



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INMUNOLOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES
COX2A Y COX2B DE LA CITOCROMO c OXIDASA
DE *Toxoplasma gondii*.

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas

P R E S E N T A

Q.F.B. Adelma Escobar Ramírez

TUTOR

Dr. Diego González Halphen.

Ciudad Universitaria 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A

**NATALIA, ROBERTO
LETY, GINDA, ADE
GUILLE
ISRAEL, EFRAIN, ELIBARDO,
ALFREDO**

Mi querida familia...

RECONOCIMIENTO

El siguiente trabajo de investigación se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del donativo No. 56619 y por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica (PAPIIT) con el donativo No. IN217108.

Durante los estudios de maestría la estudiante fué becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el No. de Becario 200847.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Diego González Halphen, por su amabilidad, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su constante apoyo y consejos.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Alejandro Fernández y Dra. Sobeida Sanchez Nieto, por su apoyo académico, asesorías y por creer que era posible obtener buenos resultados.

A la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM y al Dr. Luis Felipe Jiménez por las facilidades otorgadas y por su asesoría para la realización de la inmunolocalización por MET

A la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM y a la Dra. Araceli Patrón Soberano gracias por sus consejos, por su constante ayuda en el microscopio confocal y MET por las facilidades otorgadas para disponer de las instalaciones de la Unidad de ME y por ser una valiosa amiga.

A la Dra. Rosa Estela Navarro González, por la amabilidad de facilitarme el material para la realización de la inmunofluorescencia, parte fundamental en mi trabajo.

A la M en C. Reyna Lara Martínez por su constante apoyo durante la realización de la inmunolocalización por MET, por su paciencia y amistad.

A los Biol. Rosa María Picaso Hernandez por su apoyo durante la realización de la MEB y MET, y Gabriel Orozco Oyuela por su apoyo en la observación de las muestras con el microscopio confocal por la paciencia y disponibilidad.

Al Dr. Rodolfo Paredes García por su apoyo en el MET, y por las bromas.

A la QBP Miriam Vázquez Acevedo por su apoyo técnico en el lab 324N y por las pláticas.

Araceli Cano por su apoyo en la realización del modelo para COX2A y COX2B

Al Sr. Alfredo Octaviano Auxiliar del laboratorio por su disponibilidad siempre amable para apoyarnos.

A Juan Barbosa por su ayuda siempre amable, cuando la compu ya no quería funcionar.

A todas las personitas del IFC que amablemente me brindaron, su ayuda en algún momento mis experimentos y durante mi estancia en el IFC.

A DIOS

Por permitirme éste pequeño logro.

A mis sobrinitos:

Lety, José, Geisy, Yajaira, Frida, Indira, Lalito, Miguelito, Ivan, Laurita, Carlos, Bere, Efraín y Sarita por esperarme siempre con cariño y la mejor de sus sonrisas por todos los momentos felices compartidos.

A mis Amigos:

Genarito, Judith, Mary, Yola, Gaby, Gloria, Oto, Omar, Gladys, por su valiosa amistad.

Aydé por la amistad y por la valentía de arriesgarte a un regaño por mí, a Silvia, Cas, Valeria, Rodrigo, Andrés, Carlos etc. Por su amistad y por las pachangas.

A mis compañeros:

Lore, por los momentos de alegría y angustia con los toxos, Araceli, Paco, Alexa, Luis, Alain, Hector, Valentin, Sergio por los momentos compartidos en el labo 324N.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formas proliferativas importantes en <i>T. gondii</i>	3
1.1.1 Complejo apical.....	6
1.1.2 Organelos de <i>T. gondii</i> rodeados por membrana.....	5
1.2 Ciclo biológico.....	7
1.2.1 Reproducción sexual.....	8
1.2.2 Reproducción asexual	8
1.3 Mitocondria.....	9
1.4 Estructura de la mitocondria de <i>T. gondii</i>	9
1.4.1 Estructura del complejo ovoide mitocondrial citoplasmático.....	11
1.5 Fosforilación oxidativa.....	12
1.5.1 Complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa).....	12
1.5.2 Complejo II (succinato deshidrogenasa).....	13
1.5.3 Complejo III (citocromo c oxidoreductasa o complejo bc1).....	13
1.5.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa).....	14
1.5.5 Complejo V (ATP sintasa).....	17
1.6 Genoma mitocondrial.....	18
1.7 Transferencia de genes de la mitocondria al núcleo.....	19
1.8 Importación de proteínas.....	20
II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVO.....	24
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
VI. MATERIALES Y METODOS.....	26
6.1 Generación de la proteína recombinante COX2B con etiquetas de histidina, y purificación por afinidad en columnas de níquel.....	26
6.2 Generación de anticuerpos dirigidos contra el péptido sintético COX2A.....	27
6.3 Inmunoréplicas tipo western blot para comprobar el titulo y especificidad de los anticuerpos generados	27
6.4 Purificación de anticuerpos IgG por cromatografía con proteína A-Sefarosa.....	28
6.5 Cultivo in vivo de taquizoitos de <i>T. gondii</i>	29

6.6 Purificación de taquizoitos de <i>T. gondii</i>	29
6.7 Tinción de la mitocondria de taquizoitos de <i>T. gondii</i> con MitoTracker Red CMX Ros.....	29
6.8 Verificación del potencial electroquímico presente en la mitocondria de taquizoitos de <i>T. gondii</i> utilizando inhibidores de la cadena respiratoria	30
6.9 Procesamiento en suspensión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> para inmunofluorescencia.....	30
6.10 Procesamiento e inclusión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> en resina epóxica (Epón 812), para MET.....	31
6.11 Procesamiento e inclusión de muestras en resina acrílica Lowicryl K4M.....	32
6.12 Procesamiento de taquizoitos de <i>T. gondii</i> en Lowicryl K4M para la inmunolocalización de COX2B.....	32
VII. RESULTADOS.....	33
7.1 Detección inmunoquímica de COX2B por inmunoréplicas tipo western.....	33
7.2 Anticuerpos generados contra el péptido sintético COX2A.....	35
7.3 Detección inmunoquímica de la subunidad COX2A.....	37
7.4 Purificación de anticuerpos de isotipo IgG por afinidad con proteína A-Sefarosa.....	38
7.5 Identificación de la mitocondria funcional en el taquizoito de <i>T. gondii</i> con MitoTracker Red CMX Ros.....	41
7.6 Efecto de inhibidores de la respiración y desacoplantes sobre tinción de mitocondrias por Mitotracker CMX Ros.....	43
7.7 Localización de COX2A y COX2B en la mitocondria de taquizoitos de <i>T. gondii</i> por inmunofluorescencia.....	44
7.8 Ultraestructura de la mitocondria del taquizoito de <i>T. gondii</i>	48
7.9 Inmunolocalización de COX2B por Microscopía Electrónica de Transmisión.....	49
VIII. DISCUSIÓN.....	52
IX. CONCLUSIONES.....	60
X. BIBLIOGRAFÍA.....	61
XI. Apéndices I.....	69
XII. Apéndice II.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

i

Figura 1. Ultraestructura del taquizoito y MEB Figura.	3
Figura 2. Citoesqueleto del complejo apical.....	4
Figura 3. Apicoplasto.....	6
Figura 4. Ciclo biológico.....	7
Figura 5. Mitocondria de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 6. Complejo Ovoide Mitocondrial Citoplasmático (OMC).....	11
Figura 7. Perfil de la estructura básica del complejo OMC.....	11
Figura 8. Corte transversal del OMC avanzado.....	11
Figura 9. Corte transversal del OMC mostrando la pared multilaminar con 6 y 8 membranas.....	11
Figura 10. Estructura de la cadena respiratoria.....	12
Figura 11. Citocromo c oxidasa de bovino en estado oxidado.....	14
Figura 12. Subunidades que forman el núcleo activo de la citocromo c oxidasa.....	15
Figura 13. Dominios que forman a la proteína COX2, en bovino.....	16
Figura 14. Rutas principales de importe de proteínas en la mitocondria.....	21
Figura 15. Gel SDS-PAGE donde se visualiza a la proteína COX2B recombinante y western blot que identifica a la proteína recombinante con anti-COX2B....	34
Figura 16. Western blot que identifica a la proteína COX2B en un lisado de taquizoitos de <i>T. gondii</i> con el anticuerpo sin purificar.....	34
Figura 17. Gráfico del promedio de propensidad antigénica vs el número de residuo en la secuencia de COX2A madura.....	36
Figura 18. Identificación de COX2A en extracto de taquizoito de <i>T. gondii</i> con anticuerpos sin purificar.....	37
Figura 19. Perfil de elución de la columna de proteína A acoplada a Sefarosa a la cual se cargó el suero conteniendo los anticuerpos generados contra la proteína COX2B recombinante.....	38
Figura 20. Perfil de elución de la columna de proteína A acoplada a Sefarosa para el anticuerpo COX2A.....	39
Figura 21. Gel de SDS-PAGE con cada uno de los anticuerpos IgG COX2A e IgG COX2B purificados.....	39
Figura 22. Inmunoreplicas tipo western. Identificación de COX2A y COX2B en un lisado de taquizoitos de <i>T. gondii</i> , con el anticuerpo IgG purificado.....	40
Figura 23. Mitocondria de taquizoitos de <i>T. gondii</i> teñidas con 2.5 μ M de MitoTracker Red CMX Ros.....	42

Figura 24. Efecto de antimicina A, cianuro de sodio y el desacoplante CCCP.....	43
Figura 25. Localización de COX2A en la mitocondria del taquizoito de <i>T. gondii</i> por inmunofluorescencia.....	44
Figura 26. Localización de COX2B en el taquizoito de <i>T. gondii</i> permeabilizado con 0.05% de Tween.....	46
Figura 27. Localización de COX2B en taquizoitos permeabilizados con 0.1% de Tween.....	47
Figura 28A. Identificación de segmentos ramificados y tubulares de la mitocondria en cortes longitudinales y transversales de taquizoitos de <i>T. gondii</i>	48
Figura 28B. Secciones transversales y longitudinales de la mitocondria del taquizoito de <i>T. gondii</i> , vistos a mayor amplificación.....	49
Figura 29A. Corte longitudinal del taquizoito de <i>T. gondii</i> e inmunolocalización de COX2B.....	50
Figura 29B. Localización de COX2B en secciones de mitocondria cercanas al núcleo.....	51

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ii

Alexa 488.	Anticuerpo de isotipo IgG generado contra IgG unido a (FITC) Fluoresceína que emite a 488 nm.
♀	Forma femenina del microgametocito de <i>T. gondii</i>
♂	Forma masculina del microgametocito de <i>T. gondii</i>
IMC	Complejo de Membrana Interna
TgMIC1-3	Proteínas de micronemos con secuencias adhesivas.
Rop1- 9	Proteína de Roptrias
GRA1-7	Proteínas de granulos densos
NTPasa	Nucleotido Trifosfatasa que rompe nucleótidos di y trifosfatados
AMD	Dominio Mitocondrial Asociado al Apicoplasto
Q	Ubiquinona
QH2	Ubiquinol
OMC	Complejo Ovoide Mitocondrial citoplasmático
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMSF	Inhibidor de Proteasas (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo)
SH	Grupo Sulfhidrilo
Cys	Cisteína
COX1, 2, 3	Subunidades de la citocromo c oxidasa
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión.
PBS	Amortiguador de fosfatos
Epón	Resina epóxica
Lowicryl K4M	Resina acrílica hidrosoluble
DAPI	diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
CCCP	carbonil ciano m-clorofenilhidrazona
DIC	Microscopía de contraste diferencial de interferencia (Nomarski).
IPTG	Isopropil β tiogalactopiranósido

El complejo IV o citocromo c oxidasa es una enzima oligomérica de 13 subunidades que contiene un centro diatómico de CuA, un sitio de unión a CuB, un grupo hemo a, y un hemo aa₃. Tres subunidades conforman el núcleo de esta enzima, COX1, COX2 y COX3. La subunidad COX2 en la mayoría de los organismos se encuentra codificada por el gen *cox2* en el genoma mitocondrial. En parásitos apicomplejos se encuentra en el genoma nuclear y está fragmentado, igual que como se ha reportado para las algas clorofíceas *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii*. El gen *cox2a* codifica para la proteína COX2A, correspondiente a la porción amino de una COX2 ortodoxa, y el gen *cox2b* codifica para la proteína COX2B correspondiente a la porción carboxilo. Además COX2A posee un presecuencia mitocondrial y una extensión de cinco aminoácidos en el extremo carboxilo. La proteína COX2B no presenta presecuencia mitocondrial pero posee una extensión en su extremo amino terminal, por lo que se propone que podría interactuar con la proteína COX2A para formar un heterodímero similar a la subunidad COX2 ortodoxa. En este trabajo se identificaron a las proteínas COX2A y COX2B por dos métodos. En el primero se utilizaron taquizoitos de *T. gondii* de la cepa RH cultivados en el peritoneo de ratón Balb C, se purificaron y procesaron para microscopía electrónica de transmisión en resina Epón, donde primeramente se identificó la ultraestructura de la mitocondria del parásito. La inmunolocalización se hizo en Lowicryl K4M, con anticuerpos antiCOX2A y antiCOX2B, y un anticuerpo secundario acoplado a perlas de oro. La mitocondria activa se visualizó con Mitotracker CMX Ros en ausencia y presencia de inhibidores de la cadena respiratoria tales como antimicina A, cianuro y un desacoplante como CCCP. En el método 2 se utilizaron taquizoitos teñidos con Mitotracker CMX Ros permeabilizados con Tween 20, y se localizó a la subunidad COX2A y COX2B con anticuerpos policlonales purificados, y un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo (alexa 488). La colocalización entre Mitotracker CMX Ros que fluoresce en rojo y alexa 488 que fluoresce en verde pudo observarse en ciertas zonas de la mitocondria del taquizoito, corroborándose que las subunidades COX2A y COX2B se encuentran en la mitocondria. El análisis por inmunoréplicas tipo western del extracto de taquizoito reveló una masa molecular aproximada de 24kDa para COX2A y alrededor de 14kDa para COX2B.

I. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito oportunista intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa, capaz de invadir a una variedad de células de animales de sangre caliente y entre ellos al hombre. Entre otros protozoarios oportunistas pertenecientes a este Phylum también se encuentra Plasmodium causante de la malaria, Eimeria causante de la coccidiosis en los pollos, Cryptosporidium que ocasiona diarreas en el ganado, Sarcocystis, y Neospora. Los miembros de este Phylum se caracterizan por presentar en su ultraestructura una serie de organelos de secreción en la parte anterior del parásito (Black y Boothroyd, 2000; Dubremetz *et al.*, 1998; Carruthers, 1999).

Actualmente la toxoplasmosis es un problema de salud ya que afecta a animales de interés veterinario ocasionando abortos y pérdidas económicas. En humanos, ocasiona aborto en mujeres embarazadas; en pacientes infectados con el virus del VIH ocasiona daño en órganos importantes como el cerebro, ojos, músculos, tracto gastrointestinal, y miocardio (Vidal *et al.*, 2004; Edvinsson *et al.*, 2004). Pacientes con VIH que son seropositivos a *T. gondii* desarrollan encefalitis toxoplásmica con secuelas neurológicas que finalmente dan como resultado la muerte del paciente (Luft y Remington, 1992).

En pacientes inmunocompetentes la infección es controlada principalmente por una respuesta de tipo celular en la que participan linfocitos T CD4, CD8, Citotóxicos, células NK, macrófagos y por anticuerpos específicos circulantes de tipo IgG, IgA e IgM (Naot *et al.*, 1982; Hauser *et al.*, 1982).

Pacientes con toxoplasmosis activa manifiestan signos y síntomas como son fiebre, adenopatías, esplenomegalia, o patologías como neumonía, meningitis e infección diseminada; el diagnóstico está basado en cultivo celular, PCR (RT-PCR), y pruebas inmunológicas que incluyen titulación de anticuerpos de tipo IgG, IgA e IgM específica la cual es indicativa de exposición reciente o infección activa (<http://www.higiene.edu.uy/cefa/parasito/2006/toxo.pdf>).

Los fármacos utilizados en el control de la infección por *T. gondii* son antiprotozoarios dirigidos a inhibir la biosíntesis de folatos como Pirimetamina combinada con Sulfonamida que inhiben a la dihidrofolato reductasa o la dihidropteroato sintasa, antibióticos como Trimetoprim con Sulfametoxazol o Clindamicina, y Atovaquona que inhibe el transporte de electrones a nivel del complejo bc1. La poca efectividad de estos medicamentos y/o los efectos secundarios ocasionados por el tratamiento permite que a la fecha se continúe buscando alternativas terapéuticas contra la toxoplasmosis (Uggla *et al.*,1990;Fogel *et al.*,2008;Meneceur *et al.*, 2008).

Toxoplasma y otros miembros del Phylum Apicomplexa poseen el vestigio de un plástido (apicoplasto) el cual es un organelo derivado de un cloroplasto y que es el remanente de una endosimbiosis secundaria entre un ancestro de los apicomplejos y un organismo fotosintético (un alga roja o un alga verde). Estudios filogenéticos y análisis estructurales realizados por Khöler *et al.* (1997) y Palmer (2003) sugieren que el organismo fotosintético fue un alga verde. Otros estudios sugieren un origen a partir de un alga roja (Blanchard *et al.*,1999; Zhang *et al.*, 2000).

Estudios realizados por Pérez-Martínez *et al.* (2001) con algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp* evidenciaron la presencia del gen *cox2* de la citocromo c oxidasa en el genoma nuclear y no en el genoma mitocondrial como se encuentra en la mayoría de los organismos. Otra particularidad del gen *cox2* es que se encuentra fragmentado en *cox2a* y *cox2b*, los productos proteicos COX2A y COX2B pueden encontrarse en extractos de mitocondrias aisladas de las algas clorofíceas mencionadas. Estudios filogenéticos realizados en el laboratorio por Funes *et al.* (2002) con el gen *cox2* de la citocromo c oxidasa evidenciaron la cercanía filogenética de parásitos apicomplejos y las algas *Chlamydomonas r.* y *Polytomella sp.* El parásito apicomplejo *T. gondii* también tiene genes *cox2* fragmentados de localización nuclear (Funes *et al.*, 2002), pero no se tiene evidencia de los productos proteicos en la mitocondria del parásito. Por tanto el motivo de este proyecto es obtener evidencia bioquímica, inmunocitoquímica y por histoquímica de la presencia de los productos proteicos de los genes *cox2a* y *cox2b* en la mitocondria del taquizoito de *T. gondii*.

1.1 Formas proliferativas importantes en *T. gondii*.

Bradizoito: Es la forma de proliferación lenta, se encuentra en quistes presentes en cerebro, músculo, ojos, riñones, e hígado del huésped intermediario como cerdo u ovejas. Expresan genes específicos tales como CST1 que codifica para una glicoproteína de 116 kDa de la pared quística, BAG1 producto de un gen de copia única, su expresión esta regulada durante el desarrollo de la transcripción, es específico de bradizoito y codifica para un antígeno citoplasmático de 28-30 kDa. LDH2 es una lactato deshidrogenasa citoplasmática de 35 kDa que esta expresada únicamente en bradizoito (Weiss y Kim, 2000; Eaton, 2005).

Taquizoito: Es la forma invasiva de proliferación rápida, tiene una forma característica de media luna, y mide 2 x 6 μm . Se replica dentro de una vacuola parasitófora, tiene un movimiento de deslizamiento y gira en sentido contrario a las manecillas del reloj sobre la superficie de la célula huésped. Posee en su extremo anterior definido por el conoide organelos del complejo apical de secreción regulada que participan en los procesos de invasión celular por penetración activa o fagocitosis. El taquizoito expresa los genes específicos SAG1 antígeno de superficie y LDH1 que codifica una lactato deshidrogenasa específica de taquizoitos (Weiss y Kim 2000; Eaton, 2005).

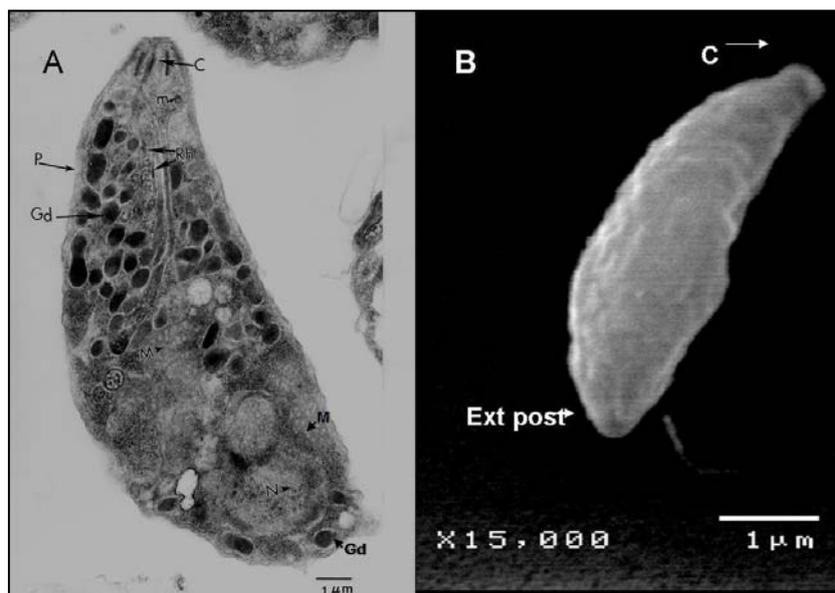


Fig 1. A) Ultraestructura del taquizoito de *T. gondii* (C) Conoide, (m) Micronemos, (P) Películo, (Gd) Gránulos densos, (Rh) Roptrias, (M) Mitocondria, (N) Núcleo. Tesis, Escobar. (2000) MET. B) Taquizoito extruyendo el conoide visto por MEB

1.1.1 Complejo apical.

El complejo apical está constituido por estructuras características propias de este Phylum como es el conoide (el cual es parte del citoesqueleto), y los organelos secretores roptrias y micronemos.

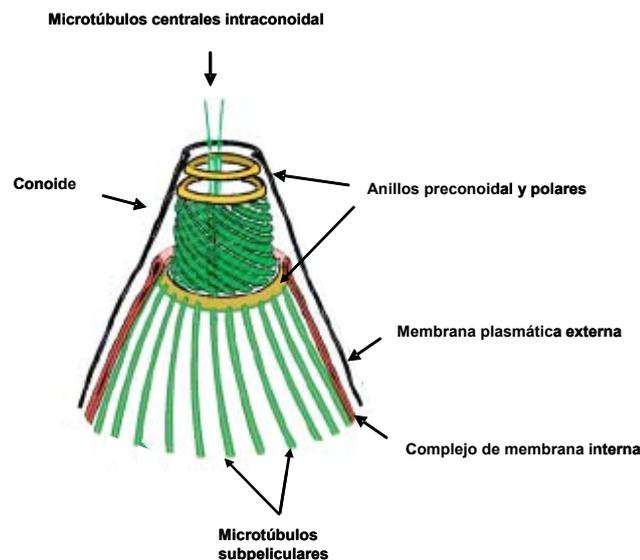


Fig 2. Citoesqueleto del complejo apical, tomado de Hu *et al.* (2006).

Conoide. Es parte del complejo apical y es un organelo de estructura fibrosa en forma de cono truncado, en la parte anterior posee 2 anillos preconoidales que la rodean. El conoide se encuentra conformado por 14 elementos de composición desconocida organizados en forma helicoidal, se extruye en el momento de la invasión celular y se retrae en condiciones de reposo (Nichols y Chiappino,1987; Russel y Burns,1984).

Micronemos. Son organelos pequeños, se encuentran adyacentes a las roptrias en el extremo apical y secretan a las proteínas de adhesión específicas TgMIC1, TgMIC2, TgMIC3 en el momento en que el parásito se adhiere a la célula huésped. (Carruthers, 1999).

Roptrias. Son organelos en forma de sacos alargados, electrodensos se encuentran entre 8 a 16 por célula y abarcan dos terceras partes del cuerpo del parásito. A la fecha se han identificado proteínas específicas de roptrias Rop1 a la Rop9.

Gránulos densos. Son organelos esferoidales electrodensos que se encuentran normalmente distribuidos en la porción media anterior y posterior del citoplasma del parásito. Se considera que promueven la replicación intracelular, posiblemente por el transporte y procesamiento de componentes de la célula huésped (Carruthers,1999; Dubremetz *et al.*,1998).

Películo: Es un complejo trimembranal que rodea a todo el cuerpo del parásito y está constituido por la membrana plasmática y el complejo membranal interno (IMC), este último es un conjunto de vesículas aplanadas que se encuentran a lo largo del cuerpo del parásito dispuestas en forma helicoidal. Asociadas a estas vesículas se encuentra una serie de partículas intramembranales que al parecer se asocian con el citoesqueleto y que son importantes en los procesos de secreción, motilidad y evasión de la respuesta inmune (Chobotar y Scholtiseck, 1982; Nichols y Chiappino, 1987).

1.1.2 Organelos de *T. gondii* rodeados por membrana.

Complejo de Golgi. En *T. gondii* existe uno y está ubicado cerca del núcleo en dirección apical. En toxoplasma los organelos secretorios son suministrados y mantenidos por una ruta secretoria polarizada incluyendo el retículo endoplásmico unido a la envoltura nuclear, existe un sitio de exportación en el retículo endoplásmico que suministra proteínas a un único aparato de Golgi (Pelletier *et al.*, 2002).

