subunit differs from that of the chlorophycean alga *Polytomella* sp. The data suggest that during its biogenesis, the mitochondrial targeting sequence of the apicomplexan COX2A precursor protein may be processed differently than the one from its algal counterpart.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Cytochrome *c* oxidase; COX2A subunit; COX2B subunit; Fragmented *cox2* gene; Apicomplexan parasite

1. Introduction

Mitochondrial cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1), or complex IV, the terminal component of the respiratory chain, transfers electrons from reduced cytochrome *c* to oxygen. This reaction is coupled to proton translocation from the matrix to the intermembrane space [1,2]. Cytochrome *c* oxidase is an oligomeric membrane protein complex of 10–13 subunits that contains four redox centers: a binuclear Cu_A, heme *a*, heme *a*₃

and Cu_B [3]. In the majority of eukaryotes, the three largest subunits of cytochrome *c* oxidase, COX1, COX2 and COX3, are encoded by the corresponding *cox1*, *cox2* and *cox3* genes of the mitochondrial genome [4]. In chlorophycean algae, i.e., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carterii* and *Polytomella* sp., the *cox2* gene is fragmented in two distinct genes, *Cox2a* and *Cox2b*, located in different chromosomes of the nuclear genome [5–8]. The *Cox2a* gene encodes subunit COX2A, homologous to the amino terminal half of a typical one-polypeptide COX2, while the *Cox2b* gene encodes subunit COX2B, equivalent to the C-terminal half of an orthodox COX2. Fragmented COX2 subunits contain unique amino acid extensions: a C-terminal extension in COX2A and a N-terminal extension in COX2B, which are thought to stabilize the interaction between both polypeptides [5]. In addition, the COX2A precursor protein

Abbreviations: CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56225620; fax: +52 55 56225611.

E-mail address: dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

¹ These authors contributed equally to this work.

contains a long mitochondrial targeting sequence (MTS) of 130 residues [5]. The non-covalent assembly of the COX2A and COX2B subunits in the inner mitochondrial membrane gives rise to a heterodimeric COX2 subunit in green algal cytochrome *c* oxidase. *Cox2a* and *Cox2b* genes are also present in the nuclear genome of two taxa of alveolates (protists with a layer of flattened vesicles): apicomplexan parasites (named for their distinctly polarized cell apex) [7,9] and dinoflagellates (flagellated, often photosynthetic protists) [10]. These findings correlate with the fact that all mitochondrial genomes of apicomplexan parasites characterized to date contain only the cytochrome oxidase encoding genes *cox1* and *cox3*, while the *cox2* gene is invariably absent [11]. The presence of COX2A and COX2B subunits in the cytochrome *c* oxidase of chlorophycean has been well documented [5,12,13], but the presence of equivalent subunits in apicomplexan parasites has not been ascertained. Here, we explore the presence of COX2A and COX2B subunits in the mitochondrion of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis. Using different microscopy techniques, we immunolocalized the COX2A and COX2B subunits in *T. gondii* mitochondria. We also describe the isolation of a mitochondria-enriched fraction from the parasite and the resolution of its protein components by Blue Native Electrophoresis (BNE), and provide immunochemical evidence for the association of COX2A and COX2B subunits with *T. gondii* cytochrome *c* oxidase. The data also suggest that the apicomplexan parasite COX2A precursor protein may be processed differently during its biogenesis as compared to its chlorophycean algal counterpart.

2. Materials and methods

2.1. Strains and cultures

T. gondii tachyzoites were cultured as previously reported [14]. Tachyzoites are the stage of the parasite that rapidly multiplies in any cell of the intermediate host and in nonintestinal epithelial cells of the definitive host. Nine-week old female mice (strain Balb/c) were inoculated intraperitoneally with 1×10^6 *T. gondii* tachyzoites strain RH in sterile PBS (pH 7.2). The parasites were recovered four days post-infection from peritoneal exudates. Exudates were passed through needles of different calibers to eliminate contaminating cells, and centrifuged at 1200 \times g for 10 min. The supernatant was filtered through a polycarbonate filter (pore diameter of 5 μ m) and centrifuged again at 2400 \times g for 10 min. Freshly harvested tachyzoites were used for microscopy studies. Otherwise, they were resuspended in a small volume of PBS and stored at -70 °C until used.

2.2. Transmission electron microscopy

T. gondii tachyzoites (10×10^6 cells) were fixed with 2.5 glutaraldehyde in PBS (pH 7.2) for 2 h at 4 °C, and washed three times with PBS by centrifugation at 2400 \times g in a table-top centrifuge. The parasite cells were post-fixed with 1% osmium tetroxide. Dehydration was carried out at room temperature in a graded series of ethanol at a concentration from 40 to 100% (v/v) in 10% increments. Then, samples were placed two times during 15 min each in propylene oxide. Pre-embedding in 1:1 propylene oxide-epoxy resin was conducted overnight. Thin sections (50 to 60 nm thick) were cut with an ultramicrotome (Leica Ultracut R) and placed onto formvar-coated 200 mesh copper grids. Grids were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEOL 1200 EX II transmission electron microscope operating at 80 kV.

2.3. Antibody production against COX2A subunit

The sequence of *T. gondii* COX2A subunit (accession numbers AAO27883 and AF503914) [15] was analyzed for possible antigenic sites at the Molecular Immunology Foundation Homepage (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>) following the semi-empirical method for prediction of antigenic determinants of Kolaskar and Tongaonkar [16]. The 14-residue antigenic determinant ETRDLVELFLVHQK was chosen. An extra cysteine was added to the N-terminus of this peptide to allow crosslinking with malimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester to a protein carrier for antibody production. Peptide synthesis and coupling to keyhole limpet hemocyanin was carried out by NeoMPS (San Diego, CA). The coupled peptide was then used to raise antibodies in rabbits.

