



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**HETEROGENEIDAD DEL COMPLEJO IV MITOCONDRIAL DEL
ALGA INCOLORA *Polytomella sp.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

DINORAH LEYVA ILLADES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

Facultad de Medicina



MÉXICO, D.F., 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

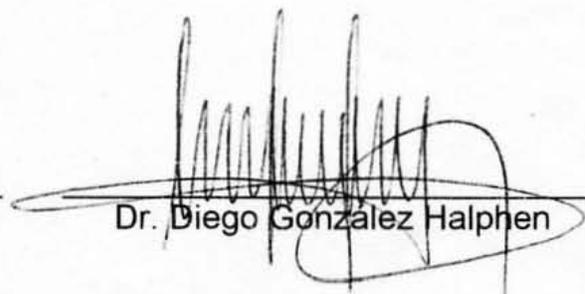


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

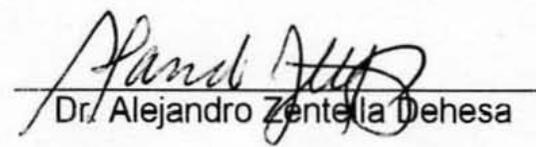
DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

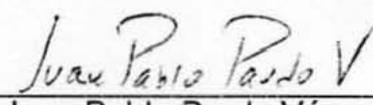
Por este conducto le informamos que la tesis titulada "**Heterogeneidad del complejo IV mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.***" que presenta la alumna **DINORAH LEYVA ILLADES** con número de cuenta **09951119-1** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.


Dr. Salvador Uribe Carvajal


Dr. Diego González Halphen


Dr. Alfonso González Noriega


Dr. Alejandro Zentella Dehesa


Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Para mis papás

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al **Dr. Diego González Halphen** por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo el apoyo que me ha brindado, por su paciencia y su tiempo.

A los miembros de **mi jurado** por su apoyo y por la revisión del presente trabajo.

A la **Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo** por su asistencia técnica.

Sobre todo quiero agradecer a mis papás, **Marco Antonio y Berenice**, por el gran ejemplo que han sido para mí, por darme su apoyo y cariño **incondicional**. No estaría donde estoy sin ustedes.

A mi hermano, **Juan Francisco**, por siempre decirme que me quiere mucho, por todo lo que hemos compartido. Estoy muy orgullosa de ser tu hermana.

A **mi familia** por los buenos momentos que hemos pasado juntos, el cariño y consejos que me han dado.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
Introducción	1
1. La mitocondria	1
1.1 Origen	1
1.2 Estructura	2
1.3 Biogénesis	3
1.4 Genética mitocondrial	4
2. Metabolismo aerobio	6
2.1 Cadena respiratoria	6
2.1.1 Complejo I	7
2.1.2 Complejo II	7
2.1.3 Complejo III	8
2.1.4 Complejo IV	8
2.2 Fosforilación oxidativa	8
2.3 Termogénesis	9
3. La citocromo c oxidasa (Complejo IV)	11
4. <i>Polytomella</i>	13
4.1 Clasificación	13
4.2 Características celulares	13
4.3 Ciclo de vida	14
4.4 Organización genómica	14
4.5 <i>Polytomella sp.</i> como modelo para el estudio de las algas Chlamydomonadaceas	16 17
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Materiales y Métodos	21
1. Cultivo de <i>Polytomella sp.</i>	21
2. Aislamiento de mitocondrias de <i>Polytomella sp.</i>	22

3. Obtención de membranas mitocondriales	23
4. Solubilización de proteínas membranales	23
5. Precipitación con sulfato de amonio	24
6. Cromatografía de intercambio iónico	25
7. Cromatografía en gel	27
8. Cuantificación de proteína	28
9. Actividad de la citocromo c oxidasa	29
10. Actividad de ascorbato TMPD oxidasa	30
11. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	30
12. Inmunorréplicas tipo Western	32
Resultados	34
Discusión y Conclusiones	50
Bibliografía	55

ABREVIATURAS

a.a.	amino ácido
Ac-CoA	acetil coenzima A
ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	seroalbúmina de bovino
COX	citocromo c oxidasa
FAD	flavín dinucleótido (oxidado)
FADH ₂	flavín dinucleótido (reducido)
GDP	difosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
kb	kilobases
LM	lauril maltósido
MOPS	ácido 3-(n-morfolino) propanosulfónico
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato (reducido)
TMPD	tetrametil-p-fenildiamina

RESUMEN

Polytomella sp. es miembro de la familia de las algas Chlamydomonadaceas. En el proceso evolutivo este organismo perdió su aparato fotosintético y la pared celular, facilitando el aislamiento de mitocondrias, por lo cual es un buen modelo para estudiar a estos organelos en esta familia de algas. Estudios previos mostraron que varios genes migraron del genoma mitocondrial al nuclear. Además de migrar al núcleo, el gen que codifica para la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa (COX) se fragmentó en dos genes, llamados *cox2a* y *cox2b*. Estos genes codifican 2 proteínas que son exportadas a la mitocondria donde interactúan para formar una COXII heterodimérica funcional. Entre los otros genes que migraron al núcleo se encuentra el que codifica para la subunidad III de la COX. El objetivo del presente trabajo de tesis fue diseñar un protocolo para la purificación de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp.* para que en un futuro se intente cristalizar esta proteína y permita entender cómo interactúan las subunidades COXIIA y COXIIB. Dicha purificación fue lograda haciendo diversas modificaciones a un protocolo ya existente. Primero, la purificación se empezó con membranas mitocondriales en lugar de mitocondrias completas, se modificó la cantidad de detergente utilizada para solubilizar las mitocondrias y además se sometió a dos columnas de intercambio iónico y una de filtración en gel. Todas estas modificaciones lograron que la preparación fuese más limpia, eliminando la mayoría de los contaminantes de alto peso molecular. A lo largo del proceso de purificación se observó que la citocromo *c* oxidasa se comporta como un complejo heterogéneo. Por medio de inmunorréplicas tipo Western se confirmó la presencia de las subunidades COXIIA, y COXIIB en la preparación.

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria

La mitocondria es el organelo donde se lleva a cabo la mayor producción de ATP en las células eucariotes, en las cuales por medio de reacciones acopladas de oxidación y reducción, se libera la energía contenida en las moléculas combustible y se producen otras formas de energía química. En el año 1890, Altman desarrolló métodos de tinción que le permitieron observar la localización citoplasmática de este organelo; el nombre de mitocondria fue asignado a este organelo por Benda en 1898 (17).

1. 1 Origen

La teoría endosimbiótica, postulada por L. Margulis, hasta el momento la teoría para la formación de la mitocondria más aceptada, propone que las mitocondrias son el resultado de la endocitosis de una bacteria aeróbica por un protoeucariote (29). El análisis de genes mitocondriales, de su organización genómica y su distribución indican que los genomas mitocondriales son derivados de una α -proteobacteria, debida a una sola antigua invasión de un hospedero aún desconocido que ocurrió hace 2,500 millones de años (Figura 1). Un paso crítico en la transición de endosimbionte autónomo a un organelo fue la reducción del genoma. Los genomas de la mitocondrias contemporáneas oscilan de 3 a 67 genes codificantes de proteínas, muchos de los genes endosimbiontes se han perdido y la mayoría de los que se retuvieron fueron transferidos al núcleo. La mitocondria ha sufrido grandes cambios que la transformaron en un organelo altamente especializado que tiene un papel clave en el metabolismo de la mayoría de los eucariontes(12).

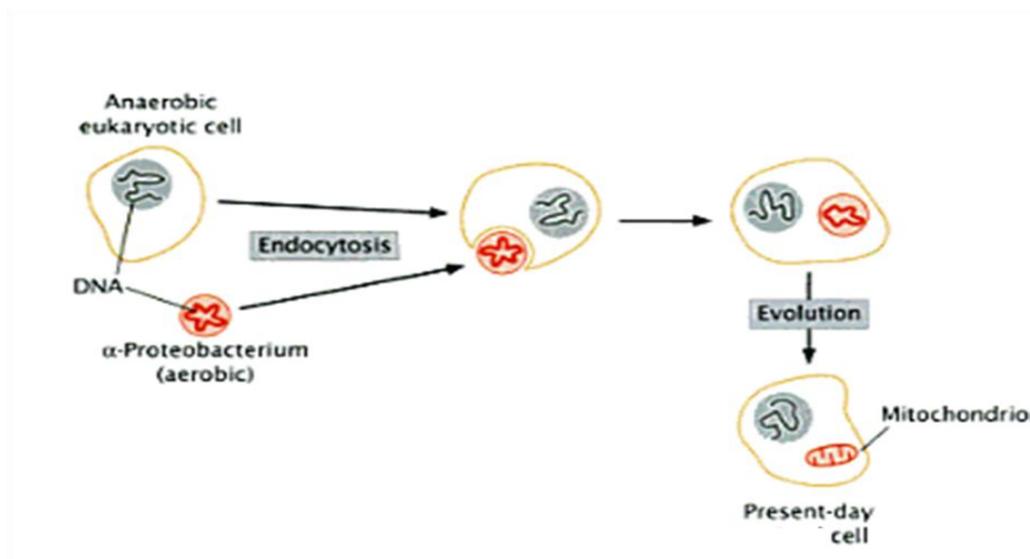


Figura 1. Esquema de la teoría endosimbiótica. Hace aproximadamente 2,500 millones de años ocurrió la endocitosis de una α -proteobacteria por un protoeucariote, ambos tenían su propio ADN. El endosimbionte aeróbico evolucionó hasta convertirse en la mitocondria, organelo de las células eucariotes actuales (35).

1.2 Estructura

Los primeros estudios de las mitocondrias en el microscopio electrónico fueron hechos en el año 1952 por Palade y Sjöstrand. La mitocondria consiste de dos sacos membranosos, uno dentro del otro, formándose así dos compartimentos. Uno externo que corresponde a un espacio limitado por las dos membranas (externa e interna) y otro espacio interno limitado por la membrana interna al cual se le denomina matriz mitocondrial. La membrana externa es lisa mientras que la membrana interna presenta varias invaginaciones que forman las crestas mitocondriales. Entre las dos membranas existen puntos de contacto que se desplazan a lo largo y ancho de ellas (Figura 2). El tamaño, forma y número de mitocondrias varía dependiendo del tipo de tejido.

La característica más importante de la membrana externa es que presenta una permeabilidad relativamente alta, su selectividad está dada por la presencia de porinas, de tal manera que la membrana externa permite el paso libre de moléculas de <10,000

Da. A su vez, la membrana interna es altamente selectiva para permear a la mayoría de las moléculas. Dicha selectividad se debe a la presencia de translocadores y acarreadores específicos. También existen diferencias en cuanto a la composición química de las dos membranas, la externa es rica en colesterol mientras que la interna está altamente enriquecida con el fosfolípido cardiolipina (9).

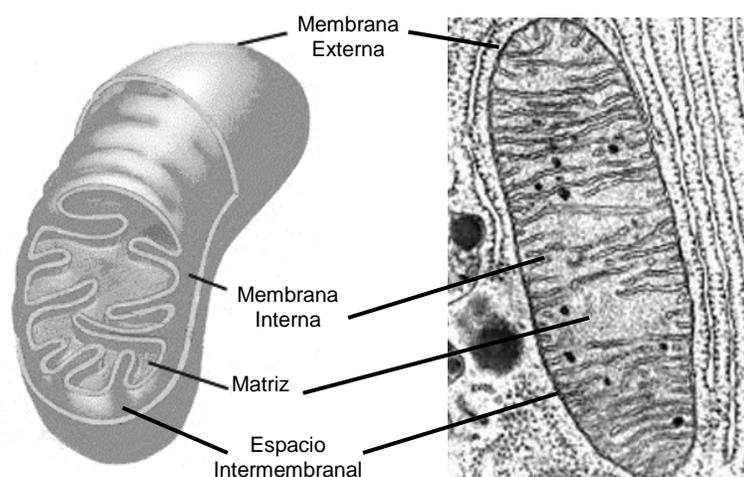


Figura 2. Representación esquemática (izq.) e imagen de microscopía electrónica (der.) de una mitocondria, donde se señalan la membrana externa, interna (las invaginaciones son denominadas crestas mitocondriales), el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (1, 32).

1.3 Biogénesis

La división de las mitocondrias se realiza por fisión binaria. La biogénesis mitocondrial está activada por diversas señales durante el estrés celular o en respuesta a estímulos del medio ambiente. Los reguladores principales de la biogénesis parecen ser la familia de coactivadores transcripcionales PGC (PGC-1 α y PGC-1 β) y el coactivador relacionado a PGC (PRC). PGC-1 α parece ser el regulador principal y se sabe que éste es capaz de coactivar al factor de respiración nuclear 2 (NRF2) y juntos activan al factor de respiración 1 (NRF1). A continuación los NRFs, activan al factor de

transcripción mitocondrial que es directamente responsable de transcribir las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. Se ha estimado que las mitocondrias están compuestas de más de 1000 proteínas diferentes, de éstas, sólo el 1-2% son sintetizadas en la mitocondrias. El resto son sintetizadas en el citosol y después son exportadas a la mitocondria. Las preproteínas mitocondriales se introducen a la mitocondria por la translocasa de la membrana externa (TOM) y la translocasa de la membrana interna (TIM), sistemas que reconocen a los péptidos señal, que determinan el destino mitocondrial identificados por el grupo de Schatz. Además existen componentes que median la exportación y ensamblaje de las proteínas que son sintetizadas en la matriz mitocondrial (22, 39).

1.4 Genética mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, los genomas mitocondriales actuales son el resultado de la reducción del genoma del endosimbionte ancestral. Actualmente los genomas mitocondriales son muy diversos en cuanto a tamaño, organización y complejidad génica. Los genomas mitocondriales pueden ser circulares o lineales, con un tamaño que va desde 6 kb (*Plasmodium falciparum*) hasta 2000 kb (plantas cucurbitáceas) (Figura 3).

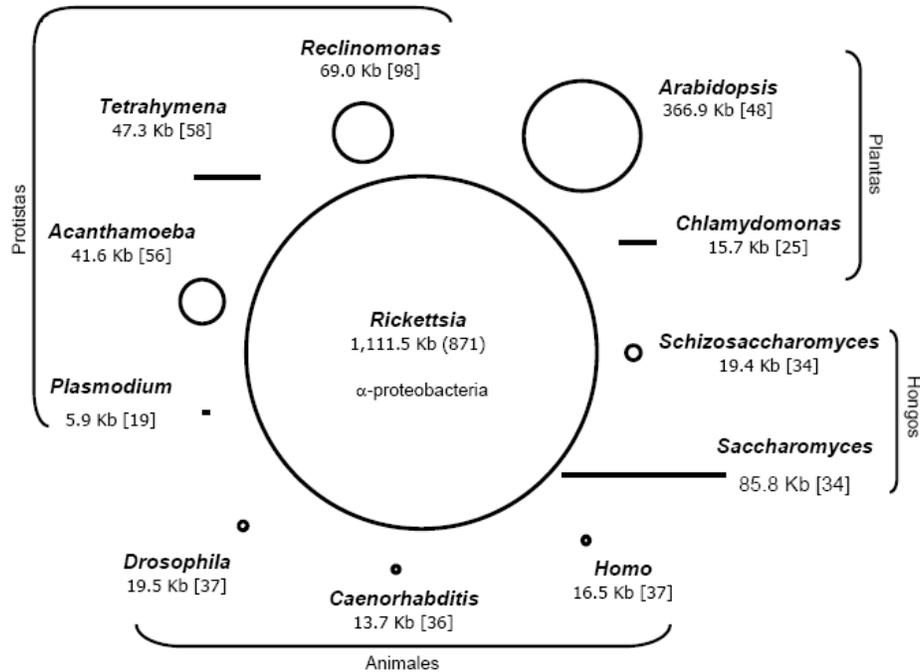


Figura 3. Tamaño relativo de diversos genomas mitocondriales, el número entre paréntesis representa el número de genes codificados(18).

La diferencia en tamaño se debe a la variabilidad de contenido de regiones de ADN no codificante. En general, todos los genomas mitocondriales contienen genes que codifican para ciertos productos como lo son ARNs ribosomales, ARNs de transferencia, ciertas proteínas involucradas en la síntesis proteica y un conjunto limitado de subunidades de los complejos membranales translocadores de protones de la fosforilación oxidativa. También es importante mencionar que el genoma mitocondrial no utiliza los mismos codones que el ARN codificado en el núcleo y el patrón de reconocimiento de codones es diferente. Por ejemplo, el codón UGA codifica para triptófano en lugar de ser señal de término (excepto en plantas y *Chlamydomonas*) y el codón AUA codifica para metionina en lugar de codificar para isoleucina (18-19).