Apicoplasto. Es un organelo producto de una endosimbiosis secundaria, derivado del cloroplasto de un alga verde o roja que fue endocitada por el ancestro de los apicomplejos. Este organelo ha perdido su función fotosintética. Puede estar ubicado adyacente al extremo apical del núcleo del parásito. De acuerdo a Khöler *et al.* (1997), el apicoplasto es un organelo rodeado por 4 membranas. Sin embargo, un reporte reciente de la misma autora (Khöler, 2005) sugiere que existen zonas del apicoplasto con membrana dual y zonas con cuatro membranas rodeando la mayoría del apicoplasto. Dentro de estas cuatro capas existe una formación en forma de bolsillo, la cual tiene conexión con la membrana más externa de la

envoltura nuclear y adyacente a una evaginación regional de la mitocondria del parásito. Esta asociación entre el apicoplasto y la mitocondria se ha denominado AMD (Dominio Mitocondrial Asociado al Apicoplasto). El AMD muestra un lumen rico en matriz mitocondrial y pocas crestas que se extienden a lo largo del apicoplasto. El AMD usualmente termina con una evaginación cilíndrica de la pared de doble membrana, y engloba cada una de las singulares crestas dilatadas o relativamente extendidas como un remolino de plegamientos de la membrana interna mitocondrial (Khöler, 2005).

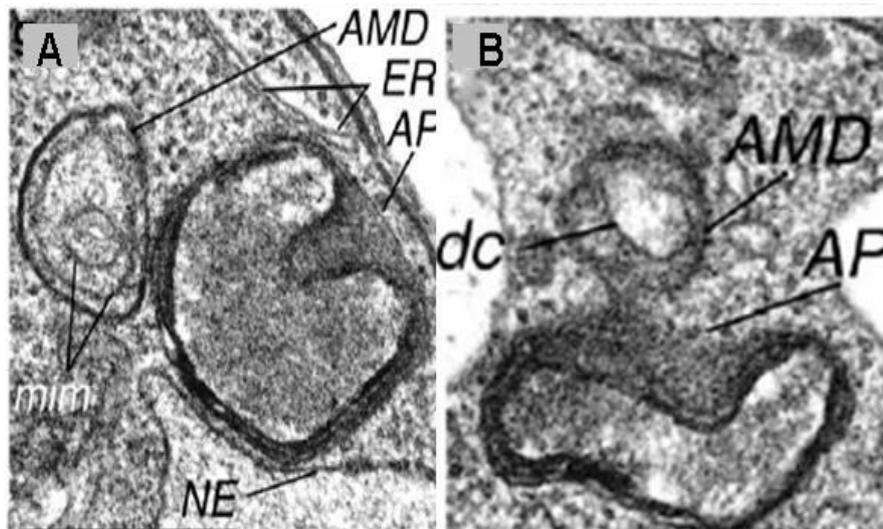


Fig 3. Apicoplasto y el (AMD) Dominio Mitocondrial Asociado al Apicoplasto, (AP) Apicoplasto, (ER) Reticulo endoplásmico, (NE) Envoltura nuclear, (mim) membrana mitocondrial interna, (dc) cresta distendida (dentro de la doble membrana). Tomado de Khöler (2005).

El apicoplasto tiene un genoma circular de 35 Kb, el cual se presume que es el remanente de un precursor cloroplástico más grande. Hay 8 copias del genoma que codifica genes para RNA polimerasa, genes ribosomales, factores de elongación de la traducción y chaperonas (Wilson y Williamson, 1997). El apicoplasto se replica por fisión binaria y es segregado dentro de las células hijas en una etapa temprana del desarrollo de la replicación (Khöler *et al.*, 1997).

Al apicoplasto se han asignado funciones metabólicas tales como la biosíntesis de aminoácidos, ácidos grasos, isoprenoides y grupos hemo, así como la asimilación de nitrato, sulfato y almacenamiento de almidón entre otros (Hrazdina y Jensen, 1992).

Retículo Endoplásmico. En *T. gondii* el retículo endoplásmico se encuentra distribuido por toda la célula, pero mayormente concentrado posterior al núcleo.

Estudios realizados por microscopía electrónica muestran que existe continuidad del Retículo endoplásmico con la superficie basal y lateral de la envoltura nuclear, por lo que se sugiere que existe intercomunicación entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi vía la envoltura nuclear (Joiner y Roos, 2002; Hager *et al.*, 1999).

Núcleo. El núcleo de *T. gondii* realiza funciones similares a cualquier núcleo de eucariontes. Sin embargo, ha separado la replicación del DNA nuclear y mitosis de los eventos asociados con la división celular, por lo que se dice que *T. gondii* utiliza un ciclo celular modificado en los puntos de chequeo de las fases del ciclo celular, la fase G₁ y S son más extensas y la fase G₂+ M es relativamente corta, cuando la replicación es lenta se aumenta la fase G₁ del ciclo celular (Hu *et al.*, 2002)

El genoma de *T. gondii* es haploide y tiene 8×10^7 pares de bases por núcleo. Está compuesto por 14 cromosomas de 2-7 megabases (Sibley y Boothroyd, 1992; Khan *et al.*, 2005). Se ha reportado que el genoma nuclear se encuentra contaminado con secuencias de origen mitocondrial cuya función no es clara (Ossorio *et al.*, 1992).

1.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Toxoplasma* incluye a un huésped definitivo en el que se lleva a cabo la fase de reproducción sexual y un huésped intermediario en el que se lleva a cabo el ciclo de reproducción asexual.

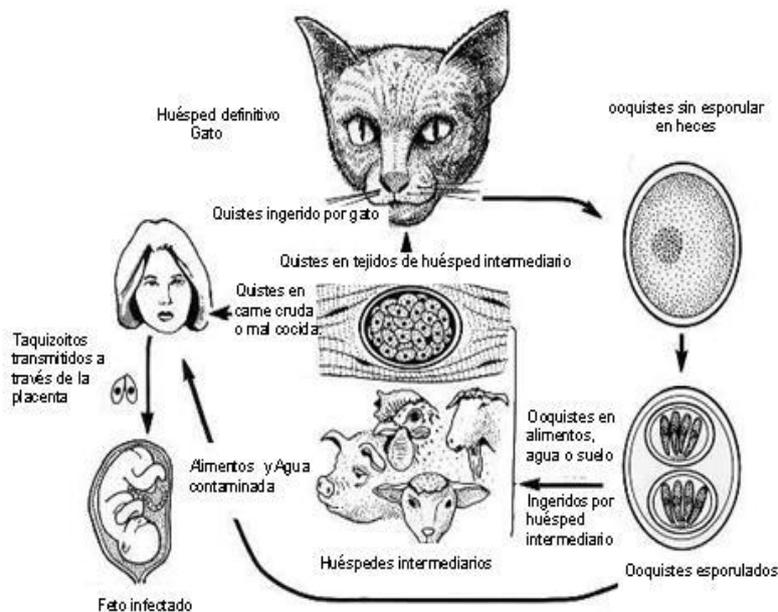


Fig 4. Ciclo biológico tomado de Samuel *et al.* (2001).

1.2.1 Reproducción sexual.

Este tipo de reproducción se lleva a cabo en el epitelio intestinal del gato, inicia cuando éste ingiere quistes presentes en tejidos de animales infectados como ratones, cerdo, cabra. Los bradizoitos presentes en el quiste se liberan e invaden el epitelio intestinal del gato en donde por un proceso de diferenciación celular conocido como gametogonia, se lleva a cabo la fertilización del microgametocito ♀ por el microgametocito ♂, dando como resultado la formación del ooquiste que contiene en su interior a los esporozoitos. Los ooquistes son excretados con las heces del gato, sin esporular, y en condiciones ambientales esporulan alrededor de 1 a 5 días, a partir de los cuales son infectivos al ser ingeridos con alimentos contaminados y agua contaminada con heces felinas (Samuel *et al.*, 2001; Black y Boothroyd, 2000).

1.2.2 Reproducción asexual.

Este tipo de reproducción sucede en el huésped intermediario, entre los que se encuentran animales de sangre caliente, ganado de interés veterinario, y principalmente el hombre. La reproducción asexual se lleva a cabo por endodiogonia, proceso en el que se generan dos células hijas a partir de una célula madre. Este tipo de reproducción la lleva a cabo la forma de proliferación rápida o taquizoito y la forma de proliferación lenta o bradizoito. El proceso comienza con la aparición de 2 membranas peliculares (IMC) que inician su formación en medio de la célula, las membranas peliculares van a definir a las células hijas en el citoplasma de la célula madre en lo que parece ser un conoide rudimentario y un centro organizador de microtúbulos (anillo polar). A medida que estas IMC se extienden, la célula madre se hace más redonda y los organelos apicales nacientes (roptrías y micronemos) se forman en el extremo anterior de las células hijas. El núcleo, el apicoplasto, la única mitocondria y el citoplasma, se reparten entre las dos células nacientes, las cuales se encuentran rodeadas por la membrana de la vacuola parasitófora hasta que finalmente el complejo de membrana interna desaparece y el plasmalema es utilizado para envolver a las dos células hijas (Black y Boothroyd, 2000; Shaw *et al.*, 2001).

Muchos protozoarios son células altamente polarizadas con un citoesqueleto subpelicular complejo y frecuentemente contienen una copia de algunos de sus

organelos. Para tales organismos es necesario que repliquen estas estructuras y organelos de una copia y que los distribuyan dentro de las células hijas mientras se está manteniendo la integridad funcional de los organelos y la célula (Shaw *et al.*, 2001).

1.3 Mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares, que de acuerdo a la teoría endosimbionte, tuvieron su origen a partir de una α proteobacteria que se estableció en el citosol de un protoeucariote en una etapa temprana de la evolución (Margulis, 1970). Las secuencias de genes mitocondriales han permitido rastrear los orígenes de las mitocondrias hacia un ancestro de los miembros de la subdivisión de los rikettsiales, a la cual pertenecen parásitos intracelulares obligados de los géneros *Rickettsia*, *Anaplasma* y *Ehrlichia* (Andersson *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 1999).

Las mitocondrias tienen dos membranas, la membrana mitocondrial externa que es permeable a pequeñas moléculas menores a 5000 Da, e iones, los cuales se mueven libremente a través de canales transmembranales formados por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas. La membrana interna es impermeable a moléculas más pequeñas e iones, incluyendo protones. El intercambio entre la membrana interna y externa se realiza a través de transportadores específicos. La matriz mitocondrial se encuentra delimitada por la membrana interna, el grado de plegamiento de esta membrana es diferente en los distintos tipos de mitocondria de vertebrados y plantas (Nelson *et al.*, 2005). En la mitocondria se llevan a cabo las transformaciones energéticas más importantes, como la oxidación de sustratos y la generación de energía química en forma de ATP. También se encuentran involucradas en los procesos de muerte celular, envejecimiento y algunos procesos patológicos (Vázquez *et al.*, 2002).

1.4 Estructura de la mitocondria de *T. gondii*.

Estudios recientes con *T. gondii* han dado a conocer la ultraestructura de la mitocondria, y en conjunto con otros estudios de oximetría, fluorescencia y microscopía electrónica, han mostrado que este parásito posee una mitocondria

altamente ramificada organizada en compartimentos, y se encuentra estrechamente relacionada con el apicoplasto y la envoltura nuclear. El organelo es funcional, a pesar de que en los parásitos apicomplejos no se encuentra presente el complejo I. Hasta ahora no se conoce exactamente como se encuentran conformados los complejos mitocondriales en toxoplasma, así mismo no se conoce bien su funcionamiento bioquímico, puesto que ninguno ha sido aislado y caracterizado..

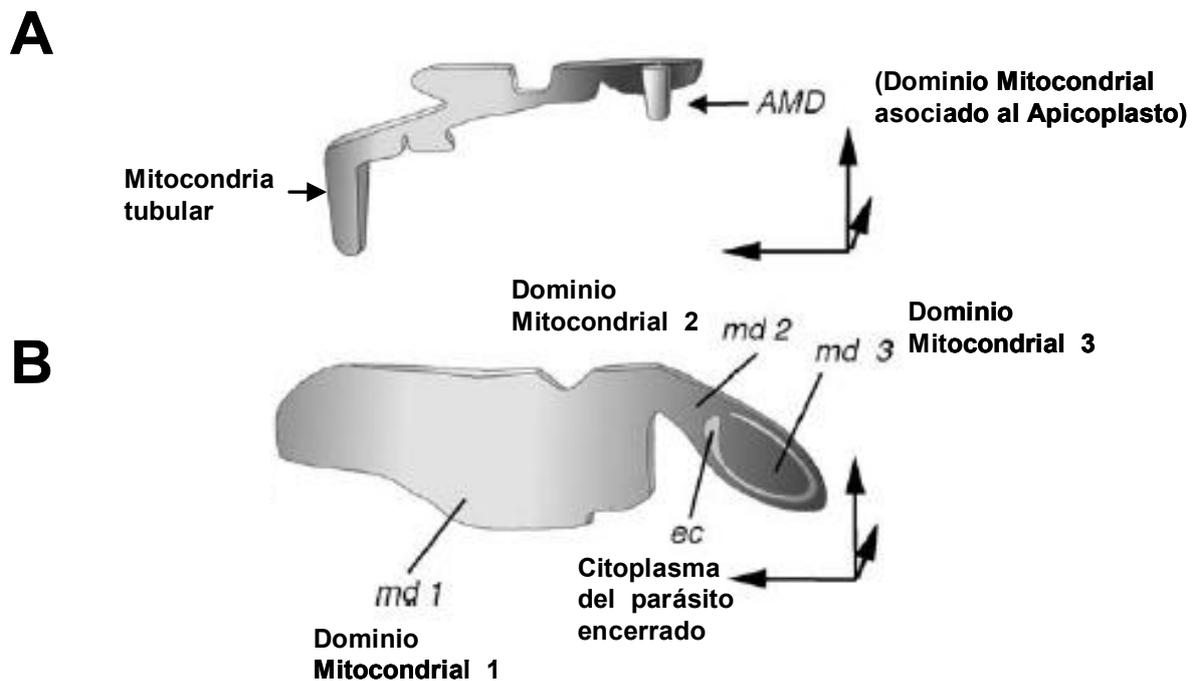


Fig 5. Mitocondria de *Toxoplasma gondii*. A) Mitocondria en forma tubular con dominio mitocondrial asociado al apicoplasto. B) Forma tridimensional de la mitocondria de *T. gondii*, con subdivisiones, y el ensamblaje del Complejo Ovoide Mitocondrial citoplasmático (OMC).

1.4.1 Estructura del OMC citoplasmático de *T. gondii*

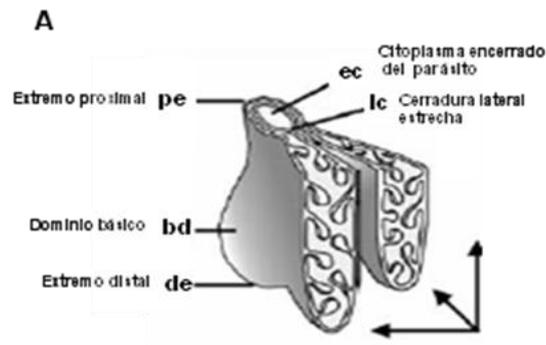


Fig 6. A.) Complejo ovoide mitocondrial citoplasmático

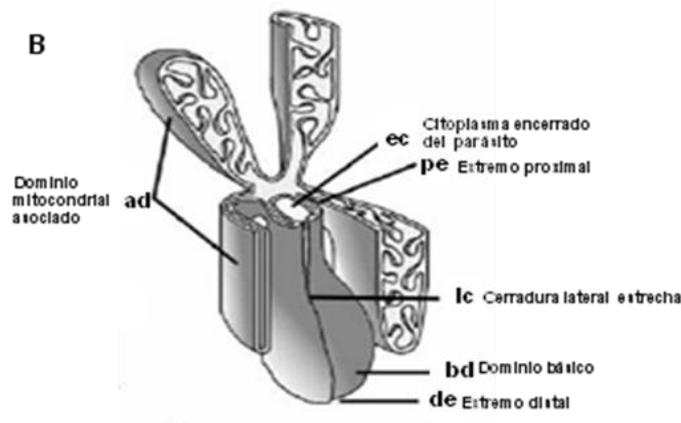


Fig 7. B.) Perfil de la estructura básica del complejo OMC

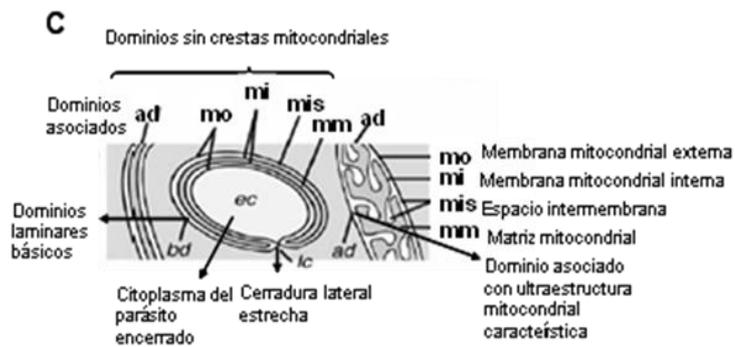


Fig 8. C. Cortetransversal del OMC avanzado.

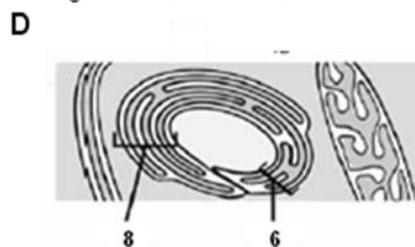


Fig 9. D. Corte transversal del OMC que muestra una pared multilaminar formada con 6 y 8 membranas.

Tomado de Khöler (2006).

1.5 Fosforilación Oxidativa

En la membrana interna mitocondrial se encuentran los cinco complejos multiproteicos que participan en la fosforilación oxidativa junto con dos pequeños transportadores de electrones móviles ubiquinona (Q) y citocromo c (cyt c). El transporte de electrones de complejo a complejo se lleva a cabo vía la quinona y el citocromo c.

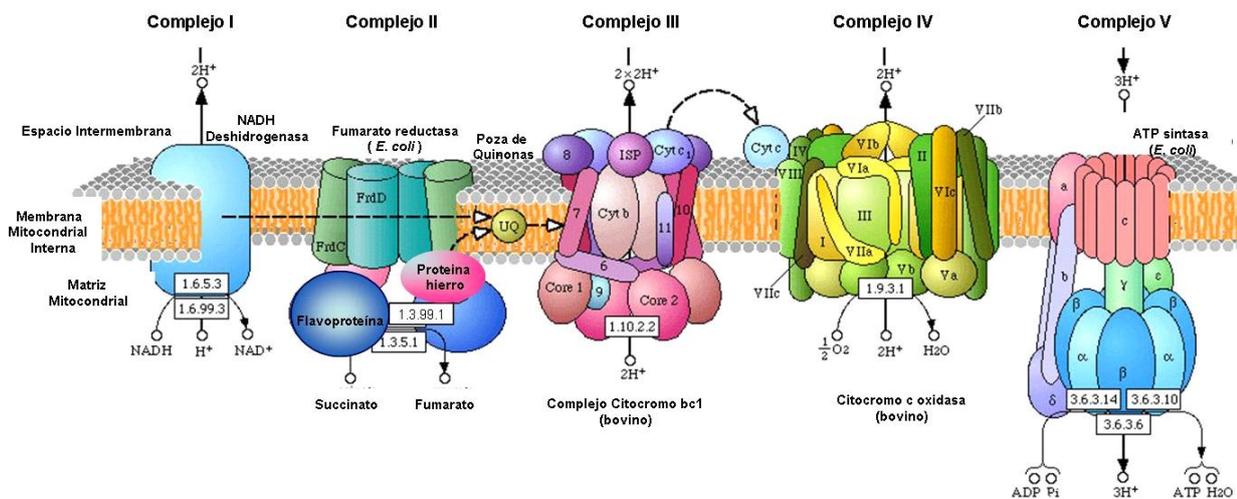


Fig 10. Estructura de la cadena respiratoria tomado de http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map_00190.html.

1.5.1 Complejo I (EC 1.6.5.3): NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa.

Esta enzima está compuesta por 46 subunidades diferentes en mamíferos, (Carroll *et al.*, 2002). El complejo inicia la transferencia de electrones al oxidar el NADH formado durante la glicólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los electrones son transferidos a la ubiquinona soluble en la membrana mitocondrial interna mediante una reacción exergónica. Esta reacción está acoplada a la translocación de cuatro protones del lado negativo en la matriz al lado positivo en el espacio intermembranal. Los dos electrones provistos por la oxidación de NADH son transferidos al aceptor primario de electrones de complejo I que es un flavin mononucleótido, subsecuentemente los electrones son transferidos a través de centros redox representados por 8 centros hierro-azufre, dos binucleares (N1a y N1b)

y seis centros tetranucleares (N2, N3-N6a, N6b), hasta el aceptor final que es la ubiquinona (Q), la cual entonces es reducida a ubiquinol (QH₂) (Rolf *et al.*, 2006).

El complejo I presenta una estructura tridimensional en forma de L constituida por dos brazos perpendiculares uno con respecto al otro, uno hidrofóbico embebido en la membrana lipídica y uno hidrofílico que se expone hacia el lado de la matriz mitocondrial.

1.5.2 Complejo II (EC 1.3.5.1): succinato deshidrogenasa.

Es un complejo unido a la membrana que también forma parte del ciclo de Krebs, cataliza la oxidación de succinato a fumarato y contiene 5 grupos prostéticos y cuatro diferentes subunidades. Las subunidades A y B contienen el sitio de unión al succinato y FAD unidos a 3 centros hierro azufre, mientras que las subunidades C y D contienen un hemo b y un sitio de unión a ubiquinona. En este complejo los electrones provenientes del succinato generado en el ciclo de Krebs son transferidos a través del FAD a los centros hierro azufre y después al sitio de unión de la ubiquinona. El complejo II es el único complejo de la cadena respiratoria que no bombea protones (Heuvel y Smeitink, 2001; Nelson *et al.*, 2005).

1.5.3 Complejo III(1.10.2.2):ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa o complejo bc₁.

Este complejo cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol (QH₂) al citocromo c, acoplada a un transporte de protones vectorial a través de la membrana interna mitocondrial. El complejo III se encuentra como dímero y solamente en esta forma es funcional. Cada monómero está constituido de 11 subunidades, que presentan en su estructura un sitio de unión para quinona QN y QP, respectivamente, citocromo b con grupos hemo b (bH y bL), y una proteína hierro-azufre de Rieske con 2 centros Fe-2S. La transferencia de los electrones a través de los centros redox de este complejo y los protones que son translocados del lado de la matriz al espacio intermembranal es lo que se conoce como ciclo Q.

1.5.4 Complejo IV (1.9.3.1): citocromo c oxidasa o ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa.

La citocromo c oxidasa es un complejo multiproteico de particular interés para nuestro estudio. Es el componente terminal de la cadena respiratoria, que transfiere electrones desde el citocromo c reducido hasta el oxígeno diatómico, contribuyendo a la formación del gradiente electroquímico de protones.

Esta enzima oligomérica contiene un hemo a , un hemo a_3 , y dos centros de cobre Cu_A y Cu_B . El centro Cu_A binuclear se encuentra asociado a la subunidad II (COX2) de la citocromo oxidasa y está unido a los grupos SH de 2 residuos de Cys (Vázquez *et al.*, 2002). Pertenece a la familia de enzimas oxidasas hemo-cobre, las cuales además de reducir el oxígeno diatómico a agua, actúan como una bomba de protones (Pereira *et al.*, 2001). Este complejo se encuentra constituido de 11-13 subunidades dependiendo del organismo. En mamíferos la enzima ensamblada la conforman 13 subunidades en cantidades equimolares.

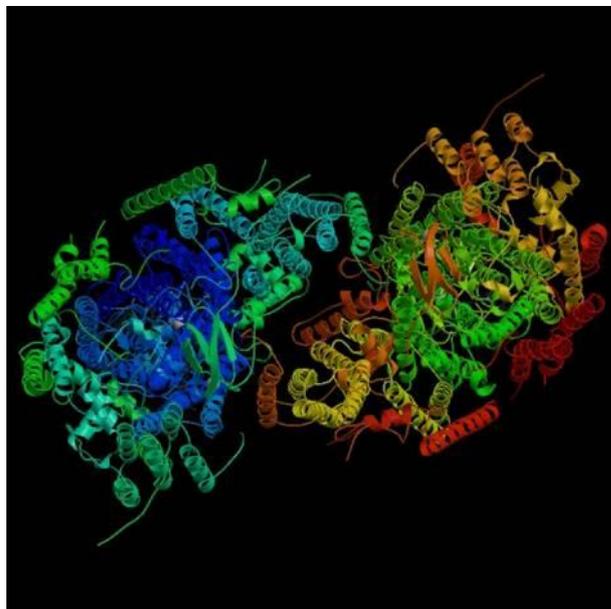


Fig 11. Citocromo c oxidasa de bovino en estado oxidado, tomado del PDB 1OCC, 1V54.

El núcleo activo de esta enzima la constituyen las subunidades COX1, COX2 y COX3, son las subunidades más grandes, están codificadas por el DNA mitocondrial, y son traducidas por ribosomas mitocondriales (Khalimonchuck y

Rödel, 2005). El resto de las subunidades están codificadas en el DNA nuclear, son sintetizadas en ribosomas citosólicos y transportadas a la mitocondria en donde son ensambladas con las otras subunidades dando lugar al complejo maduro.