2.4. COX2B overexpression and antibody production

Primers were designed based on the sequence of the *Cox2b* gene (accession numbers AAO27882 and AF499004) [15]: 5'-CGC GGA TCC GAT GTT TTC CGG TCC TTC TGG AAC-3' and 5'-CGG GGT ACC TCA GTC TTT GTA CCA CTT CTT TGC-3'. Underlined are the added *Bam*III and *Kpn*I restriction sites included to facilitate cloning. A cDNA library of *T. gondii* was the template for PCR amplification with *Taq* polymerase [15]. The 560-bp product was cloned into the restriction sites *Bam*III and *Kpn*I of the pQE30 vector (Qiagen) and the COX2B protein of 23.8 kDa containing a six-residue histidine tag at the N-terminus was overexpressed in an *Escherichia coli* XL1 blue strain in the presence of 1 mM IPTG (37 °C for 4 h). The overexpressed polypeptide, which was mainly found in inclusion bodies, was extracted in the presence of 6 M guanidine-HCl, purified using a Ni-NTA agarose resin, and used to raise anti-COX2B antibodies in a rabbit.

2.5. Immunoelectron microscopy

The method described by Agredano-Moreno, et al. [17] was adapted for *T. gondii* cells. Tachyzoites (10×10^6 cells) were fixed with 4% paraformaldehyde followed by dehydration with increasing concentrations of methanol, and embedded in Lowicryl K4M resin. Polymerization was carried out in Eppendorf tubes for 55 min under UV light (320–360 nm). Thin sections (60 nm thick) were placed onto 200-mesh formvar-coated gold-grids and incubated for 2 h with 0.1% TBST (pH 7.6) in a humid chamber at room temperature. The grids were washed three times with TBS (pH 7.5) and incubated with anti-COX2B antibody (1:50 dilution in TBS) overnight at 4 °C in the humid chamber, washed four times with TBS, and blocked with 1% ovalbumin in 0.01 M PBS for 30 min as described [18]. Grids were then incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG coupled to gold beads of 12 nm from Jackson ImmunoResearch) in a 1:20 dilution. Subsequently, the grids were washed four times with TBS and five times with distilled water. Finally, they were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL JEM 1010 electron microscope coupled to a digital camera MTI model CCD-300-RC.

2.6. Mitotracker staining of *T. gondii* tachyzoites

A suspension of living parasites (100 μ l, containing 12.5×10^6 tachyzoites) was incubated with 2.5 μ M Mitotracker CMX Ros (Molecular Probes) at room temperature and in the dark for 20 min. The cells were washed four times with PBS, resuspended in 10 μ l of the same buffer, and loaded on slides covered with 0.1 M poly-L-lysine. The samples were cover-slipped and observed under a Laser Scanning Confocal Microscope Fluoview FV 1000 Spectral (Olympus) using a helium–neon laser emitting at 543 nm. Where indicated, tachyzoites were also incubated in the presence of DAPI (1 μ g/ml) to stain nuclei, and blue fluorescence was followed with a laser diode emitting at 405 nm. Also, where indicated, before labeling with Mitotracker, 6.25×10^4 tachyzoites were incubated in the presence of either 1 mM NaCN, 250 μ M Antimycin A, or 6 mM CCCP during 30 min at room temperature.

2.7. Confocal immunolocalization studies

T. gondii tachyzoites (6.25×10^4) were labeled with 2.5 μ M Mitotracker CMX Ros (Molecular Probes) at room temperature and in the dark for 30 min.

The cells were then washed four times by centrifugation (2400 ×g for 10 min) with PBS pH 7.2. The parasite cells were permeabilized with 0.05% Tween 20 for 90 min at room temperature, washed four times, and blocked with 1% BSA for 1 h as previously described [19]. The tachyzoites were incubated at 4 °C overnight either with the rabbit anti-Toxoplasma COX2B antibody (1:10 dilution) or with the rabbit anti-Toxoplasma COX2A antibody (1:5 and 1:10 dilutions), washed three times with PBS and incubated for 2 h with fluorochrome-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 from Molecular Probes, 1:100 dilution in PBS containing 1% BSA). Primary antibodies were omitted from samples used as negative controls. The cells were washed three times with PBS and incubated with DAPI (1 µg/ml) for 30 min at room temperature, and washed again four times. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and washed three times. Finally, the tachyzoites were pelleted by centrifugation at 3600 ×g for 10 min and resuspended in 10 µl of PBS and observed under the Laser Scanning Confocal Microscope. Alexa 488 (green fluorescence) was followed with an argon laser emitting at 488 nm.

2.8. Isolation of mitochondria and oxygen uptake measurements

For the isolation of the mitochondrial fraction, we modified the protocol of Leriche and Dubrenetz [20], originally developed for the isolation of *T. gondii* secretory organelles. All steps were carried out at 4 °C. *T. gondii* tachyzoites (250 × 10⁶) were thawed and washed twice by centrifugation at 2000 ×g for 10 min and resuspension in 10 ml of a buffer containing 250 mM sucrose, 1 mM potassium EDTA, and 5 mM triethanolamine (pH 7.5) (TES buffer). The pellet was resuspended in 10 ml of TES buffer and broken mechanically with a Potter homogenizer with five to six gentle manual strokes of the teflon-pestle. The broken cells were centrifuged at 2000 ×g for 10 min and the supernatant centrifuged at 27,000 ×g for 30 min. The resulting pellet was resuspended in a small volume of TES buffer, taken to a final concentration of 40% Percoll, and loaded onto 10 ml centrifuge tubes containing 40% Percoll in TES buffer. Samples were centrifuged at 180,000 ×g for 45 min in a 50Ti rotor. Fractions of 700 µl each were collected, and the mitochondrial fraction identified by measuring the oxygen uptake of each fraction in the presence of 10 mM succinate at 27 °C. A Clark-oxygen electrode in a reaction vessel of 3 ml of air-saturated respiration buffer (5 mM MES, 0.6 M mannitol, 4 mM H₂O₂, 20 mM KCl, and 0.5 mM MgCl₂ at pH 6.8) was used. Measurements were performed with 0.25–0.35 mg/ml of protein of the mitochondrial-enriched fraction.