2. Metabolismo aerobio

El metabolismo aerobio ocurre en tres etapas principales. En la primera, moléculas combustibles como la glucosa, los ácidos grasos y algunos aminoácidos son oxidados para dar lugar al grupo acetilo de la acetil-coenzima A (Ac-CoA). En la segunda etapa, los grupos acetilo son introducidos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos que los oxida enzimáticamente a CO_2 , la energía liberada es conservada en acarreadores de electrones reducidos (NADH y FADH_2). En la tercera y final etapa de la respiración estas coenzimas reducidas son oxidadas, liberando protones (H^+) y electrones. Los electrones son transferidos al O_2 a través de la cadena respiratoria. En el transcurso de la respiración, se libera una gran cantidad de energía que es acumulada en forma de fuerza protón-motriz (23).

2.1 Cadena respiratoria

Todos los pasos oxidativos en la degradación de carbohidratos, grasas y aminoácidos convergen en esta última etapa de la respiración celular. La respiración involucra la reducción del O_2 a H_2O con los electrones donados por el NADH y el succinato. En el transporte de electrones intervienen moléculas con propiedades óxido-reductoras asociadas a proteínas que en su conjunto constituyen los complejos respiratorios mitocondriales, que se encuentran embebidos en la membrana interna mitocondrial. Las moléculas asociadas a las proteínas en los complejos respiratorios que tienen la capacidad de transferir electrones pueden ser flavinas, centros Fe-S, grupos hemo y átomos de Cu. La transferencia de electrones está regida por el potencial redox. Los componentes móviles involucrados en la transferencia de electrones de la cadena respiratoria son el citocromo c soluble y la ubiquinona (23).

2.1.1 Complejo I

El complejo I (NADH deshidrogenasa) está compuesto por 45 cadenas polipeptídicas (11). Tiene una estructura tridimensional en forma de “L” y está constituida por una parte hidrofóbica membranal y una parte hidrofílica que se encuentra expuesta hacia la matriz mitocondrial. La parte periférica que se proyecta hacia la matriz mitocondrial, es el sitio de la oxidación del NADH. Los electrones del NADH son enviados a la ubiquinona por varias subunidades que contienen un mononucleótido de flavina (FMN) y varios centros de hierro-azufre (FeS). Mediante este complejo, por cada dos electrones se traslocan cuatro protones a través de la membrana interna (6) (Figura 4).

2.1.2 Complejo II

El complejo II (succinato deshidrogenasa) también es parte del ciclo de Krebs, siendo la única enzima de este ciclo que está asociada a la membrana interna mitocondrial. Este complejo enzimático transfiere los electrones desde el succinato proveniente del ciclo de Krebs hasta la ubiquinona. Está conformado por 5 grupos prostéticos de dos tipos y 4 subunidades. Las subunidades C y D son proteínas membranales y contienen un hemo tipo *b* que es un sitio de unión para la ubiquinona, el aceptor final de electrones de la reacción catalizada por este complejo. Las subunidades A y B se extienden hacia la matriz mitocondrial y contienen 3 centros hierro-azufre (2Fe-2S) unidos a FAD, el sitio de unión del succinato. Este complejo no bombea protones (21) (Figura 4).

2.1.3 Complejo III

El complejo III (complejo citocromo *bc*₁) está compuesto de 11 subunidades y cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo *c* soluble. Dicha reacción está acoplada a la traslocación de cuatro protones a través de la membrana interna, mediante el ciclo Q. El citocromo *b* del complejo III contiene dos grupos hemo que tienen distintos potenciales redox (*b*₅₆₀ y *b*₅₆₆). En cada ciclo, de los dos electrones pertenecientes al ubiquinol, un electrón es transportado por la proteína Rieske (FeS), mientras que el otro es transportado por los dos hemos *b* para formar ubisemiquinona (Q⁻) a partir de la ubiquinona que se encuentra del otro lado de la membrana interna. La repetición del ciclo Q produce otro ubiquinol, lo cual resulta en el transporte neto de cuatro protones a través de la membrana interna (8) (Figura 4).

2.1.4 Complejo IV

En el último paso de la cadena respiratoria, el Complejo IV (citocromo *c* oxidasa) acarrea los electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular, reduciéndolo hasta H₂O. El Complejo IV será discutido con mayor detalle en la siguiente sección (23) (Figura 4).

2.2 Fosforilación oxidativa

El gradiente de protones generados por los complejos I, III y IV es utilizado por la ATP sintasa (Complejo V). Mediante el flujo de protones hacia la matriz mitocondrial este complejo utiliza la energía del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. La ATP sintasa tiene una masa molecular de más de 500 kDa y está constituida por 16 subunidades. Tiene dos componentes: F₁ y F₀, la sección membranal (F₀) contiene un canal de protones y está conectada a la parte catalítica (F₁) que está

expuesta a la matriz. La F_0 está compuesta por al menos 9 subunidades, de las cuales las subunidades a , b y c tienen una estequiometría 1:1:12, respectivamente. La F_1 está compuesta por 5 subunidades (α , β , γ , δ , ϵ) con una estequiometría 3:3:1:1:1. La subunidad γ interactúa con las subunidades ϵ y c para formar el rotor mientras que el estabilizador está conformado por las subunidades α , β , δ , a y b . La subunidad β posee el sitio catalítico, y ya que hay 3 subunidades β en cada F_1 , existen tres sitios catalíticos en la F_1 . Los protones, al pasar por la F_0 hacen que gire el rotor, que resulta en tres estados conformacionales: un estado sin sustrato, un estado con ADP y Pi y finalmente un estado con ATP. La subunidad γ funciona como el eje de rotación. La ATP sintasa también puede funcionar como ATPasa, al hidrolizar ATP se obtiene la energía necesaria para translocar protones y generar un gradiente electroquímico. (Figura 4) (2, 23).

2.3 Termogénesis

En los organismos homeotermos, las mitocondrias no tienen como única función la conservación de energía, también se encargan de generar calor. Anteriormente se pensaba que el metabolismo energético estaba completamente acoplado a la producción de ATP, sin embargo, actualmente se sabe que una porción de la respiración mitocondrial no está acoplada a la síntesis de ATP. La oxidación de sustratos y el transporte de electrones en la cadena respiratoria producen calor, pero en el caso de la respiración desacoplada, esta generación de calor es independiente de la producción de trabajo. En el tejido adiposo hay una expresión elevada de la proteínas desacopladora UCP-1, cuya función parecer ser transportar protones del

espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial, provocando la pérdida del gradiente de protones y consecuentemente aumentando la respiración desacoplada y la generación de calor. A la fecha hay varios miembros de la familia de UCPs que incluyen a la UCP-2y UCP-3 (44).

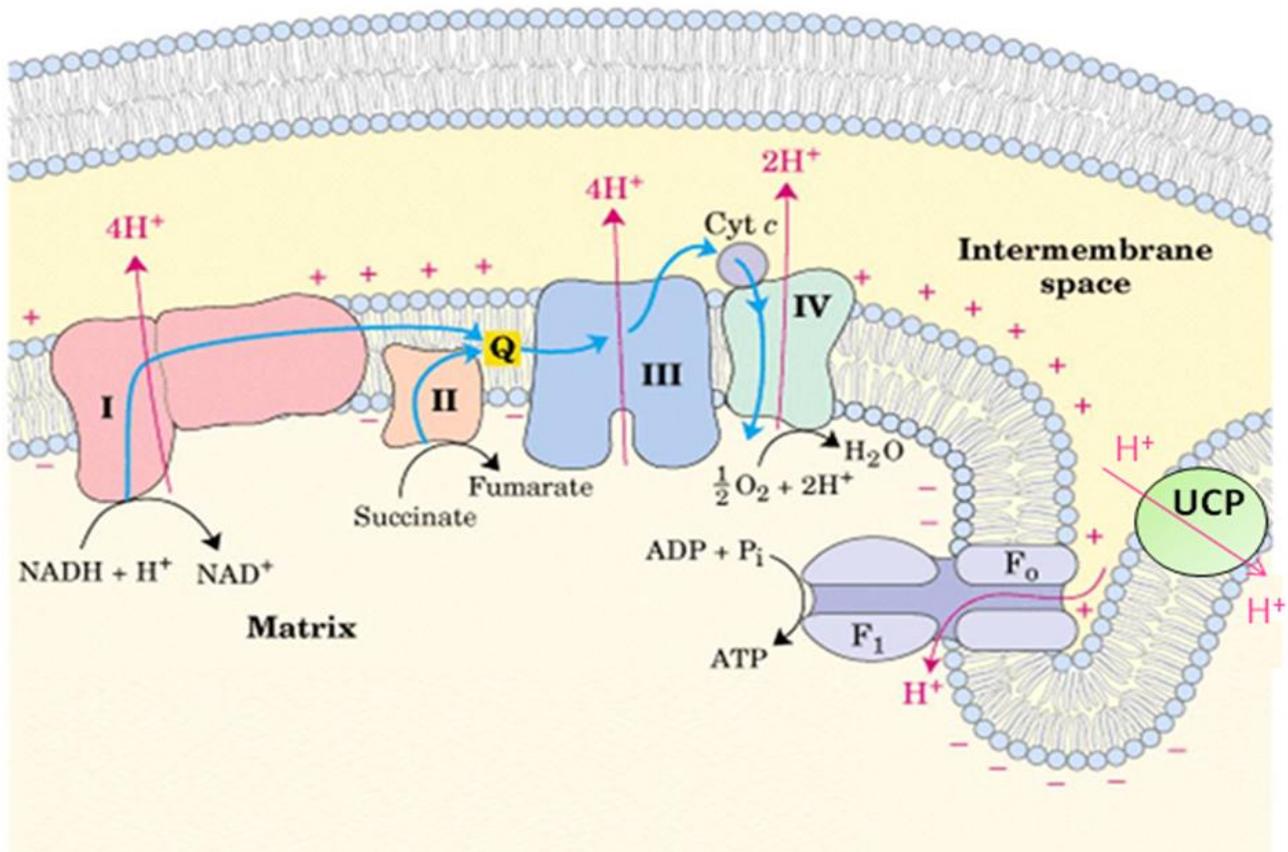
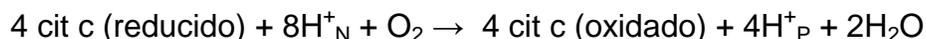


Figura 4. Esquema donde se muestran los complejos de la cadena respiratoria I-IV, la ATP sintasa y las reacciones que catalizan, ubiquinona, citocromo *c* y la proteína desacoplante (UCP). Todos estos complejos se encuentran en la membrana interna mitocondrial. Se observa que los complejos I, III y IV son bombas primarias de protones mientras que el complejo II solamente mueve electrones. El gradiente transmembranal de protones es usado por el complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i. La UCP (proteína desacoplante) parece ser un transportador de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, jugando un papel importante en la termogénesis (23, 44).

3. La citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La citocromo c oxidasa (COX) es la enzima terminal de la cadena respiratoria de la mitocondria. La COX cataliza la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular, reduciendo este último a agua, además de contribuir a la generación del gradiente electroquímico de protones:



La citocromo c oxidasa de bovino está constituida por 13 subunidades distintas (Figura 5); tres de ellas (subunidades I, II y III) están codificadas en el genoma mitocondrial, las 10 restantes (IV, Va, Vb, Via, Vib, Vic, VIIa, VIIb, VIIc y VIII) en el genoma nuclear. Además, la COX contiene 2 hemos tipo a (a y a_3) contenidos en la subunidad I y dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) en las subunidades II y I, respectivamente. La masa molecular del complejo es de 204,005 Da. La transferencia de electrones a través del Complejo IV es del citocromo c, al Cu_A , al hemo a, al centro hémico $a_3\text{-Cu}_B$ y finalmente al O_2 . Por cada 4 electrones que pasan por este complejo, la enzima consume 4 protones de la matriz mitocondrial, convirtiendo oxígeno molecular a agua. También usa la energía de esta reacción de óxido-reducción para bombear protones hacia el espacio intermembranal (19, 23).

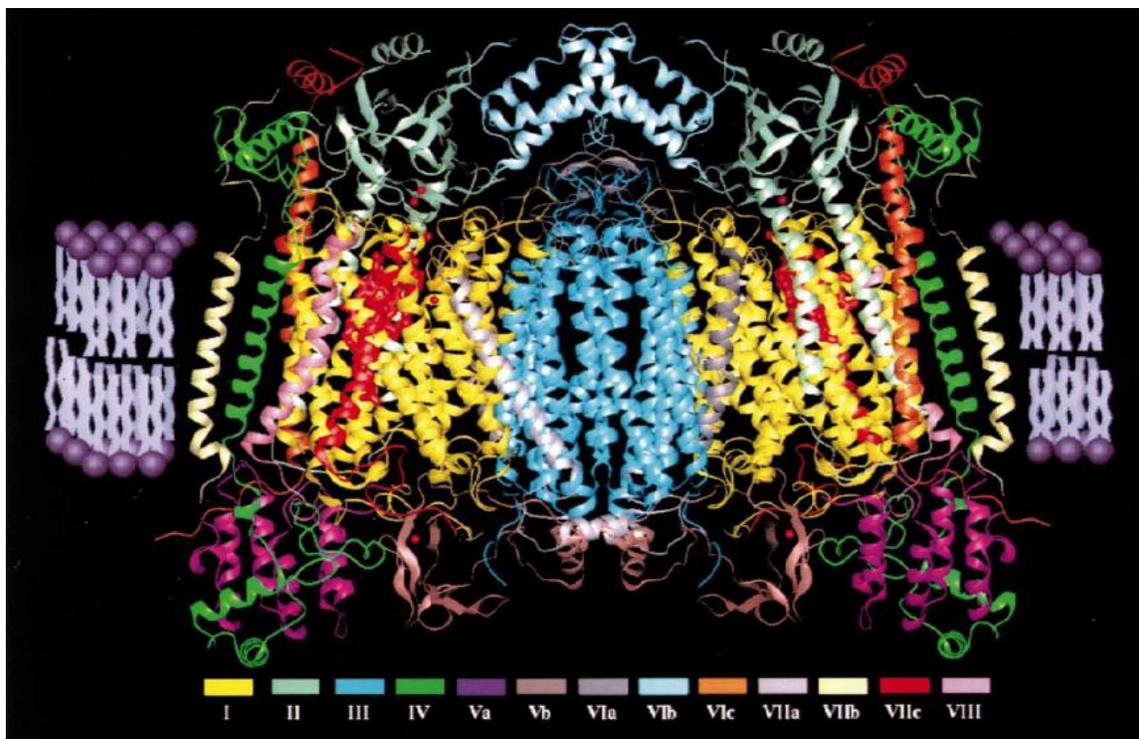


Figura 5. La citocromo *c* oxidasa de bovino dimérica dibujada como listones en la bicapa lipídica a ~ 40 Å de grosor. La parte superior corresponde al espacio intermembranal y la inferior a la matriz mitocondrial. El color de cada subunidad se muestra en la parte inferior. Se observa que la región transmembranal tienen abundantes α -hélices(41).

Cabe mencionar que en las algas Chlamydomonadaceas, familia a la cual pertenece *Polytomella sp.*, tanto la subunidad II como la subunidad III de la citocromo *c* oxidasa están codificadas por genes nucleares, a diferencia de la mayoría de los organismos. Además, la subunidad II es un heterodímero que está codificado por dos genes independientes, *cox2a* y *cox2b* que codifican para las subunidades COXIIA y COXIIB, respectivamente. La subunidad COXIIA corresponde al N-terminal, mientras que COXIIB corresponde al C-terminal de la COXII canónica, estas dos proteínas son ensambladas junto con otras subunidades de la citocromo *c* oxidasa en la membrana interna mitocondrial para formar un complejo maduro (Figura 6) (33-34).

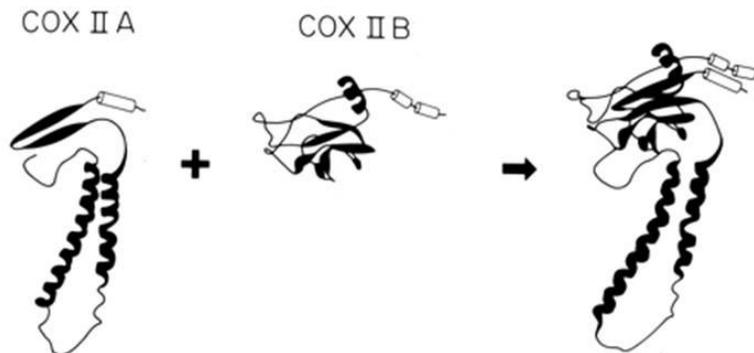


Figura 6. Modelo de la interacción de las subunidades COX IIA y COX IIB para formar la COX II heterodimérica de las algas Chlamydomonadaceae. Este modelo propone una interacción entre el dominio C-terminal único de COX IIA con el dominio N-terminal altamente cargado de COX IIB (34).