Núcleo activo del complejo IV

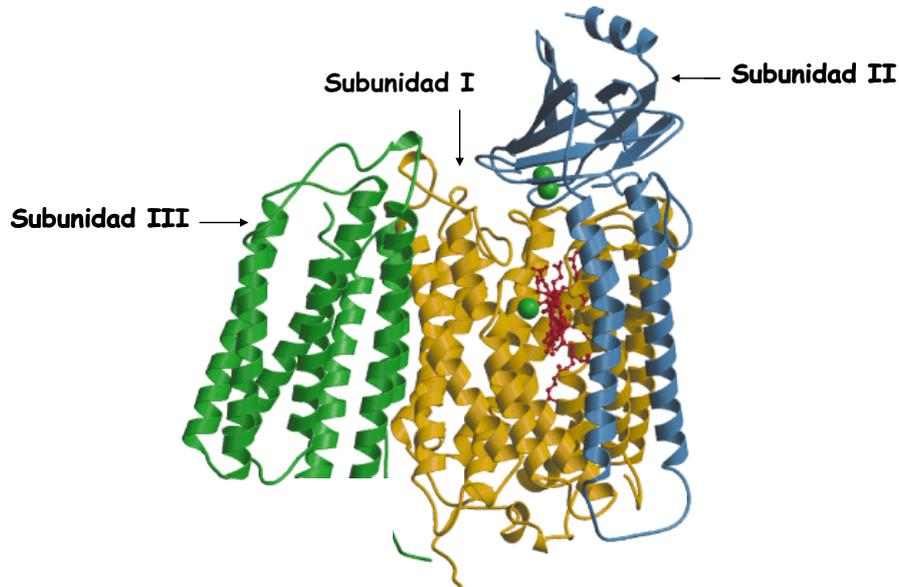


Fig 12. Subunidades que forman el núcleo activo de la citocromo c oxidasa, tomado de Lehninger (2005).

Las tres subunidades que constituyen el núcleo activo de la enzima de mamíferos son las que constituyen a la enzima funcional en procariotes (Keightley *et al.*,1995; Poyton y Mc Ewen,1996). En estos organismos los centros activos metálicos redox participan de manera importante en el ensamble y función de la enzima, la cual es dimerica (Frey y Murria, 1994; Tsukihara *et al.*,1995).

Las citocromos c oxidadas de las cuales se tienen las estructuras tridimensionales a alta resolución son las tipo aa3 de corazón de bovino (Tsukihara *et al.*,1995; Yoshikawa *et al.*,1998), de *Paracoccus denitrificans* y de *Thermus thermophilus* (Williams *et al.*, 1999; Soulimane *et al.*, 2000).

La subunidad COX1 en eucariotes y procariotes coordina el hemo a y la fusión del hemo a con el hemo binuclear del centro redox a3-CuB. Este último también une a un ion sodio por un sitio por el cual posee afinidad por iones calcio (Tsukihara *et al.*, 1995; Kirichenko *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002). COX1 es la subunidad más grande y

la más hidrofóbica de la enzima, tiene 12 cruces transmembranales, y es clave en el ensamblaje y función de la enzima así como en el bombeo de protones.

COX2

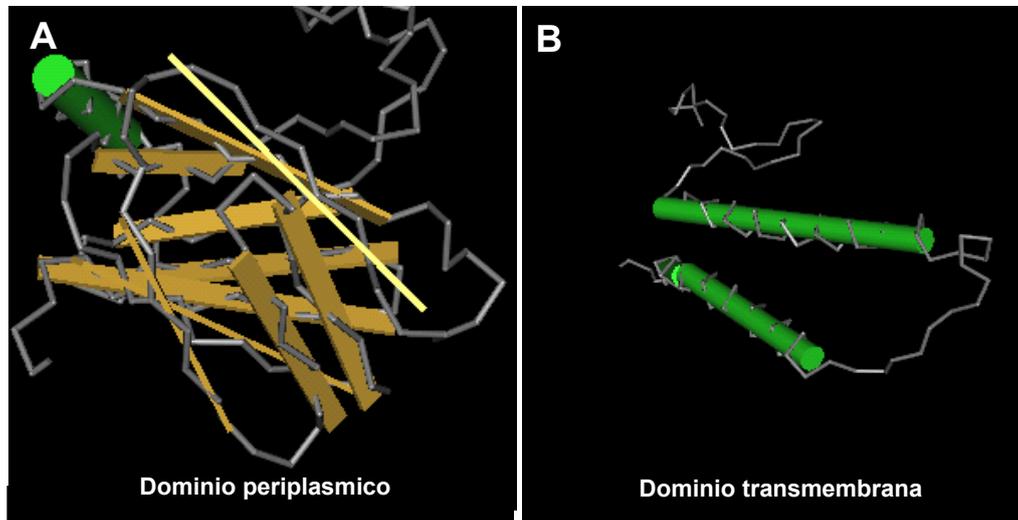


Fig 13. Dominios que forman a la proteína COX2, en Bovino. PDB, A) pfam00116 B) pfam02790.

COX2 es una subunidad de 26-27 kDa, la más pequeña del núcleo de la enzima (ver **fig.12**) y contiene dos iones Cu que se encuentran formando complejo con los grupos $-SH$ de dos residuos de Cys en un centro binuclear de CuA. Este centro binuclear y el sitio de unión al citocromo c están localizados en un dominio de la subunidad 2 que protruye hacia el lado P de la membrana interna (espacio intermembranal), (Nelson *et al.*, 2005). En este sitio se lleva a cabo la interacción del citocromo c vía el centro de cobre A (Poyton y Mc Even, 1996). En humanos, tanto la subunidad COX2 como la COX1 son necesarias para la unión del hemo a3 (Rahman *et al.*, 1999).

Si dividimos a COX2 en dos dominios como se muestra en la **fig.13**, tendríamos que presenta un segmento amino terminal que se localiza en el espacio intermembranal (dominio periplásmico), y un dominio transmembranal muy hidrofóbico, que corresponde a las dos hélices transmembranales. Por otra parte, tiene un segmento hidrofílico en el que se encuentra el extremo carboxilo terminal. Este último dominio está ubicado en el espacio intermembranal y es en este segmento donde se ubican los residuos que participan en la unión al centro bimetálico de cobre (CuA).

La subunidad COX3 es una proteína hidrofóbica de cerca de 30 kDa que atraviesa 7 veces la membrana interna mitocondrial. De las tres subunidades esta es la menos conservada y puede participar en el plegamiento, actividad y/o estabilidad de la enzima (Lemaire *et al.*, 1998; Meunier y Taanman, 2002). Además ésta subunidad no participa en la translocación de protones (Capaldi, 1990; Haltia *et al.*, 1991; Poyton y McEwen, 1996). Estudios con homólogos bacterianos de COX sugieren que COX3 no se requiere para la unión de centros metálicos (Bratton *et al.*, 2000).

Estudios de mutagénesis realizados con COX3 de *Rhodobacter sphaeroides* sugieren que éste participa en mantener la salida rápida de protones a través del canal D a pH fisiológico, ya que cuando es mutada se afecta la actividad. Así mismo se sugiere que limita el número de ciclos catalíticos de la enzima y de esta forma previene el suicidio por inactivación, protegiendo el sitio de CuB durante la actividad enzimática (Bratton *et al.*, 1999; Hosler, 2004).

COX4 participa en la modulación del ensamblaje inicial de la enzima, así como en el de las otras subunidades COX6, COX7, COX7a (Nijtmans *et al.*, 1998). Por su parte la subunidad COX8 tiene un efecto sobre la función, aparentemente en la formación del dímero activo (Poyton y McEwen, 1996). La subunidad 5 participa modulando la actividad catalítica de COX1 alrededor del centro de reacción binuclear, alterando el ambiente del hemo a₃ (Poyton y McEwen, 1996; Burke y Poyton, 1998).

Los cuatro complejos respiratorios descritos utilizan la energía liberada de la transferencia de electrones para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial dentro del espacio intermembranal, creando un gradiente de pH y un potencial eléctrico transmembranal.

1.5.5 Complejo V (EC 3.6.3.14) ATPasa o ATP sintasa.

La ATPasa es una enzima tipo F similar en estructura y mecanismo a la ATP sintasa de cloroplasto y bacterias. Esta enzima se encuentra formada por dos subcomplejos: F1 formado por proteínas solubles y Fo formado por proteínas integrales de membrana.

La F1 mitocondrial posee 9 subunidades en su estructura $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Cada una de las subunidades β tiene un sitio catalítico para la síntesis de ATP. Las diferentes

conformaciones de las subunidades β se denominan β ATP, β ADP y β vacía, esta diferencia en la unión de nucleótidos entre las tres subunidades es crítica para el mecanismo del complejo. El complejo Fo es el poro de salida de protones, y está compuesto de tres subunidades a, b, y c en proporción ab_2c_{10-12} . (Nelson *et al.*, 2005). El complejo usa la energía almacenada del gradiente electroquímico para condensar ADP y Pi y en consecuencia formar ATP (Yajatri, 2006).

El gradiente de protones es esencial para el funcionamiento de este complejo debido a que en ausencia de éste el ATP no puede ser liberado de la enzima. Para la síntesis continua de ATP la enzima debe ciclar entre una forma que une ATP fuertemente y una que lo libera.

El mecanismo que utiliza la ATP sintasa es una catálisis rotacional, en la que las diferentes subunidades β llevan a cabo la síntesis de ATP, primeramente el sitio β ADP une ADP y Pi del medio, seguidamente la subunidad cambia su conformación asumiendo la forma β ATP que une fuertemente y estabiliza el ATP en la superficie de la enzima. Posteriormente la subunidad cambia a la conformación β vacía de baja afinidad para el ATP, el cual es liberado. Una vez liberado el ATP puede iniciarse otro ciclo de síntesis con la unión de nuevos sustratos (Nelson *et al.*, 2005).

1.6 Genoma mitocondrial.

Los genomas mitocondriales presentan una gran diversidad de organización génica, diferentes mecanismos de expresión y diversos patrones de evolución en cada grupo de organismos. La mayoría de los genomas mitocondriales que se han caracterizado son circulares, pero también existen genomas lineales. El tamaño es variable, desde los reportados en plantas cucurbitáceas de 2000 kb hasta el de *Plasmodium falciparum* con un tamaño aproximado de 6 kb. En general, en los genomas mitocondriales únicamente se encuentran codificadas proteínas de naturaleza hidrofóbica pertenecientes a los complejos de la cadena respiratoria y del complejo de la ATPsintasa, así como también algunos RNA ribosomales y algunos o todos los RNA de transferencia. A pesar de la importancia del genoma mitocondrial en el funcionamiento de la célula, la mayoría de información para la función y biogénesis se encuentra codificada en el DNA nuclear, de donde son importados la gran mayoría de los componentes que forman parte de la estructura y función mitocondrial (González-Halphen *et al.*, 2003).

El genoma mitocondrial de *T. gondii*, aun no se encuentra totalmente secuenciado, sin embargo, se ha encontrado que los parásitos apicomplejos poseen un genoma lineal muy compacto y muy pequeño, de menos de 6 kb que se encuentran repetidos y concatenados unos con otros. En otro miembro del phylum, Theileria, las unidades lineales se encuentran de manera independiente y presentan secuencias repetidas en los extremos. En los apicomplejos en los que se ha caracterizado el genoma mitocondrial se ha encontrado que existen tres genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Cyb, COX1 y COX3) y genes que codifican RNA ribosomales fragmentados en módulos. En *T. gondii* ha sido difícil la caracterización del DNA mitocondrial debido a que existen numerosos fragmentos de secuencias de origen mitocondrial flanqueadas por secuencias repetidas en el genoma nuclear (Feagin, 2000).

1.7 Transferencia de genes de la mitocondria al núcleo.

La transferencia de genes de la mitocondria al núcleo se ha llevado a cabo durante la evolución. A partir del evento de endosimbiosis entre dos organismos, uno de ellos una α -proteobacteria, se inició también la reducción del genoma del organismo engullido. La causa principal de esta reducción de tamaño fue la transferencia de genes al núcleo. En el caso de los parásitos apicomplejos y las algas, se sugiere que el ancestro del apicomplejo esclavizó en su interior a un alga, de la cual únicamente tomó a los genes que le eran útiles para su sobrevivencia y los genes que no le eran útiles fueron perdiendo actividad hasta que fueron silenciados y eliminados. Como ejemplo, tenemos a los genes que participaban en el proceso de fotosíntesis y que ya no están presentes en el genoma del apicoplasto del parásito (Gray *et al.*, 1999; González-Halphen *et al.*, 2004).

Los genomas mitocondriales actuales representan sólo una fracción de aquellos genes que estaban presentes en el endosimbionte original. Se sugiere que la mayor parte de esta pérdida de material genético debe haber sucedido durante el establecimiento de la endosimbiosis y que puede ser el resultado de dos fenómenos distintos:

- 1) La eliminación de genes no esenciales o redundantes en los que la función pudo ser substituida por los genes nucleares del hospedero.

2) La exportación de material genético desde la protomitocondria hacia el núcleo celular (Andersson *et al.*, 2003; Kurland *et al.*, 2000).

Actualmente se conoce que existen organismos en los cuales se han dado fenómenos de migración de genes de la mitocondria al núcleo, tal es el caso de *S. cerevisiae*, y el hongo *Podospora anserina* en el que la migración se relaciona con el envejecimiento celular (Wright y Cummings, 1983). Otros casos de migración de genes de la mitocondria al núcleo se han podido observar en las algas clorofíceas como *Scenedesmus obliquus*, y otras como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.* En la mayoría de los organismos eucariontes las tres subunidades más grandes de la citocromo c oxidasa (COX1, COX2, y COX3) se encuentran codificadas en el DNA mitocondrial en los genes correspondientes *cox1*, *cox2*, *cox3* y son sintetizadas en la matriz mitocondrial. Sin embargo en las algas clorofíceas las subunidades COX2 y COX3 se encuentran codificadas en el genoma nuclear. Otra particularidad observada en las algas clorofíceas es que el gen *cox2* se encuentra fragmentado en dos genes independientes denominados *cox2a* y *cox2b*. El gen *cox2a* codifica para la subunidad COX2A, que corresponde al extremo amino terminal y a la región hidrofóbica transmembranal de una subunidad COX2 ortodoxa. El gen *cox2b* codifica para la proteína COX2B, equivalente a la porción hidrofílica, que une al centro diatómico del CuA en una subunidad COX2 tradicional (Pérez-Martínez *et al.*, 2001). Estos genes codificados en el genoma nuclear y que se encuentran fragmentados también se presentan en otros parásitos apicomplejos como *Plasmodium falciparum*, *P. yoelii*, *Theileria annulata*, *T. parva* y *Eimeria tenella* (Funes *et al.*, 2002). Esto sugiere que los parásitos apicomplejos obtuvieron dichos genes a partir de un alga verde ancestral.

1.8 Importación de proteínas.

La mayoría de proteínas que forman parte de la maquinaria mitocondrial se encuentran codificadas en el núcleo celular y son importadas desde el citosol. Así mismo cada proteína importada tiene que alcanzar un subcompartimiento determinado. Por lo tanto se requiere la translocación selectiva de estas proteínas a través de varias membranas hasta que llegan al lugar donde son funcionales.

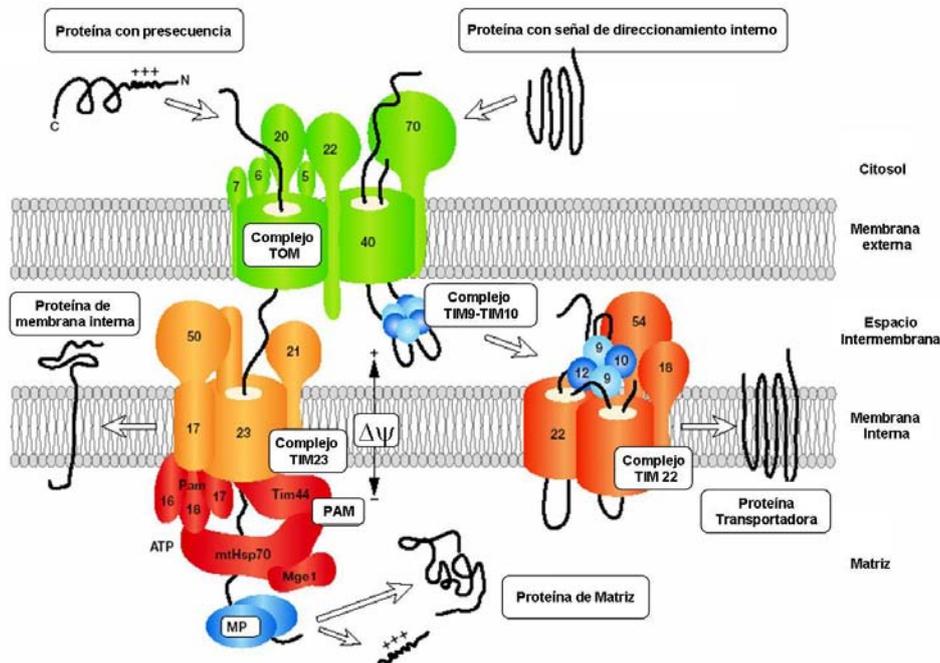


Fig 14. Rutas principales de importación de proteínas en la mitocondria.

La figura 14 muestra a proteínas dirigidas por presecuencias mediante el complejo TOM (Translocasa de la Membrana Externa), complejo TIM 23 (Translocasa de la Membrana Interna), y el motor PAM. MP es la peptidasa de procesamiento mitocondrial que remueve la presecuencia. También se muestran las proteínas de membrana interna que son escindidas y liberadas lateralmente del complejo TIM 23. La otra ruta muestra a los precursores con señales de direccionamiento interno que son transportados. Estos precursores son reconocidos por el receptor TOM70, translocado por el complejo TOM y por las chaperonas translocasas del espacio intermembrana TIM9-TIM10. El complejo TIM22 promueve la inserción de proteínas transportadoras dentro de la membrana interna como la Mthsp70 (chaperona de membrana interna), PAM Motor asociado a presecuencia translocasa, TIM (translocasa de membrana interna) y TOM (translocasa de membrana externa). Tomado de Bolender *et al.* (2008).

Las proteínas que son importadas a la matriz mitocondrial son captadas desde el citosol en cuanto son sintetizadas, la mayoría de estas proteínas precursoras mitocondriales tienen un péptido señal entre 10 a 80 residuos de aminoácidos en su extremo amino terminal, el cual es escindido por una proteasa específica (peptidasa de señal). Los péptidos señal generalmente forman alfa hélices anfipáticas en las que todos los residuos cargados positivamente se localizan en un lado de la hélice y todos los restos hidrofóbicos se distribuyen en el lado opuesto, dando como consecuencia que tales estructuras sean reconocidas por proteínas receptoras

específicas de la superficie mitocondrial (Alberts *et al.*, 2002; Heijne *et al.*, 1989). Muchos precursores carecen de esta secuencia señal pero poseen secuencias internas que le permiten ser direccionadas a la mitocondria como se muestra en la **figura 14**.

Para el proceso de importación de proteínas al interior de la mitocondria se requiere la energía de hidrólisis del ATP y un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial (Alberts *et al.*, 2002.; Neupert y Herrmann, 2007).

Otra de las familias de proteínas importantes que participan en el importe son las conocidas como chaperoninas del tipo de las HSP70 citosólicas, las cuales aseguran el correcto plegamiento de las proteínas al interior de las mitocondrias, así como mantener el estado desplegado de los precursores durante la translocación.

II. ANTECEDENTES DIRECTOS.

En *T. gondii*, el gen *cox2* está fragmentado y se encuentra codificado en el genoma nuclear. De acuerdo a los resultados obtenidos con *Plasmodium falciparum* y otros apicomplejos, se ha encontrado que los genes *cox2a* y *cox2b* no se encuentran en regiones contiguas más bien en dos cromosomas diferentes. En *Plasmodium falciparum* se determinó que *cox2a* se encuentra en el cromosoma 13 y *cox2b* se encuentra en el cromosoma 14. Se piensa que todos los parásitos apicomplejos presentan genes *cox2* fragmentados (Funes *et al.*, 2002).

La mayoría de las células con organelos rodeados por membranas encaran algunas dificultades para importar proteínas correctamente. Los parásitos apicomplejos presentan muchos niveles de complejidad, debido a que además de contar con los organelos típicos de una célula eucariota, contiene tres tipos adicionales de organelos de secreción y un apicoplasto (Khöler *et al.*, 1997; Waller *et al.*, 1998).

Se ha reportado la existencia de la chaperona HSP60 en la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii* que indica el direccionamiento de proteínas in vivo, y por tanto la existencia de una mitocondria funcional para este estadio del parásito. Este tipo de chaperonas funcionan selectivamente en el ensamblaje postranscripcional de proteínas multiméricas codificadas por genes mitocondriales y genes nucleares

(Toursel *et al.*, 2000). También se reportó otra proteína de direccionamiento mitocondrial, una superóxido dismutasa que contiene hierro (TgSODB2). Este tipo de enzimas existen principalmente en procariotes, protistas y cloroplastos, y son las responsables de neutralizar los radicales superóxido generados por la respiración celular. Contienen una presecuencia inusual que consiste de una secuencia N-terminal hidrofóbica que se asemeja a un péptido señal seguida por una presecuencia mitocondrial anfipática más convencional. Ambos elementos son importantes para el direccionamiento mitocondrial, ya que si se elimina la secuencia hidrofóbica la proteína se dirige al citoplasma y si se elimina la presecuencia se convierte en una proteína de secreción. Finalmente si se mutan los residuos cargados en la secuencia hidrofóbica la proteína se dirige al apicoplasto (Brydges y Carruthers, 2003).

En *T. gondii* no sabemos como funciona el aparato importador de las subunidades COX2A y COX2B de la citocromo c oxidasa. Sabemos que el gen *cox2* está fragmentado y codificado como *cox2a* y *cox2b* en el genoma nuclear en diferentes cromosomas, y que ambos genes codifican para las subunidades COX2A y COX2B respectivamente, sin embargo no se conoce si efectivamente estas proteínas se encuentran presentes y podrían sintetizarse en el citosol y posteriormente ser transferidas al interior de la mitocondria para ser ensambladas en la membrana interna mitocondrial. Se ha postulado que las proteínas COX2A y COX2B interaccionan a través de unas extensiones que poseen en su secuencia primaria. Estas extensiones posiblemente forman estructuras de alfa hélices que al interactuar entre sí formen lo que sería una COX2 heterodimérica en el interior de la mitocondria. Lo anterior es relevante debido a que a futuro esta particularidad de los dímeros COX2A y COX2B, podría ser aprovechada como un blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios dirigidos a bloquear el ensamblaje de estos polipéptidos que forman a la subunidad COX2 en la mitocondria. Por todo lo anterior este trabajo estuvo enfocado en localizar a las subunidades COX2A y COX2B en las mitocondrias de taquizoitos de *T. gondii*, mediante diferentes técnicas inmunoquímica, inmunocitoquímica, e inmunohistoquímica.

III. HIPÓTESIS.

Las subunidades COX2A y COX2B se localizan en la mitocondria de *T. gondii*, están formando parte del complejo de la citocromo c oxidasa y son el producto de los genes *cox2a* y *cox2b* funcionales.

IV. OBJETIVO.

Localizar por medio de técnicas inmunoquímicas, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica las subunidades COX2A y COX2B de la citocromo c oxidasa en la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii* (utilizando anticuerpos anti-COX2A y COX2B).

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

- Se utilizó el anticuerpo generado contra la proteína COX2B recombinante que contiene un epítotope de hexahistidinas.
- Se generaron anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos, diseñados a partir de los sitios más antigénicos de las secuencias polipeptídicas de las subunidades COX2A.
- Se purificó a los anticuerpos IgG de los anticuerpos policlonales generados anteriormente mediante una columna de proteína A acoplada a Sefarosa.
- Identificación de la mitocondria y su funcionalidad en taquizoitos de *T. gondii* mediante la utilización de Mitotracker CMX Ros e inhibidores de la respiración o desacoplantes por microscopía confocal.
- Localización de las subunidades COX2A y COX2B en la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii* en suspensión por inmunofluorescencia.
- Procesamiento e inclusión de taquizoitos de *T. gondii* en resina epóxica Epón, para observación de ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión.
- Procesamiento e inclusión de taquizoitos en resina Lowicryl K4M para llevar a cabo la inmunolocalización.
- Inmunolocalización de cada una de las subunidades COX2A y COX2B en la mitocondria de los taquizoitos con anticuerpos secundarios acoplados a partículas de oro.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Generación de la proteína recombinante COX2B con etiquetas de histidina, y purificación por afinidad en columnas de níquel.

En el laboratorio se realizó la obtención de la proteína y los anticuerpos contra la proteína COX2B recombinante de la siguiente manera.

Se amplificó el gen *cox2b* por PCR a partir de una genoteca de cDNA de *T. gondii* y el amplificado se clonó en el vector pQE30. Este vector se utilizó para transformar bacterias de *Escherichia coli* XL1-blue; las bacterias transformadas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (50 µg/ml). La colonia seleccionada se cultivó en medio líquido Luria Bertani con ampicilina y tetraciclina y se indujo con 1 mM de IPTG. Se creció a la bacteria por 16 h y al término del cultivo se obtuvo el precipitado de células centrifugando a 10,000 rpm en un rotor SS34 durante 15 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido en amortiguador de fosfatos pH 7.8 con lisozima a 10 mg/ml y PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas, seguidamente se sonicó en un sonicador Branson de 3- 5 watts / min. La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor SS34, se eliminó el sobrenadante y el botón de lisis se resuspendió en guanidina 6 M, fosfato de sodio 500 mM y NaCl 5 mM a pH 7.8. La muestra se incubó durante 16 h a 4°C y se cargó en una columna de Ni-ácido nitrilotriacético, se lavó con 5-6 volúmenes de columna con PBS sin guanidina, y se eluyó con imidazol 10 mM y posteriormente con imidazol 100 mM en PBS. La proteína obtenida se corrió en un gel de Laemmli al 12%. La banda correspondiente a la proteína COX2B, se extrajo del gel con Tris 20 mM pH 6.8. Para generar el anticuerpo se realizó una primera inoculación con 100 µg de proteína con adyuvante completo de Freund y dos refuerzos posteriores espaciados por 22 días con 50 µg de proteína con adyuvante incompleto de Freund. Después de este tiempo se sangró el conejo, se obtuvo el suero, se evaluó el título del anticuerpo y posteriormente se precipitó con sulfato de amonio al 40 %. Se hicieron alícuotas del precipitado y se guardó a -70°C para su posterior uso.