Table 1
Species that contain fragmented *Cox2a* and *Cox2b* genes

Lineage	Species	COX2A	COX2B	
Dinoflagellata	<i>Alexandrium tamarense</i>		CK782370	
	<i>Karenia brevis</i>		CO060735	
	<i>Karlodinium micrum</i>	ABF22753.1	KME00016886	
	<i>Oxyrrhis marina</i>	ABF22755.1	ABF22756.1	
	Apicomplexa	<i>Eimeria tenella</i>	CD666153	
		<i>Neospora caninum</i>	CF423061	CF275235.1
		<i>Plasmodium berghei</i>	XP_680277.1	XP_678991.1
		<i>Plasmodium chabaudi</i>	XP_738170.1	XP_731807.1
		<i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001350328.1	XP_001348462.1
		<i>Plasmodium yoelii</i>	EAA20212.1	XP_728989.1
<i>Sarcocystis falcitula</i>			DV180913	
<i>Theileria annulata</i>		XP_954616.1		
<i>Theileria parva</i>		XP_765620.1	XP_766204.1	
<i>Toxoplasma gondii</i>		AAO27883.1	AAO27882.1	
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AF443624.1	AF305543.1	
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	DV203769	DV203283	
	<i>Polytomella parva</i>	POE00000962	POE00004826	
	<i>Polytomella</i> sp.	AF305541.1	AF305542.1	

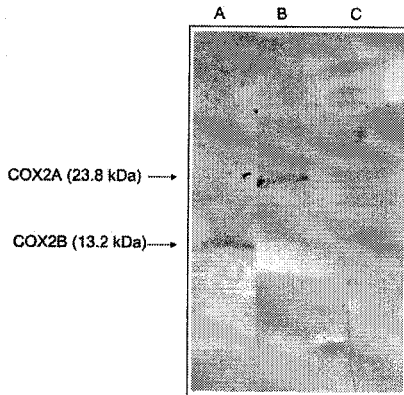


Fig. 1. Immunoblot analysis of whole *T. gondii* cell extracts. *T. gondii* whole cell protein extracts (equivalent to 40 µg of protein) were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nylon membranes for Western blot analyses. A) Lane decorated with the anti-COX2B antibody. B) Lane decorated with the anti-COX2A antibody. C) Molecular mass markers. Two immunoreactive bands with apparent molecular masses of 23.8 kDa (COX2A) and 13.2 kDa (COX2B) could be identified.

2.9. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis

Sample preparation and BN-PAGE were carried out as described by Schägger and von Jagow [21]. Mitochondria were thawed and centrifuged at maximum velocity of a table-top centrifuge for 5 min. The pellet was resuspended in TES buffer, centrifuged again and the supernatant was discarded. Mitochondria were then resuspended in sample buffer (50 mM Bis-Tris, 0.75 M amino caproic acid, pH 7.0) to a final protein concentration of 5 mg/ml and solubilized in the presence of 2% (w/v) *n*-dodecyl maltoside at the same protein concentration for 30 min at 4 °C. After centrifugation at 100,000 ×g for 30 min, Coomassie Blue was added and the sample loaded onto 5–15% (w/v) gradient polyacrylamide gels.

2.10. 2D-SDS-PAGE

Entire lanes from BN-PAGE were used to resolve the subunits in the second dimension Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-SDS-PAGE) (15% acrylamide) as previously described [21]. Apparent molecular masses were estimated using BenchMark protein standards (Invitrogen).

2.11. Protein analysis

Protein concentrations were determined as described [22]. After electrophoresis, proteins were electrotransferred onto nitrocellulose (BioRad) for Western blotting. The antisera used were raised against *T. gondii* COX2A and COX2B subunits (see below). For protein identification, Coomassie Blue-stained spots were excised from the gel and sent to the W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, USA) for Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC–MS/MS) analysis.

2.12. Sequence analysis in silico

Protein sequences were obtained from ENTREZ at the NCBI server (www.ncbi.nlm.nih.gov). Multiple alignments were done with Clustal W (searchlauncher.bcm.tmc.edu). Molecular masses and *pI* calculations were done with the compute *pI*/MW tool [23] at the ExpASY Molecular Biology Server (www.expasy.ch).

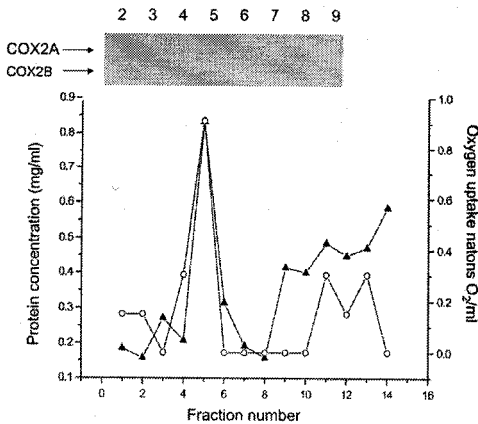


Fig. 2. Subcellular fractionation of *T. gondii* tachyzoites by Percoll gradient centrifugation. Bottom panel, elution profile of the Percoll gradients. Protein concentration (black triangles) and oxygen consumption rates (open circles) for each fraction are shown. Upper panel, immunoblot analysis of selected fractions forms the Percoll gradient. Numbers on top indicate the corresponding fraction number. Fractions exhibiting anti-COX2A and anti-COX2B immunoreactivity were those that exhibited maximal oxygen consumption activity using succinate as substrate.

