



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IMPORTACIÓN DE LAS SUBUNIDADES
COX2A Y COX2B DE LA CITOCROMO *c*
OXIDASA EN LAS MITOCONDRIAS DEL
ALGA INCOLORA *Polytomella* sp.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

ALEJANDRA JIMÉNEZ SUÁREZ



Tutor
DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

MÉXICO, D. F.

MAYO 2011



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.

IMPORTACIÓN DE LAS SUBUNIDADES COX2A Y COX2B DE LA CITOCROMO *c* OXIDASA EN LAS MITOCONDRIAS DEL ALGA INCOLORA *Polytomella* sp.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324 Norte, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

| | |
|----------------------------|---------------------------------------|
| Dr. Dimitris Georgellis | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dra. Sobeida Sánchez Nieto | Facultad de Química, UNAM |

Se reconoce la colaboración del Dr. Salvador Uribe Carvajal y del M. en C. Andrés Rojas Hernández del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, quienes participaron en los experimentos previos de obtención y caracterización de las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.

Se reconoce la asesoría técnica de la Q. B. P. Miriam Vázquez Acevedo en los experimentos para la obtención de mitocondrias de *Polytomella* sp., y su medición del consumo de oxígeno, así como también en experimentos de importación *in vitro* de las proteínas COX2A y COX2B.

Se reconoce el apoyo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por la utilización del aparato para revelar las autorradiografías de los ensayos de importación *in vitro* indispensables en este trabajo, así como también por la secuenciación de clonas y síntesis de oligonucleótidos.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT a través del donativo No. 56619 y por PAPIIT con el donativo IN217108. Durante los estudios de Maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT con el No. de registro 264683.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

| | | |
|------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Presidente | Dr. Ruy Pérez Monfort | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Vocal | Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo | Facultad de Química, UNAM |
| Secretario | Dr. Ángel Zarain Herzberg | Facultad de Medicina, UNAM |
| Suplente | Dra. Sobeida Sánchez Nieto | Facultad de Química, UNAM |
| Suplente | Dr. Rogelio Rodríguez Sotres | Facultad de Química, UNAM |

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alejandro Jiménez Fernández y Verónica Suárez Ruiz por su todo apoyo incondicional, y por haberme enseñado valores que me han ayudado a seguir adelante y superar muchas adversidades en la vida.

A mis hermanos Jonathan y Verónica por brindarme todo su amor, compañía y saber que cuento con ustedes en todo momento.

Al Dr. Diego González Halphen por permitirme hacer la maestría en su laboratorio y por su enseñanza y guía en estos años.

A mis compañeros de laboratorio Alexa, Araceli, Ángela, Elizabeth, Valentín, Héctor, Alain, Francisco, Sergio, por su gran apoyo, compañía, pláticas y amistad. A Miriam, muchas gracias por haberme enseñado las técnicas y por tu constante apoyo en los experimentos. Ha sido un placer trabajar con ustedes.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABREVIATURAS | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA | 3 |
| LA CADENA RESPIRATORIA | 4 |
| ORIGEN DE LA MITOCONDRIA..... | 6 |
| MIGRACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES AL NÚCLEO..... | 8 |
| IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA | 9 |
| PRECURSORES CITOSÓLICOS | 9 |
| MAQUINARIA DE IMPORTACIÓN..... | 10 |
| RUTAS DE IMPORTACIÓN..... | 13 |
| ALGAS CLOROFÍCEAS | 16 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 16 |
| <i>Polytomella</i> sp..... | 16 |
| ANTECEDENTES DIRECTOS | 17 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| HIPÓTESIS | 19 |
| OBJETIVO GENERAL | 20 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| CLONACIÓN DE LOS GENES <i>cox2a</i> Y <i>cox2b</i> EN EL VECTOR PSP64 | 21 |
| SÍNTESIS <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS..... | 24 |
| CULTIVO DEL ALGA <i>Polytomella</i> sp..... | 25 |
| OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE <i>Polytomella</i> sp..... | 25 |
| OXIMETRÍA..... | 26 |
| ENSAYOS DE IMPORTACIÓN <i>in vitro</i> | 27 |
| RESULTADOS | 29 |
| CONSTRUCCIÓN DE CLONAS | 29 |
| OXIMETRÍA..... | 29 |
| SÍNTESIS DE PROTEÍNAS <i>in vitro</i> | 32 |
| IMPORTACIÓN..... | 35 |
| ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CON COX2B | 37 |
| ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CON COX2A..... | 41 |
| UTILIZACIÓN DE EXTRACTO CITOSÓLICO DE <i>Polytomella</i> sp. | 42 |
| ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CO-TRADUCCIONALES..... | 43 |
| ENSAYOS DE IMPORTACIÓN DE COX2A CON GTP | 44 |
| DISCUSIÓN..... | 47 |
| HIDROFOBICIDAD DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES CODIFICADAS EN EL NÚCLEO | 47 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Y <i>Polytomella</i> sp. | 48 |
| MITOCONDRIAS DE <i>Polytomella</i> sp. | 48 |
| MAQUINARIA DE IMPORTACIÓN EN <i>Polytomella</i> sp..... | 49 |
| PRESECUENCIAS MITOCONDRIALES (EL CASO DE COX2A)..... | 49 |
| IMPORTACIÓN SIN PRESECUENCIA MITOCONDRIAL (EL CASO DE COX2B)..... | 52 |
| CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA IMPORTACIÓN..... | 54 |
| CONCLUSIÓN | 56 |
| PERSPECTIVAS | 57 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 58 |
| APÉNDICE..... | 62 |