6.2 Generación de anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos, diseñados a partir de los sitios más antigénicos de la secuencia polipeptídica madura de la subunidad COX2A.

a) El diseño de los péptidos sintéticos se realizó a partir de la secuencia de la proteína madura de COX2A de *Toxoplasma gondii*, de acuerdo al algoritmo del sitio <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html> (Kolaskar y Tongaonkar,1990). Este sitio utiliza un método semiempírico para predicción de determinantes antigénicos sobre proteínas. El programa grafica el promedio de propensión antigénica en el eje de las ordenadas contra el número de residuos de aminoácidos en el eje de las abscisas, basándose para ello en la detección de las zonas hidrofílicas del péptido que probablemente no formen elementos de estructura secundaria, potencialmente epítopes para la generación de anticuerpos específicos. El péptido escogido se sintetizó en NeoMPS (<http://www.neomps.com>) con la siguiente secuencia de aminoácidos de COX2A: **CETRDLEVELVHQQK**. El péptido se acopló a hemocianina, una proteína antigénica utilizada como acarreador. La cisteína del extremo amino terminal se adicionó para poder entrecruzar el péptido a la proteína acarreadora a través de un agente entrecruzador (NeoMPS).

b) El péptido antigénico COX2A acoplado a la hemocianina, con número de lote VS 27-60, se inoculó en conejos de 0.5 kg vía intramuscular, primeramente con 200 µg/ml del péptido en adyuvante completo de Freund y con cinco refuerzos consecutivos de 100 µg/ml en adyuvante incompleto de Freund a las 1, 8, 12, 13 y 15 semanas. Al cabo de este tiempo se sangró al conejo, obteniéndose aproximadamente 25-30 ml de suero, el cual fue alicuotado para su posterior utilización.

6.3 Realización de inmunorélicas tipo western para comprobar el título y la especificidad de los anticuerpos generados.

Los anticuerpos obtenidos contra la proteína recombinante COX2B así como el obtenido para el péptido sintético antigénico COX2A, se utilizaron para realizar inmunorélicas tipo western. Se usó tanto la proteína recombinante como extractos completos de taquizoitos de *T. gondii*. Primeramente la proteína recombinante y el

extracto de taquizoitos se corrieron en geles de SDS-PAGE, los cuales se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema semi-seco de Amersham. El anticuerpo secundario utilizado fue de cabra anti-IgG de conejo en una dilución 1:3000, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA A-8025).

6.4 Purificación de anticuerpos IgG mediante cromatografía con proteína A-Sefarosa.

a) Purificación del Ab IgG generado contra la proteína COX2B recombinante.

Se dializaron 520 μ l del suero anti-COX2B recombinante (precipitado con sulfato de amonio al 40%), con el amortiguador de unión del sistema de purificación, protein A antibody de SIGMA en microtubos de 3500 Da de diámetro de poro de PIERCE. A lo dializado se le cuantificó proteína por el método de Lowry, y se cargó en una columna de proteína A, el lavado y la elución del anticuerpo se hizo de acuerdo al sistema de purificación mencionado anteriormente, se estimó la absorbencia a 280 nm de las muestras eluidas. Las muestras en las que se encontró el anticuerpo purificado se concentraron en un tubo centricon de 30 kDa de diámetro de poro hasta un volumen final de \approx 500 μ l. El anticuerpo puro fue utilizado posteriormente.

b) Purificación del Ab IgG generado contra el péptido sintético COX2B y COX2A.

A la mezcla de 1 ml de suero + 2 ml de amortiguador de unión, se le cuantificó proteína por el método de Lowry, y posteriormente se cargó a la columna de proteína A, se lavó y se eluyó como se mencionó anteriormente. Los tubos en los que se encontraba el anticuerpo purificado se concentraron en tubos centricon hasta un volumen de \approx 700- 800 μ l.

El sistema de purificación de anticuerpos anti-IgG utiliza proteína A acoplada a Sefarosa protein A Antibody Purification Kit de SIGMA.

6.5 Cultivo in vivo de taquizoitos de *T. gondii*.

El cultivo *in vivo* se realizó por inoculación vía intraperitoneal de 0.2 ml de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH, en PBS pH 7.2 estéril, en ratones BalbC hembras sanas de 9 semanas de edad.

Los ratones infectados presentan los síntomas de la infección después de 4 días de inoculación como son temblor generalizado, erizamiento del pelo, encorvamiento, dificultad para caminar y dificultad para ver, se sacrifican por dislocación cervical, se desinfecta el área del peritoneo, se hace un pequeño corte de la piel y se retira con pinzas para dejar al descubierto el peritoneo en el que se inyecta 5 ml de PBS pH 7.2 estéril con el que se extraen los taquizoitos obteniéndose un promedio de 5×10^6 parásitos/ml, y un total de 25×10^6 parásitos/ ratón. (MacLaren *et al.*, 2004).

6.6 Purificación de taquizoitos de *T. gondii*.

El exudado con taquizoitos obtenido como se menciona anteriormente se pasa a través de agujas de diferentes calibres y se centrifuga a 1000 rpm por 10 min. El sobrenadante se filtró en un filtro Millipore con membrana de policarbonato de 5 μ m de diámetro de poro, posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener a los taquizoitos limpios.

6.7 Tinción de la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii* con MitoTracker Red CMX Ros.

Una suspensión de 100 μ l con 12.5×10^6 de taquizoitos purificados obtenidos en PBS se incubaron con 2.5 μ M de MitoTracker Red CMX Ros (Molecular Probes) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 min. Seguidamente se realizaron 4 lavados con PBS (pH 7.2), se resuspendió en 10 μ l de PBS y se montó sobre portaobjetos cubiertos con Poly-L-Lisina 0.1M. Se cubrió con cubreobjeto y se selló con esmalte de uñas, las muestras se observaron inmediatamente en el microscopio Confocal Laser Scanning marca Olympus Fluoview FV 1000 Spectral utilizando un laser de Helio-Neón a 543 nm de emisión para el análisis de las muestras.

6.8 Verificación del potencial electroquímico de la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii*. El potencial electroquímico se verificó mediante la utilización de inhibidores de la cadena respiratoria tales como cianuro, antimicina A y un agente desacoplante CCCP (carbonil-cianato de m-clorofenil-hidrazona).

Una suspensión de 6.25×10^4 taquizoitos purificados se incubó primeramente con el inhibidor correspondiente, ya sea cianuro de sodio 1 mM, antimicina A 250 μ M ó CCCP 6 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente se incubó 30 minutos con 2.5 μ M de Mito Tracker Red CMX Ros, a temperatura ambiente, en oscuridad y con DAPI (para visualizar al núcleo) a una concentración de 1 μ g/ml. Seguidamente se realizaron 5 lavados con PBS, se fijó con paraformaldehído al 4%, se lavó 3 veces y se montaron en laminillas con medio de montaje (Vectashield) para su observación bajo el microscopio Confocal Laser Scanning marca Olympus Fluoview FV 1000 Spectral utilizando un laser diode (LD) a 405 nm de emisión para visualizar el diclorohidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para Mitotracker se utilizó el laser a 543 nm mencionado anteriormente.

6.9 Procesamiento en suspensión de taquizoitos de *T. gondii* para inmunofluorescencia.

Los taquizoitos purificados (equivalente a 6.25×10^4 células) se incubaron en 2.5 μ M de MitoTracker Red CMX Ros (Molecular Probes) durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz; se lavó 4 veces con PBS pH 7.2 centrifugando en cada ocasión a 2000 rpm durante 10 min. Seguidamente se permeabilizó con Tween 20 al 0.05% y 0.1% durante 90 min a temperatura ambiente y se lavó 4 veces 10 min c/u. Seguidamente se realizó un bloqueo con BSA al 1% durante 1h a temperatura ambiente de acuerdo al protocolo de del Arco *et al.*,(1998), se incubó directamente con el anticuerpo primario purificado COX2B generado contra la proteína recombinante en una dilución 1:10 en PBS ó con anti-COX2A generado contra el péptido sintético en una dilución 1:10 y 1:5 durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluido 1:100 en

BSA al 1% en PBS, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBS pH 7.2. Seguidamente se incubó con DAPI 1 µg/ml en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente, se realizaron 4 lavados con PBS, se fijó durante 1 h con paraformaldehído al 4% en PBS, se lavó 3 veces, y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El precipitado de taquizoitos obtenidos se resuspendió en 10 µl de PBS y se depositaron sobre portaobjetos con Poly-L-Lisina 0.1 M. Enseguida se colocó medio de montaje (Vectashield), se colocó un cubreobjeto y se selló con esmalte para uñas. Las muestras fueron observadas en un microscopio Confocal Laser Scanning marca Olympus Fluoview FV 1000 Spectral utilizando un láser de Argón para seguir la fluorescencia de Alexa 488 con una emisión a 488 nm, y usando los laser correspondientes para Mito Tracker Red CMX Ros y para DAPI.

6.10 Procesamiento e inclusión de taquizoitos de *T. gondii* en resina epóxica (Epón 812), para microscopía electrónica de transmisión.

Los taquizoitos purificados (10×10^6) se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en PBS pH 7.2 durante 2 h a 4°C, se centrifugaron a 2000 rpm, el botón de células se lavó 3 veces con PBS y se post fijó con tetraóxido de osmio al 1 % durante 2 h a 4 °C en amortiguador de fosfatos pH 7.2. Se realizaron 3 lavados, seguidos de deshidratación etanólica gradual de 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % a 4 °C con 2 cambios de 15 minutos c/u. Un segundo cambio al 100 % se realizó a temperatura ambiente, después se trató 2 veces durante 15 min con óxido de propileno. La inclusión en resina epóxica Epón 812 se llevó a cabo primeramente en una proporción resina 1:1 óxido de propileno 18 h en desecador, resina pura 2 h en rotador y polimerización a 60° de 24- 48 h. Los cortes ultrafinos 70 a 80 nm de grosor se obtuvieron en un ultramicrotomo (Leika Ultracut R.) y se depositaron sobre rejillas de cobre de 200 mallas cubiertas con formvar. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo acuoso al 2 % durante 20 min, se lavó por goteo con agua y se tiñó con citrato de plomo en un ambiente libre de CO₂ durante 15 min. Una vez lavadas, las rejillas fueron observadas en un microscopio electrónico JEOL 1200EX II.

6.11 Procesamiento e inclusión de muestras en resina acrílica Lowicryl K4M.

El método descrito por Agredano-Moreno *et al.*, (2001) se siguió para el procesamiento de taquizoitos de *T. gondii* purificados. 10×10^6 taquizoitos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 % 1 h a 4°C, se hicieron 3 lavados de 5 min en PBS 0.1 M pH 7.2, deshidratación con metanol al 30, 50, 70 % por 5 min y 90% durante 30 min a -20°C. Se llevó a cabo la Inclusión en Lowicryl 1:1 metanol 90% durante 1h a -20°C, Lowicryl 2:1 metanol 90 % 1h a -20°C, Lowicryl pura 1, 20 y 1 hr a -20°C. Finalmente, se hizo una inclusión en Lowicryl pura en tubos eppendorf durante 55 min utilizando una cámara de luz UV de 320-360 nm.

6.12 Procesamiento de taquizoitos de *T. gondii* en Lowicryl K4M para la inmunolocalización de COX2B.

De los bloques polimerizados se obtuvieron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor los cuales se depositaron sobre rejillas de oro de 200 mallas, los cortes fueron incubados durante 2 h con TBST (Amortiguador Tris-Hcl-Tween 0.1 % pH 7.6) en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó en gota 3 veces con TBS (Amortiguador Tris-Hcl a pH 7.5), y seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario anti-COX2B purificado en una dilución 1:50 en TBS, y con el anticuerpo contra COX2A obtenido contra el péptido sintético sin (diluir), cada uno en la rejilla correspondiente. Se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, se realizaron 4 lavados en gota con TBS y se bloqueó con ovoalbúmina al 1 % en PBS 0.01 M durante 30 min, de acuerdo a Laboux *et al.*, (2003). Posteriormente se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario Anti-IgG cabra anti-conejo acoplado a oro de 12 nm (de Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:20, se realizaron 4 lavados en gota con TBS y 5 lavados en gota con agua, se contrastó con uranilo acuoso al 4 % (8 min) y citrato de plomo (5 min). Las muestras fueron observadas en un microscopio JEOL JEM 1010 con cámara digital MTi modelo CCD-300-RC.

VII. RESULTADOS.

El gen *cox2* se encuentra fragmentado en algunas especies de alveolados, algas clorofíceas y parásitos apicomplejos (Morales *et al.*, 2007). En *Toxoplasma gondii* el gen *cox2* se encuentra escindido y cada uno de los fragmentos está codificado en cromosomas diferentes. Considerando la ubicación de estos genes en Plasmodium, probablemente el gen *cox2b* se encuentra en *T. gondii* insertado en el cromosoma 14 y el gen *cox2a* en el cromosoma 13 (Funes *et al.*, 2002). El gen *cox2b* codifica para la porción carboxilo de una subunidad COX2 ortodoxa. La secuencia de la proteína COX2B se determinó a partir de la secuencia del gen *cox2* de *T. gondii*. COX2B es una proteína que se encuentra ubicada en el espacio intermembranal de la mitocondria. La proteína COX2B madura tiene una extensión en su extremo amino terminal de 72 a.a. y una secuencia interna de 113 a.a. Como se muestra en el **esquema a)**. En nuestro trabajo el primer paso fue la identificación inmunoquímica de la proteína COX2B utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante en un lisado completo de taquizoitos de *T. gondii*. Los mismos anticuerpos se utilizaron para identificar a COX2B por microscopía.

a) Secuencia de a.a de la proteína COX2B de *T. gondii*.

MDVFRSFWNRRGAAPGGAATSSGRPAGCREENSSVLLQSLKANSQQKKGETPLQ
NVAADYVTPQKYLDDPDKIPTY YVFQSNMTDEDLLPGMLRNLEVDKRLTLPTRTHI
RFLITATDVIHSWAVPALGIKADAIPGRLQRINTFIQREGVIFYGQCSELGALHGFMPI
VIEAVSPETYAAHAKKWKYD (161-165).

■ Extensión presente en la secuencia de la proteína COX2B de *T. gondii*

7.1 Detección inmunoquímica de COX2B por inmunorélicas tipo western.

La detección inmunoquímica de COX2B se realizó en gel de SDS-PAGE al 12 % utilizando a la proteína COX2B recombinante. La identificación de dicha proteína se realizó con inmunorélicas tipo western, utilizando anticuerpos policlonales generados contra la proteína recombinante (**Fig. 15 y 16**).

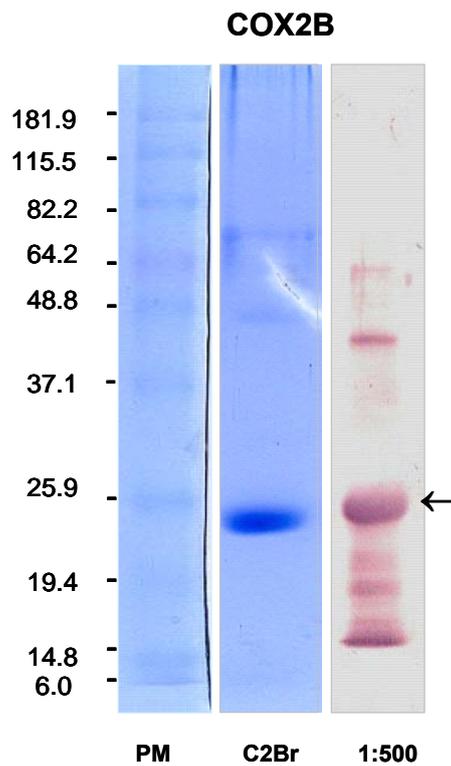


Fig. 15 Gel SDS-PAGE donde se visualiza a la proteína COX2B recombinante de ≈ 22 KDa y western blot que identifica a la proteína con anti-COX2B, generado contra la proteína recombinante en una dilución 1:500.

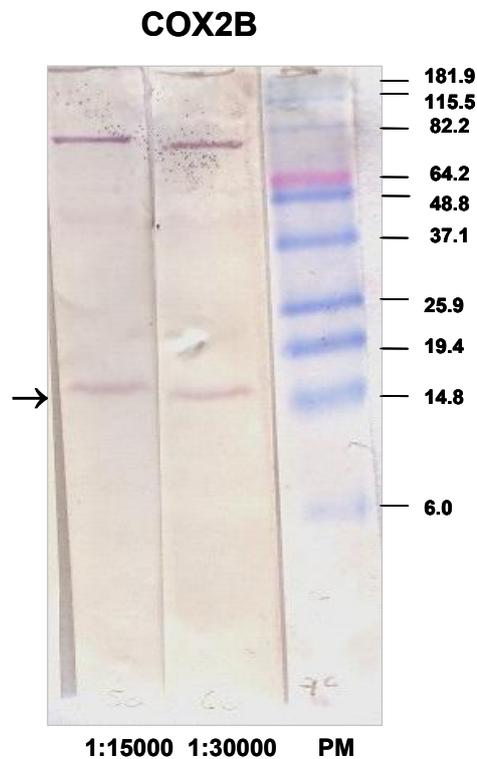


Fig. 16 Western blot que identifica a la proteína COX2B en un lisado de taquizoitos de *T. gondii* con el anticuerpo sin purificar en dilución 1:15000, 1:30000.

El anticuerpo policlonal anti-COX2B generado contra la proteína recombinante, se probó en lisado de taquizoitos de *T. gondii*, el anticuerpo identificó una banda con una masa molecular alrededor de 14.8 KDa (**Fig.16**).

Con la finalidad de incrementar la pureza del anticuerpo, y poder realizar la inmunolocalización, se procedió a purificar los anticuerpos de isotipo IgG, mediante afinidad con proteína A, como se menciona más adelante en el texto

7.2 Anticuerpos generados contra el péptido sintético COX2A.

El gen *cox2a* se encuentra insertado en el genoma de *T. gondii*, probablemente en el cromosoma 13 y codifica para la proteína COX2A que correspondería a la porción amino terminal de una subunidad COX2 ortodoxa. La proteína COX2A se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Es una proteína de direccionamiento mitocondrial dado que posee en su secuencia un péptido señal de 172 a.a., una secuencia interna de 294 a.a. y una extensión de 6 a.a. en su extremo carboxilo terminal. Debido a la naturaleza hidrofóbica de la proteína y a la dificultad para generar anticuerpos contra la proteína completa, se utilizó un programa de cómputo que permitió tomar una región de la proteína que presentaba la mayor antigenicidad.

En la secuencia de la proteína COX2A de *T. gondii* (**esquema b**), se muestran los aminoácidos utilizados en el diseño del péptido sintético contra el cual se generaron los anticuerpos policlonales.

b) Secuencia de a.a. de la proteína COX2A de *T. gondii*.

MLAYFAASRELAVVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASSPCSLFFGSRLYPIRSCCGR
PAGFPAKIVYPFLSAHTFPKMMPLSSSLFRPYGHLFHQFPRRFFSSAQRGDYSLML
PRHFSSTASSVTKPPQKTDAPAKHDEHDSHHGTNNFYHMPSHHSPSRHHLNPDGT
MRDLTTAETFHWEHAEAEETPAQQIVSVNGRKMVKGVETRDLVELFLVHQNIPFWP
RMRMNWVGNHDLLMKAEFLFFWTPTFITWLSLAIPMFTLLYMLDEA
VYAAMTVKVIGRQWYWIYEEVESPVDDEE residuo (35-48).

■ Presecuencia mitocondrial para COX2A ■ Secuencia del péptido sintético ■ Extensión COX2A.

La secuencia del péptido elegido se encuentra localizada entre el residuo 34 y el residuo 49 de la proteína madura y se encuentra constituida de 14 aminoácidos (**Fig.18**). Además, el péptido se encuentra acetilado en el extremo amino **CETRDLEVELFLVHQQ** y con un grupo amida en el extremo carboxilo; Adicionalmente se le agregó una cisteína en el extremo amino terminal para poder acoplarlo covalentemente con la hemocianina, una proteína muy antigénica que potencia una mejor respuesta de anticuerpos.

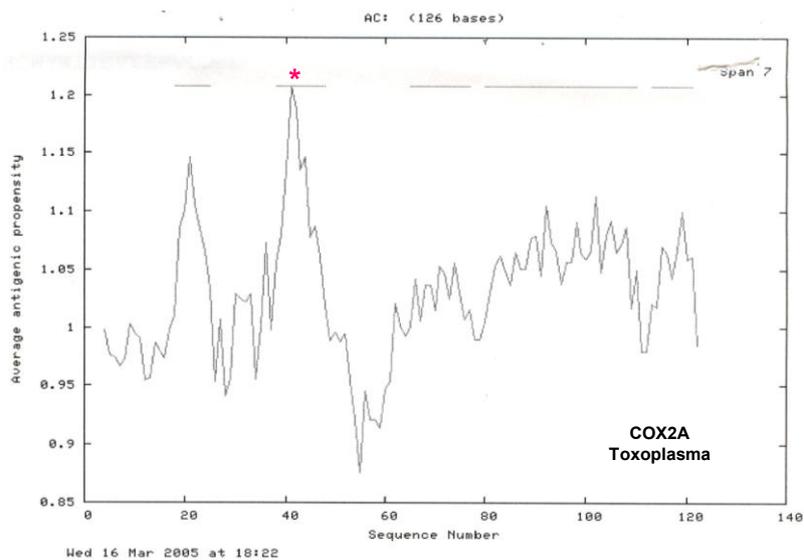


Fig 17. Gráfico del promedio de propensidad antigénica vs el número de residuo en la secuencia de COX2A madura, El * evidencia la zona elegida para el diseño del péptido sintético COX2A.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales como producto de la inoculación en conejo del péptido sintético COX2A acoplado a hemocianina, el suero obtenido se alicuotó y guardó a -70 °C. Los anticuerpos policlonales obtenidos se utilizaron en la detección de la proteína COX2A presente en extractos totales de taquizoitos de *T. gondii* mediante inmunoréplicas tipo western (**Fig 18**).

7.3 Detección inmunquímica de la subunidad COX2A.

El análisis de las inmunorélicas tipo western nos permitió observar que en el extracto total de taquizoitos de *T. gondii* se encontraba presente la proteína COX2A. La masa molecular aparente fue alrededor de 24 KDa (**Fig.19**).

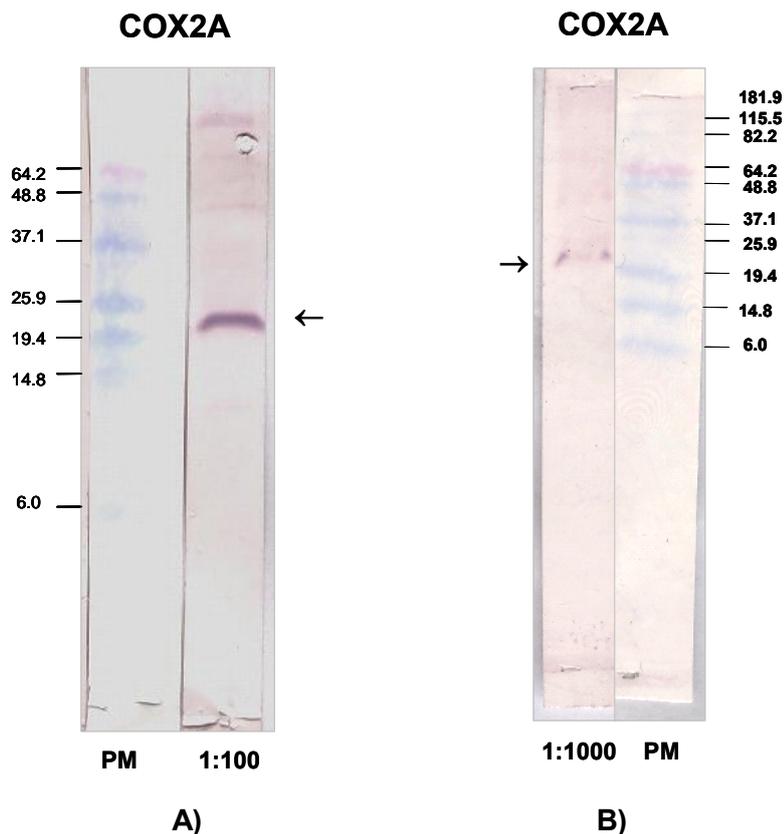


Fig 18. A) Identificación de COX2A en extracto de taquizoitos de *T. gondii* con anticuerpo sin purificar en una dilución 1:100 y B) 1:1000.

El bajo título obtenido en la identificación de COX2A con el anticuerpo policlonal en el extracto total de taquizoito, y la presencia de ligeras bandas inespecíficas, condujo a la necesidad de purificar los anticuerpos de isotipo IgG presentes en el suero policlonal y con esto identificar de mejor manera la proteína COX2A en los taquizoitos procesados para microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal.

7.4 Purificación de anticuerpos de isotipo IgG por afinidad con proteína A-Sefarosa.

Los anticuerpos generados contra la proteína recombinante y contra el péptido sintético COX2A se purificaron en una columna de proteína A unida a Sefarosa (**Fig. 19**). Las fracciones eluidas se concentraron, y se midió el título del anticuerpo en inmunorélicas tipo western, utilizando para esto un lisado completo de taquizoitos de *T. gondii*.