3. Results

Nucleus-localized *Cox2a* and *Cox2b* genes are present in a limited number of eukaryotic lineages: chlorophycean algae, apicomplexan parasites, and in some dinoflagellates. Table 1 summarizes the COX2A and COX2B sequences that have been identified to date and the corresponding accession numbers. Although *Cox2a* and *Cox2b* genes are present in several apicomplexan parasites, until now, biochemical evidence for the presence of the corresponding protein products is lacking. This work explored the presence of mature COX2A and COX2B subunits assembled in the cytochrome *c* oxidase complex of an apicomplexan parasite. We generated specific antibodies against the parasite's COX2A and COX2B polypeptides. Anti-COX2A antibodies were induced against a 15-residue synthetic peptide, while anti-COX2B antibodies were generated against the 6-His-tagged recombinant protein. *T. gondii* whole cell protein extracts were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nylon membranes for Western blot analyses. Two immunoreactive bands with apparent molecular masses of 23.8 kDa (COX2A) and 13.2 kDa (COX2B) could be identified (Fig. 1). In a parallel gel, using the same set of molecular mass markers, *Polytomella* sp. extracts were run and transferred to membranes for Western blotting, using antibodies raised against the algal COX2A and COX2B subunits. The immunoreactive bands of the alga exhibited apparent molecular masses of 13.0 kDa (COX2A) and 15.0 kDa (COX2B) (data not shown).

Western blot analyses were also carried out with a *T. gondii* cell fraction enriched in mitochondria. For this purpose,

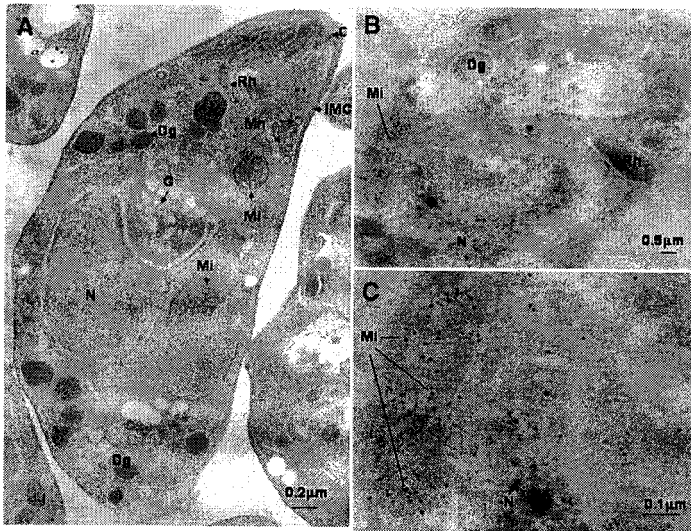


Fig. 3. Ultrastructure of a *T. gondii* tachyzoite and immunolocalization of COX2B to mitochondria by electron microscopy using gold-labeled secondary antibodies. A) Electron micrograph of a sectioned tachyzoite. The main subcellular structures are indicated: conoids (C), dense granules (Dg), Golgi apparatus (G), internal membrane complex (IMC), rhoptries (Rh), micronemes (Mn), mitochondria (Mi) and nucleus (N). Immunolocalization of COX2B to *T. gondii* mitochondria (Mi). The other observed subcellular structures are also indicated: dense granule (Dg), rhoptries (Rh), nucleus (N). C) Higher magnification of panel B, that shows intense labeling in the mitochondrion.

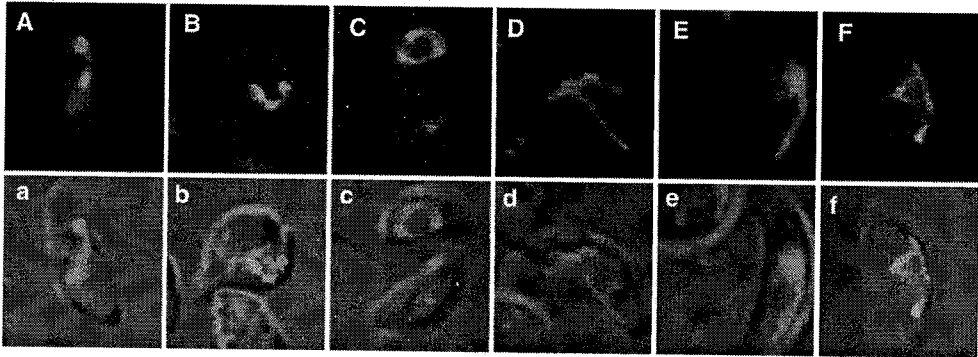


Fig. 4. Fluorescent images of mitochondria of *T. gondii* tachyzoites labeled with Mitotracker. Panels A, B, C, D, E and F show the different mitochondrial structures found in tachyzoites incubated in the presence of 2.5 μ M Mitotracker Red CMX Ros. Panels a, b, c, d, e and f show the corresponding superimposed images of Mitotracker-stained mitochondria and tachyzoites observed under differential interference contrast.