4. *Polytomella*

4.1 Clasificación

El género *Polytomella* fue descrito en 1910 por Aragao (3). En 1955 Pringsheim aisló diferentes especies (*P. caeca*, *P. caeca* var. *minor*, *P. papillata*, *P. parva*, *P. magna*, y *P. capuana*) con diferencias morfológicas no muy significativas (36). Actualmente, *Polytomella* está ubicada dentro del Phylum *Chlorophyta*, en la familia Chlamydomonadaceae, que también incluye a los géneros *Polytoma* y *Chlamydomonas*. Esta clasificación está basada en las similitudes tanto fisiológicas como morfológicas que comparte *Polytomella* con el alga fotosintética *Chlamydomonas* (Figura 7) (28).

Reino	Protoctista
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Chlamydomonadales
Familia	Chlamydomonadaceae
Género	<i>Polytomella</i>

Figura 7. Ubicación taxonómica del género *Polytomella* (28).

4.2 Características celulares

Las algas del género *Polytomella* son unicelulares, incoloras, carecen de pared celular y cloroplastos y cuentan con cuatro flagelos apicales. Tienen forma ovoide o esférica y miden de 7.5 a 18 μm de largo y 4.5 a 9.0 μm de ancho, de acuerdo a las condiciones de cultivo (16). Las células de *Polytomella* contienen gránulos de almidón como reserva de energía, los cuales se han detectado con tinción con yodo (40). A continuación se muestra una fotografía de *Polytomella* vista al microscopio y un esquema de su morfología (Figura 8).

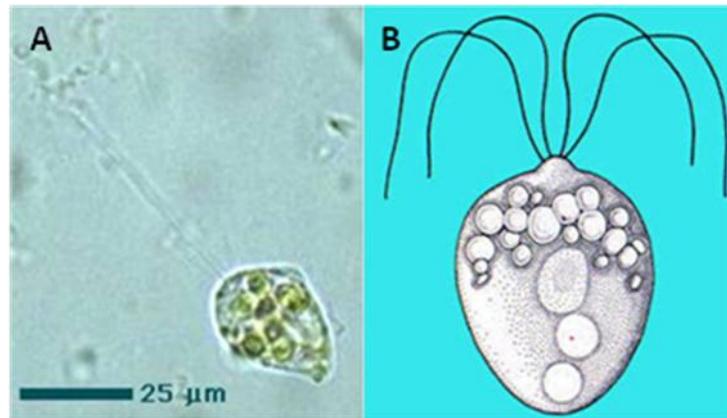


Figura 8. *Polytomella* vista al microscopio (a) y esquema de su morfología (b). Los círculos verdes (a) y los blancos (b) son gránulos de almidón, los pelitos en el polo superior de ambos paneles son flagelos. La barra negra en el panel (a) es la escala en μm . (<http://www.eol.org>, <http://protist.i.hosei.ac.jp/>)

4.3 Ciclo de vida

La reproducción de *Polytomella* ocurre por fisión binaria, en una fase asexual y una fase sexual isogamética. La división asexual ocurre desde el momento de la inoculación en un medio de cultivo. Las células se dividen en dos en un plano que comienza en la parte posterior y termina en la anterior (Figura 9. Incisos 1- 5), la separación en dos células toma de 5 a 6 minutos. Las células comparten los 4 flagelos

de la célula madre hasta que ocurre la división citoplasmática completa. Cuando las células finalmente se separan, cada una tiene un juego completo de flagelos. El enquistamiento ocurre a todo lo largo del desarrollo del cultivo, se ha observado que a la mitad del crecimiento logarítmico el 7% de las células están enquistadas, este número incrementa a 80% en la fase estacionaria temprana. Las células vegetativas se vuelven no móviles, se redondean, disminuyen de tamaño y son recubiertas por una capa cística que consiste de membrana externa semirrígida y una membrana interna flexible (Figura 9. 6-9). El desenquistamiento (Figura 9. Incisos 10-14) comienza con el hinchamiento del quiste, lo cual toma de 2 a 3 horas. Posteriormente el protoplasto es expulsado del quiste debido a la presión. La reproducción sexual (Figura 9. Incisos 15-25) puede ocurrir en cualquier momento del crecimiento exponencial, pero es más frecuente cuando la población es más densa. Los isogametos monoicos son ligeramente más pequeños que las células vegetativas. Cuando dos gametos hacen contacto, sus flagelos se enredan vigorosamente. La fusión celular tiene lugar de la parte anterior a la posterior, es decir, en la dirección opuesta de la división, y resulta en un cigoto que tiene 1 núcleo y 4 flagelos. El cigoto formado es tan móvil como las células vegetativas. La etapa cigótica (Figura 9. Inciso 21) dura aproximadamente 3-3.5 horas. Durante este tiempo el cigoto aumenta su diámetro y se vuelve estacionario. Al comienzo de la división del cigoto, 2 planos de corte se forman en la parte posterior. La división del citoplasma en 4 células toma alrededor de 15-20 minutos, una de las 4 células hijas retiene los flagelos y las 3 restantes los desarrollan durante la separación (24).

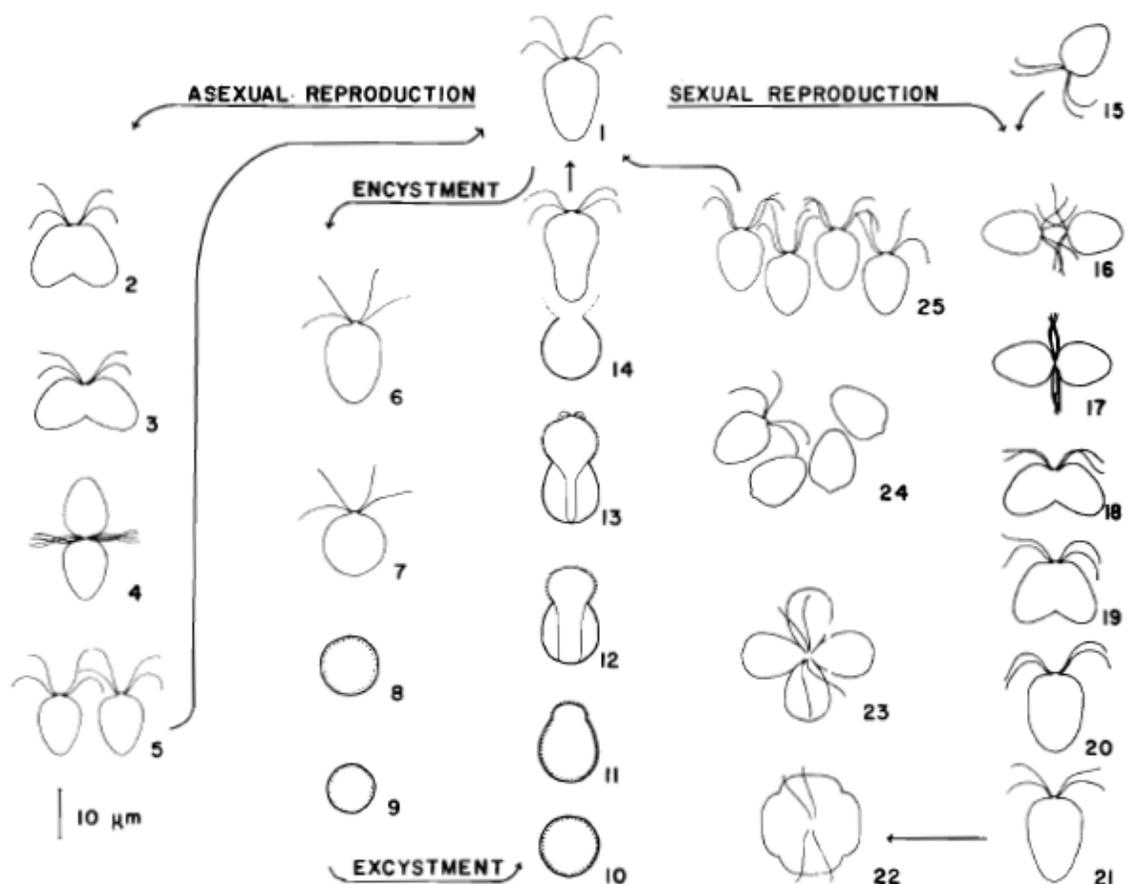


Figura 9. Ciclo de vida de *Polytomella caeca*. Esquema donde se muestran las fases correspondientes a la reproducción asexual (1-5), el enquistamiento (6-9), el desenquistamiento (10-14), la reproducción sexual (15-25) y la etapa cigótica (21) de *Polytomella caeca*. Para mayores detalles acerca de cada fase, referirse al texto (24).

4.4 Organización genómica de la mitocondria.

El genoma mitocondrial de *Polytomella parva*, un pariente cercano de *Polytomella sp.* ha sido secuenciado (9). El genoma consiste de dos moléculas lineales de 13.5 y 3.5 kb. La molécula de 13.5 kb contiene las secuencias de los genes *cox1*, *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5*, mientras que la molécula de 3.5 kb solo contiene al gen *nad6*. Las regiones codificantes del ADN mitocondrial de 13.5 kb están organizadas de manera compacta, sin intrones y arregladas en dos conjuntos de tamaños desiguales,

que tienen orientación transcripcional opuesta (Figura 10). Este es el primer caso descrito donde existen ADNs mitocondriales subgenómicos en un alga clorofícea. La ausencia del gen *nad6* en la molécula de 13.5 kb, sugiere que el gen *nad6* en la molécula de 3.5 kb es funcional (15).

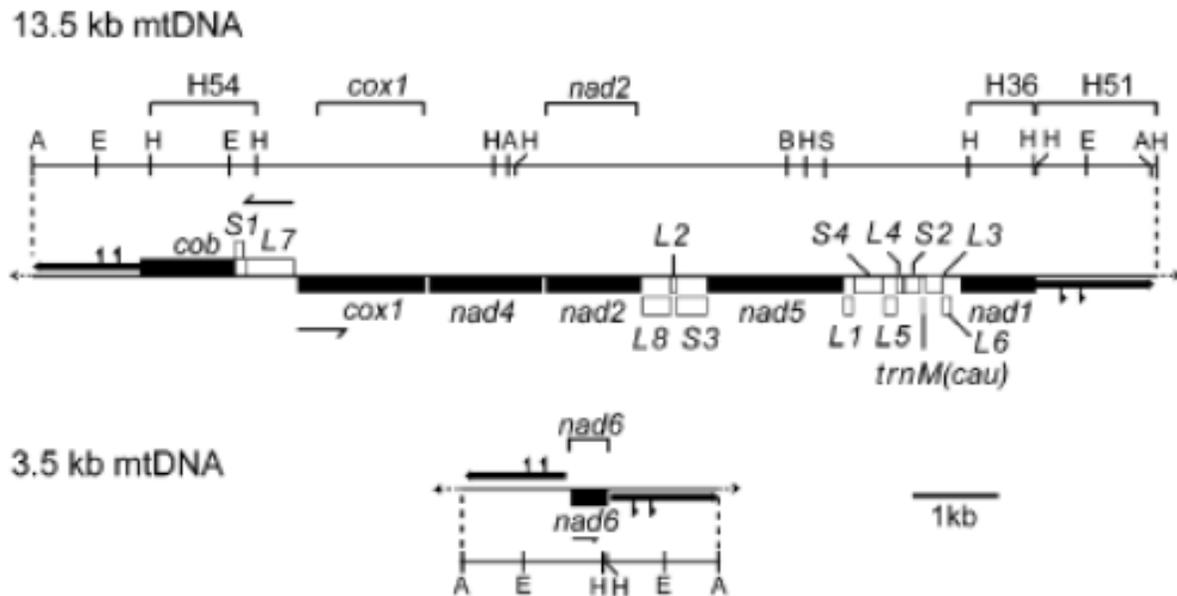


Figura 10. Representación esquemática del genoma mitocondrial de *Polytomella parva*. Se observa que está compuesto por dos moléculas lineales de ADN de 13.5 y 3.5 kb. La molécula de 13.5 kb contiene los genes *cob*, *cox1*, *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5*, mientras que el fragmento de 3.5 kb contiene el gen *nad6*. Las medias flechas indican la dirección de la transcripción génica (27).

4.4 *Polytomella sp.* como modelo para el estudio de las mitocondrias de las algas Chlamydomonadaceas.

Polytomella sp. pertenece a la familia de las algas Chlamydomonadaceas, a pesar de no ser un alga fotosintética. Como se ha mencionado anteriormente, el género *Polytomella* perdió su aparato fotosintético durante un proceso evolutivo secundario. Dicha cualidad es de gran utilidad en el laboratorio, ya que permite el aislamiento de

mitocondrias sin contaminantes tilacoidales como en el caso de *C. reinhardtii*. Además, al carecer de pared celular, los métodos de ruptura celular pueden ser más suaves, resultando así en mitocondrias aisladas con mínimo daño a la membrana (43).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos protocolos de purificación de la citocromo *c* oxidasa han sido descritos para múltiples organismos. En el caso de la COX de bovino, la cual ha sido cristalizada, uno de los métodos descritos para su purificación a partir de mitocondrias de corazón de bovino incluye el uso del detergente Triton X-100 en presencia de cloruro de sodio y una columna de hidroxiapatita (7). El método utilizado para la purificación de la COX de hígado de rata, incluye el uso de los detergentes Triton X-114 y X-100, cromatografía de intercambio iónico, precipitaciones con sulfato de amonio en presencia de colato de sodio y cromatografía de exclusión molecular (31). Estos son algunos ejemplos de los métodos utilizados para obtener preparaciones de la citocromo *c* oxidasa.

El protocolo de purificación de la COX de *Polytomella sp.* propuesto por Pérez-Martínez y col incluye los siguientes pasos: la solubilización de mitocondrias con el detergente lauril maltósido, posteriormente la precipitación con sulfato de amonio al 40% en presencia de colato de sodio 1.6% y finalmente cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Biogel A) con la aplicación de un gradiente lineal de 0 a 100 mM de NaCl y la elución de la fracción rica en COX con NaCl 200 mM. La citocromo *c* oxidasa obtenida con este protocolo está compuesta por 7 polipéptidos (54.6, 29.6, 18.6, 14.5, 13.4, 10.8 y 9.6 kDa). También se encontraron dos polipéptidos (80 y 41.8 kDa) en la preparación que fueron considerados contaminantes (34). Por lo tanto, el método actual de purificación de la COX de *Polytomella sp.* no permite obtener el complejo en forma pura.

HIPÓTESIS

Si se llevan a cabo diversas modificaciones al protocolo de purificación de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp*, usado actualmente, incluyendo el método de solubilización de mitocondrias y las cromatografías utilizadas, entonces se optimizará el método hasta obtener una preparación más pura.

OBJETIVOS

General

- Optimizar el método actual de purificación de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp*.

Específicos

- Modificar las condiciones de elución de la columna de intercambio iónico
- Modificar las condiciones de solubilización de las mitocondrias
- Explorar el uso de cromatografías alternativas

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo de *Polytomella sp.*

La cepa del alga incolora *Polytomella sp.* (198.80, E.G. Pringsheim) que se utiliza en el laboratorio proviene de la colección de algas de la Universidad de Göttingen, Alemania (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen). El alga se cultivó a temperatura ambiente (25 °C a 28 °C) en matraces de 2.5 litros de base ancha con 2 litros de medio REP(5) para favorecer el intercambio de gases. Se cultivaron sin agitación para evitar la ruptura de las células. El inóculo que se utilizó fue 100 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento para 2 litros de medio. A continuación se detallan los componentes del medio REP y la composición de las soluciones madre que lo conforman.

Medio REP (pH 3.7 con HCl) (5)

Reactivo	[]	2 l
Ac. tartárico	20 mM	9.2 g
Beijerinck's 20x		100 ml
Elementos traza		2 ml
Amortiguador de fosfatos		2 ml
*Etanol filtrado	40 mM	3.68 g
*Sol. de vitaminas (B ₁ y B ₁₂)		200 µl

**Se agregan después de esterilizar el medio.*

Amortiguador de Fosfatos 1M pH 7

K₂HPO₄ 1 M, KH₂PO₄ 1 M. Se utilizan aproximadamente 170 ml de KH₂PO₄ y 250 ml de K₂HPO₄ para ajustar a pH 7.0.