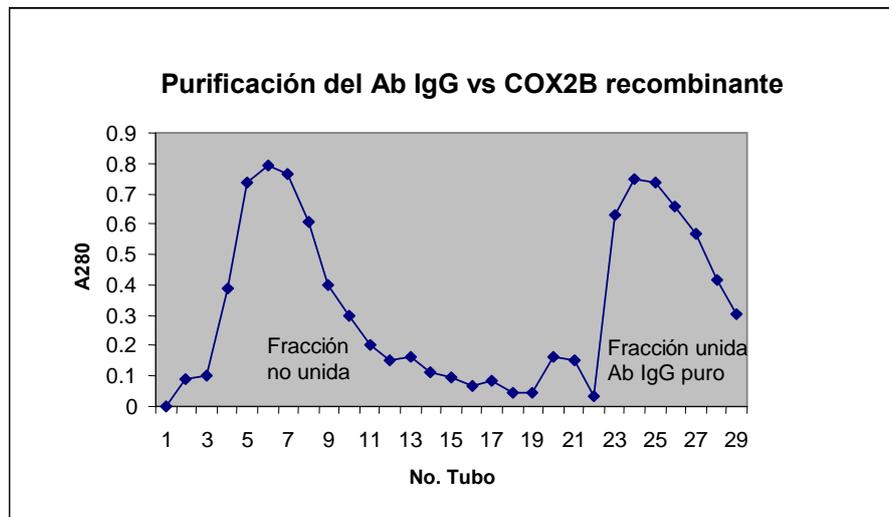


Fig 19. Perfil de elución de la columna de proteína A acoplada a Sefarosa a la cual se cargó el suero conteniendo los anticuerpos generados contra la proteína COX2B recombinante.

El primer pico del perfil de elución muestra la fracción que no se une a la columna y es donde se encuentran inmunoglobulinas y otras proteínas propias del suero. (**Fig.19 y 20**). En el segundo pico del perfil se encuentran los anticuerpos de isotipo IgG que se unieron a la columna de proteína A, específicos contra COX2B recombinante (**Fig. 19**). Estos anticuerpos se concentraron y fueron utilizados para realizar las inmunorélicas tipo western con lisado de taquizoito y para las observaciones por microscopía electrónica y confocal.

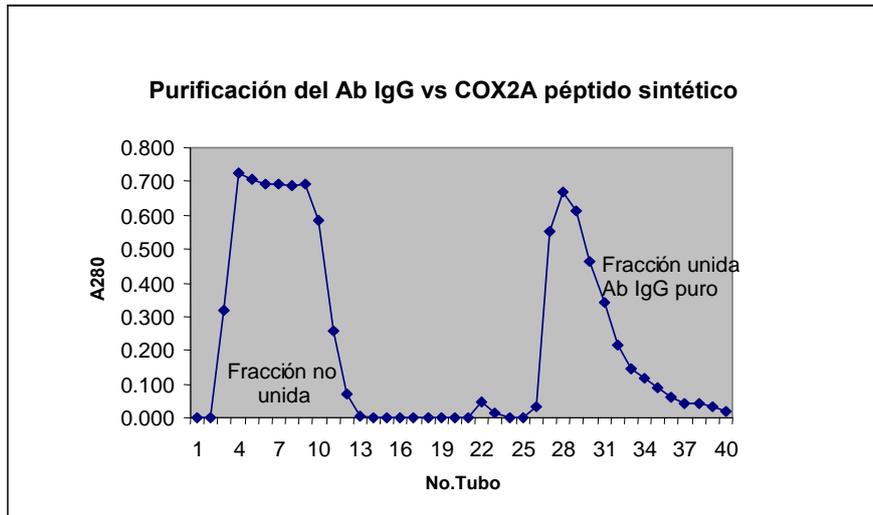


Fig 20. Perfil de elución de la columna de proteína A acoplada a Sefarosa a la cual se cargó el suero conteniendo los anticuerpos generados vs el péptido sintético COX2A.

En el perfil de elución se muestra al anticuerpo vs COX2A puro y a la fracción de proteínas séricas eliminadas en la fracción no unida. Los anticuerpos purificados y concentrados se corrieron en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. (**Fig. 21**).

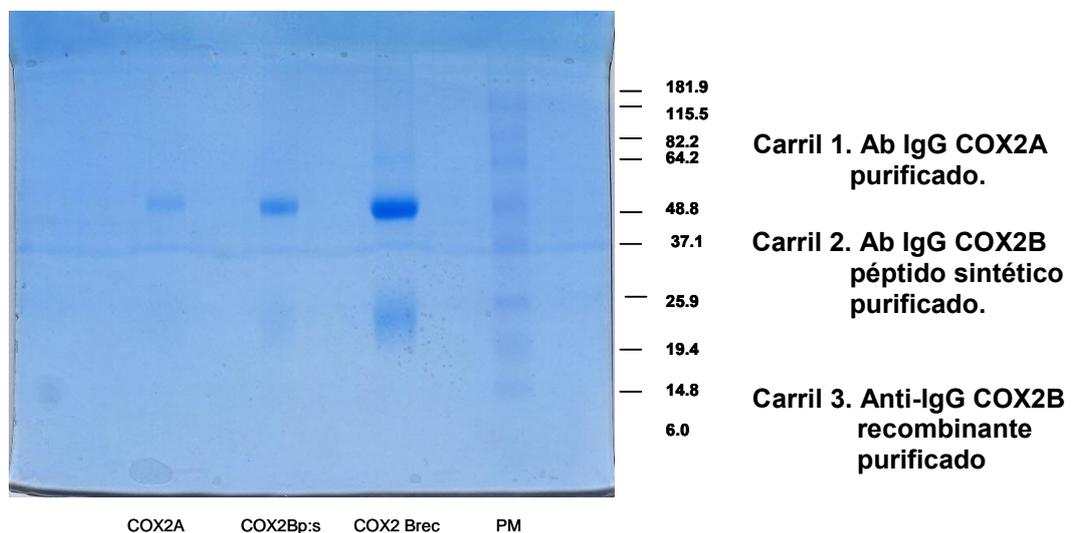


Fig 21. Gel de SDS-PAGE con cada uno de los anticuerpos IgG COX2A, IgG COX2B purificados.

De acuerdo al gel de SDS-PAGE de la **fig. 21**, podemos decir que del suero policlonal con anticuerpos contra COX2A y COX2B se pudieron obtener anticuerpos

de isotipo IgG purificado, lo anterior se puede corroborar porque únicamente se observan en el gel 2 bandas de proteína en el carril correspondiente. Las bandas superiores corresponden a las cadenas pesadas con una masa molecular alrededor de 50 kDa y las bandas inferiores a las cadenas ligeras con una masa molecular alrededor de 25 kDa, que concuerda con los valores reportados para cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de isotipo IgG (Janeway *et al.*, 2000). Para corroborar la especificidad del anticuerpo purificado contra COX2A y COX2B se realizaron inmunoréplicas tipo western con extractos totales de taquizoitos.

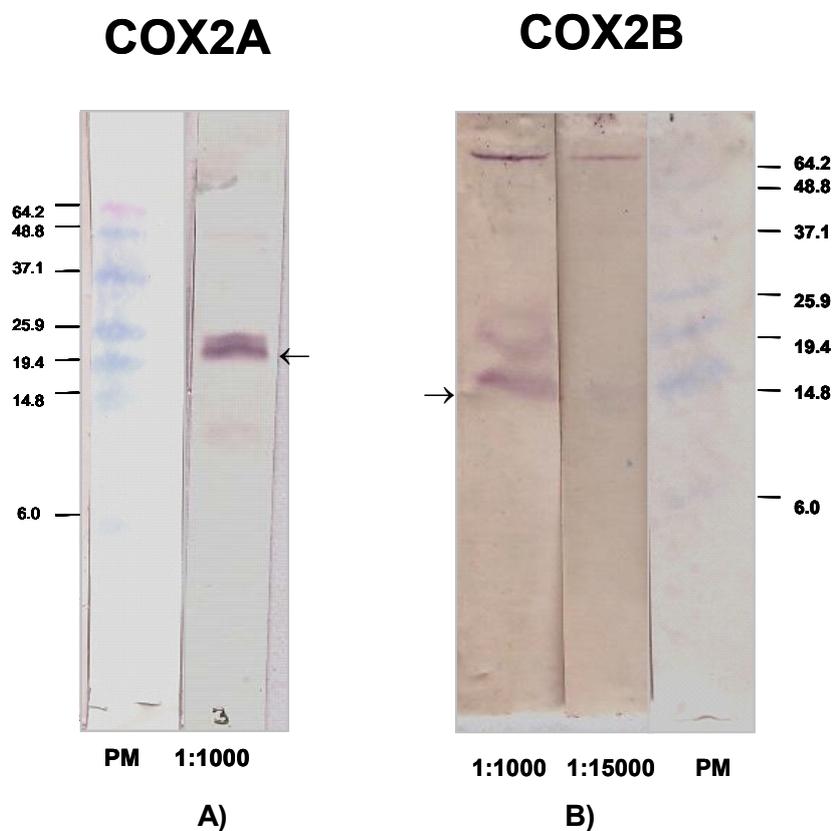


Fig 22. Inmunoréplicas tipo western. A) Identificación de COX2A en un lisado de taquizoitos de *T. gondii*, con el anticuerpo IgG purificado en una dilución 1:1000. B) Identificación de COX2B en dilución 1:1000 y 1:15000.

En la **figura 22**, se muestran las inmunoréplicas donde se identificaron nuevamente a COX2B alrededor de 24 kDa y COX2A alrededor de 14.8 KDa. Estos anticuerpos se utilizaron para realizar inmunolocalización por microscopía electrónica y por inmunofluorescencia de las proteínas en estudio.

7.5 Identificación de la mitocondria funcional en el taquizoito de *T. gondii* con MitoTracker Red CMX Ros.

Las imágenes muestran la identificación de las diferentes formas de mitocondria en taquizoitos de *T. gondii*, obtenidos del peritoneo de ratón. En los taquizoitos observados, fue evidente la presencia de la mitocondria iluminada con el colorante catiónico Mitotracker CMX Ros. Lo anterior nos indicó, en primer lugar, la ubicación de la mitocondria en el organismo completo. También nos mostró que en el estadio de taquizoito la mitocondria presenta un potencial de membrana activo, indicativo de que la mitocondria es totalmente funcional. La mitocondria del taquizoito presenta diferentes formas desde las formas lobuladas como se ve en la **figura 23**. Panel **A** la mitocondria tiene un lóbulo redondo como plato que parece tener forma de OMC (complejo ovoide mitocondrial citoplasmático) y una porción en forma de tubo hacia la parte posterior del taquizoito. Panel **B** mitocondria en el centro del cuerpo del parásito la cual presenta lóbulos en ambos extremos dando una forma de media luna. Panel **C** muestra a la mitocondria en forma circular rodeando al núcleo del parásito y ubicada cerca de la parte posterior del taquizoito. En **D** podemos ver una mitocondria bifurcada, las ramificaciones se extienden hacia la región apical del cuerpo de parásito, el panel **E** nos muestra que el taquizoito tiene una mitocondria compartimentalizada, en la imagen puede verse la cabeza como forma de martillo con 3 lóbulos, la porción gruesa donde se unen estos lóbulos y un segmento tubular que se extiende hacia un extremo del cuerpo del parásito, esta mitocondria podría indicar que el taquizoito se encuentra en un estadio maduro, tal como lo sugiere Khöler, (2006). El panel **F** muestra una mitocondria formada por segmentos tubulares ramificados donde no se observan lóbulos como en las figuras anteriores. La presencia de mitocondrias ramificadas sin lóbulos parece ser indicativo de taquizoitos inmaduros. Las ramificaciones de acuerdo a las figuras anteriores pueden encontrarse hacia el extremo apical o hacia el extremo posterior. La tinción con 2.5 μM de Mitotracker CMX Ros fue un paso importante previo a la inmunolocalización para asegurarnos que ésta fuera precisamente en la mitocondria del parásito. Para verificar la entrada del Mitotracker en las mitocondrias únicamente cuando éstas se encuentran energizadas, se incubó a los taquizoitos con inhibidores y/o agentes desacoplantes de la cadena respiratoria como se indica a continuación

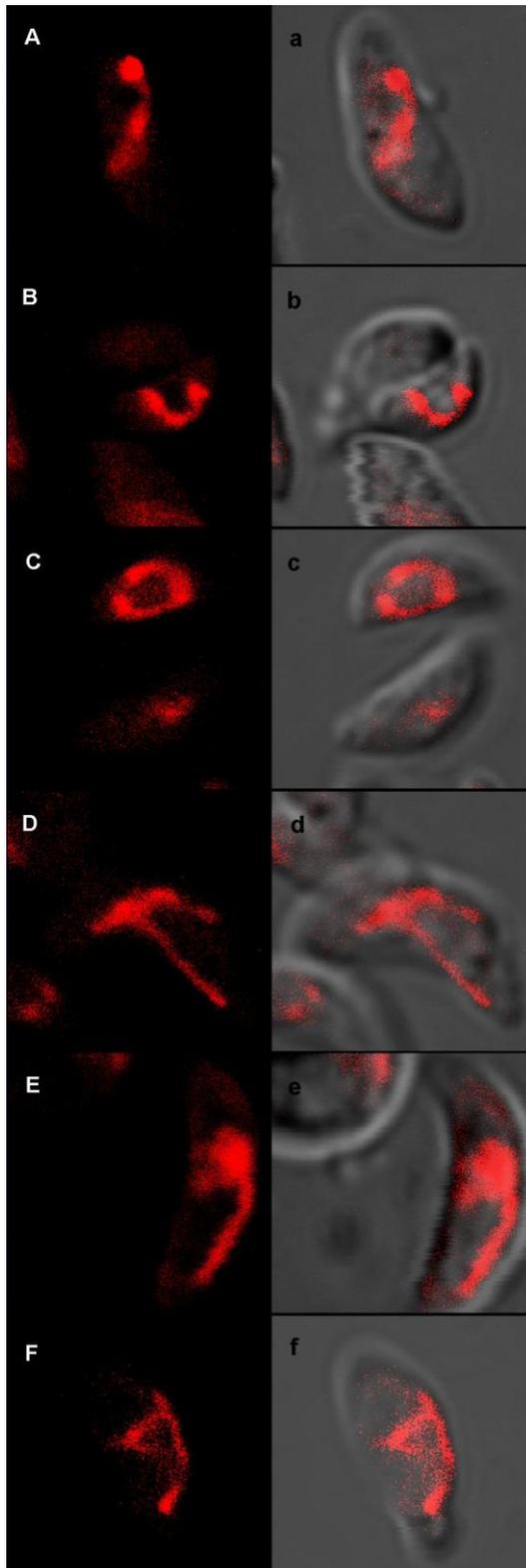


Fig 23. Mitochondrias de taquizoitos de *T. gondii* teñidas con 2.5 μ M de MitoTracker Red CMX Ros. Los paneles A, B, C, D, E, y F muestran a la mitocondria activa funcional en cada uno de los taquizoitos encontrados. Paneles A y B. Mitochondrias lobuladas C. Mitochondria rodeando posiblemente al Núcleo D. Mitochondria bifurcada E. Mitochondria con 3 lóbulos y porción en forma de tubo, F. Mitochondria totalmente, ramificada a, b, c, d, e, y f, imagen fluorescente de la mitocondria sobrepuesta en DIC (Diferential Interference Contrast).

7.6 Efecto de inhibidores de la respiración y desacoplantes sobre tinción de mitocondrias por Mitotracker CMX Ros.

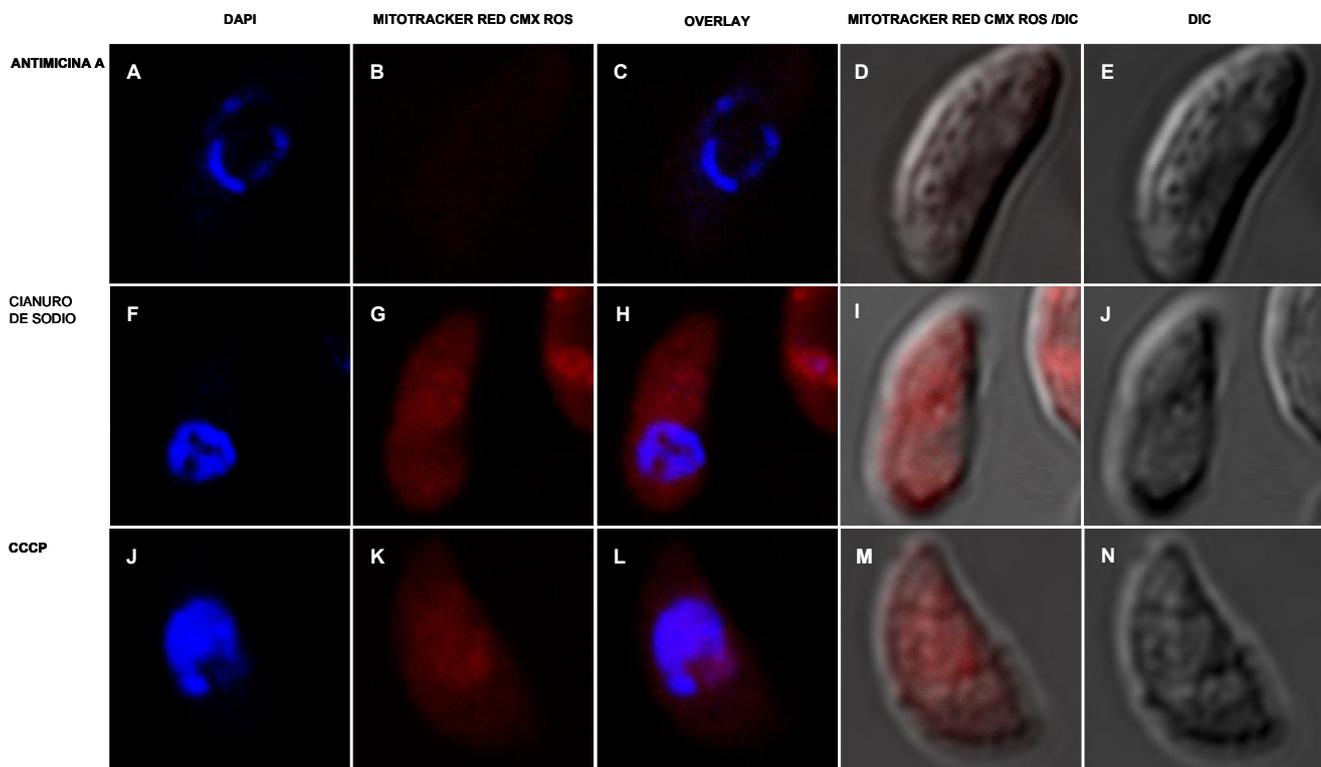


Fig. 24 Muestra el efecto de antimicina A (250 μ M), cianuro de sodio (1 mM) y el desacoplante CCCP (6 mM).

El experimento anterior corroboró que Mitotracker tiñe específicamente mitocondrias energizadas. Nuestros resultados nos permitieron demostrar, que cuando los inhibidores de la cadena respiratoria como antimicina A, cianuro de sodio y el desacoplante CCCP a las concentraciones que se mencionan en la **fig. 24**, son utilizados previamente al uso del Mitotracker CMX Ros, son capaces de bloquear la cadena respiratoria provocando con esto que el potencial de membrana que permite la entrada del Mitotracker (colorante catiónico) al interior de la mitocondria sea abatido. Tal efecto, hizo imposible visualizar a la mitocondria iluminada y únicamente se pudo apreciar un fondo de Mitotracker disperso en el citoplasma del parásito como se muestra en los paneles (**B**, **G**, y **K** iluminado con el láser a 543 nm para Mitotracker por confocal, y en los paneles **D**, **I**, **M** la imagen del Mitotracker sobre DIC). La tinción del núcleo con DAPI nos sirvió como referencia, ya que la mitocondria, en la mayoría de las ocasiones, presenta una relación estrecha con el núcleo.

7.7 Localización de COX2A y COX2B en la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii* por inmunofluorescencia.

La inmunolocalización de COX2A fue posible primeramente por la utilización de Mitotracker CMX Ros que permitió la identificación de la mitocondria en el taquizoito como muestra la **fig 25** panel **a**. La unión covalente que forma el Mitotracker con las proteínas de la mitocondria permitió que éste no saliera durante la permeabilización. COX2A se identificó con el anticuerpo anti-COX2A purificado y se evidenció con el anticuerpo anti-IgG Alexa 488 en el mismo sitio que la identificación con Mitotracker como se muestra en la **fig 25** panel **b**.

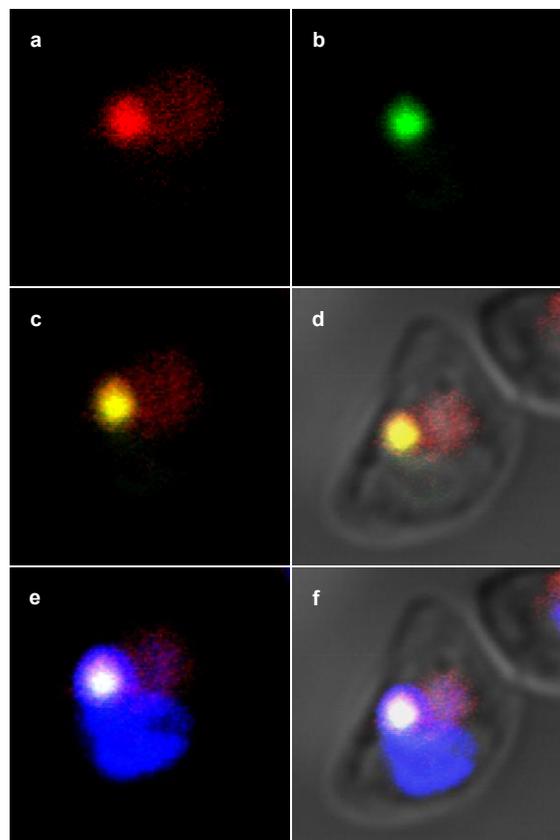


Fig 25 . Localización de COX2A en la mitocondria del taquizoito de *T. gondii*.

a) Tinción con Mitotracker a 2.5 μ M. b) Identificación de COX2A en la mitocondria con anti-COX2A-Alexa 488. c) Colocalización Mitotracker CMX Ros y Anti-COX2A-Alexa 488 d) Colocalización sobre DIC. e) Tinción del núcleo con DAPI y colocalización f) Imagen fluorescente de la colocalización en la mitocondria sobre DIC.

La proteína COX2A también fue identificada en una porción de la mitocondria con estructura redonda que parecía ser un OMC (complejo mitocondrial ovoide citoplasmático), así mismo la imagen fluorescente de la inmunolocalización fue posible verla en el taquizoito teñido por DIC como lo muestra la imagen **25** panel **d**. La identificación del núcleo con DAPI nos sirvió como un punto de referencia, por la localización cercana de éste con la mitocondria como se aprecia en la **fig 25** panel **e** donde la localización de COX2A se encuentra en la estructura redonda en asociación cercana con el núcleo.

Localización de COX2B.

La identificación de COX2B se realizó de la misma forma que con COX2A, marcando primeramente a la mitocondria con Mitotracker CMX Ros. En las imágenes se puede apreciar a la mitocondria con dos y más lóbulos como se muestra en la **fig. 26 A y B** paneles **a**. COX2B se identificó con el anticuerpo purificado anti-COX2B, y se evidenció su presencia con el anticuerpo secundario Alexa 488, con mayor intensidad en ciertas zonas de la mitocondria como se muestra en los paneles **b** de la **figura 26 A y B**. La inmunolocalización del Mitotracker con el anticuerpo secundario Alexa 488, también se observó con mayor intensidad en ciertas zonas de la mitocondria como se aprecia en los paneles **c** de **A** y **B**. La tinción con DAPI permitió observar que COX2B se encuentra localizada en porciones de la mitocondria que también se encuentran muy cercanas al núcleo **B** panel **e**.

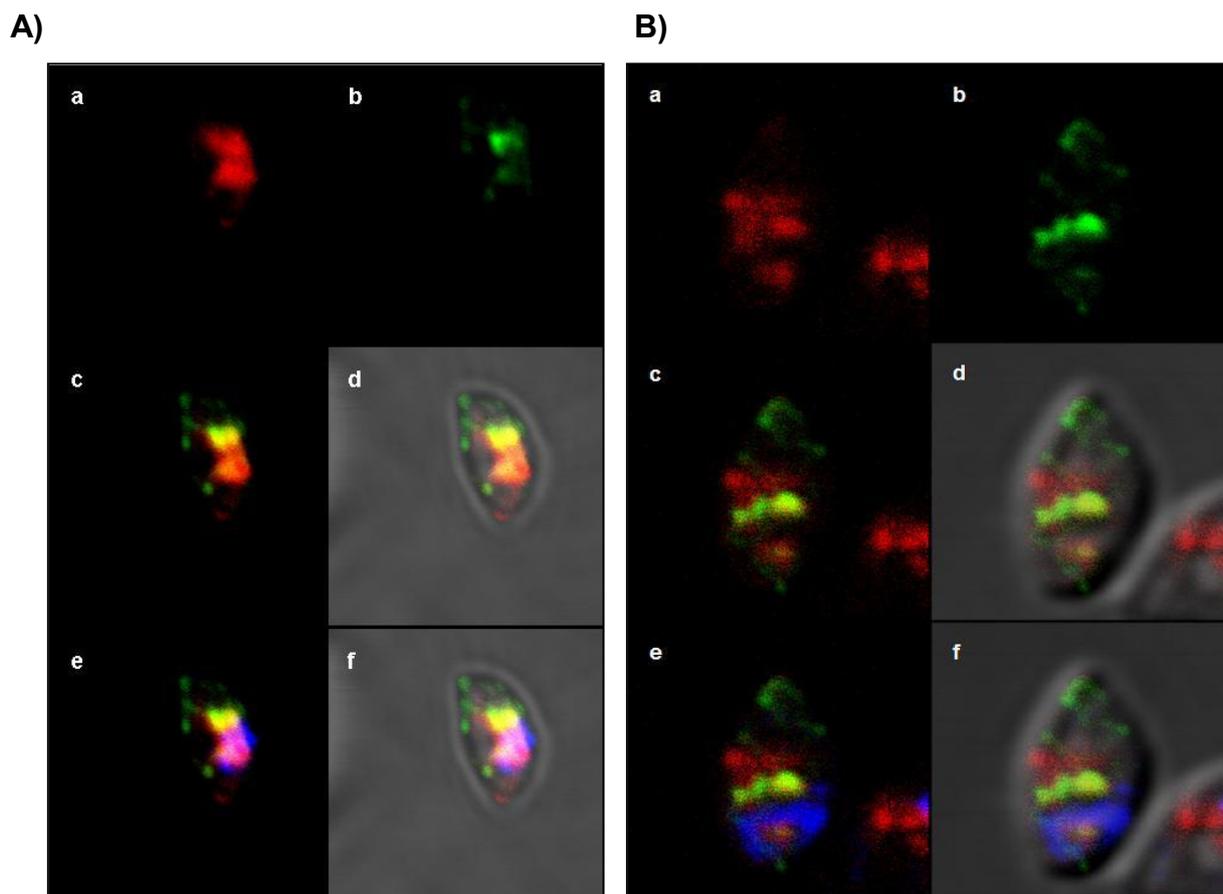


Fig. 26. A y B Localización de COX2B en el taquizoito de *T. gondii* permeabilizado con 0.05% de Tween.

a) Imagen lobulada de la mitocondria del taquizoito teñida con mitotracker 2.5 μ M. b) Identificación de COX2B en la mitocondria con AntiCOX2B-Alexa 488. c) Colocalización de Mitotracker CMX Ros y AntiCOX2B-Alexa 488 en la mitocondria. e) Colocalización y tinción del núcleo con DAPI. d) y f) Imagen de la colocalización y tinción del núcleo sobre DIC.