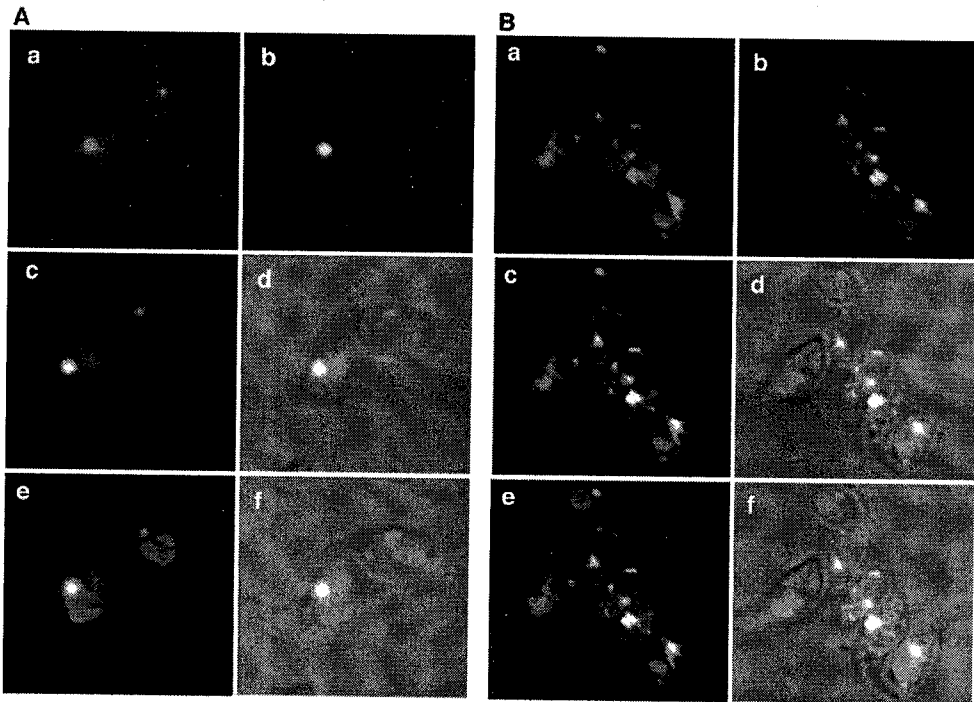


Fig. 5. Immunolocalization of COX2A and COX2B polypeptides by confocal microscopy of permeabilized tachyzoites using fluorochrome-labeled secondary antibodies. Panel A: a) Staining of mitochondria with Mitotracker (red fluorescence). b) Labeling with the rabbit anti-Toxoplasma COX2A antibody followed by the Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibodies (green fluorescence). c) Colocalization of antibody fluorescence and Mitotracker staining. d) Overlay of panel "c" and tachyzoites observed under differential interference contrast. e) Staining of the nucleus with DAPI (blue fluorescence) and of mitochondria with Mitotracker (red fluorescence). f) Overlay of panel "e" and tachyzoites observed under differential interference contrast. Panel B: a) Staining of mitochondria with Mitotracker (red fluorescence). b) Labeling with the rabbit anti-Toxoplasma COX2B antibody followed by the Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibodies (green fluorescence). c) Colocalization of antibody fluorescence and Mitotracker staining. d) Overlay of panel "c" and tachyzoites observed under differential interference contrast. e) Triple overlay of stainings: nucleus with DAPI (blue fluorescence), mitochondria with Mitotracker (red fluorescence), and anti-Toxoplasma COX2B antibodies (green fluorescence). f) Overlay of panel "e" and tachyzoites observed under differential interference contrast.

rupted *T. gondii* tachyzoites were fractionated by ultracentrifugation on Percoll gradients. Cyanide-sensitive oxygen uptake in the presence of succinate was detected in several fractions of the Percoll gradient indicating the presence of mitochondria (Fig. 2). The antisera raised against the *T. gondii* COX2A and COX2B subunits were used to probe the polypeptides in the Percoll gradient fractions. As shown in Fig. 2, the cross-reactive polypeptides were found only in the fractions exhibiting maximal oxygen consumption, indicating that the two immunoreactive bands that correspond to the COX2A and COX2B polypeptides are associated to mitochondria. The same set of antibodies were then used to immunolocalize COX2A and COX2B polypeptides in *T. gondii*. Two experimental approaches were followed: immunolocalization by electron microscopy using gold-labeled secondary antibodies and immunodecoration by confocal microscopy of permeabilized tachyzoites using fluorochrome-labeled secondary antibodies. *T. gondii* possesses one or few branched mitochondria, with variations in shape and substructural organization [24–27]. The mitochondrial structures were readily identified by electron microscopy in sectioned tachyzoites (Fig. 3A). Although the Epon-embedded samples reveal a detailed fine-structure of the mitochondria cristae, Lowicryl K4M resin-embedded samples did not (Fig. 3B and C as compared to A). Nevertheless, Lowicryl K4M was the only resin that allowed immunogold localization. Immunogold electron microscopy of Lowicryl K4M resin-embedded tachyzoites decorated with anti-COX2B antibodies show high density

labeling associated with mitochondria (6.5 gold particles/ μm^2 in mitochondria against 0.7 gold particles/ μm^2 in the rest of the cell) (Fig. 3B and C).

The localization of COX2B in *T. gondii* tachyzoites was also examined by confocal immunofluorescence analysis. To illuminate mitochondria, living parasites were stained with Mitotracker (red fluorescence, Fig. 4). This lipophilic cationic dye is able to accumulate only in the matrix of mitochondria that have built up a membrane potential. If *T. gondii* cells were preincubated with either cyanide, antimycin or CCCP, Mitotracker was not taken up by the organelle, and diffused throughout the parasite's cytoplasm (results not shown). The confocal images of Mitotracker-stained *T. gondii* mitochondria were similar to those previously obtained [27], revealing the unusual structural features of an ovoid mitochondrial cytoplasmic complex. Mitochondria-internalized Mitotracker links covalently to matrix proteins, preventing its wash-out after cell permeabilization. Thus, tachyzoites containing Mitotracker-stained mitochondria were permeabilized with low concentrations of detergent and incubated with anti-COX2A and anti-COX2B antibodies, followed by incubation with fluorochrome-labeled secondary antibodies. The immunolocalization of COX2A and COX2B (green fluorescence, Fig. 5) was restricted to mitochondria, and in all cases, colocalized with Mitotracker. Not all Mitotracker-stained mitochondria reacted with the antibodies, indicating that permeabilization, and thus antibody accessibility, was not complete. In our hands, antibodies raised against the recombinant protein (in this case anti-COX2B antisera) gave