Solución de Beijerinck's 20x

Reactivo	1 l
NH ₄ Cl	8 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ anhidro	1.3 g

Solución de Vitaminas

Reactivo	100 ml
Tiamina (B ₁)	20 mg
Cianocobalamina (B ₁₂)	1 mg

Una vez preparada la solución se filtra a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m y se hacen alícuotas. Se guarda a -20 °C.

Elementos Traza

Reactivo	[]	500 ml
CuSO ₄	0.16 mM	0.25 g
H ₃ BO ₃	0.8 μ M	0.02 g
KI	0.6 μ M	0.05 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.74 μ M	0.1 g
MnSO ₄	2.65 mM	0.2 g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.83 μ M	0.1g
ZnSO ₄	1.39 μ M	0.2g

Se prepara todo por separado. Se junta y se afora a 500 ml. Esterilizar y guardar en alícuotas de 50 ml en tubos Falcon estériles a 4 °C

2. Aislamiento de mitocondrias de *Polytomella sp.*

Las células se cosecharon 48 h después de su inoculación, cuando el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, por medio de una centrifugación a 5,000 r.p.m en un rotor Sorvall GS3 por 10 min. Una vez cosechadas las células, se resuspendieron en amortiguador SME (sacarosa 250 mM, MOPS 20 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, pH 7.2) y se centrifugaron a 5,000 r.p.m en el mismo rotor por 10 minutos.

El botón de células fue resuspendido en 5 ml de SME. Las células resuspendidas se pusieron en un homogenizador de vidrio y se rompieron con un vástago de teflón, pasándolo 15 veces manualmente.

El homogenado obtenido se diluyó con amortiguador SME y se centrifugó a 2,000 r.p.m. en un rotor Sorvall SS34 durante 10 minutos. El sobrenadante se diluyó con 5 ml de amortiguador SME y posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m en el mismo rotor por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y las mitocondrias se obtuvieron en el botón (5).

3. Obtención de membranas mitocondriales

Para aislar membranas mitocondriales se empleó sonicación. Las mitocondrias se diluyeron a 20 mg/ml de proteína con amortiguador SME. Se sometieron a 4 pulsos de 10 seg c/u. Posteriormente se centrifugaron a 90,000 x g durante 1 hora (30,000 r.p.m. en un rotor Beckman 60 Ti). La pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador TM (tris, magnesio) con un homogenizador de vidrio con vástago de teflón.

4. Solubilización de proteínas membranales

Se midió el volumen de las membranas mitocondriales o mitocondrias, según fuese el caso y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry (26). Se estimó el volumen final de la mezcla y se ajustó a 10 mg de proteína/ml, con base en este cálculo se determinó la cantidad de LM 10%-TM que se debía agregar para que la concentración final fuera de 3 mg de LM por cada mg de proteína mitocondrial. También se calculó el volumen a agregar de NaCl 5M para que la concentración final fuera 100 mM. Restando del volumen final el volumen de LM10%-TM, el del NaCl 5 M y el de las mitocondrias (o membranas mitocondriales en su caso) se obtuvo el volumen de amortiguador TM que se tenía que agregar para ajustar el volumen final.

Las mitocondrias (o membranas mitocondriales en su caso) se mezclaron con el amortiguador TM y se pusieron a agitar suavemente en hielo. Se les agregó el NaCl 5M gota a gota. Posteriormente se les adicionó el LM 10%-TM también gota a gota. Se dejaron incubando durante 30 min en hielo con agitación suave. Una vez concluido el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 90,000 x g durante 20 min (30,000 r.p.m. en el rotor Beckman 60Ti) con el fin de separar el material no solubilizado.

El sobrenadante obtenido se dializó contra 20 volúmenes de amortiguador TM durante 2 h a 4°C. La membrana de diálisis que se utilizó tenía un MWCO (molecular weight cut out) de 12-14,000. A continuación se muestran los componentes del amortiguador TM:

Amortiguador TM (pH 8.0)

Reactivo	[]	2 l	2.5 l	3 l
Tris 2 M pH 8	50 mM	50 ml	62.5 ml	75 ml
MgSO ₄ 1 M	1 mM	2 ml	2.5 ml	3 ml
PMSF 1 M	1 mM	2 ml	2.5 ml	3 ml
TLCK 20 mg/ml	50 µg/ml	5 ml	6.25 ml	7.5

5. Precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante dializado fue precipitado con sulfato de amonio (NH₂SO₄) al 40% de saturación en presencia de colato de sodio al 1.6%, el cual se agregó gota a gota a partir de una solución madre al 20%. Luego se agregó el sulfato de amonio gota a gota de una solución saturada. La mezcla se incubó 15 min a 4 °C con agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 30,000 x g durante 20 min. (17,000 r.p.m. en el rotor Beckman 60Ti). El botón verde es rico en citocromo c oxidasa y fue resuspendido en amortiguador TM-LM-100mM NaCl en el volumen original de la muestra con ayuda de un homogenizador y vástago de teflón.

El material resuspendido se centrifugó nuevamente a 30,000 x g durante 20 min. (17,000 r.p.m. en el rotor Beckman 60Ti) para deshacerse del material que no se resuspendió completamente. Finalmente se dializó contra 20 volúmenes de amortiguador TM durante 2 horas o toda la noche a 4 °C. A continuación se muestran los componentes del amortiguador TM-LM-100 mM NaCl (34).

Amortiguador TM-LM-100mM NaCl (pH 8.0)

Reactivo	[]	50 ml	100 ml
Tris 2 M pH 8	50 mM	1.25 ml	2.5 ml
MgSO ₄ 1 M	1 mM	50 µl	100 µl
Lauril maltosido 10%	1.2 %	6 ml	12 ml
NaCl 5 M	100 mM	1 ml	2 ml
PMSF 1 M	1 mM	50 µl	100 µl
TLCK 20 mg/ml	50 µg/ml	125 µl	250 µl

6. Cromatografía de intercambio iónico

A partir de este punto todo el procedimiento se realizó en el cuarto frío. La preparación obtenida después de precipitar con (NH₄)₂SO₄ y dializar se cargó en una columna de intercambio iónico de DEAE-Sefarosa previamente equilibrada con amortiguador TM-LM y con una capa de Sephadex G-100 en la parte superior para proteger de la entrada de impurezas. Esto se hizo primero conectando la columna al colector de fracciones (el colector se ajustó a 100 gotas por tubo) y una vez conectada se prendió el colector y se abrió la llave. Se abrió la columna de la parte superior y se eliminó el exceso de amortiguador TM-LM sobre el Sephadex. La muestra se cargó con una pipeta Pasteur con un movimiento circular por las paredes.

La columna con muestra se lavó con 3 volúmenes de TM-LM y enseguida con 3 volúmenes de TM-LM-150 mM NaCl. La fracción rica en citocromo c oxidasa se obtuvo

al lavar con el amortiguador TM-LM-200 mM NaCl. Se hicieron pasar 2-3 volúmenes de TM-LM-200 mM NaCl. Al final se midió la absorbencia de todas las fracciones a 280 nm (proteínas) y 415 nm (citocromos). Se construyó un perfil de elución con las absorbencias correspondientes de cada fracción. Las fracciones correspondientes al pico rico en citocromo c oxidasa se reunieron y se dializaron contra 20 volúmenes de amortiguador TM durante 2 h o toda la noche a 4 °C.

Las fracciones del pico enriquecido en citocromo c oxidasa obtenidas de la columna de DEAE-Sefarosa fueron cargadas como se describió anteriormente en una columna de intercambio iónico Toyopearl QAE 550 C. En este caso no fue necesario lavar con TM-LM. El fraccionador también se ajustó a 100 gotas por tubo.

Las proteínas se eluyeron con 5 volúmenes de un gradiente de 0 a 400 mM de NaCl. Esto se hizo con la ayuda de un formador de gradientes en cuyo recipiente interno se pusieron 2.5 volúmenes de amortiguador TM-LM y en el externo 2.5 volúmenes de TM-LM 400 mM NaCl. Finalmente, se lavó con 2 volúmenes de TM-LM 400 mM NaCl. Al igual que en la columna anterior se realizó el perfil leyendo las fracciones a 280 y 415 nm.

Además del perfil espectroscópico se realizó un perfil en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Analizando los geles y determinando en que pico la relación 415/280 nm era mayor se escogieron las fracciones que iban a ser sometidas a filtración en gel (34). A continuación se muestran los componentes del amortiguador TM-LM-150 y 200 mM NaCl:

Amortiguador TM-LM-150 mM NaCl (pH 8.0)

Reactivo	[]	250 ml	500 ml
Tris 2 M pH 8	50 mM	6.25 ml	12.5 ml

MgSO ₄ 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
Lauril maltosido 10%	0.1 mg/ml	25 mg	500 µl
NaCl 5 M	150 mM	7.5 ml	15 ml
PMSF 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
TLCK 20 mg/ml	50 µg/ml	625 µl	1.25 ml

Amortiguador TM-LM- 200 mM NaCl (pH 8.0)

Reactivo	[]	250 ml	500 ml
Tris 2 M pH 8	50 mM	6.25 ml	12.5 ml
MgSO ₄ 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
Lauril maltosido 10%	0.1 mg/ml	25 mg	500 µl
NaCl 5 M	200 mM	10 ml	20 ml
PMSF 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
TLCK 20 mg/ml	50 µg/ml	625 µl	1.25 ml

7. Cromatografía de filtración en gel

La tercer columna que se utilizó fue de filtración en gel con una resina Sephacryl S-300. Para poder cargar la muestra fue necesario concentrar las fracciones elegidas en un ultrafiltro de Amicón de 10 ml con una membrana YM100 a un volumen final de 1 ml omitiendo el paso previo de diálisis. A esta muestra se le agregaron unas gotas de glicerol para poder cargar la muestra a la columna, ya que en este tipo de cromatografía no es posible dejar que se seque la resina en ningún momento. Después de cargar la muestra se dejaron pasar varios volúmenes de amortiguador TM-LM leyendo las fracciones a 280 nm hasta que ya no se registró ninguna absorbencia. Se obtuvo el perfil espectroscópico (280 y 415 nm) y el perfil en gel. Analizando ambos perfiles se determinó que fracciones se iban a concentrar en un ultrafiltro de Amicon de 10 ml con una membrana YM100. Las fracciones se concentraron a 1.6 ml. Se midió la concentración de proteína de la preparación, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -

70 °C. A continuación se muestran los componentes del amortiguador TM-LM-200mM NaCl.

Amortiguador TM-LM-200 mM NaCl (pH 8.0)

Reactivo	[]	250 ml	500 ml
Tris 2M pH 8	50 mM	6.25 ml	12.5 ml
MgSO ₄ 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
Lauril maltósido 10%	0.1 mg/ml	25 mg	500 µl
NaCl 5 M	400 mM	20 ml	20 ml
PMSF 1 M	1 mM	250 µl	500 µl
TLCK 20 mg/ml	50 µg/ml	625 µl	1.25 ml

8. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry (26) con la modificación de Markwell y col (30). Este método consiste en una reacción colorimétrica que corresponde a la unión del cobre en solución alcalina con las uniones peptídicas y los residuos de tirosina, una de las soluciones contiene SDS lo que facilita la determinación de la concentración de proteínas membranales. A continuación se muestra la composición de las soluciones utilizadas para la determinación de proteína.

Solución A

Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4%, tartrato de Na 0.16%, SDS 1%

Solución B

CuSO₄ 5 H₂O 4%

Solución C

100 volúmenes de A + 1 volumen de B

Solución D

1 volumen de reactivo de Folin + 1 volumen de H₂O

La curva patrón se hizo con BSA 1 mg/ml de 10 a 100 μ g y cada tubo se aforó a 1 ml con agua bidestilada. Las muestras a determinar se pusieron en cantidades de 10 μ l por duplicado y también se aforaron a 1 ml. A cada tubo se le pusieron 3 ml de solución C y se incubó durante 10 min. Al terminar se les agregaron 300 μ l de solución D y se incubaron 30 min más. Después se leyeron los tubos en el espectrofotómetro (Shimadzu) a 540 nm en modo de cuantificación por lo que el mismo espectro calculó la concentración de proteína.

9. Actividad de la citocromo c oxidasa

La actividad de la citocromo c oxidasa se midió espectroscópicamente siguiendo el método de Errede y col (13). La actividad se estimó en un volumen final de 3 ml de amortiguador TM-LM que contenía antimicina 20 μ M y citocromo c de caballo reducido 30 mM. La reacción comenzó al adicionar al medio 20-50 μ g de oxidasa, se registró la velocidad de disminución de citocromo c reducido midiendo el cambio de absorbancia a 550 nm en el tiempo. Si se desea observar sensibilidad de la citocromo c oxidasa a cianuro, se adiciona una solución fresca de KCN a una concentración final de 0.5 a 1 mM.

Para reducir el citocromo c se prepararon 500 μ l del mismo a una concentración de 10 mM en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH. 7.0, posteriormente se redujo con unos granitos de ascorbato hasta que obtuvo una coloración rosa. Después se pasó por una columna de 10 mm x 70 mm de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo amortiguador, con la finalidad de separar el citocromo c reducido del exceso de ascorbato. La concentración de citocromo c se determinó de acuerdo a González-

Halphen y col. (20), tomando como coeficiente de extinción molar para el citocromo *c* el valor de 18.5 mM⁻¹ cm⁻¹ a 550 nm.

10. Actividad de ascorbato-TMPD oxidasa.

La actividad en el consumo de oxígeno que corresponde sólo a la citocromo *c* oxidasa se detectó utilizando donadores artificiales de electrones, ascorbato y TMPD, que pueden reducir directamente al citocromo *c* soluble y éste a su vez ser oxidado por la citocromo *c* oxidasa que transfiere los electrones al oxígeno. Esto se hizo en presencia de antimicina 1 µM para evitar el posible flujo de electrones desde el complejo III hacia el citocromo *c* soluble (en el caso de la medición de actividad en fracciones membranales). El amortiguador utilizado es el KM (MOPS, KCl). A continuación se muestran los componentes de las soluciones requeridas para la determinación de la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa (37).

Ascorbato 1M pH 6.0

1.76 g en 10 ml de H₂O.

TMPD 100 mM (N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilen-diamina)

0.24 g en 10 ml de H₂O.

Amortiguador KM (pH 7.2)

Reactivo	[]	250 ml	500 ml
MOPS 1 M pH 7.4	20 mM	5 ml	10 ml
KCl	120 mM	2.2 ml	4.47 g

11. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes se realizó de acuerdo a lo descrito por Schägger y col (38). A continuación se muestran los

componentes de los geles de separación y de muestra, además de los amortiguadores utilizados en la electroforesis.

	Gel de Separación 14.1% Urea 8M	Gel de Separación 16% Sin urea	Gel para muestra 4% Sin urea
Acrilamida 49.5% / 30%	9.7 ml	16 ml	0.96 ml
Amortiguador electroforético	10 ml	10 ml	3 ml
Glicerol 100% / 79.5%	3.18 ml	4 ml	-----
Urea (8M)	14.4 g	-----	-----
H ₂ O	-----	-----	7.4 ml
PSA 10%	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Amortiguador electroforético

Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0.3%

Amortiguador catódico (superior)

Tris 0.1 M, tricina 0.1 M, SDS 0.1%

Amortiguador anódico (inferior)

Tris 0.2 M pH 8.9

Solución digestora

Tris 100 mM pH 7.0, SDS 10%, glicerol 30%, β-mercaptoetanol 4% y azul de bromofenol 0.3%

Cuando el gel separador está en proceso de polimerización se le pone encima 1 ml de sec-butanol para eliminar curvaturas debidas a la tensión superficial. Cuando el gel ya polimerizó se elimina el solvente y se pone el gel concentrador. Las muestras se incubaron durante un par de minutos con solución digestora y se cargaron al gel de poliacrilamida-SDS. El gel se corrió en una cámara de electroforesis vertical a 50 mV

durante 1 h y posteriormente a 100 mV durante toda la noche. Al término se fijó con una solución de metanol 50% y ácido acético 10% durante 30 min. Posteriormente, se tiñó con azul de Coomassie G-25 0.1% y ácido acético 10% y se destiñó con ácido acético 10%.