La localización de COX2B pudo corroborarse con taquizoitos tratados con una concentración de Tween al 0.1 %. Se repitió el protocolo anterior y se identificó a COX2B en una superficie un poco mayor en una mitocondria ramificada aunque con mayor intensidad en zonas que asemejan el OMC, como se muestra en la **figura 27 A** panel **c**. De la misma forma se evidencia nuevamente que la inmunolocalización de COX2B se encuentra en regiones cercanas al núcleo como muestra el panel **e** en la figura **A**. La metodología utilizada nos permitió ver la inmunolocalización en más de un taquizoito como muestra la **fig. 27 B** donde podemos apreciar que la inmunolocalización de COX2B, panel **c**, igual que en las imágenes anteriores, se encuentra con mayor intensidad en ciertas zonas de la mitocondria pero casi

siempre estrechamente relacionada con el núcleo del taquizoito (panel e, figura 27 B).

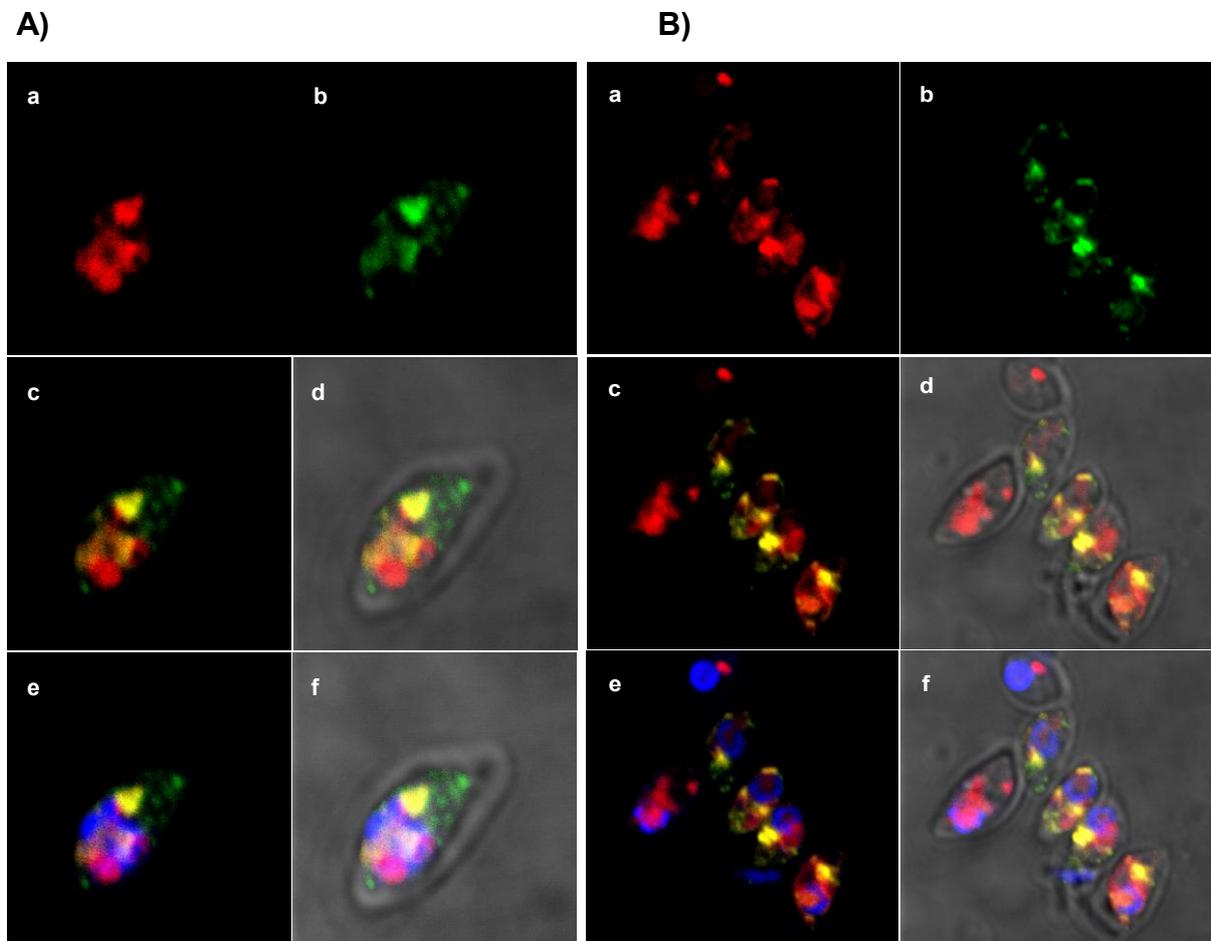


Fig. 27. A y B Localización de COX2B en taquizoitos permeabilizados con 0.1% de Tween.

a) Mitocondria teñida con 2.5 μM de Mitotracker CMX Ros. b) Identificación de COX2B con AntiCOX2B-Alexa 488 en la mitocondria. c) Colocalización de Mitotracker CMX Ros-AntiCOX2B-Alexa 488. e) Colocalización en la mitocondria y tinción del núcleo con DAPI d) y f) colocalización sobrepuesta en DIC.

La identificación de las mitocondrias así como las diversas estructuras que éstas presentan en el taquizoito de *T. gondii* por microscopía confocal nos facilitaron la comprensión de las imágenes observadas por microscopía electrónica de transmisión. El procesamiento de taquizoitos de *T. gondii* en resina Epón 812 permitió ver la ubicación y conocer la ultraestructura de la mitocondria en el taquizoito.

7.8 Ultraestructura de la mitocondria del taquizoito de *T. gondii*.

Las **figura 28A** nos muestra a la mitocondria de *T. gondii*, podemos observar segmentos de lo que parece ser el OMC panel **A**, así como segmentos tubulares de la mitocondria panel **B** y **C**.

A)

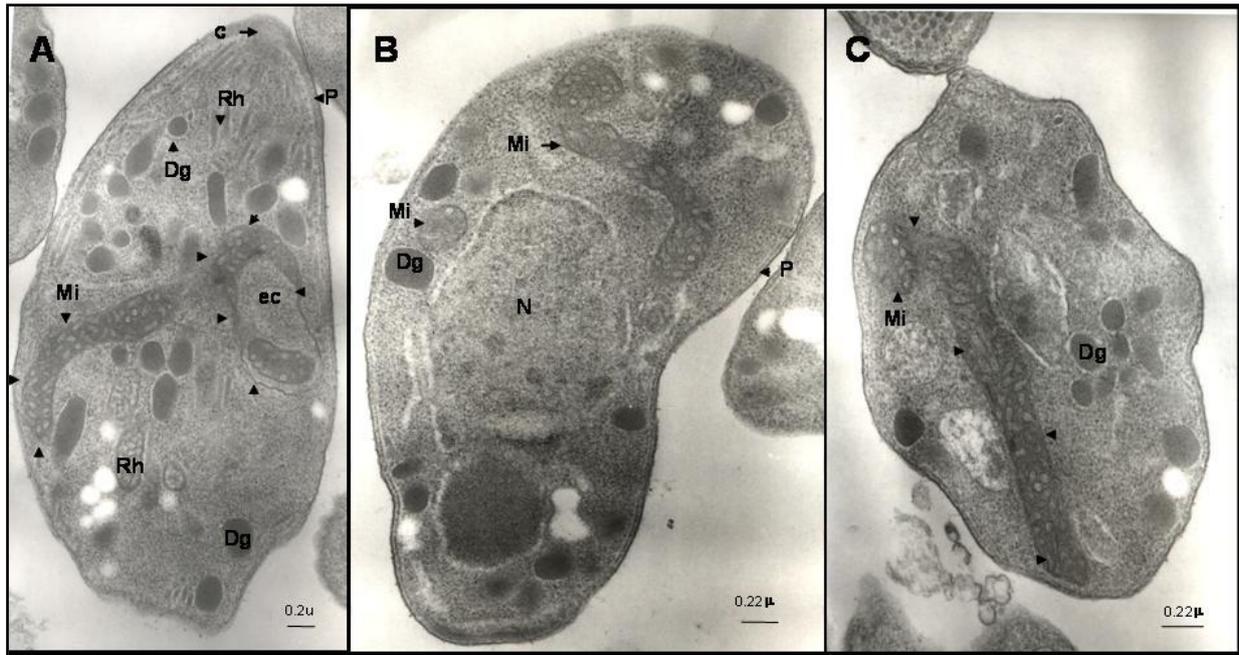


Fig 28 A). A, B y C. Identificación de segmentos ramificados y tubulares de la mitocondria en cortes longitudinales y transversales de taquizoitos de *T. gondii*. Las cabezas de flecha indican (Mi) Mitocondria (Dg) Gránulos densos, (Rh) Roptrias (C) Conoide P) Películo, (ec) Porción citoplasmática dentro de la mitocondria.

Las imágenes a mayor amplificación **Figura 28 B** permitieron la observación de las crestas tubulares, y del cuerpo de la mitocondria en su parte ancha como se muestra en el panel **F**. También fue posible la visualización seccionada de complejos ovoides mitocondriales citoplasmáticos (OMC) de la mitocondria como el que se muestra en el panel **G**. Podemos apreciar los diferentes dominios que lo conforman, la porción gruesa que forma como un cuello, y la sección tubular de la mitocondria. La estructura casi redondeada del OMC nos permite intuir que esta porción de la mitocondria es la misma que se observa con mayor intensidad bajo el confocal. En MET, el OMC seccionado como en el panel **G** solamente se observó esporádicamente. Los datos anteriores sugieren que la mitocondria de *T. gondii*, es

una sola y que se encuentra compartimentalizada, como ya lo sugirió Khöler, (2006).

B)

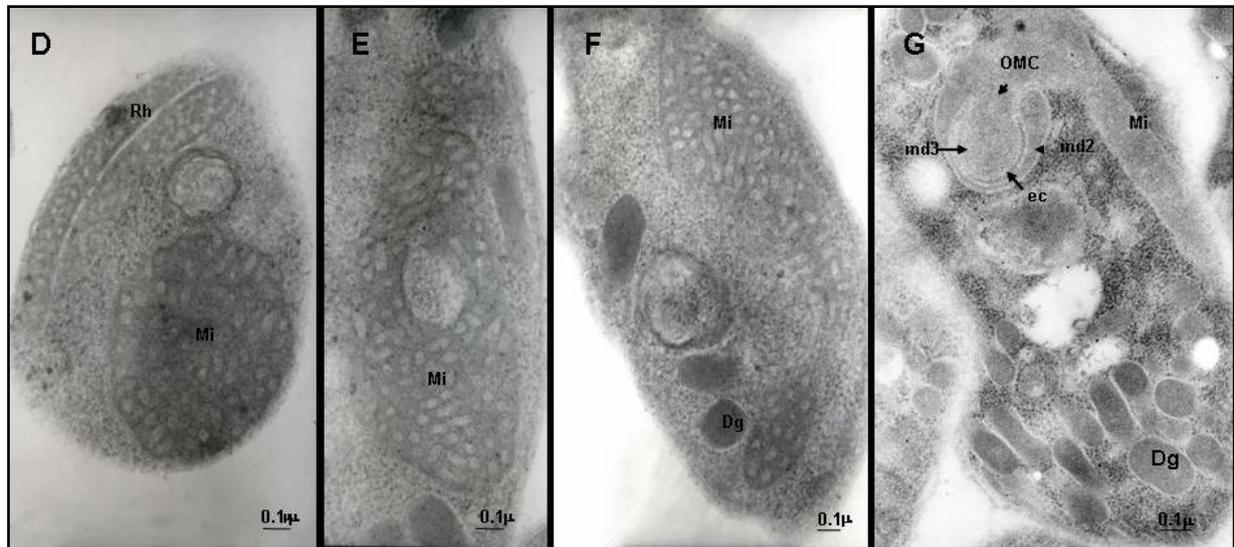


Fig 28 B). D, E y F Secciones transversales y longitudinales de la mitocondria del taquizoito de *T. gondii*, vistos a mayor amplificación. (Mi) Mitocondria, (Rh) Roptrias, (Dg) Gránulo denso, G) Estructura del OMC con el dominio md2, md3 (dominio básico) y (ec) la pequeña porción de citoplasma que se encuentra encerrado dentro.

El procesamiento de los taquizoitos de *T. gondii*, para MET en Epón 812 nos permitió conocer la ubicación de la mitocondria y observar su ultraestructura. Lo anterior facilitó el análisis de los taquizoitos procesados con Lowicryl K4M, resina en la que se realizó la inmunolocalización de las proteínas COX2A y COX2B.

7.9 Inmunolocalización de COX2B por Microscopía Electrónica de Transmisión.

El procesamiento de taquizoitos en Lowicryl K4M, permitió la inmunolocalización de COX2B, en la mitocondria de taquizoitos de *T. gondii*.

En el panel **A** de la **fig. 29 A** se muestra la ultraestructura de un taquizoito de *T. gondii* en el que se aprecian algunos de sus organelos y secciones de mitocondria en la parte anterior y media cercana al núcleo. La localización de la mitocondria en zonas cercanas al núcleo se tomó como punto de referencia en la inmunolocalización de COX2B por MET, como muestra el panel **B** y la amplificación

en **C** de un segmento de mitocondria que está rodeando al núcleo. Las partículas de oro en la mitocondria se estimó de 6.5 partículas de oro/ μm^2 y 0.7 partículas de oro/ μm^2 en el resto del campo.

A)

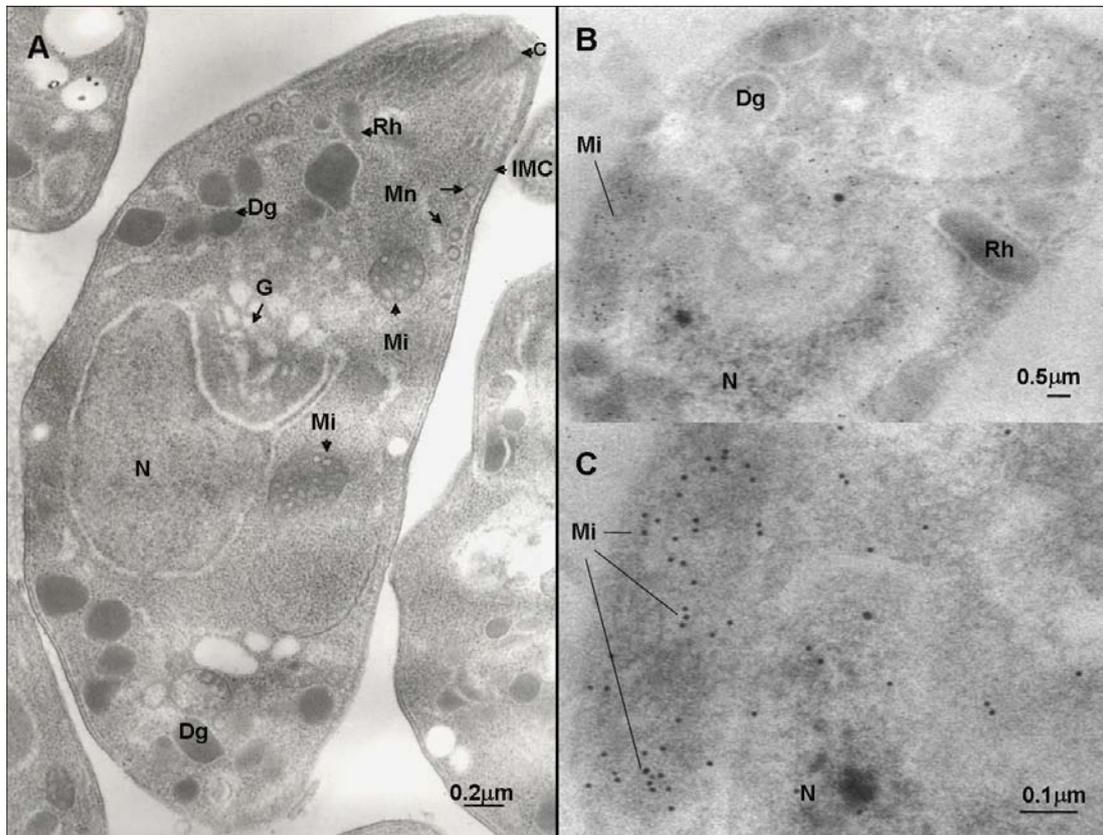


Fig 29 A). A) Corte longitudinal del taquizoito de *T. gondii* C) Conoide, IMC) Complejo de membrana interna, Rh) Roptrias, Mn) Micronemos Dg) Gránulos densos G) Complejo de Golgi Mi) Mitocondria N) Núcleo. B) Inmunolocalización de COX2B en un corte transversal de mitocondria (Mi), (Dg) Gránulo denso, (Rh) Roptrias C) Amplificación de la mitocondria que muestra la inmunolocalización de COX2B, (Mi) Mitocondria, N (núcleo).

La inmunolocalización de COX2B pudo corroborarse al encontrar otras imágenes donde se observa ésta relación cercana con el núcleo, como en la **figura 29 B** panel **A** y en **B** donde las partículas de oro se encuentran depositadas en estructuras que parecen ser lóbulos de mitocondria en cercanía con el núcleo. Así mismo encontramos que en algunos cortes del parásito las partículas de oro parecían seguir cierto contorno definido sobre ultraestructura al parecer de mitocondria, como se muestra en el panel **C** figura **29 B**.

B)

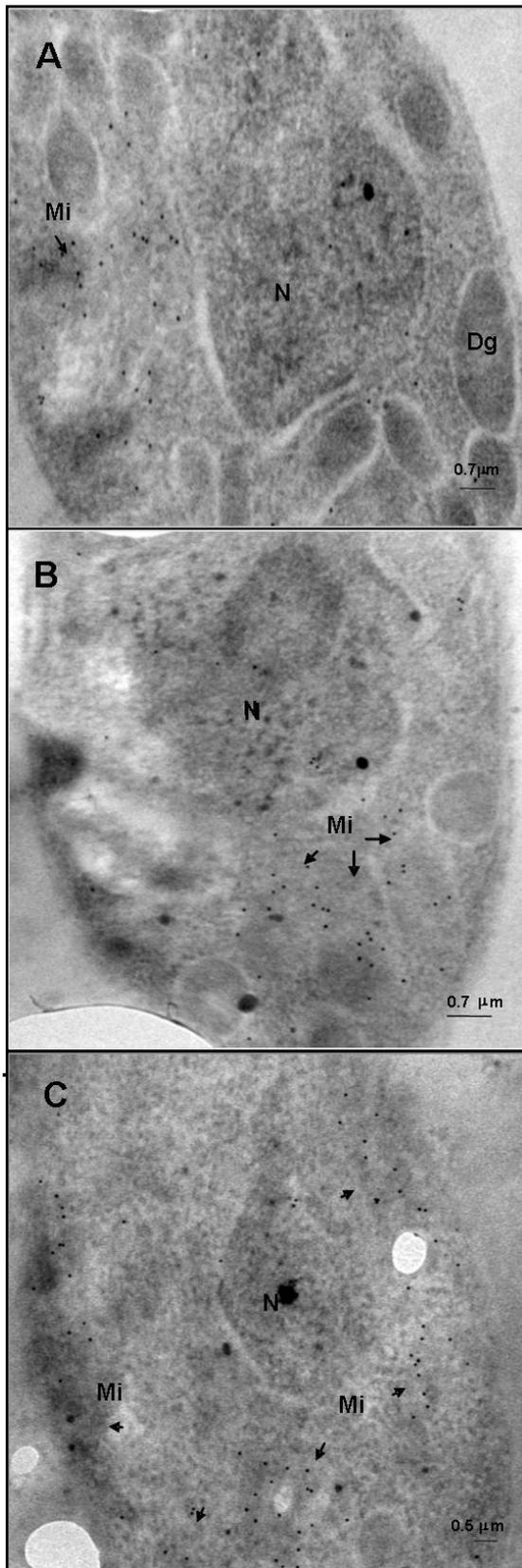


Fig 29 B). Localización de COX2B en secciones de mitocondria cercanas al núcleo.

A) Localización de COX2B en una porción lateral al núcleo.

(Mi) Mitocondria (flechas), (N) Núcleo, (Dg) Gránulos densos.

B) Inmunolocalización en la parte posterior al núcleo, y C) Localización periférica al núcleo sobre ultraestructura semejante a mitocondria.

A pesar de lo obtenido anteriormente para COX2B, no pudieron obtenerse los mismos resultados para COX2A por esta metodología debido a que la localización fue poco satisfactoria. Uno de los inconvenientes quizá fue la utilización de un anticuerpo generado contra un péptido sintético y puede ser que el epítipo de la proteína COX2A para el cual estaba dirigido dicho anticuerpo no estaba expuesto.

La inmunolocalización de COX2B y COX2A por MET y confocal, nos indica inequívocamente que las proteínas COX2A y COX2B se encuentran formando parte del complejo de la citocromo c oxidasa de *T. gondii*, en una mitocondria que es totalmente activa en este estadio del parásito. Estas afirmaciones las corroboramos por los experimentos realizados con Mitotracker y con los inhibidores de la cadena respiratoria.

Nuestros resultados comprueban que la presencia de los genes *cox2a* y *cox2b* son el producto de una migración exitosa de la mitocondria al núcleo y los productos proteicos son importados a la mitocondria donde son funcionales. Un punto importante sería identificar la ruta de importación que estos productos proteicos siguen para ser ensamblados en la mitocondria del parásito, ya que no se sabe si para estos polipéptidos se lleva a cabo a través del sistema de endomembranas o por inserción directa a la mitocondria inmediatamente después de ser sintetizados.

VIII. DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, del *Phylum* Apicomplexa. Algunos estudios realizados en otros parásitos apicomplejos como *Plasmodium falciparum* han reportado la existencia de estadios que no contribuyen a la producción de ATP (Wang, 1982; Fry y Beesley, 1991; Srivastava *et al.*, 1997), aunque se ha reportado la existencia de una mitocondria con crestas tubulares en el estadio asexual del parásito (trofozoito), y una mitocondria con un mayor número de crestas en el estadio sexual (Krungkrai, 2004).

En el pasado se dudó de la existencia de mitocondrias funcionales en *T. gondii* debido a su naturaleza intracelular. Sin embargo estudios realizados con rodamina 123, la cual se une a mitocondrias funcionales (Tanabe, 1984), permitieron visualizar a la mitocondria en taquizoitos extracelulares, no así las de taquizoitos intracelulares. Por su parte Petit y Vivier, 1972 visualizaron por MET la presencia de una mitocondria. Melo *et al.*, (2000) observaron la presencia de una mitocondria por histoquímica y tinción con Mitotracker, realizando una reconstrucción tridimensional que indicó la presencia de una mitocondria ramificada. Recientes estudios realizados por MET por Khöler, (2006), indicaron la existencia de una mitocondria ramificada en la cual existen varios compartimentos, sin embargo aun no se han caracterizado todas sus posibles funciones bioquímicas.

Nuestros resultados aseguran la existencia de una mitocondria funcional en el estadio de taquizoito, como ya lo sugirieron Melo *et al.*, (2000). También observamos una mitocondria ramificada y compartimentalizada en lóbulos, segmentos en forma de tubo y en algunas ocasiones con un OMC. Las imágenes obtenidas con 2.5 μM de Mitotracker CMX Ros, en las que se visualizan a las mitocondrias del taquizoito casi completas, contrastan con lo reportado por Khöler, (2006). En sus experimentos se utilizaron cantidades menores de Mitotracker y no fue posible observar en la mitocondria estructuras como el OMC. Esta diferencia puede deberse a que nuestros experimentos fueron realizados con taquizoitos obtenidos de ratón, los cuales se encuentran en diferentes estadios de su ciclo lítico y en diferentes estadios de maduración.

Un estudio bioquímico realizado con taquizoitos tratados con digitonina y con inhibidores de la cadena respiratoria indicó la existencia de una mitocondria funcional con capacidad de inhibirse con antimicina A, cianuro, oligomicina y ionóforos como CCCP (Vercesi *et al.*, 1998). Nuestros experimentos con Mitotracker y con inhibidores de la cadena respiratoria nos indican la existencia de un potencial de membrana activo como sugieren Vercesi *et al.*, (1998).

En este trabajo la evaluación de la presencia de complejos respiratorios funcionales se llevó a cabo con taquizoitos recién obtenidos, los cuales fueron tratados previamente con inhibidores de la cadena respiratoria y posteriormente con

Mitotracker y DAPI. Nuestros resultados de tinción con Mitotracker confirman la existencia del complejo III por la sensibilidad a antimicina A, el complejo IV por su inhibición con cianuro de sodio y la presencia de un gradiente de protones activo por la disipación de este con CCCP. Así mismo datos obtenidos en el laboratorio por Morales *et al.*, (2007) sugieren la presencia de una fracción mitocondrial de *T. gondii* sensible a cianuro lo que es indicativo de actividad respiratoria en el taquizoito.