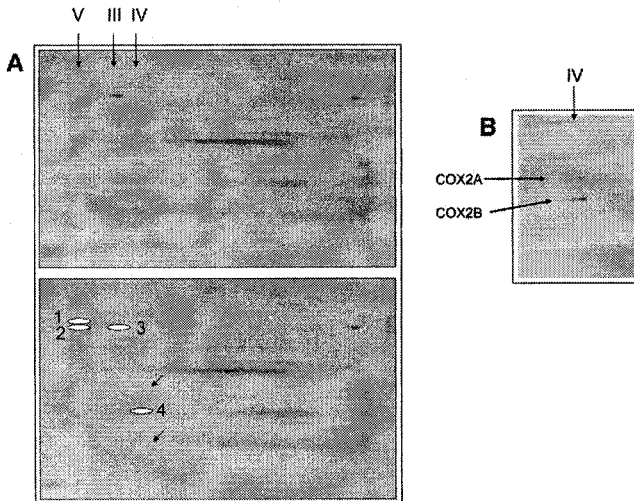


Fig. 6. Two-dimensional resolution of the mitochondria-enriched fraction from *T. gondii*. A) The identified OXPHOS complexes are indicated as V (F_1F_0 -ATP synthase), III (bc_1 complex) and IV (cytochrome *c* oxidase). Mitochondria-enriched fractions were resolved on BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. Bottom panel shows the spots that were identified as OXPHOS polypeptides by LC-MS/MS analysis. Spot 1, subunit α of F_1F_0 -ATP synthase (complex V); spot 2, F_1F_0 -ATP synthase subunit β ; spot 3, subunit core 1 of bc_1 complex (complex III); and spot 4, subunit Vb of cytochrome *c* oxidase (complex IV). Arrows indicate the region where COX2A and COX2B were identified by immunoblotting. B) Immunoblot analysis of a 2D gel in the region where complex IV is located. The two immunoreactive bands with apparent molecular masses of 23.8 kDa (COX2A) and 13.2 kDa (COX2B), previously identified in whole cell extracts and in the mitochondria-enriched fraction, migrated in association with complex IV.

much stronger signals and labeled more cells, than those raised against the antigenic peptide (anti-COX2A antisera).

To explore if the two immunoreactive bands (COX2A and COX2B) were actually associated with complex IV (cytochrome *c* oxidase), the *T. gondii* fraction enriched in mitochondria, obtained from Percoll gradients, was detergent-solubilized and analyzed by BN-PAGE followed by denaturing 2D Tricine-SDS-PAGE [21]. The polypeptide pattern of the obtained 2D gel is complex, exhibiting bands associated with high molecular weight OXPHOS complexes and abundant low-molecular mass proteins, some of which smear along the gel (Fig. 6). LC-MS/MS analysis of selected protein spots excised from the 2D gels revealed the presence of several secretion and surface components of *T. gondii* heavily contaminating the mitochondrial preparation (results not shown). Nevertheless, several other spots were unambiguously identified by LC-MS/MS analysis as mitochondrial polypeptides. Some of the identified proteins that pertained to OXPHOS complexes were the α and β subunits of F₁F₀-ATP synthase (GenBank 728921 and ABB17195 respectively), subunit I and the Rieske iron-sulfur protein of the *bc*₁ complex (GenBank AAF07940 and ToxoDB4.1_641.m00178), cytochrome *c* oxidase subunit Vb (GenBank CAJ20625), and the mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase precursor (GenBank ABE76503). COX2A and COX2B polypeptides could not be identified in the spots analyzed by LC-MS/MS. Nevertheless, the above-mentioned analysis allowed the identification of OXPHOS complexes, III, IV and V (Fig. 6). A blot of a similar 2D gel was probed with the anti-COX2A and anti-COX2B antibodies. Again, the two immunoreactive bands with apparent molecular masses of 23.8 kDa (COX2A) and 13.2 kDa (COX2B) were detected; both clearly migrated in association with mitochondrial complex IV.

4. Discussion

4.1. *T. gondii* cytochrome *c* oxidase contains a heterodimeric COX2 subunit

A previous biochemical study carried out with digitonin-permeabilized tachyzoites provided unequivocal evidence that respiration and OXPHOS are functional in *T. gondii*, and that a cyanide-sensitive cytochrome *c* oxidase is present in the parasite's mitochondria [28]. We thought of the importance to demonstrate that the presence of fragmented *Cox2a* and *Cox2b* genes in this apicomplexan parasite is not mere evolutionary remnants or pseudogenes, but fully functional genes whose corresponding products are imported into mitochondria, targeted to the inner mitochondrial membrane and assembled, giving rise to an active cytochrome *c* oxidase complex. In this work we demonstrated the presence of mature COX2A and COX2B subunits in *T. gondii* mitochondria by means of specific antibodies. Moreover, these polypeptides co-migrate with complex IV in BN-PAGE. The identification of COX2A (23.8 kDa) and COX2B (13.2 kDa) as distinct polypeptides indicates that subunit COX2 is a heterodimer in *T. gondii* like previously shown for the fragmented COX2 subunit of the chlorophycean algae *Polytomella* sp. [5] and *C. reinhardtii* [12].

BN-PAGE was the method of choice to address the study of mitochondrial components in an apicomplexan parasite. At this stage, secretory and surface proteins are still contaminating the parasite mitochondrial preparation, and further purification of mitochondria is required. Nevertheless, all the major OXPHOS complexes could be identified. The combination of BN-PAGE with mass spectrometry may allow the complete characterization of the *T. gondii* mitochondrial proteome in a near future.