12. Inmunorrélicas tipo Western

Primero se llevó a cabo la electroforesis con 50 a 100 μ g de proteína en cada carril. El gel (sin fijar o teñir) se incubó en amortiguador de transferencia del ánodo durante 2 min, en este mismo amortiguador se remojaron 6 pedazos de papel filtro del tamaño del gel. En el amortiguador de transferencia del cátodo se remojó la membrana de nitrocelulosa y otros 6 pedazos de papel filtro. En la cámara de transferencia se acomodó todo de la siguiente manera (de abajo hacia arriba): papel filtro remojado en amortiguador (+), membrana de nitrocelulosa, gel y papel filtro remojado en amortiguador (-). La cámara de transferencia que se utilizó es la Hoefer TE 70.

Al terminar la transferencia electroforética, las membranas de nitrocelulosa se lavaron en TBS durante 5 min, dos veces. Se bloquearon con gelatina 3% en TBS durante toda la noche. Se incubaron con el anticuerpo primario (policlonales de conejo anti COXIIA y COXIIB, respectivamente) durante 3 h en presencia de gelatina 1%. Se lavaron 3 veces durante 5 min cada vez con TTBS. Se incubaron con el anticuerpo secundario (acoplado a fosfatasa alcalina) en una dilución 1:2500 durante 1 h también en presencia de gelatina 1.0%. Se lavaron 4 veces durante 5 min cada vez con TTBS. Para revelar se agregó a cada tira 20 ml de una solución de bicarbonato de sodio 100 mM y cloruro de magnesio 1 mM a pH 9.8 y se dejó agitar 1 min. Luego se le agregaron

200 μ l de BCIP y 200 μ l de NBT, se esperó a que se desarrollara la reacción colorimétrica. La reacción se interrumpió lavando con agua bidestilada (33). A continuación se muestran los componentes de las soluciones y amortiguadores requeridos para la realización de las inmunorrélicas tipo Western.

Amortiguador de transferencia del cátodo

Tris 150 mM, Tricina 50 mM, Metanol 20%

Amortiguador de transferencia del ánodo

Ac. ϵ -amino-n-capróico 300 mM, SDS 0.05%, el pH se ajusta a 8.5 con Tris sólido (1-2g).

TBS

Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M.

TTBS

Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.05%

BCIP (fosfato de 5-brom-4-cloro-3indolil)

30 mg en 4 ml de dimetil formamida.

NBT (azul de nitrotetrazolio)

60 mg en 2.8 ml de dimetil formamida y 1.2 ml de agua.

RESULTADOS

Debido a la baja abundancia del complejo IV mitocondrial de *Polytomella sp.* en células cultivadas en medio que contiene acetato como fuente de carbono, las células utilizadas para este estudio fueron cultivadas en un medio cuya fuente de carbono es etanol (4). La primera modificación que se decidió hacer fue la eliminación del gradiente 0-100 mM de NaCl (34) y sustituirlo por un lavado con NaCl 150 mM seguido de la elución de la enzima con NaCl 200 mM. El perfil de elución de la columna se muestra en la figura 11, en el que se observan el volumen de exclusión, los máximos obtenidos con los lavados de NaCl 150 y 200 mM.

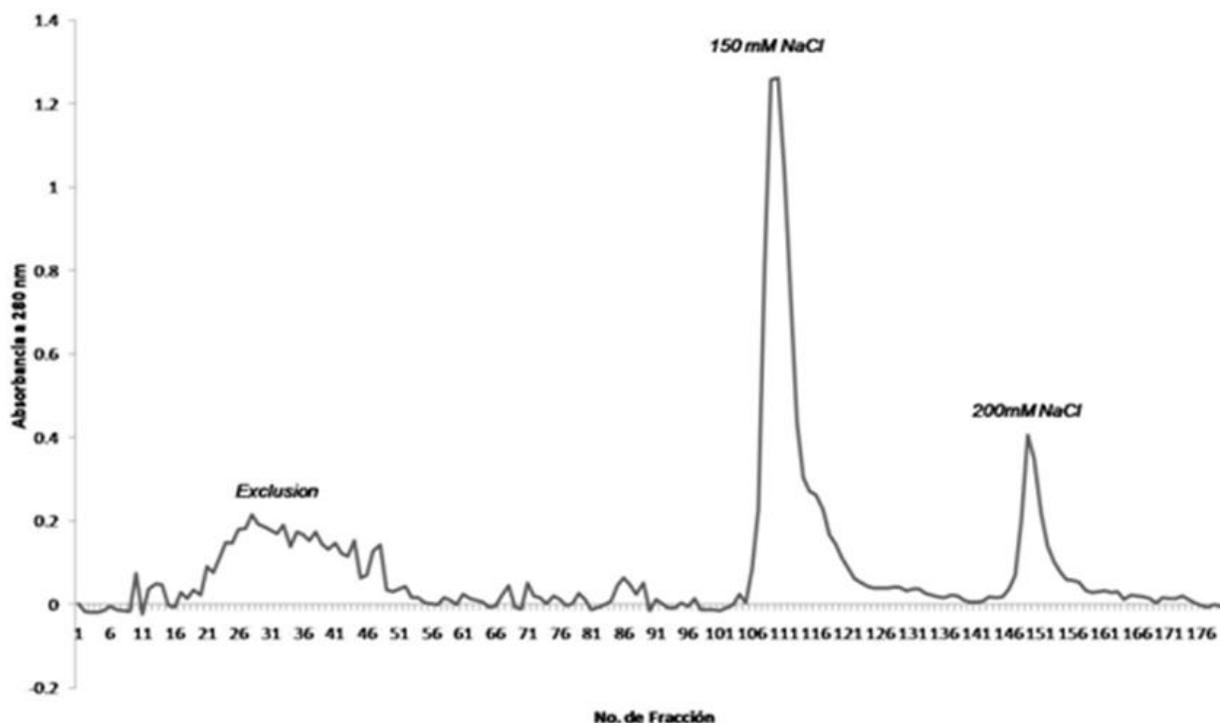


Fig. 11. Perfil de elución de la columna de DEAE-sefarosa de la purificación 1, donde se observan el volumen de exclusión (fracciones 17-54) y los máximos correspondientes a la elución con NaCl 150 (fracciones 107-115) y 200 mM (fracciones 148-153). Las absorbancias fueron medidas a 280 nm.

Al analizar el máximo correspondiente a la citocromo c oxidasa mediante electroforesis, se observó un enriquecimiento de la enzima, pero que aún contiene bandas de alto peso molecular que son consideradas contaminantes (Figura 12).

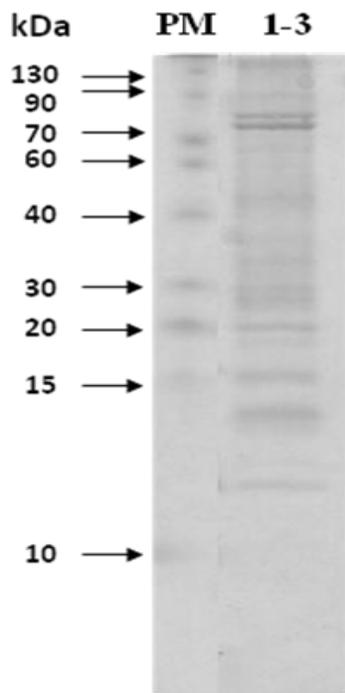


Fig. 12. Perfil electroforético del máximo correspondiente a la COX de la purificación 1 (el eluido con 200 mM NaCl). Gel desnaturizante von Jagow 16%. PM= marcador de peso molecular, Carril 1-3= 50 μ g de proteína del máximo 3 de la purificación 1.

Por lo tanto se decidió aumentar la cantidad de detergente no iónico lauril maltósido (LM) con la que se solubilizan las mitocondrias de 2mg LM/ 1mg de proteína mitocondrial a 3 mg LM/ 1mg.

Para demostrar que este aumento en el detergente no interfiere con la actividad de la citocromo c oxidasa se midió la actividad específica en el espectrofotómetro y la de ascorbato-TMPD oxidasa en el oxímetro. Los resultados de actividad se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de la concentración de lauril maltósido (LM) en la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa y citocromo c oxidasa.

Condiciones de solubilización	Actividad de ascorbato-TMPD oxidasa (nmolas/O ₂ /min)	Actividad citocromo c oxidasa (μmol de cit c oxidado/min/mg de proteína)
2.0 mg de LM/mg de proteína mitocondrial	212.3	65.91
3.0 mg de LM/mg de proteína mitocondrial	179.6	86.93

Como se puede observar, no hay una diferencia significativa en la actividad de la citocromo c oxidasa, por lo que se decidió hacer este cambio en el protocolo de solubilización de mitocondrias para la siguiente purificación. También se modificaron las condiciones de elución de la columna, se utilizó un gradiente de NaCl 0-200 mM seguido de un lavado de NaCl 200 mM. El perfil de elución de la segunda purificación se muestra en la Figura 13, la concentración de proteína se siguió a 280 nm mientras que los hemos se siguieron a 415 nm.

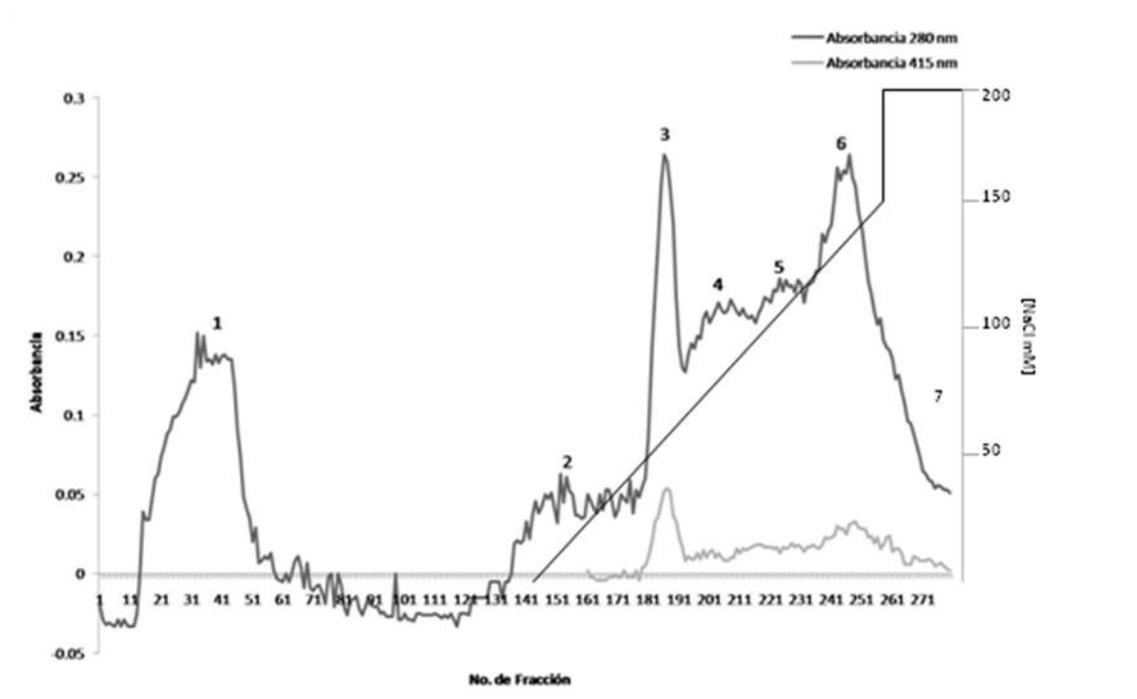


Figura 13. Perfil de elución de la columna de DEAE-sefarosa de la purificación 2, donde se observan el volumen de exclusión (1, fracciones 15-52) y los máximos correspondientes a la elución con un gradiente de NaCl 0-150 mM (2, fracciones 137-181; 3, fracciones 182-192; 4, fracciones 193-216; 5, fracciones 217-237 y 6, fracciones 238-252) y posteriormente con NaCl 200 mM (7, fracciones 253-280). La línea negra representa las absorbancias obtenidas a 280 nm y la gris a las obtenidas a 415 nm. La diagonal en color negro representa el gradiente de NaCl.

Como se puede observar, la combinación de la mayor solubilización de las mitocondrias con el gradiente de NaCl resultó en un perfil de elución donde las lecturas a 415 nm correspondientes a los hemos se encuentran dispersas en los máximos 3 al 7. El máximo más conspicuo a 415 nm fue el 3 por lo que se presumió que este correspondía a la citocromo *c* oxidasa. Al analizar el perfil electroforético de estas fracciones se observó que en la fracción 3 se siguen observando bandas de alto peso molecular (>70 kDa), al igual que en el resto de las fracciones (Figura 14). Al hacer un análisis mediante inmunorréplicas tipo Western se observó la presencia de COXIIA y COXIIB en todos los picos correspondientes al gradiente de NaCl, con diferentes

intensidades (Figura 15). Debido a estos resultados se concluyó que este método de elución de la columna no era el óptimo.

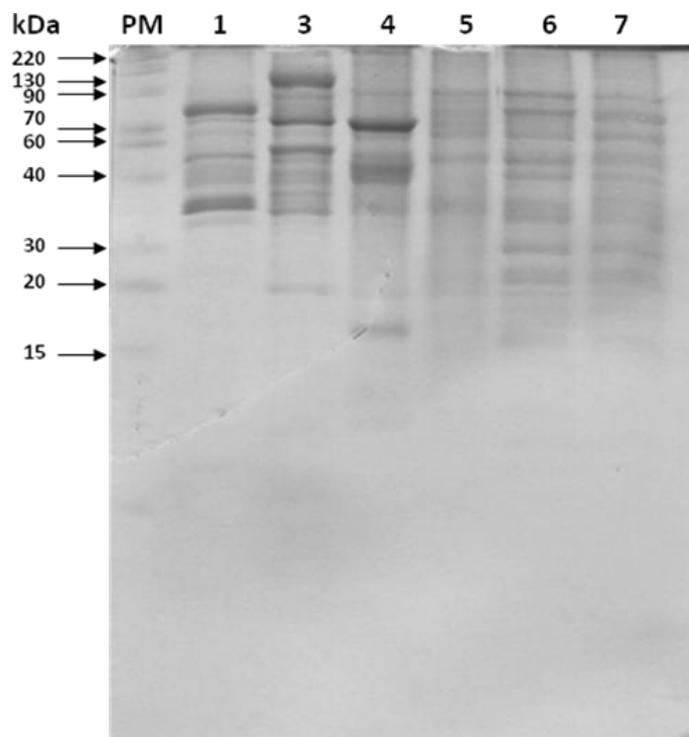


Figura 14. Perfil electroforético de la purificación 2. Carriles 1-7= fracciones (concentradas) obtenidas de la columna DEAE-sefarosa. Gel desnaturalizante vonJagow 14% Urea 8M. PM= Marcador de peso molecular, (50 μ g de proteína/carril). Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

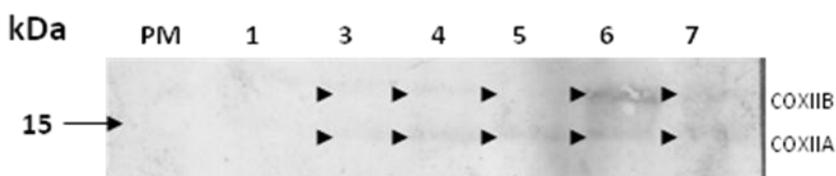


Figura 15. Inmunorréplica tipo western de las fracciones de la purificación 2 usando anticuerpos para COXIIA y COXIIB. PM= Marcador de peso molecular, carriles 1-7= fracciones obtenidas de la columna DEAE-Sefarosa (100 μ g proteína/carril). Se observan bandas correspondientes a COXIIA y COXIIB en las fracciones 1-7 con diferentes intensidades.

En la tercera purificación de la citocromo c oxidasa se mantuvo el protocolo de solubilización de mitocondrias pero se cambió el método de elución de la columna. Se eliminó el gradiente de NaCl 0-200 mM y se sustituyó por un lavado con NaCl 150 mM

seguido de uno con NaCl 200 mM. En la figura 16 se muestra el perfil de elución de esta purificación.