De acuerdo a Gray *et al.*, (1999), el evento endosimbiótico que dio origen a la mitocondria tuvo como consecuencia la migración de genes al núcleo. Esta migración es un proceso activo que continúa hasta la fecha, como puede verse en algunos genes que codifican para la subunidad ATP9 en *Neurospora crassa* (Van den *et al.*, 1982) y para el gen *cox2* en leguminosas (Covello y Gray, 1992); Adams *et al.*, 1999). También existen ejemplos de genes que migraron en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Campbell y Thorsness, 1998) y en el hongo *Podospora anserina* (Wright y Cummings, 1983). El evento de migración de genes de la mitocondria al núcleo dio como resultado la reducción del genoma mitocondrial, en el que actualmente se encuentran codificadas algunas subunidades de proteínas muy hidrofóbicas de los complejos de la cadena respiratoria y algunos RNAs (González-Halphen *et al.*, 2004). En nuestro laboratorio el evento de migración de genes de la mitocondria al núcleo se ha estudiado en algas clorofíceas tales como *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* y el alga incolora *Polytomella sp.* Pérez-Martínez *et al.*, (2000, 2001); y Funes *et al.*, (2002) encontraron que los genes mitocondriales que codifican para las subunidades COX2 y COX3 de la citocromo c oxidasa, el gen *atp6* que codifica para la subunidad ATP6 de la F1Fo ATP sintasa, y el gen *NAD4* de la NADH ubiquinona óxido reductasa, que en la mayoría de organismos están codificados en el genoma mitocondrial, en las algas clorofíceas se encuentran codificados en el genoma nuclear. Se plantea que dichos genes han adquirido una presecuencia de direccionamiento mitocondrial, un cambio en el uso de codones, la adquisición de señal de poliadenilación y la disminución de la hidrofobicidad < H > y de la mesohidrofobicidad Meso < H > en los productos polipeptídicos de estos genes. Todos estos cambios han permitido la expresión de genes originalmente mitocondriales que ahora se encuentran en otro compartimento celular.

El gen *cox2* que codifica para la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa, en algas clorofíceas como *Polytomella sp*, *Chlamydomonas reinhardtii*, y en parásitos apicomplejos como *Toxoplasma gondii* ha sufrido un proceso fragmentación en dos genes *cox2a* y *cox2b*, seguido de la migración de la mitocondria al núcleo. Cada uno de estos genes se insertaron en el genoma nuclear en cromosomas diferentes, como sucedió en *Plasmodium falciparum* donde el gen *cox2a* se encuentra en el cromosoma 14 y el gen *cox2b* en el cromosoma 13. Tal distribución podría ser similar en *T. gondii* (Funes *et al.*, 2002).

Análisis filogenéticos del gen TufA codificado en el apicoplasto de parásitos apicomplejos agruparon a estos organismos con cianobacterias y plástidos, mostrando una estrecha relación con plástidos presentes en alga verdes. Tales observaciones sugieren que los apicomplejos *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* y *Plasmodium falciparum* adquirieron dicho plástido por la endosimbiosis secundaria de un alga verde como sugirieron Khöler *et al.*,(1997). El origen verde del apicoplasto también lo sugieren los análisis filogenéticos realizados por Funes *et al.*, (2002) con el gen *cox2* de algas clorofíceas y parásitos apicomplejos. En contraste, otros trabajos sugieren el origen del apicoplasto a partir de un alga roja (Blanchard *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

A pesar de conocer la existencia de los genes *cox2a* y *cox2b* en *T. gondii* no se había aportado evidencia de que los polipéptidos COX2A y COX2B maduros se encontraran presentes formando parte de la citocromo c oxidasa en la mitocondria de *T. gondii*. Cabía la posibilidad de que estos genes no se expresaran, o bien que sus productos proteicos no se integraran funcionalmente en la citocromo c oxidasa.

La identificación de los polipéptidos COX2A y COX2B, por métodos inmunoquímicos, por microscopía electrónica y confocal, es la primera evidencia que nos permite asegurar que estos polipéptidos se encuentran formando una subunidad 2 heterodimérica en el complejo IV de la citocromo c oxidasa en un parásito apicomplejo. COX2A es el producto proteico del gen *cox2a* que corresponde a la región amino de una COX2 tradicional y COX2B corresponde a la porción carboxilo. Estas subunidades son sintetizadas en el citoplasma y posteriormente son transportadas al interior de la mitocondria. De acuerdo a la secuencia de COX2A

obtenida del genoma de *T. gondii* se ha encontrado que posee una presecuencia mitocondrial en su extremo amino terminal de 172 a. a., una secuencia interna de 122 y una extensión de 6 aminoácidos la cual se encuentra ubicada en el extremo carboxilo de la proteína, por lo tanto la masa molecular esperada para la proteína madura COX2A es de ≈ 14 kDa. Los resultados obtenidos a partir de las inmunoréplicas tipo western con el lisado de taquizoitos indican la presencia de una proteína COX2A con una masa molecular alrededor de 24 kDa. En el caso de COX2B la secuencia obtenida del genoma sugiere una proteína de 190 a.a. con una secuencia interna de 77 aminoácidos que le sirve como extensión en la proteína madura, tal proteína tendría una masa molecular alrededor de 21 kDa. Sin embargo, en nuestros análisis por inmunoréplicas tipo western del extracto total de taquizoitos se identificó a una proteína alrededor de 14 kDa. Los resultados anteriores sugieren que las subunidades COX2A y COX2B en el parásito *Toxoplasma gondii* sufren un procesamiento distinto a lo esperado con respecto a la secuencia genómica y con respecto al procesamiento que se presenta en algas clorofíceas como *Chlamydomonas reinhardtii* y el alga incolora *Polytomella sp.*, en las que los polipéptidos COX2A tienen una masa molecular de 16 kDa y COX2B de 17 kDa (Pérez-Martínez *et al.*, 2000).

Esta diferencia de los polipéptidos COX2A y COX2B es comprensible debido a que *T. gondii* es un parásito con un ciclo biológico distinto y que además presenta en su ultraestructura una serie de organelos de secreción, así como organelos rodeados de membrana como el apicoplasto, una sola mitocondria y el núcleo el cual se encuentra rodeado por una envoltura nuclear compleja, y tal complejidad en estos organelos no se observa en algas verdes. Puede ser que la importación de las proteínas COX2A y COX2B esté asociada a un procesamiento diferente de las preproteínas para formar los productos maduros. Proponemos que la biogénesis de las proteínas COX2A y COX2B en parásitos apicomplejos, puede ser distinta de lo que ocurre en las algas clorofíceas.

T. gondii es un organismo modelo que presenta un genoma haploide y organelos como el complejo de Golgi, la mitocondria y el apicoplasto. Esta particularidad ha sido aprovechada por algunos autores para la identificación de proteínas en organelos específicos así como el direccionamiento que éstas tienen dependiendo

del procesamiento del péptido señal como reportan DeRocher *et al.*, (2000); Gubbels *et al.*, (2004); Brydges *et al.*, (2003); Toursel *et al.*, (2000). Sin embargo, estos estudios han sido realizados utilizando técnicas de biología molecular que permiten clonar a las proteínas o péptidos señal a proteínas fluorescentes tales como la GFP, YFP o la CFP y por tanto permiten identificar a la proteína en el organelo de interés. Mitotracker ha sido utilizado para identificar a la mitocondria en varios de los reportes antes mencionados. En nuestros experimentos utilizamos Mitotracker (2.5 μ M) para identificar a la mitocondria, sin embargo la localización de COX2A y COX2B se realizó utilizando anticuerpos policlonales purificados, y la colocalización se evidenció utilizando el Anticuerpo anti-IgG Alexa 488. La inmunolocalización por microscopía confocal de ambos polipéptidos se realizó modificando la técnica convencional para inmunofluorescencia donde las células son primeramente fijadas con fijadores aldehídicos como el paraformaldehído, que como su nombre lo indica, fija a las proteínas rigidizando de alguna manera a las estructuras celulares. Se sabe que los fijadores pueden llegar a enmascarar los epítopes presentes en las proteínas, ocasionando que los anticuerpos no puedan reconocer los epítopes contra los cuales están dirigidos. Otro de los puntos importantes fue considerar la complejidad que presenta *T. gondii* en la estructura de su mitocondria y que era necesario penetrar al interior de ésta para poder localizar a los polipéptidos en estudio. Cabe mencionar que de acuerdo a lo reportado por Khöler en el (2006), la mitocondria presenta en algunos puntos de su estructura entre 6 y 8 membranas. Considerando lo anterior, se planeó un procesamiento de los taquizoitos en los que la fijación con aldehído fuera realizada al final del procesamiento, para poder llevar a cabo la inmunolocalización. La permeabilización fue otro punto importante, ya que pequeñas concentraciones de Tween no eliminaban al Mitotracker con el que previamente se trataron los taquizoitos, por lo que concentraciones de 0.05% y 0.1% permitieron ver taquizoitos con colocalización de COX2B en la mitocondria.

En las imágenes obtenidas con el procesamiento anterior pudimos ver que COX2A y COX2B se localizan con mayor intensidad en una zona redondeada en la parte apical de la mitocondria en lo que podría ser el OMC mitocondrial y donde podrían encontrarse los precursores de proteínas que se encuentran codificadas en el

núcleo. La colocación en puntos determinados podrían sugerir la compartimentalización de la función bioquímica de la mitocondria.

En parásitos apicomplejos poco se conoce respecto a la función de la mitocondria, y también pocos estudios han estado enfocados al estudio ultraestructural de la mitocondria. En especies de *Plasmodium* se ha identificado una mitocondria en el estadio sexual y asexual con algunas diferencias con respecto a la cantidad de crestas (Krungkrai, 2004). En *T. gondii* únicamente existe un estudio que evidencia la ultraestructura de la mitocondria y que ha sido realizado en taquizoitos obtenidos de cultivos celulares, en los que se han identificado los componentes estructurales que forman parte de la mitocondria (Khöler, 2006).

En nuestro caso el procesamiento de taquizoitos en resina Epón permitió evidenciar la ultraestructura de la mitocondria con sus crestas tubulares, las ramificaciones y los dominios que presenta, que en ocasiones asemeja a una estructura de cabeza de martillo. Algunas estructuras permiten visualizar el OMC (Complejo Ovoide Mitocondrial citoplasmático), la porción de citoplasma encerrada en el interior de la mitocondria, así como su relación cercana con el núcleo del taquizoito. Este paso previo fué fundamental para la identificación de estructura mitocondrial en taquizoitos procesados en la resina acrílica hidrosoluble Lowycryl K4M. Las resinas acrílicas hidrosolubles normalmente se utilizan para la inclusión de células para inmunolocalización como reporta Agredano-Moreno *et al.* (2001), ya que permite mantener la antigenicidad en la muestra permitiendo la identificación de los epítopes por los anticuerpos utilizados (Vázquez y Echeverría, 2000).

La inmunolocalización de COX2B en la mitocondria del taquizoito por microscopía electrónica fue lo que nos permitió asegurar la existencia de esta proteína en la mitocondria. También tomamos en consideración los resultados obtenidos por inmunofluorescencia. Tomamos como punto de referencia el núcleo de la célula con el que la mitocondria se encuentra estrechamente relacionada, con esta referencia consideramos la inmunolocalización en zonas cercanas al núcleo que presentaban estructura de mitocondria. La localización de partículas de oro fue de mayor proporción en la zona con estructura de mitocondria que en el resto de la célula, y se

observaron partículas de oro que se encontraban dispuestas siguiendo la posible estructura de la mitocondria en zonas cercanas al núcleo.

COX2A es una proteína con presecuencia de direccionamiento mitocondrial y una extensión en el extremo carboxilo terminal, típica de proteínas que se encuentran ancladas a la membrana mitocondrial interna (Alberts *et al.*, 2002). La inmunolocalización fue difícil para el caso de COX2A quizá por el reconocimiento pobre de la proteína por esta metodología o quizá por que el anticuerpo contra COX2A fue generado contra un péptido sintético. Otra posibilidad es que el epítipo de interés se encontraba muy oculto dado que COX2A es una proteína que su mayor parte se encuentra insertada en la membrana mitocondrial interna y podría ser de difícil acceso considerando la complejidad que presenta la mitocondria en *T. gondii*.

Actualmente no se conoce mucho respecto al sistema de importación de proteínas en la mitocondria de *T. gondii*, sin embargo Toursel *et al.*, (2000) ha reportado la presencia de la chaperona HSP60 la cual posee una presecuencia típica de direccionamiento mitocondrial. Brydges y Carruthers, (2003) también reportaron la existencia de una superóxido dismutasa con una presecuencia de direccionamiento mitocondrial que posee una secuencia N-terminal hidrofóbica que asemeja a un péptido señal, seguida por una presecuencia anfipática convencional, y ambas son importantes en el direccionamiento de la proteína a la mitocondria. Lo anterior indica la existencia de un aparato de importación de proteínas en *T. gondii*, y que posiblemente pueda encontrarse en otros miembros de este Phylum como en *Cryptosporidium parvum* (Slapeta y Keithley, 2004) donde se ha reportado la existencia de una HSP70 mitocondrial. En este parásito la mitocondria ha sufrido una reducción de su genoma y por lo consiguiente únicamente tiene una reliquia del organelo.

No sabemos cuál es la ruta de importación que siguen las proteínas COX2A y COX2B, sin embargo sería interesante conocer si éstas siguen una ruta secretoria o un sistema de endomembranas. Esto con la finalidad de conocer a qué nivel fuese posible la inhibición del ensamblaje entre COX2A y COX2B y que esto permita su utilización como blanco terapéutico contra la toxoplasmosis.

IX. CONCLUSIONES

- Se logró la inmunolocalización de COX2A y COX2B por métodos inmunoquímicos, inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos utilizando inmunoréplicas tipo western, microscopía confocal y microscopía electrónica. Lo obtenido asegura que los parásitos apicomplejos tienen subunidades COX2 heterodiméricas en la citocromo c oxidasa.
- Se visualizó por microscopía confocal el efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria utilizando Mitotracker como marcador mitocondrial, evidencia de la capacidad respiratoria de la mitocondria.
- Fue posible la detección de COX2A y COX2B en la mitocondria y con más intensidad en una porción semejante a un OMC.
- Los polipéptidos COX2A y COX2B son productos proteicos los cuales sufren un procesamiento distinto a lo que se esperaba respecto a su secuencia genómica y respecto al procesamiento de sus contrapartes en algas clorofíceas.

X. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams K., Song K., Roessier P., Nugent J., Doyle J., Doyle J. and Palmer J. (1999). Intracellular gene transfer in action: Dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13863-13868.
- Agredano-Moreno L., González-Jiménez M., Segura-Valdéz M., Ubaldo E., Ramos C., Martínez E. and Jiménez-García L. (2001). Further Ultrastructural characterization of the intranuclear ring-shaped bodies of the plant *Lacandonia Schimatica*, *J. Struct. Biol.* **136**:1-6.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raft M., Roberts K. and Watson J. (2002). *Biología Molecular de LA CELULA*. 3a. Edición. Edit. OMEGA: pg.607- 613.
- Andersson S., Karlberg O., Canback B., and Kurland C. (2003). On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **358**: 165-179.
- Black M. and Boothroyd C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **64**: 607-623.
- Blanchard L. and Hicks S. (1999). The Non-Photosynthetic plastid in malarial parasites and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:367-375.
- Bolender N., Sickmann A., Wagner R., Meisinger Ch. and Pfanner N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. Review. *EMBO reports.* **9** :42-49.
- Bratton M., Pressler M. and Hosler J. (1999). Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: Catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry* **38**: 16236-16245.
- Bratton M., Hiser L., Antholine W., Hoganson C. and Hosler J. (2000). Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **39**: 12989-12995.
- Burke P. and Poyton R. (1998). Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J. Exp. Biol.* **201**: 1163-1175.
- Brydges D. and Carruthers V. (2003). Mutation of an unusual mitochondrial targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science* **116**:4675-4685.
- Campbell C. and Thorsness P. (1998). Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in yme 1 yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci.* **111**: 2455-2464.
- Capaldi R. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 569-596.
- Carruthers V. (1999). Armed and Dangerous : *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *International Parasitology* **48**: 1-10.
- Carroll J., Shannon R., Fearley I., Walter J. and Hirsh. (2002). Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification two new subunits. *J. Biol Chem.* **277**: 50311-50317.

- Claros G., Davidson E., King P. and Gonzalez-Halphen D. (2000). Unusual Location of a Mitochondrial Gene. *Journal of Biological Chemistry*. **275** (39).
- Chobotar B. and Schotyseck E. (1982). Ultrastructure in "the Biology of the coccidian" P.L Long Ed: 101-165. *Univ. Park Press Baltimore*.
- Covello S. and Gray W. (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (cox2) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *The EMBO Journal* 11: 3815-3820.
- Daley O., Adams L., Rachel C., Svenja Q., Millar H., Jeffrey P., Elke P. and James W. (2002). Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *The Plant Journal*.**30**: 11-21.
- Del Arco A. and Satrústegui J. (1998). 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**:23327-23334
- DeRocher A., Hagen B., Christopher E., Froehlich J., Feagin J. and Parsons M. (2000). Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. *Journal of Cell Sciences*.**113**: 3969-3977.
- Dubremetz J., Garcia R., Conseil V. and Noëlle F. (1998). Apical organelles and Host-cell invasion by Apicomplexa. *International journal for Parasitology*. **28**: 1007-1013
- Eaton S., Weiss M. and Kami K. (2005). Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* **xx**: 1-8.
- Edvinsson B., Shah J., Nord C., Pedersen B. and Birgitta E. (2004). DNA extraction and PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*. *APMIS*.**112**:342.348
- Feagin J. (2000). Mitochondrial genome diversity in parasites. *International Journal for Parasitol.* 30: 371-390.
- Fogel B., Cheung M., Pittman E., Hecht D. (2008). Modeling the inhibition of quadruple mutant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase by pyrimethamine derivatives. *J Comput Aided Mol Des*.**22**: 29-38.
- Frenkel J.(1988). Pathophysiology of Toxoplasmosis. *Parasitology Today*. **4** :273-278.
- Frey T. and Murray J. (1994). Electron microscopy of cytochrome c oxidase crystal, Monomer-dimer relationship and cytochrome c binding site. *J.Mol.Biol.* **237**: 275-297.
- Fry M. and Beesley J. (1991). *Parasitology* **102**: 17-26.
- Funes S., Reyes-Prieto A., Pérez-Martinez X. and González-Halphen D. (2004). Review On the evolutionary origins of apicoplasts: revisiting the rhodophyte vs. chlorophyte controversy. *Microbes and Infection* **6**: 305-311.
- Funes S., Davidson E., Reyes-Prieto A., Magallón S., Herion P., King M. and González-Halphen D.(2002). A Green Algal Apicoplast Ancestro. *Science*. **298**: 2155.
- Funes S., Davidson E. and Claros M. (2002). The typically mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Lett.* **325**: 140-145.

- Glavert M. and Lewis R. (1998). Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. *Princeton*, Nw. Jersey. 299 -305.
- Gonzalez-Halphen D., Funes S., Pérez-Martinez X., Reyes Prieto A., Claros G., Davidson E. and King P. (2004). Genetic Correction of Mitochondrial Diseases. Using the Natural Migration of Mitochondrial Genes to the Nucleus in Chlorophyte Algae as a Model System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**: 232-239.
- González-Halphen D., Pérez – Martínez X., Funes S., Reyes-Prieto A. y Santillán – Torres J. (2003). La Migración de Genes de la Mitocondria al Núcleo y la Evolución de los Genomas Mitocondriales. *Mensaje Bioquímico.* **XXVII**: 201-219.
- Gubbels MJ., Wieffer M. and Striepen B.(2004). Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **137**: 99-110.
- Hrazdina G. and Jensen R. (1992). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **43**: 241
- Gray M., Burger G. and Lang B. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481.
- Hager M., Striepen B., Lewis T. and Roos D. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science.* **112**:2631-2638.
- Haltia T., Saraste M. and Wikstrom M. (1991). Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *EMBO J.* **10**: 2015-2021.
- Hauser E., Sharma D. and Remington S. (1982). Natural Killer Cell Induced by Acute and Chronic Toxoplasma Infection. *Cellular Immunology.* **69**: 330-346.
- Heijne Von, Steppuhn G. and Herrman R. (1989). Domain Structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**: 535-545.
- Heuvel L. and Jan Smeitink. (2001).The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *BioEssays review.* **23**: 518-525.
- Hosler J. (2004). The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1655**: 332-339.
- Kolaskar A. and Tongaonkar P.(1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* **276** : 172-4.
- Hu K., Johnson J., Florens L., Fraunholz M., Suravajjala S., DiLullo C., Yates J., Roos S. and Murray M. (2006). Cytoskeletal Components of an Invasion Machine-The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens.* **2** : 0121-0138.
- Hu K., Mann T., Striepen B., Beckers C., Roos D. and Murray J. (2002). Daughter Cell Assembly in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biology of the Cell.* **13**:593-606.

- Jan-Marc G., Marnix W. and Boris S. (2004). Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Molecular & Biochemical Parasitology*. **137**:99-110.
- Janssen J., Nijtmans G., Lambert P., Van den H. and Smeitink A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structure, function and Pathology. *J Inherit Metab Dis* **29**: 499-515.
- Janeway Ch., Travers Paul., Walport M. and Capra J. *INMUNOBIOLOGIA*. (2000). 2a. Edición. Edit. MASSON S.A. p: 33-75.
- Jensen R. and Johnson A. (1999). Protein translocation: is Hsp70 pulling my Chain? *Curr. Biol.* **9**: R779-782.
- Joiner A. and Graham W. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Letters to Nature*. **418**: 548-542.
- Joiner K and Roos D. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii* less is more. *The journal of Cell Biology*.157:557-563.
- Kami K. and Weiss L. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International Journal for Parasitology* **34**:423-432.
- Keightley J., Zimmermann B., Mather M., Springer P., Pastuszyn A., Lawrence D. and Fee J.A. (1995). Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome ba3 from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* **270**: 20345-20358.
- Khalimonchuk O. and Rödel G. (2005). Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 5: 363-388.
- Khan A., Taylor S., Su Ch., Mackey J., Jon B., Cole R., Glover D., Tang K., Pulsen T., Berriman M., Boothroyd C., Pfeifferkorn R., Dubey P., Ajioka W., Roos S., Wootton C. and Sibley D. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. **33**: 2980-2992
- Khöler S. (2006). Multimembrane-bound structures of Apicomplexa: II. The ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol Res*: 355-369.
- Khöler S. (2005). Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa I: The Architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitology Research* **96**: 258-272.
- Khöler S., Delwiche C., Denny P., Tilney L., Webster P., Wilson R., Palmer J. and Roos, D. (1997). A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**:1485-1489.
- Kirichenko A., Vygodina T., Mkrtychyan H. and Konstantinov A. (1998). Specific cation binding site in mammalian cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* **423**: 329-333.
- Krungskrai J. (2004). The multiples roles of the mitochondrion of the malarial parasite. *Review.Parasitology*. **129**: 511-524.
- Kurland C. and Andersson S. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:786-820.

- Laboux O., Ste-Marie L., Glorieux F. and Nanci A., (2003). Quantitative immunogold labeling of bone sialoprotein and osteopontin in methylmethacrylate-embedded rat bone. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 61-67.
- Lang B., Gray M. and Burger G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* **33**: 351-397.
- Lee A., Kirichenko A., Vygodina T., Siletsky S., Das T., Rousseau, D., Gennis R. and Konstantinov A. (2002). Ca (2+)-binding site in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **41**: 8886-8898.
- Lemaire C., Robineau S. and Netter P. (1998). Molecular and biochemical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cox1 mutants. *Curr. Genet.* **34**: 138-145.
- Leriche M. and Dubremetz J. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitology Research.* **76**: 559-562.
- London Resin Company Limited. Using L.R White for Electron Microscopic Immunocytochemistry.
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. and Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol Chem.* **193**: 265-275.
- Luft B. and Remington J. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* **15**: 211-22.
- Margulis L. (1970). The origin of Eucaryotic cells, Yale University Press. New Haven, USA.
- Mc Fadden L. and Van Dooren G. (2004). Evolution: Red Algal Genome Affirms a Dispatch Common Origin of All Plastids. *Current Biology.* **14**: 514-516.
- MacLaren A., Attias M., de Souza W. (2004). Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Veterinary Parasitology.* **125**: 301-312.
- Melo E., Attias M. and De Souza W. (2000). The single Mitochondrion of Tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology.* **130**: 27-33.
- Meneceur P., Bouldouyre M., Aubert D., Villena I., Menotti J., Sauvage V., Garin J., Derouin F. (2008). In Vitro Susceptibility of Various Genotypic Strains of *Toxoplasma gondii* to Pyrimethamine, Sulfadiazine and Atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **52**: 1269-1277.
- Meunier B. and Taanman J. (2002). Mutations of cytochrome c oxidase subunits 1 and 3 in *Saccharomyces cerevisiae*: assembly defect and compensation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1554**: 101-107.
- Morales-Sainz L., Escobar-Ramírez A., Cruz-Torres V., Reyes- Prieto A., Vasquez-Acevedo M., Lara-Martinez R., Jiménez-García L. and Gonzalez-Halphen D. (2007). The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1777**: 202-210.
- Naot Y., Guptill D. and Remington J. (1982). Duration of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* after acute acquired toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **145**: 770.