4.2. Mitochondrial targeting sequences

Very few studies have addressed the targeting of *T. gondii* proteins to mitochondria and the structure of mitochondrial targeting sequences (MTS). Tournal et al. [29], demonstrated that the mitochondrial chaperone HSP60 contains an orthodox MTS. In contrast, Brydges and Carruthers [30] characterized an atypical mitochondrial superoxide dismutase with an unusual presequence, consisting of a hydrophobic segment similar to a signal peptide followed by a MTS. Parasite mitochondrial-targeted precursor proteins may exhibit unique MTS sequences that ensure delivery to the mitochondria and exclude targeting to other subcellular compartments (i.e., the apicoplast). The N-termini of neither COX2A nor COX2B could be determined in this work, therefore, no precise information on the processing sites of the corresponding precursor proteins could be obtained. Nevertheless, a striking difference between the apparent molecular mass of the *T. gondii* COX2A subunit (23.8 kDa) and its *Polytomella* sp. counterpart (13.0 kDa) was evident from the SDS-PAGE polypeptide patterns obtained using the same buffer system and the same set of molecular mass markers. It is known that highly hydrophobic polypeptides may exhibit anomalous mobility (usually reflecting lower apparent molecular masses) because of increased SDS binding to transmembrane regions [31]. Nevertheless, anomalous electrophoretic mobility could not account for such a large difference in apparent molecular masses (more than 10 kDa). An alternative explanation invokes a different processing site for the MTS in the parasite COX2A precursor protein. The N-terminus of the *Polytomella* sp. COX2A subunit has been determined experimentally, and therefore the exact processing site for the MTS is known [5]. The MTS of the COX2A protein from other organisms has been predicted on the basis of sequence similarity. If the *T. gondii* COX2A precursor protein would be processed at the same site as in its chlorophycean counterpart (as predicted only by sequence similarity alignment), a mature COX2A subunit of 14.8 kDa would be expected. To account for the experimentally observed *T. gondii* COX2A apparent molecular mass of 23.8 kDa, we hypothesize that the MTS of the COX2A precursor protein (accession number AF503914) is processed between residues H₉₆ and Q₉₇ (or somewhere in a region close to these residues), yielding a 23.8 kDa mature subunit. The MTS of the *T. gondii* COX2A precursor protein is longer than the algal one, and their amino acid sequences exhibit rather poor similarity. The processing site of the COX2A MTS, and thus the structure of the mature COX2A subunit in the parasite, may differ substantially from its counterpart in chlorophycean algae.

4.3. Evolutionary considerations

Nucleus-encoded *Cox2a* and *Cox2b* genes are present in a limited set of eukaryotic lineages: chlorophycean algae, apicomplexan parasites and dinoflagellates. Remarkably, apicomplexans and dinoflagellates form a well supported monophyletic group in eukaryotic phylogenies [32,33]. In phylogenetic reconstructions carried out with *Cox2a* and *Cox2b* gene sequences, chlorophycean algae tend to affiliate with apicomplexans and dinoflagellates, and appear far away from plant and other green algal sequences [7,15,10,34,35]. These results have been interpreted based on two different evolutionary scenarios. On one hand, it was suggested that apicomplexans acquired *Cox2a* and *Cox2b* genes from an endosymbiotic chlorophycean alga through horizontal gene transfer [7,15,36]. On the other hand, it has been argued that mitochondrial *cox2* genes fragmented and migrated to the nucleus in both the chlorophycean and the ancestor of dinoflagellates and apicomplexans in independent and unrelated events [34,35]. A recent phylogenomic analysis of the dinoflagellate *Karenia brevis* [37] revealed the existence of six plastid proteins derived from green algae. A reasonable explanation is that those dinoflagellate *green* genes derived from an ancestral green algal endosymbiont before the acquisition of the typical red-algal plastid of 'chromalveolates' [36,38]. Clearly, the evolutionary origin of fragmented, nucleus-encoded *Cox2* genes in apicomplexan parasites remains debatable. Nevertheless, the present work shows the presence of an active, heterodimeric COX2 subunit in an organism outside of the plant kingdom, and ascertains that the corresponding *Cox2a* and *Cox2b* genes are not evolutionary relics, but encode proteins of functional relevance to the parasites.

Acknowledgments

The authors thank Rosa María Picaso and Gabriel Orozco Hoyuela (Unidad de Microscopía Electrónica, IFC, UNAM) for their expert help in microscopy and confocal techniques. We are grateful to Aydeé Mendoza Oliva and Dr. Rosa Navarro for their generous gift of fluorescence-labeled goat anti-rabbit antibody; to Héctor Malagón Riveros for his help in generating conventional antibodies; and to Drs. G. Dreyfus, S. Funes, D. Georgellis, and X. Pérez-Martínez for their critical comments on the manuscript. This research was supported by grants TW01176 from the Fogarty International Center at NIH (USA); HL59646 from NHLBI, NIH, (USA); 40696-Q from CONACyT (Mexico) and IN218705-3 from DGAPA, UNAM (Mexico).