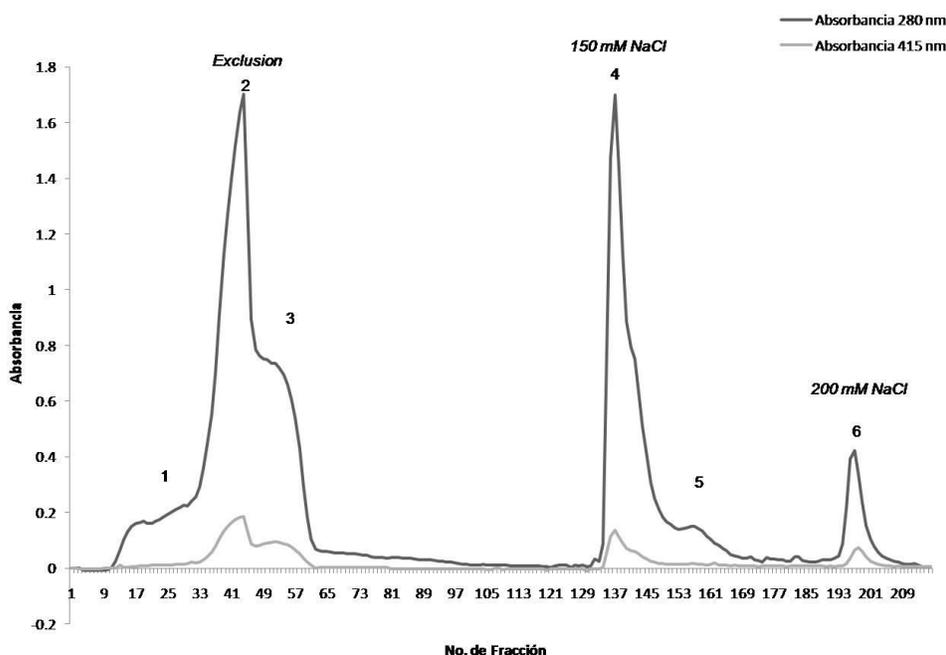


Figura 16. Perfil de elución de la columna de DEAE-Sefarosa de la purificación 3, donde se observan el volumen de exclusión (1, fracciones 12-31; 2, fracciones 32-47; y 3, fracciones 48-62) y los máximos (4, fracciones 133-149; 5, fracciones 150-166 y 6, fracciones 193-204) correspondientes a la elución con NaCl 150 mM y 200 mM. La línea negra representa las absorbancias obtenidas a 280 nm y la gris a las obtenidas a 415 nm.

El perfil de esta columna contiene 6 máximos, interesantemente se observó absorbencia a 415nm (correspondiente a los hemos) en la mayoría de los picos. Sin embargo, el pico que se consideró como la COX con mayor pureza fue el 6, ya que la relación entre las lecturas de absorbencias entre 415nm/280nm fue de 0.156 a comparación de 0.080 para el pico 4.

Al analizar el perfil electroforético de la purificación 3 (Figura 17), se puede observar como a comparación de las purificaciones anteriores hay menos bandas de alto peso molecular tanto en los picos 4 como en el 6.

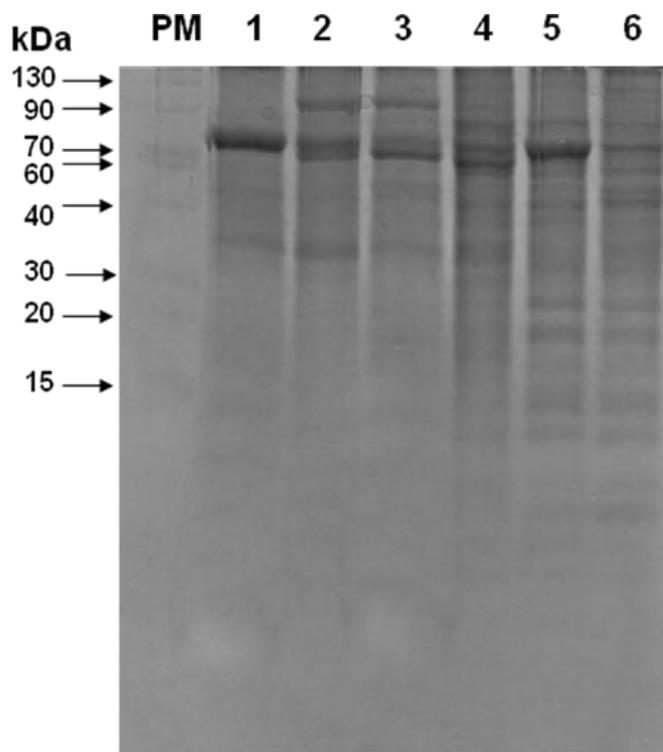


Figura 17. Perfil electroforético de la purificación 3. Carriles 1-6= fracciones obtenidas de la columna DEAE-Sefarosa. Gel desnaturalizante vonJagow 14% Urea 8M. PM= Marcador de peso molecular, (50 μ g proteína/carril). Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

Al analizar la presencia de las subunidades COXIIA y COXIIIB mediante inmunorréplicas tipo western en los picos 4 y 6 de esta purificación se observó su presencia en ambos, pero con mayor intensidad en el pico 6 (Figura 18).

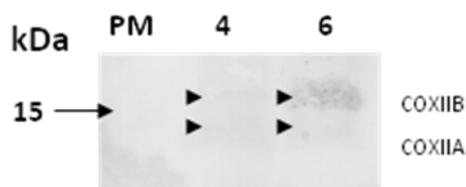


Figura 18. Inmunorréplica tipo western de las fracciones 4 y 6 de la purificación 3 usando anticuerpos para COXIIA y COXIIIB. PM= Marcador de peso molecular, 1 y 4= fracciones obtenidas de la columna DEAE-Sefarosa (100 μ g proteína/carril). Se observan ligeras bandas correspondientes a COXIIA y COXIIIB en ambas fracciones, pero con mayor intensidad en la fracción 6.

Para la última purificación, las mitocondrias fueron aisladas en varias etapas de 90 litros de cultivo de *Polytomella sp.* en fase logarítmica, al determinar la concentración de proteína, se determinó que la purificación se empezó con 2766.4 mg de proteína mitocondrial (100%). Para disminuir la cantidad de contaminantes, se obtuvieron membranas mitocondriales mediante sonicación, así eliminando las proteínas de la matriz mitocondrial, al medir la concentración de proteína en esta preparación con un rendimiento de 1444.3 mg (52.2%). Una vez obtenidas las membranas mitocondriales, fueron solubilizadas en la presencia de lauril maltósido bajo las condiciones establecidas anteriormente.

La precipitación con sulfato de amonio es un método sumamente efectivo en la separación de proteínas. Dicho método funciona con base en la deshidratación del microambiente de una molécula de proteína. Se decidió incluir como uno de los pasos en la purificación de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp.* Las membranas mitocondriales solubilizadas fueron sometidas a precipitación con sulfato de amonio al 40% en presencia de colato 1.6%. El botón verde obtenido de este procedimiento que es rico en citocromo *c* oxidasa, fue resuspendido, dializado y sometido a cromatografía de intercambio iónico (el rendimiento obtenido fue de 308.14 mg, 11.1%). El perfil de elución obtenido de la columna DEAE-Sefarosa es presentado en la Figura 19.

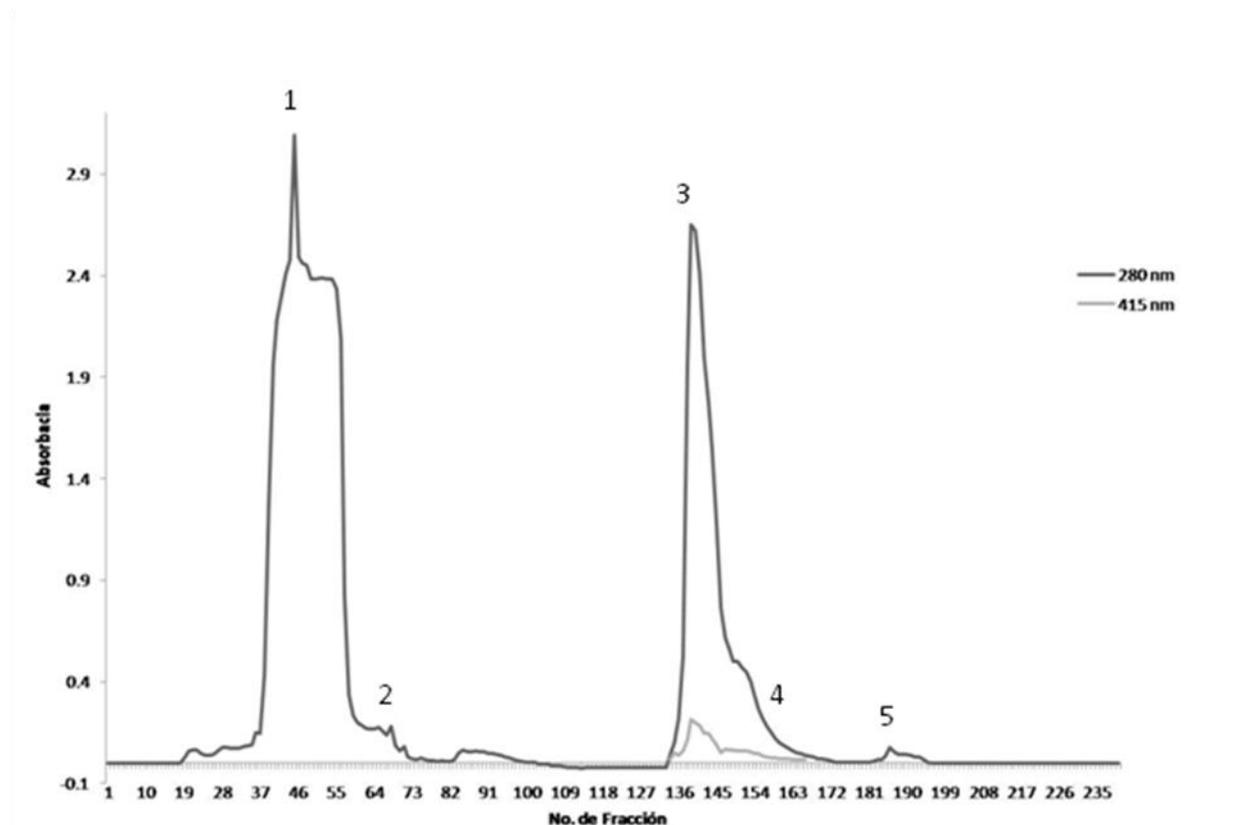


Figura 19. Perfil de elución de la columna de intercambio iónico DEAE-Sefarosa, donde se observan el volumen de exclusión (1, fracciones 37-58 y 2, fracciones 59-66) y los máximos (3, fracciones 134-146; 4, fracciones 147-156 y 5, fracciones 183-194) correspondientes a la elución con NaCl 150 mM. La línea negra representa las absorbancias obtenidas a 280 nm y la línea gris a las obtenidas a 415 nm.

Como se puede observar se obtuvieron 5 máximos. Los máximos 1 y 2 corresponden al volumen de exclusión de la columna mientras que los máximos 3-5 fueron eluidos con el lavado de NaCl 150 mM. Este perfil de elución difiere de los obtenidos anteriormente, en los cuales, las fracciones ricas en citocromo *c* oxidasa eran eluidas con una mayor concentración de NaCl (200 mM) además de que sólo se registró absorbancia a 415nm en las fracciones obtenidas con el lavado de NaCl 150 mM. Esto probablemente es debido a que la purificación se empezó con membranas mitocondriales a diferencia de mitocondrias completas. Con el propósito de obtener una preparación más pura, se decidió someter el máximo 3 de la columna DEAE-Sefarosa

a una segunda columna de intercambio iónico Toyopearl QAE 550C. El perfil de elución de dicha columna se presenta a continuación (Figura 21).

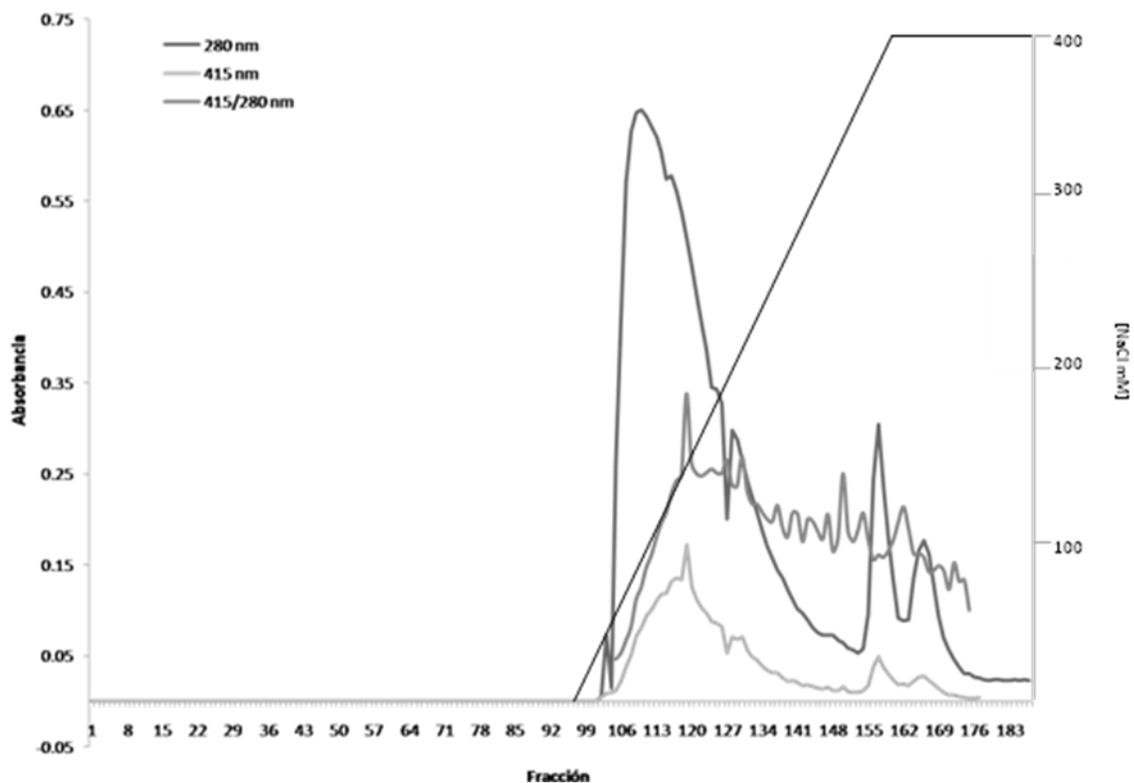


Figura 21. Perfil de elución de la columna de intercambio iónico Toyopearl QAE 550C, donde se observa la ausencia del volumen de exclusión y los máximos obtenidos correspondientes a la elución con un gradiente de NaCl 0-400 mM. La línea negra representa las absorbancias obtenidas a 280 nm y la gris oscuro a las obtenidas a 415 nm y la gris claro a las relación entre las absorbancias obtenidas a 415 y 280 nm.

Como se puede observar en el perfil de elución de la columna Toyopearl QAE 550C no se observa un pico de exclusión, esto es debido a que las proteínas que son incapaces de unirse a la columna de intercambio iónico fueron eliminadas en la columna anterior (DEAE-Sefarosa). La columna se eluyó con un gradiente de 0-400 mM de NaCl. Los máximos seleccionados para posterior análisis están compuestos por las fracciones 106-126 y 149-170, basándose en la relación de las absorbancias

obtenidas a 415 y 280 nm. Dichas fracciones fueron sometidas a electroforesis desnaturizante para su análisis. Como se puede observar en la Figura 22, la fracción 106 está mayoritariamente compuesta por proteínas de masa molecular por arriba de los 30 kDa, lo que sugiere que las subunidades de peso molecular menor como lo son COXIIA y COXIIB probablemente no estén presentes. A partir de la fracción 110 y hasta la 126 se observa un incremento en las bandas correspondientes a pesos moleculares menores.