- Nelson L. and Michael M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. Four edition. Edit W.H. Freeman and Company. New York : 690 -704.
- Neupert W. and Herrman J. (2007). Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu.Rev.Biochem* 76: 723-749.
- Neupert W y Herman M. (1997). Protein Import into Mitochondria. *Annu. Rev.Biochem.* **66**: 863 – 917.
- Nichols B. and Chiappino M. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Protozoology.* **34**: 217-226.
- Nijtmans L., Taanman J., Muijsers A., Speijer D. and Van den B. (1998). Assembly of cytochrome c oxidase in cultured human cells. *Eur. J.Biochem.* **254**: 389-394.
- Ossorio P., Schwartzman J. and Boothroyd J. (1992). *Mol. Biochem. Parasitol* **50**: 1-15.
- Palmer J. (2003). The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit?. *J Phyco* **39**: 4-11.
- Pelletier L., Stern A., Pypaert M., Sheff D., Ngô M., He Y., Roper N., Hu K., Derek T., Coppens I., Roos S., Joiner A. and Warren G. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii* *Nature.***418**:548-551.
- Pereira M., Santana M. and Teixeira M. (2001). A novel Scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 185-208.
- Pérez-Martinez X., Antaramian A., Vázquez M., Funes S., Tolkunova E., d'Alayer J. Claros M., Davidson E., Kings M., and González H. (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.
- Pérez-Martinez X., Vázquez-Acevedo M., Tolkunova E., Funes S., Claros G., Davidson E., Kings P. and Gonzalez-Halphen D. (2000). Unusual Location of a Mitochondrial Gene. *The journal of Biological Chemistry.* **275**:30144-52
- Pérez-Martinez X., Funes S., Tolkunova E., Davidson E., King P. and González-Halphen D. (2002). Structure of nuclear-localized cox3 genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Curr Genet.* **40**: 399-404.
- Petitprez A. and Vivier E. (1972). Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*, *protistologica* VIII: 199-221.
- Poyton R. and Mc Ewen J. (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 563-607.
- Que X., Huân N., Lawton J., Gray M., Qing L., Engel J., Brinen L., Ghosh P., Joiner A. and Reed L. (2002). The Cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, Toxopain-1, Is Critical for Parasite Invasion and Roptry Protein Processing. *The Journal of biological Chemistry.* **277**: 25791-25797.
- Rahman S., Taanman J., Cooper J., Nelson I., Hargreaves I., Meunier B., Hanna M., Garcia J., Capaldi R., Lake B., Leonard J. and Schapira A. (1999). A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 1030-1039.

- Russell D. and Burns R. (1984). The polar ring of coccidian Sporozoites: A unique microtubule-organizing centre. *Journal Cell Science*. **65**: 193-207.
- Ryan T. and Hoogenraad J. (2007). Mitochondrial- Nuclear Communications. *Annu Rev. Biochem.* **76**: 4.1- 4.22.
- Samuel M., Pybus J. and Alan A. (2001). *Iowa State University Press/Ames*.
- Schägger H. and Von J. (1987). Tricina-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Shaw K., Roos S. and Tilney G. (2001). DNA replication and daughter cell budding are not tightly linked in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection*. **3**: 351-362.
- Sinai P. and Joiner A. (2001). The *Toxoplasma gondii* Protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of Cell Biology*. **54**: 95- 108.
- Sibley L. and Boothroyd J. (1992). Construction of a molecular Karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**: 291-300.
- Slapeta J. and Keithly S. (2004). *Cryptosporidium Parvum* Mitochondrial-Type HSP70 Targets Homologous and Heterologous Mitochondria. *Eukaryotic Cell*. **3**: 483 – 494.
- Soulimane T., Buse G., Bourenkov G., Bartunick H., Huber R. and Than M. (2000). Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **19**: 1766-1776.
- Srivastava I., Rottenberg H. and Vaidya A. (1997). *J.Biol.Chem.* **272**: 3961-3966.
- Tanabe K. and Murakami K. (1984). Reduction in the Mitochondrial Membrane Potential of *Toxoplasma gondii* after invasion of Host Cells. *J.Cell Sci.* **70**:73-81.
- Toursel C., Dzierszinski F., Bernigaud A., Mourtuaire M. and Tomavo St. (2000). Molecular Cloning Organellar targeting and Developmental expression of mitochondrial chaperona HSP60 in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**: 319 – 332.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomisaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh., Nakashima R., Yaono R. and Yoshikawa S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8Å. *Science* **269**: 1069-1074.
- Ugglä A. and Buxton D. (1990). Inmune response against *Toxoplasma gondii* and Sarcocystis infections in ruminants: Diagnosis and Prospects for Vaccination. *Rev Sci Tech.* **9** 441-462.
- Van den B., Samallo J. and Agsteribbe E. (1982). *Nature*. **298**: 187-189.
- Vázquez M. and Tuena de G. (2002). Mitochondria. Edit. Prado; México D. F. Pg. 67-87.
- Vazquez N. and Echeverria O. (2000). Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM. Ed. *Fondo de Cultura Económica*.

- Vercesi E., Rodriguez O., Uyemura A., Zhong L. and Moreno N. (1998). Respiration and Oxidative Phosphorylation in the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 31040-31047.
- Vidal E., Colombo A., Penalva de O., Foccacia R. and Pereira-Chiocola V. (2004). PCR Assay Using Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** :4765-4768.
- Waller R., Keeling P., Donald R., Striepen B., Handman E., Lang-Unnasch N., Cowman A., Besra G., Roos D. and McFadden G. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Nat. Acad.Sci.USA*.**95**:12352-12357.
- Wang C. (1982). In *The Biology of Coccidia* (Long, P.L. ed) pp.167-228 *University Park Press*, Baltimore, MD.
- Weiss, L. and Kim K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. **5**: 391-405.
- Wilson J. and Williamson D. (1997). Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**: 1-16.
- Williams P., Blackburn N., Sanders D., Bellamy H., Stura E., Fee J. and McRee D. (1999). The CuA domain of *Thermus thermophilus* ba3-type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution. *Nat. Struct. Biol*. **6**: 509-516.
- Wright R. and Cummings D. (1983). Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during Senescence in a fungus. *Nature*. **302**: 86-88.
- Yajatri D. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *BioEssays*.**28**: 890-901.
- Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh. and Tsukihara T. (1998). Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *J. Bioenerg. Biomembr*. **30**: 7-14.
- Zhang Z., Green R. and Cavalier-Smith T. (2000). Phylogeny of Ultra-Rapidly Evolving Dinoflagellate Chloroplast Genes: A Possible Common Origin for Sporozoan and Dinoflagellate Plastids. *J Mol Evol*.**51**:26-40.

Páginas de Internet.

- <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>.
- <http://www.higiene.edu.uy/cefa/parasito/2006/toxo.pdf>.
- <http://www.iqb.es/cbasicas/forma/forma04/0069.htm>.

Apéndice I

Artículo publicado

Morales-Sainz L., Escobar-Ramírez A., Cruz-Torres V., Reyes- Prieto A., Vásquez-Acevedo M., Lara-Martínez R., Jiménez-García L., Gonzalez-Halphen D. (2007). The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*. *Biochemica et Biophysica Acta*.1777: 202-210.

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, Mexico

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

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 μm) 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 maleimidobenzoyl-*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*HI 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*HI 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 μl , containing 12.5×10^6 tachyzoites) was incubated with 2.5 μM 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 μl 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 μM 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 μM 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 Dubremetz [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 H₂PO₄, 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>Karodinium 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 falcatula</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 sp.</i>	AF305541_1	AF305542_1

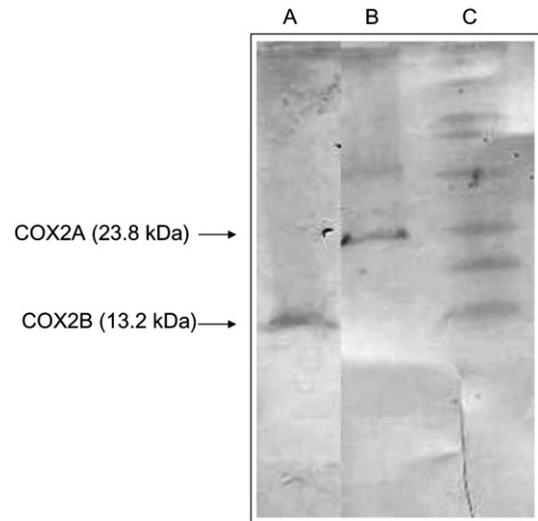


Fig. 1. Immunoblot analysis of whole *T. gondii* cell extracts. *T. gondii* whole cell protein extracts (equivalent to 40 µg of protein) were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nylon membranes for Western blot analyses. A) Lane decorated with the anti-COX2B antibody. B) Lane decorated 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 Schagger 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).

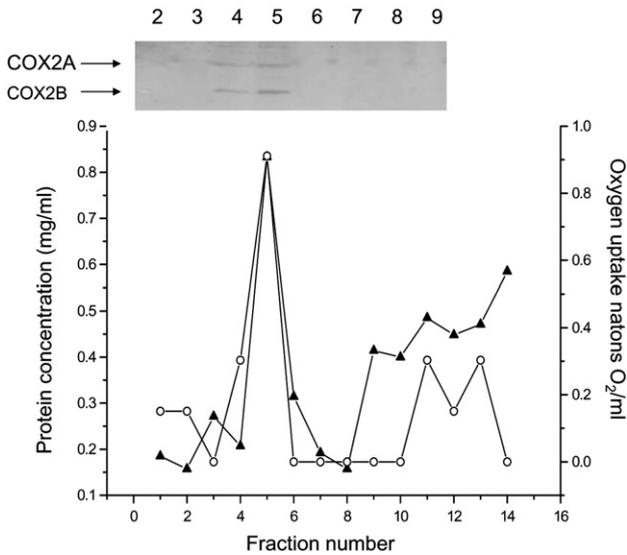


Fig. 2. Subcellular fractionation of *T. gondii* tachyzoites by Percoll gradient centrifugation. Bottom panel, elution profile of the Percoll gradients. Protein concentration (black triangles) and oxygen consumption rates (open circles) for each fraction are shown. Upper panel, immunoblot analysis of 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,

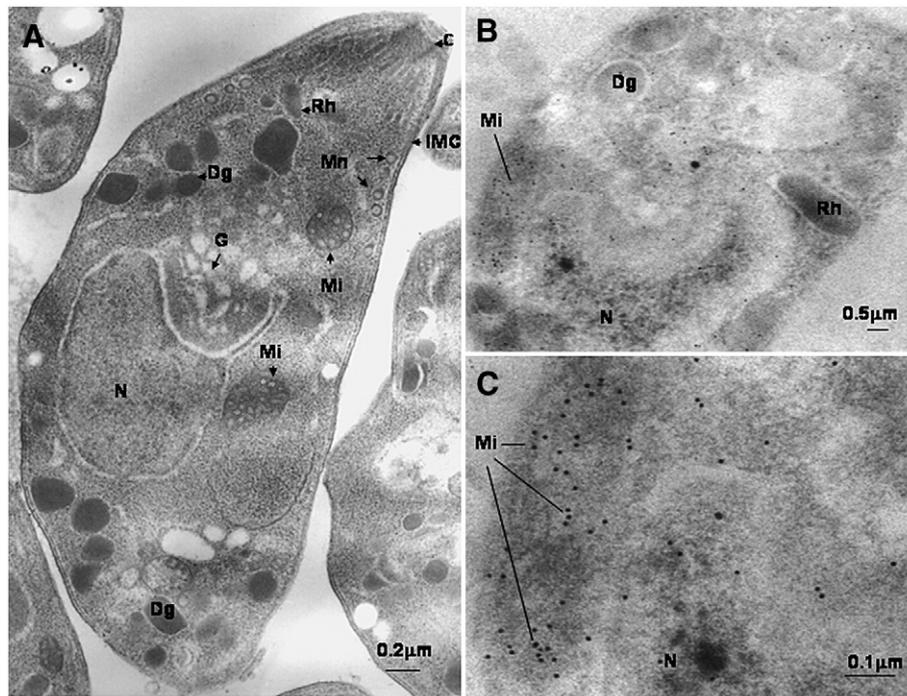


Fig. 3. Ultrastructure of a *T. gondii* tachyzoite and immunolocalization of COX2B to mitochondria by electron microscopy using gold-labeled secondary antibodies. A) Electron micrograph of a sectioned tachyzoite. The main subcellular structures are indicated: conoids (C), dense granules (Dg), Golgi apparatus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

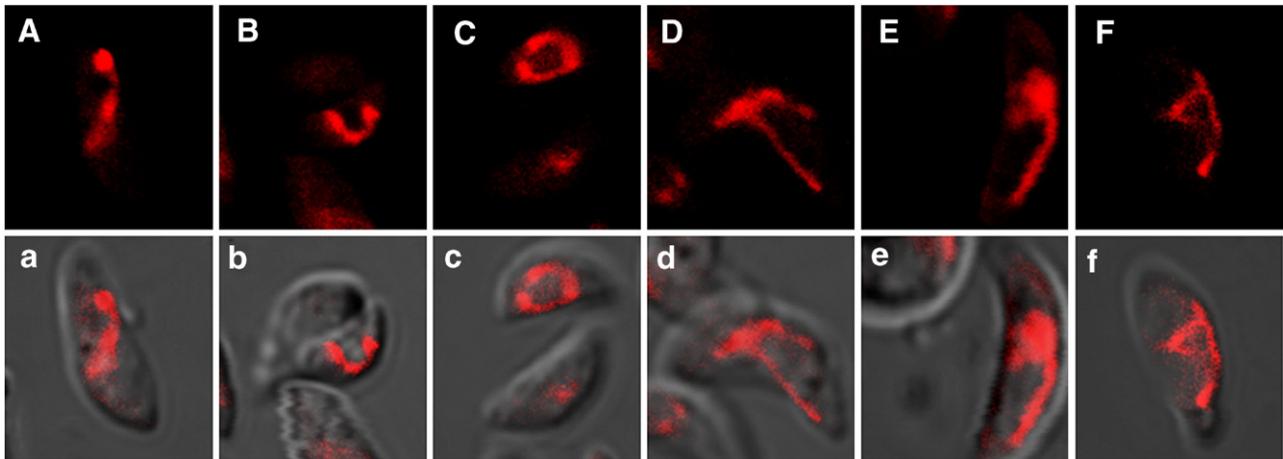


Fig. 4. Fluorescent images of mitochondria of *T. gondii* tachyzoites labeled with Mitotracker. Panels A, B, C, D, E and F show the different mitochondrial structures found in tachyzoites incubated in the presence of 2.5 μ M Mitotracker Red CMX Ros. Panels a, b, c, d, e and f show the corresponding superimposed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

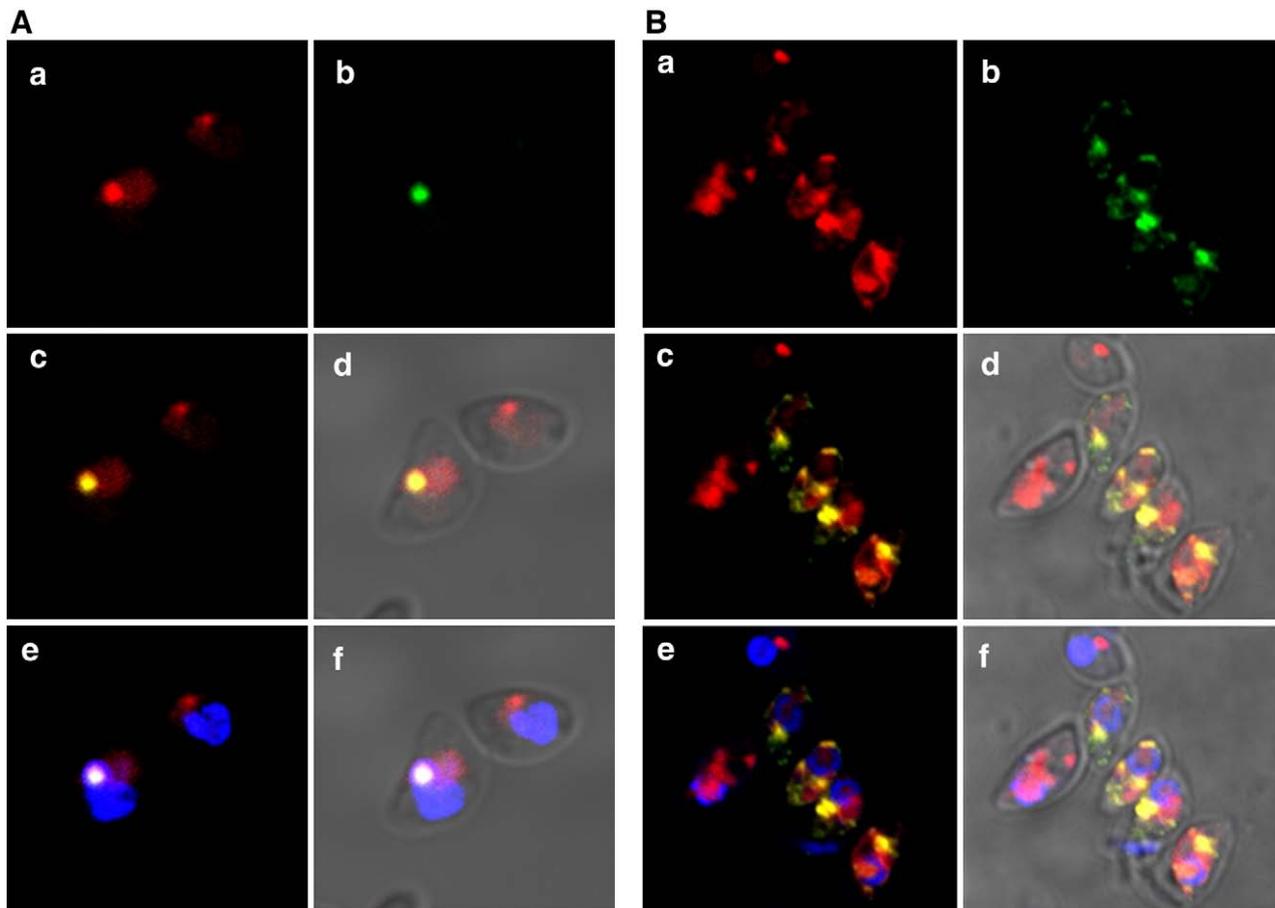


Fig. 5. Immunolocalization of COX2A and COX2B polypeptides by confocal microscopy of permeabilized tachyzoites using fluorochrome-labeled secondary antibodies. Panel A: a) Staining of mitochondria with Mitotracker (red fluorescence). b) Labeling with the rabbit anti-Toxoplasma COX2A antibody followed 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

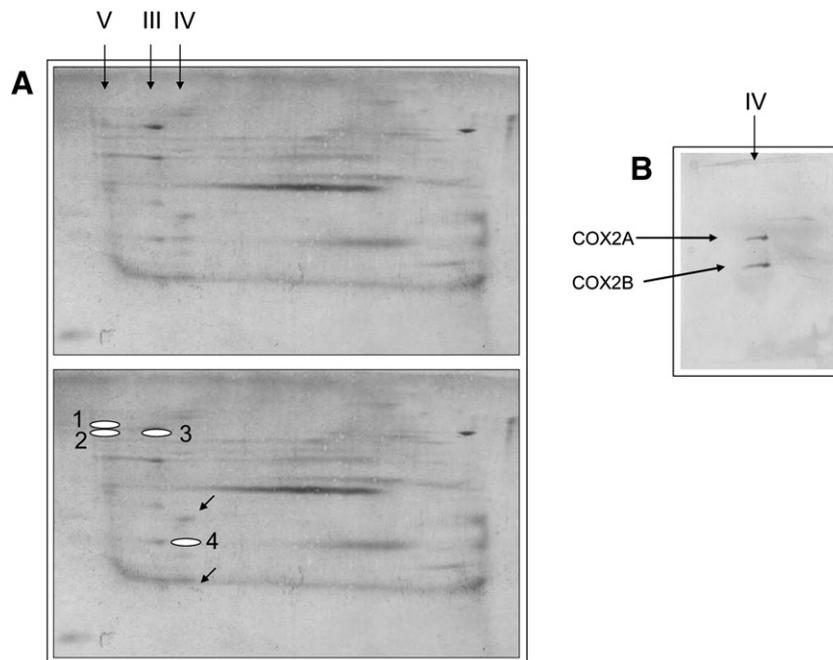


Fig. 6. Two-dimensional resolution of the mitochondria-enriched fraction from *T. gondii*. A) The identified OXPHOS complexes are indicated as V (F_1F_0 -ATP synthase), III (bc_1 complex) and IV (cytochrome *c* oxidase). Mitochondria-enriched fractions were resolved on BN-PAGE followed by 2D-Tricine-SDS-PAGE. 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 I 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 F₁F_o-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 abovementioned 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). Toursel 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 Aydé 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. Chan, V. Nene, S.J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Perlea, 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. Buret, 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. Satrustegui, 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. Toursel, 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.

Apéndice II

**Algunos eventos de la biogénesis de la mitocondria de
T. gondii vistas por Microscopía Electrónica de
Transmisión**

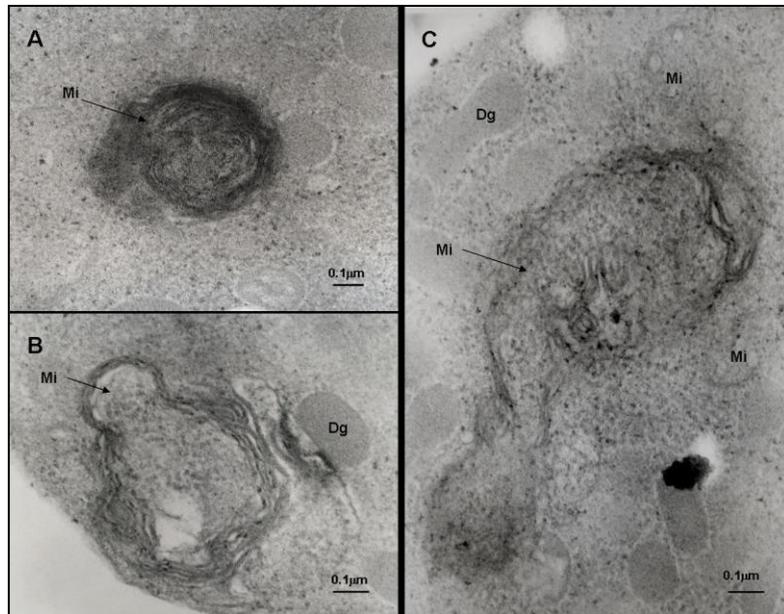


Fig.1. Etapas distintas de la formación del OMC mitocondrial y de la mitocondria.

Panel **A**, Plegamiento estrecho de las membranas que forman parte de la mitocondria. **B**. OMC en formación. **C**. Mitocondria en formación.

En la **figura 1** imágenes obtenidas en distintos campos de observación, nos permiten observar parte de la biogénesis mitocondrial, como en el panel **A** en el que se muestra una porción de membrana muy enrollada que forma parte de la mitocondria. En el panel **B** se observa la formación del OMC rodeado de membranas laxas que formarán parte de las membranas mitocondriales. En **C**. podemos apreciar la formación de una mitocondria en una forma laxa, y el crecimiento de la mitocondria donde las crestas mitocondriales son poco definidas.

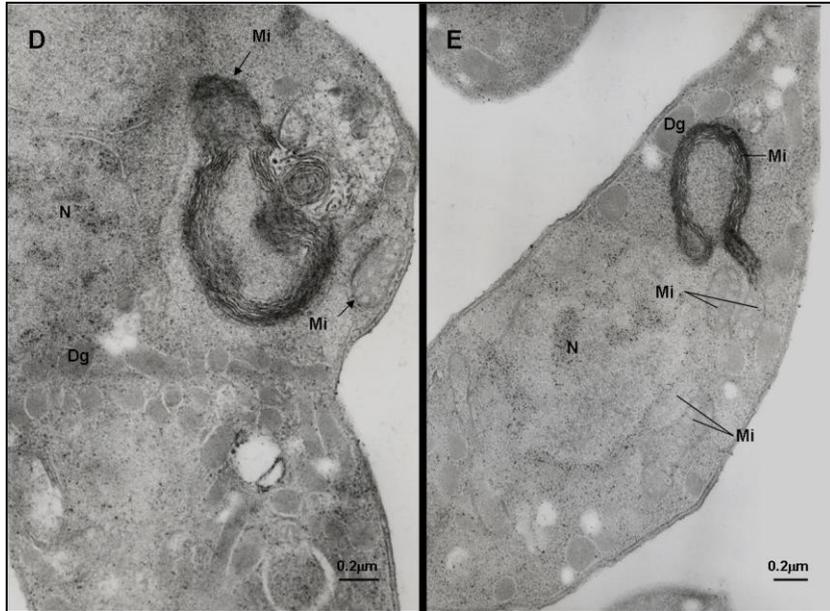


Fig. 2. Formación de las crestas mitocondriales y crecimiento de la mitocondria.

En el panel **D**, podemos apreciar la formación de las crestas mitocondriales a partir de las múltiples membranas plegadas alrededor de una porción de citoplasma contenido dentro de la estructura. Aquí podrían encontrarse componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales y precursores mitocondriales. En el extremo superior se aprecia el segmento de mitocondria que empieza a ensamblarse para formar las crestas tubulares, también se encuentran segmentos de mitocondria con ultraestructura definida. En el panel **E** encontramos la estructura con múltiples membranas a partir de la cual se van formando las crestas mitocondriales y como consecuencia de ello la mitocondria va creciendo y se van formando las ramificaciones que van a formar a toda la mitocondria. Al parecer es a partir de esta estructura que se lleva a cabo la formación de las crestas mitocondriales y el crecimiento de la mitocondria.

Las imágenes anteriores evidencian que la biogénesis de la mitocondria en el taquizoito de *T. gondii* sucede de un modo diferente que en la mayoría de los eucariotes, en los que la división de la mitocondria sucede por eventos de fisión binaria (Vázquez *et al.*, 2001). Por tanto dada la importancia en salud pública y a nivel veterinario del parásito apicomplejo *T. gondii*, sería importante conocer un poco más de la biogénesis de la mitocondria y su funcionamiento bioquímico.