References

- [1] G.T. Babcock, M. Wikström, Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature* 356 (1992) 301–309.
- [2] M. Saraste, Oxidative phosphorylation at the fin de siècle, *Science* 283 (1999) 1488–1493.
- [3] R.A. Capaldi, Structure and function of cytochrome *c* oxidase, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990) 569–596.
- [4] M.W. Gray, B.F. Lang, G. Burger, Mitochondria of protists, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 477–524.
- [5] X. Pérez-Martínez, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, S. Funes, E. Tolkunova, J. d'Alayer, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Subunit II of cytochrome *c* oxidase in Chlamydomonas algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11302–11309.
- [6] K.I. Watanabe, T. Ohama, Regular spliceosomal introns are invasive in *Chlamydomonas reinhardtii*: 15 introns in the recently relocated mitochondrial *cox2* and *cox3* genes, *J. Mol. Evol.* 53 (2001) 333–339.
- [7] S. Funes, E. Davidson, A. Reyes-Prieto, S. Magallón, P. Herion, M.P. King, D. González-Halphen, A green algal apicoplast ancestor, *Science* 298 (2002) 2155.
- [8] P. Kathir, M. LaVoie, W.J. Brazelton, N.A. Haas, P.A. Lefebvre, C.D. Silflow, Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome, *Eukaryot. Cell* 2 (2003) 362–379.
- [9] M.J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R.W. Hyman, J.M. Carlton, A. Pain, K.E. Nelson, S. Bowman, I.T. Paulsen, K. James, J.A. Eisen, K. Rutherford, S.L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.S. Chai, V. Nene, S.J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Percea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M.W. Mather, A.B. Vaidya, D.M. Martin, A.H. Fairlamb, M.J. Fraunholz, D.S. Roos, S.A. Ralph, G.I. McFadden, L.M. Cummings, G.M. Subramanian, C. Mungall, J.C. Venter, D.J. Carucci, S.L. Hoffman, C. Newbold, R.W. Davis, C.M. Fraser, B. Barrell, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Nature* 419 (2002) 498–511.
- [10] J.D. Hackett, T.E. Scheetz, H.S. Yoon, M.B. Soares, M.F. Bonaldo, T.L. Casavant, D. Bhattacharya, Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis, *BMC Genomics* 6 (2005) 80–93.
- [11] J.E. Feagin, Mitochondrial genome diversity in parasites, *Int. J. Parasitol.* 30 (2000) 371–390.
- [12] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernández, D. González-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318–330.
- [13] P. Cardol, D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R.F. Matagne, C. Remacle, The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project, *Plant Physiol.* 137 (2005) 447–459.
- [14] A. Bouchot, J.D. Jaillot, A. Bonhomme, N.P. Alessandro, P. Laquerriere, L. Kilian, H. Burtel, J.E. Gómez-Marín, M. Pluot, P. Bonhomme, J.M. Pinon, Detection and localization of a Ca²⁺-ATPase activity in *Toxoplasma gondii*, *Cell Struct. Funct.* 26 (2001) 49–60.
- [15] S. Funes, E. Davidson, A. Reyes-Prieto, S. Magallón, P. Herion, M.P. King, D. González-Halphen, Comment on "A green algal apicoplast ancestor", *Science* 301 (2003) 49.
- [16] A.S. Kolaskar, P.C. Tongaonkar, A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens, *FEBS Lett.* 276 (1990) 172–174.
- [17] L.T. Agredano-Moreno, M.A. González-Jiménez, M. de L. Segura-Valdéz, E. Ubaldo, C.H. Ramos, E. Martínez, L.F. Jiménez-García, Further ultrastructural characterization of the intranuclear ring-shaped bodies of the plant *Lacandonia schismatica*, *J. Struct. Biol.* 136 (2001) 1–6.
- [18] O. Laboux, L.G. Ste-Marie, F.H. Glorieux, A. Nanci, Quantitative immunogold labeling of bone sialoprotein and osteopontin in methylmethacrylate-embedded rat bone, *J. Histochem. Cytochem.* 51 (2003) 61–67.
- [19] A. del Arco, J. Satriestegui, Molecular cloning of Aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23327–23334.
- [20] M.A. Leriche, J.F. Dubremetz, Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies, *Mol. Biochem. Parasitol.* 45 (1991) 249–259.
- [21] H. Schägger, J. von Jagow, Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 190–203.
- [22] M.A.K. Markwell, S.M. Haas, L.L. Bieber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [23] B. Bjellqvist, B. Basse, E. Olsen, J.E. Celis, Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human

- cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions, *Electrophoresis* 15 (1994) 529–539.
- [24] A. Petitprez, E. Vivier, Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*, *Protistologica* VIII (1972) 199–221.
- [25] F. Seeber, D.J.P. Ferguson, U. Gross, *Toxoplasma gondii*: a paraformaldehyde-insensitive diaphorase activity acts as a specific histochemical marker for the single mitochondrion, *Exp. Parasitol.* 89 (1998) 137–139.
- [26] E.J. Melo, M. Attias, W. De Souza, The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 27–33.
- [27] S. Köhler, Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. The ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Parasitol. Res.* 98 (2006) 355–369.
- [28] A.E. Vercesi, C.O. Rodrigues, S.A. Uyemura, L. Zhong, Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31040–31047.
- [29] C. Tourseil, F. Dzierszynski, A. Bernigaud, M. Mortuaire, S. Tomavo, Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 111 (2000) 319–332.
- [30] S.D. Brydges, V.B. Carruthers, Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*, *J. Cell Sci.* 116 (2002) 4675–4685.
- [31] H. Schagger, in: G. von Jagow, H. Schagger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 59–79.
- [32] J.D. Hackett, H.S. Yoon, S. Li, A. Reyes-Prieto, S.E. Rummele, D. Bhattacharya, Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of ‘Rhizaria’ with chromalveolates, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 1702–1713.
- [33] N.J. Patron, Y. Inagaki, P.J. Keeling, Multiple gene phylogenies support the monophyly of cryptomonad and haptophyte host lineages, *Curr. Biol.* 17 (2007) 887–891.
- [34] R.F. Waller, P.J. Keeling, G.G. van Dooren, G.I. McFadden. Comment on “A green algal apicoplast ancestor”, *Science* 301 (2003) 49.
- [35] R.F. Waller, P.J. Keeling, Alveolate and chlorophycean mitochondrial *cox2* genes split twice independently, *Gene* 383 (2006) 33–37.
- [36] S. Funes, A. Reyes-Prieto, X. Pérez-Martínez, D. González-Halphen, On the evolutionary origins of apicoplasts: revisiting the rhodophyte vs. chlorophyte controversy, *Microbes Infect.* 6 (2004) 305–311.
- [37] T. Nosenko, K.L. Lidie, F.M. Van Dolah, E. Lindquist, J.F. Cheng, D. Bhattacharya, Chimeric plastid proteome in the Florida “red tide” dinoflagellate *Karenia brevis*, *Mol. Biol. Evol.* 23 (2006) 2026–2038.
- [38] S. Li, T. Nosenko, J.D. Hackett, D. Bhattacharya, Phylogenomic analysis identifies red algal genes of endosymbiotic origin in the chromalveolates, *Mol. Biol. Evol.* 23 (2006) 663–674.