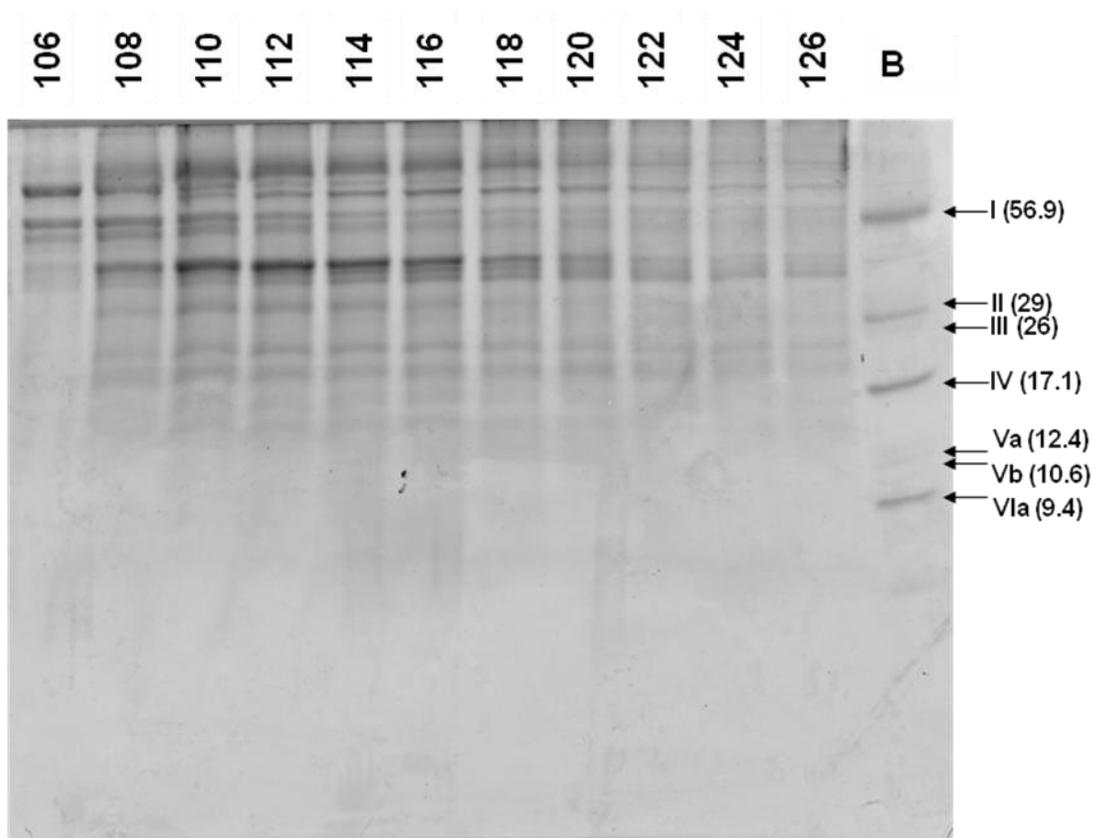


Figura 22. Perfil de elución de las fracciones 106-126 de la columna Toyopearl QAE 550 C. B= citocromo c oxidasa de bovino como marcador de peso molecular (40 μ g), 50 μ l/carril de las fracciones sin concentrar 106-126. Gel desnaturizante vonJagow 14% Urea 8M. Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

Al analizar el perfil electroforético de las fracciones 149-170 de la columna Toyopearl QAE 550C (Figura 23) se observa que están compuestas principalmente por proteínas de masa molecular >50 kDa y mínimamente por proteínas de masas moleculares pequeñas.

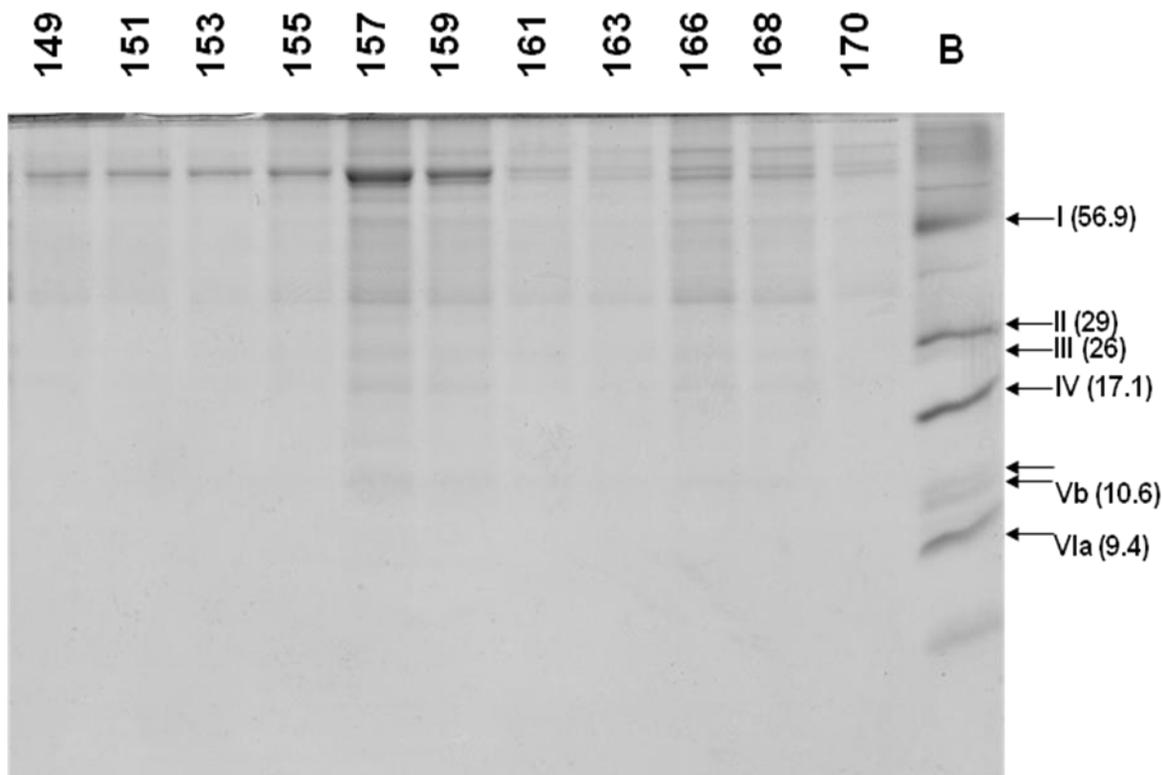


Figura 23. Perfil de elución de las fracciones 149-170 de la columna Toyopearl QAE 550 C. B= citocromo c oxidasa de bovino como marcador de peso molecular (40 μ g), 50 μ l/carril de las fracciones sin concentrar 149 a 170. Gel desnaturante vonJagow 14% Urea 8M. Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

Esto nos permite concluir que la columna de Toyopearl QAE 550 nos permitió eliminar una buena parte de los contaminantes de alto peso molecular. Basándonos en los perfiles electroforéticos se decidió someter las fracciones 110-127 reunidas a una

tercera columna de filtración en gel Sephacryl S-300. El perfil de dicha columna se muestra en la Figura 24.

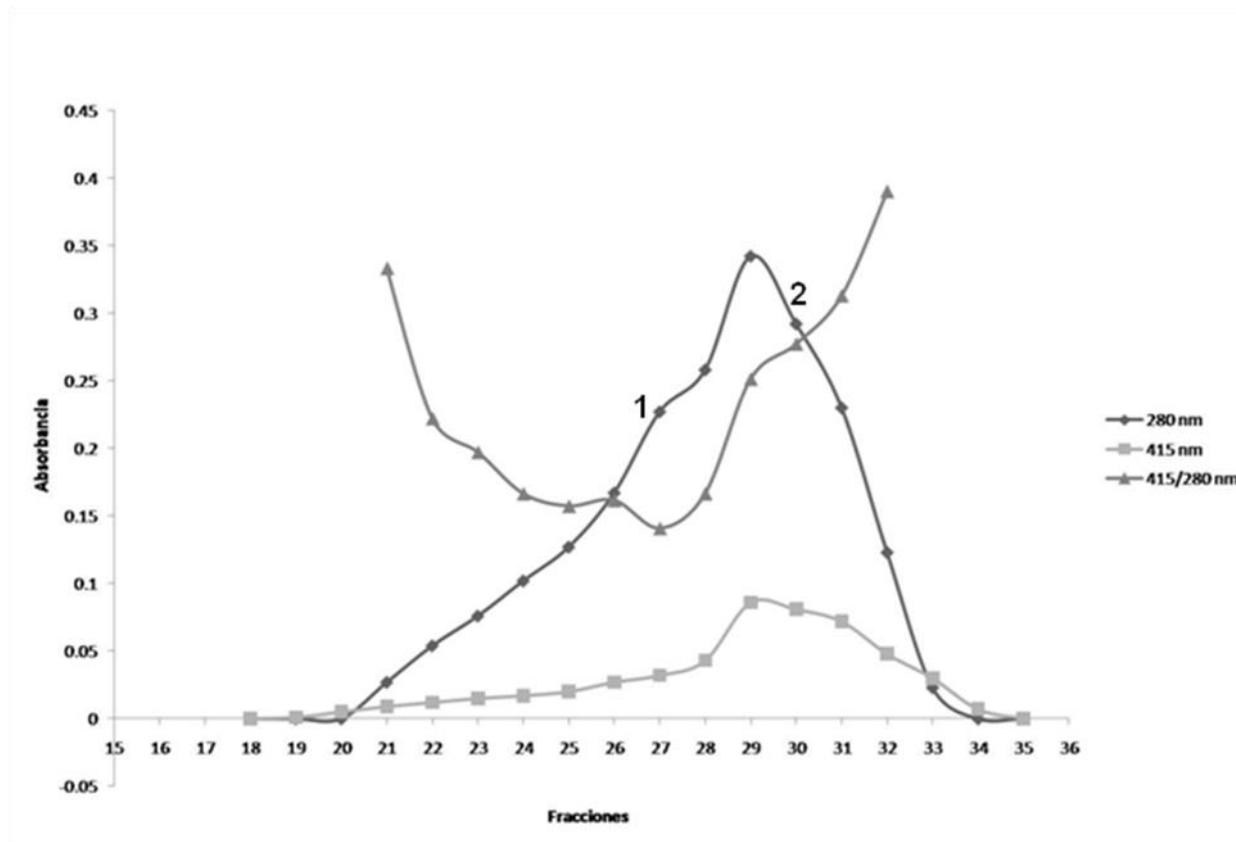


Figura 24. Perfil de elución de la columna de filtración en gel Sephacryl S-300, donde se observan los máximos obtenidos correspondientes a la elución con NaCl 200 mM (1, fracciones 21-28 y 2, fracciones 29-34). La línea negra representa las absorbencias obtenidas a 280 nm (proteína) y la gris oscuro a las obtenidas a 415 nm y la gris claro a la relación entre las absorbencias obtenidas a 415 y 280 nm.

Al analizar el perfil de elución de la columna de filtración en gel se observaron dos máximos principales basándose en la relación 415/280 nm. Las fracciones fueron sometidas a electroforesis para analizar su composición polipeptídica.

Como se puede observar en el gel, las fracciones 22 a la 28 contienen bandas de alto peso molecular que prácticamente desaparecen en las fracciones 29 a 32 (Figura 25).

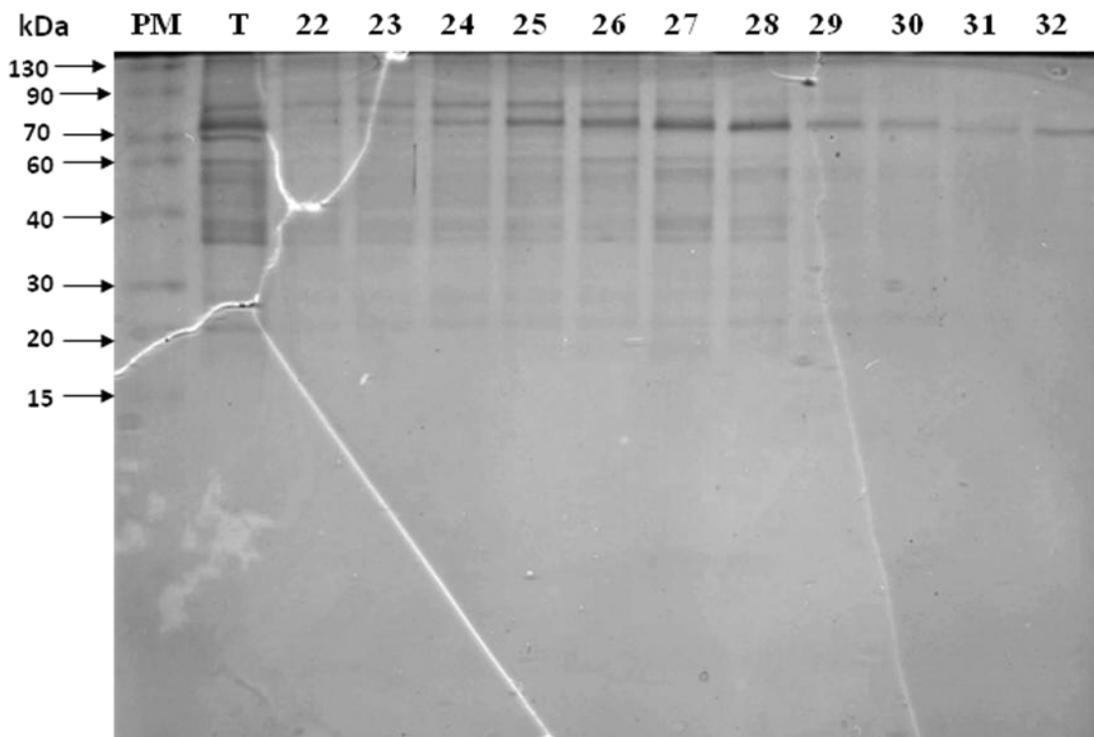


Figura 25. Perfil de elución de las fracciones 22-32 de la columna Sephacryl S-300 (50 μ l/carril de las fracciones sin concentrar). T= fracciones 110-137 columna Toyopearl concentradas. Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

Basándose en la relación 415-280 nm y el perfil de elución en geles desnaturalizantes se determinó que las fracciones 21-28 y 29-34 se reunirían y concentrarían. En la tabla 2 se muestra el rendimiento final de esta purificación, la cual carece de la pureza específica y la concentración de citocromo *a*.

Tabla 2. Rendimiento de la cuarta purificación de COX de *Polytomella sp.*

FRACCION	[PROTEINA] (mg/ml)	VOLUMEN (ml)	PROTEINA TOTAL (mg)	RENDIMIENTO % DE PROTEINA
<i>Mitocondrias</i>	42.56	65	2766.4	100.0
<i>Membranas</i>	26.26	55	1444.3	52.2
<i>Membranas solubilizadas y dializadas</i>	nd*	133	nd*	nd*
<i>Pellet verde dializado</i>	2.17	142	308.14	11.1
<i>Fracción 3 DEAE</i>	133	67.5	89.7	3.2
<i>Fracciones 110-127 Toyopearl</i>	1.16	7.5	8.7	0.3
<i>Fracción 1 Sephacryl</i>	1.07	2	2.14	0.08
<i>Fracción 2 Sephacryl</i>	0.8	1.6	1.6	0.06

*nd: no disponible

Las fracciones 1 y 2 de la filtración en gel fueron sometidas a electroforesis desnaturizante (Figura 26). Como se puede observar hay varias diferencias entre las dos fracciones, para empezar la banda de ~80 kDa presente en la fracción 1 es mucho más intensa que la observada en la fracción 2, lo mismo es cierto para la banda de ~40 kDa. Además se observa una banda debajo de la de ~80kDa que no está presente en el pico 1. La fracción 1 también parece tener más bandas de muy bajo peso molecular (<10kDa). En la fracción 1 existe una banda de ~30KDa que no está presente en la fracción 2.

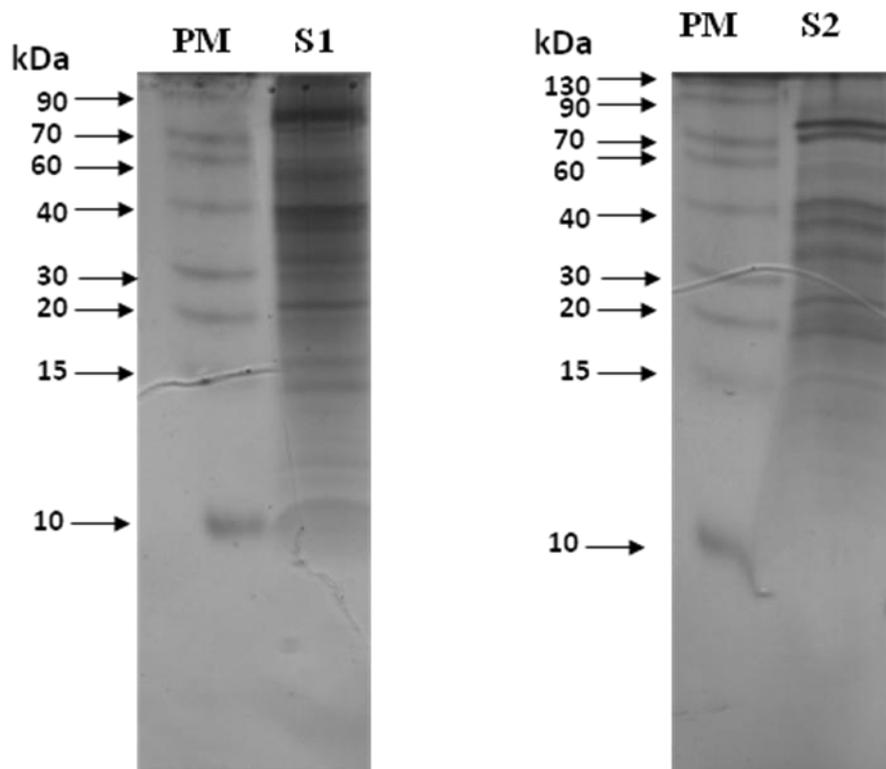


Figura 26. Perfil electroforético de las fracciones 1 y 2 de la columna Sephacryl S-300. Gel von Jagow 14% Urea 8M. PM= marcador de peso molecular, S1= fracción 1, S2= fracción 2 (50 μ g proteína/carril, concentradas). Se observan las diferencias en los patrones de las bandas correspondientes a las diferentes fracciones.

La presencia de COXIIA y COXIIB fue observada en ambas fracciones como se muestra en la Figura 27. La banda correspondiente a COXIIA en la fracción 1 no es tan intensa como la observada en la fracción 2.

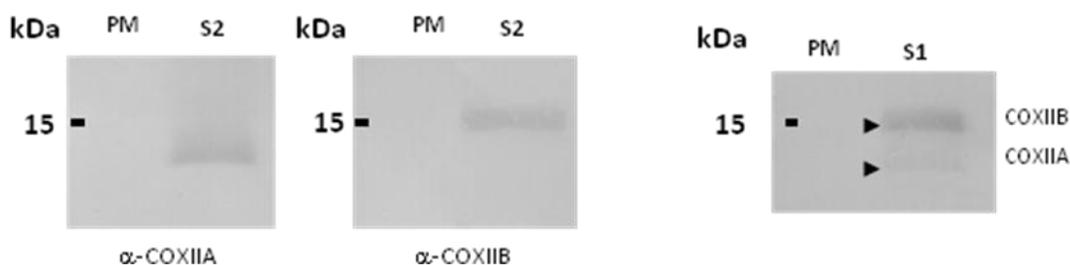


Figura 27. Inmunorréplica tipo western de las fracciones 1 y 2 de la purificación 4 usando anticuerpos para COXIIA y COXIIB. PM= marcador de peso molecular, S1= fracción 1, S2= fracción 2 (100 μ g proteína/carril). Se observan bandas correspondientes a las subunidades COXIIA y COXIIB tanto en la fracción S1 como en la S2.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A la fecha se han descrito diversos protocolos de purificación de la citocromo *c* oxidasa que varían dependiendo del organismo del cual se quiera aislar dicho complejo. Los métodos publicados incluyen el uso de detergentes tales como Tritón X-100, X-114 y colato de sodio para la solubilización de la proteínas mitocondriales, precipitación con sulfato de amonio y cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular (7, 31). El protocolo de purificación de la COX de *Polytomella sp.* propuesto por Pérez-Martínez y col. resulta en una preparación en la cual existen proteínas contaminantes con pesos moleculares de 80 y 41.8 kDa. Por lo tanto, se decidió tomar este método como base y hacerle modificaciones para mejorar la pureza de la preparación (34).

A lo largo de las diversas purificaciones de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp.* realizadas en el presente trabajo, se fueron estableciendo modificaciones al protocolo antes mencionado (34). Entre las modificaciones hechas fue comenzar la purificación con membranas mitocondriales en lugar de mitocondrias completas, esto permitió eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes de la matriz mitocondrial. También se incrementó la cantidad de detergente utilizado para solubilizar las mitocondrias ya que se demostró que ésto no tiene un efecto significativo en la actividad de la COX, manteniéndose funcional, y se eliminó la elución de la columna de intercambio iónico con un gradiente, optándose por eluir con concentraciones altas de NaCl. Finalmente, se incluyeron cromatografías adicionales tanto de intercambio iónico como de filtración en gel. Al final se obtuvo una preparación en la cual no se observaron contaminantes de alto peso molecular. Sin embargo, en ambas fracciones

de la última columna se observaron bandas de ~80 kDa que también habían sido observadas con el método de purificación anterior y que fueron consideradas contaminantes (34). Una impureza en una preparación, puede ser considerada como tal cuando basándose en estudios previos no se espera como parte del complejo que se quiere aislar, pero quizá en algunos casos esta definición es un prejuicio, ya que si una proteína tiene interacciones tan fuertes con la proteína o complejo de interés que no permiten su separación, existe la explicación alternativa que quizá se deba a que es un componente o una proteína accesoria desconocida hasta el momento.

Debido a todos los pasos adicionales de purificación a los cuales fue sometida esta preparación, vale la pena considerar la posibilidad de que las proteínas de ~80 kDa que son parte de la preparación obtenida, puedan ser proteínas asociadas a la COX de *Polytomella* que estén involucradas en la regulación de la función, y/o la estructura de este complejo, sin embargo estas bandas de alto peso molecular no fueron observadas en los geles azules no desnaturizantes (42). Quizá esto se deba a las diferentes técnicas de solubilización de proteínas que fueron empleadas en ambos estudios. Esta pregunta sería motivo de estudios posteriores en los cuales se comience por obtener la secuencia del amino terminal de estas proteínas para determinar su identidad. Al comparar las fracciones resultantes de la filtración en gel se puede observar que hay una banda de 30 kDa que está presente en la fracción 1 pero ausente en la fracción 2. Este fenómeno se puede interpretar de varias formas, una es que una preparación contiene contaminantes mientras que la otra no, una explicación alterna es que en la membrana mitocondrial existen diferentes formas de la citocromo c oxidasa, Estudios hechos por van Lis y col (43) en el laboratorio muestran que cuando mitocondrias solubilizadas con el detergente dodecil-maltósido, considerado un

detergente suave, son analizadas por medio de geles azules nativos y luego en una segunda dimensión en geles desnaturizantes, se observa que el Complejo IV de *Polytomella* exhibe dos formas monoméricas (forma-L y forma-S). La forma-S carece de una proteína de 25 kDa a comparación de la forma-L, se predice que dicha proteína puede ser COXIII, o sea que exista heterogeneidad de la enzima *in vivo* (43). El posible significado fisiológico de la presencia de dos formas de la enzima es aún desconocido. La subunidad COXIII no contiene grupos prostéticos, por lo que no está implicada directamente en la actividad transportadora de electrones en la enzima. Posiblemente tenga un papel estructural, participando en la estabilidad de la enzima. Las subunidades de la citocromo c oxidasa que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos son las I, II y III, debido a este alto nivel de conservación se podría inferir que la falta de COXIII resultaría en un complejo IV menos activo o inactivo, sin embargo esto representaría un gasto de energía de la célula innecesario. Una posible explicación para la falta de esta subunidad en algunas de las COX, es que el complejo este en formación o que al haber cambios en la redes mitocondriales como lo son fusión y fisión de las mitocondrias, existan intermediarios de la COX carentes de esta subunidad (25).

En el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, el complejo IV está compuesto por 10 subunidades con masas moleculares aparentes de 40, 25, 18, 16, 14, 14, 12, 10, 8 y 5 kDa de las cuales COXI, COXIIA, COXIIB, COXIII, COXVIb, COXVb, COXVIa han sido identificadas y parece estar presente en diversos estados oligoméricos con masas moleculares aparentes de 530, 240 y 160 kDa. La subunidad II de la COX de *C. reinhardtii* es heterodimérica al igual que su contraparte en *Polytomella* sp. Algunas subunidades de la COX de *C. reinhardtii* son atípicas, la subunidad COXVb tiene poca

similitud con su contraparte en mamíferos, además los primeros 60 residuos de su subunidad COXVIb no tiene similitud con ningún otra COXVIb reportada. Al analizar el genoma de *C. reinhardtii* solamente se encontraron 8 secuencias que codifican para las subunidades que conforma a la COX, a pesar de que como se mencionó anteriormente, el complejo parece estar compuesto por 10 subunidades. Posiblemente las dos subunidades no identificadas tengan secuencias de aminoácidos que difieren fuertemente de las de otros eucariontes y sean componentes específicos del linaje de las algas clorofíceas (10, 42).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un fenómeno similar al mostrado por van Lis y col. (43), en este caso también se piensa que la banda de ~30kDa que muestra heterogeneidad en las dos preparaciones podría ser COXIII, ya que la masa molecular estimada de esta subunidad es de 29.6 kDa (34). Inmunorréplicas tipo western se realizaron para observar la presencia de COXIII utilizando un anticuerpo anti subunidad COXIII de levadura, sin embargo no se obtuvieron resultados concluyentes. El fenómeno de heterogeneidad de la citocromo c oxidasa también se ha observado en mitocondrias solubilizadas con digitonina del frijol *Phaseolus vulgaris*; en este caso las diferencias son a nivel de las subunidades tipo COXVIb (14).

El rendimiento obtenido para la preparación de COX usando este método es baja (0.06-0.085%). Sin embargo, si se empieza con una mayor cantidad de mitocondrias se podría obtener suficiente proteína para hacer análisis posteriores, como lo son la concentración de citocromo a y la pureza específica y secuenciación de los amino terminales de las bandas obtenidas en el perfil electroforético de las fracciones S1 y S2, en particular de las de ~80 kDa y si se obtiene

suficiente cantidad, intentar la cristalización de la COX de *Polytomella* para observar las interacciones entre las subunidades COXIIA y COXIIB. También se podría mejorar el rendimiento modificando las condiciones de crecimiento de *Polytomella* de tal manera que resulten en una mayor producción de COX. Dichas modificaciones pueden incluir el uso de otras fuentes de carbono o cambios en el pH.

En conclusión, el método aquí presentado para la purificación de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella sp.* permitió deshacerse parcialmente de los contaminantes de alto peso molecular, sin embargo, es un método de bajo rendimiento lo que impidió la determinación de la concentración de citocromo *a* y la pureza específica en la preparación, lo cual no permite concluir que este método sea más efectivo que el publicado anteriormente. Es importante mencionar que un hallazgo relevante de este trabajo fue que se encontró que la COX está presente en dos conformaciones, una que parece carecer de la subunidad COXIII y otra que si la contiene pero la relevancia fisiológica que esto implica es motivo de otros estudios.

BIBLIOGRAFIA

1. 2001. Encarta Encyclopedia. Microsoft.
2. **Abrahams, J., A. Leslie, R. Lutter, and J. Walker.** 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**:621-628.
3. **Aragao, H.** 1910. Untersuchungen uber *Polytomella agilis* n.g., n. sp. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **2**:42-47.
4. **Atteia, A., R. van Lis, G. Mendoza-Hernández, K. Henze, W. Martin, H. Riveros-Rosas, and D. González-Halphen.** 2003. Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Mol Biol* **53**:175-188.
5. **Atteia, A., R. van Lis, J. Ramírez, and D. González-Halphen.** 2000. *Polytomella* spp. growth on ethanol. Extracellular pH affects the accumulation of mitochondrial cytochrome c550. *Eur J Biochem* **267**:2850-2858.
6. **Brandt, U.** 1997. Proton-translocation by membrane bound NADH: ubiquinone-oxidoreductasa (Complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* **1318**:79-91.
7. **Brandt, U., H. Schagger, and G. von Jagow.** 1989. Purification of cytochrome *c* oxidase retaining its pulsed form. *Eur J Biochem* **182**:705-711.
8. **Braun, H.** 1995. The bifunctional cytochrome *c* reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **27**:423-436.
9. **Cárabez Trejo, A., and F. Sandoval Z.** 2002. Ultraestructura mitocondrial. In M. E. Vázquez Memije and M. Tuena de Gómez Puyou (ed.), *Mitocondria: Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos* Editorial Prado S.A. de C.V., México D.F.
10. **Cardol, P., D. González-Halphen, A. Reyes-Prieto, D. Baurain, R. F. Matagne, and C. Remacle.** 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project. *Plant Physiology* **137**:447-459.
11. **Carroll, J., R. Shannon, I. Fearnley, J. Walker, and H. J.** 2002. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Chem* **277**:50311-50317.

12. **Dyall, S. D., M. T. Brown, and P. J. Johnson.** 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**:253-257.
13. **Errede, B., M. D. Kamen, and Y. Hatefi.** 1978. Preparation and properties of complex IV (ferrocytochrome c: oxygen oxidoreductase EC 1.9.3.1). *Methods Enzymol* **53**:40-47.
14. **Eubel, H., L. Jansch, and H. P. Braun.** 2003. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**:274-286.
15. **Fan, J., and R. W. Lee.** 2002. Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat Termini. *Mol Biol Evol* **19**:999-1007.
16. **Gittleson, S. M., R. E. Alper, and S. F. Conti.** 1969. Ultrastructure of trophic and encysted *Polytomella agilis*. *Life Sci* **8**:591-599.
17. **Gómez Lojero, C., and M. E. B. Gutiérrez Cirlos.** 2002. La mitocondria: un ensayo histórico de un organelo transductor de energía. *In* M. E. Vázquez Memije and M. Tuena de Gomez Puyou (ed.), *Mitocondria: Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. Editorial Prado S.A. de C.V., México D.F.
18. **González-Halphen, D., X. Pérez-Martínez, S. Funes, A. Reyes-Prieto, and J. L. Santillán-Torres.** 2003. La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. *In* O. Flores Herrera, H. Riveros Rosas, A. Sosa Peinado, and E. Vázquez Contreras (ed.), *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVII. UNAM, Mexico, D.F.
19. **González-Halphen, D., and M. Vázquez-Acevedo.** 2002. La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural. *In* M. E. Vázquez Memije and M. Tuena de Gómez Puyou (ed.), *Mitocondria: Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. Editorial Prado S.A. de C.V., México D.F.
20. **González-Halphen, D., M. Vázquez-Acevedo, and B. García-Ponce.** 1991. On the interaction of mitochondrial complex III with the Rieske iron-sulfur protein (subunit V). *J Biol Chem* **266**:3870-3876.
21. **Hägerhäll, C.** 1997. Succinate: quinone oxidoreductase. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* **1320**:107-141.
22. **Koehler, C. M., and M. F. Bauer.** 2004. *Mitochondrial function and biogenesis*. Springer, Berlin ; New York.

23. **Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox.** 2005. Lehninger principles of biochemistry, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
24. **Lewis, E., G. Munger, R. Watson, and D. Wise.** 1974. Life cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, Polyblepharidae). J Protozool **21**:647-649.
25. **Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano.** 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. Physiol Rev **89**:799-845.
26. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**:265-275.
27. **Mallet, M. A., and R. W. Lee.** 2006. Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features. J Eukaryot Microbiol **53**:79-84.
28. **Margulis, L.** 1990. Handbook of protocista : the structure, cultivation, habitats, and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants, and fungi : a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, slime molds, and the other protocists. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
29. **Margulis, L.** 1981. Symbiosis in cell evolution : life and its environment on the early Earth. W. H. Freeman, San Francisco.
30. **Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert.** 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem **87**:206-210.
31. **Merle, P., and B. Kadenbach.** 1980. The subunit composition of mammalian cytochrome *c* oxidase. Eur J Biochem **105**:499-507.
32. **Palade, G.** 1952. The fine structure of mitochondria. Anat Rec **114**:427-451.
33. **Pérez-Martínez, X., A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, S. Funes, E. Tolkunova, J. d'Alayer, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King, and D. González-Halphen.** 2001. Subunit II of cytochrome *c* oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. J Biol Chem **276**:11302-11309.
34. **Pérez-Martínez, X., M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King, and D. González-Halphen.** 2000. Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome *C* oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. J Biol Chem **275**:30144-30152.
35. **Pierce, B.** 2007. Genetics: A conceptual approach, 3rd ed. MacMillan.
36. **Pringsheim, E.** 1955. The genus *Polytomella*. J Protozool **2**:137-145.

37. **Reyes-Prieto, A.** 1997. Estudio de los componentes de la fosforilación oxidativa en mitocondrias del alga incolora *Polytomella* spp. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
38. **Schagger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-379.
39. **Schatz, G.** 1996. The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem* **271**:31763-31766.
40. **Sheeler, P., J. Moore, M. Cantor, and R. Granik.** 1968. The stored polysaccharide of *Polytomella agilis*. *Life Sci* **7**:1045-1051.
41. **Tomizaki, T., E. Yamashita, H. Yamaguchi, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa.** 1999. Structure analysis of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**:31-45.
42. **van Lis, R., A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez, and D. Gonzalez-Halphen.** 2003. Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol* **132**:318-330.
43. **van Lis, R., D. González-Halphen, and A. Atteia.** 2005. Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta* **1708**:23-34.
44. **Zorzano, A., D. Bach, S. Pich, and M. Palacín.** 2004. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Rev Med Univ Navarra* **48**:30-35.