RESUMEN

La migración de genes mitocondriales al núcleo es un proceso evolutivo que aún continúa. En la mayoría de los organismos el genoma mitocondrial contiene genes que codifican para 13 proteínas de la fosforilación oxidativa. Las algas clorofíceas, entre las que se encuentra el alga incolora *Polytomella* sp., tienen un genoma mitocondrial reducido que carece de los genes *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, y *atp8*. Se ha demostrado que estos genes migraron al núcleo en este linaje de algas.

El gen *cox2* del alga *Polytomella* sp. se escindió en dos genes independientes llamados *cox2a* y *cox2b*, los cuales migraron independientemente al núcleo. El gen *cox2a* codifica a la proteína COX2A con dos cruces transmembranales; el gen *cox2b* codifica a la proteína COX2B, correspondiente a la región hidrofílica de una COX2 ortodoxa. Ambas proteínas se sintetizan en el citosol, se internalizan en la mitocondria y se ensamblan junto con varias otras subunidades formando el complejo maduro de la citocromo *c* oxidasa.

En este trabajo se realizaron ensayos de importación buscando las condiciones que permitieran el ingreso de las proteínas COX2A y COX2B sintetizadas *in vitro* a mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. Los datos obtenidos demostraron que la subunidad COX2B, la cual carece de una presecuencia mitocondrial, parece ingresar directamente al espacio intermembranal, ya que su importación no depende de la presencia de un gradiente electroquímico. Además, dicha importación es sensible al detergente digitonina, el cual permeabiliza la membrana externa mitocondrial. En el caso del precursor de la proteína COX2A observamos que su presecuencia mitocondrial se procesa proteolíticamente, quizá más de una vez. La proteína ingresa a la mitocondria, en un proceso que requiere de un gradiente electroquímico y de la presencia de ATP o GTP.

ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| ADNmt | ADN mitocondrial |
| MTS | Secuencia blanco mitocondrial o presecuencia |
| TOM | Translocasa de la membrana externa mitocondrial |
| TIM | Translocasa de la membrana interna mitocondrial |
| MPP | Peptidasa de procesamiento mitocondrial |
| AVO | Antimicina, Valinomicina y Oligomicina |
| PK | Proteinasa K |

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un organelo celular formado por cuatro subregiones diferentes: la membrana externa altamente permeable, la membrana interna con permeabilidad selectiva, el espacio intermembranal y la matriz. La membrana interna forma plegamientos llamados crestas que se proyectan hacia el interior de la mitocondria. El número de mitocondrias presentes en las células eucariotas varía enormemente, pudiendo estar ausentes como en eritrocitos de mamíferos, o alcanzar los millares, como en los óvulos de erizos de mar. Así mismo, el número de mitocondrias por célula no es constante ya que las mitocondrias tienen una naturaleza dinámica, por lo que se encuentran continuamente fusionándose y fisionándose.

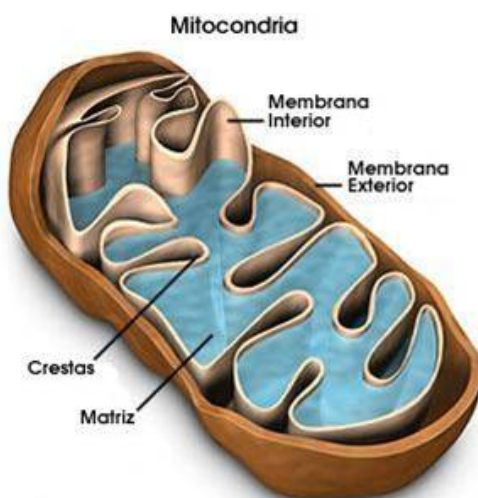


Figura 1. La mitocondria y sus compartimentos. Tomada de <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/imagenesorganelos.htm>.

En 1948 Kennedy y Lehninger descubrieron que en las mitocondrias de los organismos eucariontes se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. En éstos organelos se llevan a cabo muchos otros procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos y la

oxidación de aminoácidos. Además, este organelo contiene enzimas para la biosíntesis del grupo hemo y otras que están asociadas a la formación de cuerpos cetónicos.

LA CADENA RESPIRATORIA

Los componentes de la fosforilación oxidativa están organizados en complejos embebidos en la membrana interna mitocondrial, actuando en secuencia para la síntesis de ATP. En general, los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona a partir de los donadores NADH (complejo I) y succinato (complejo II). El complejo III transporta electrones desde la ubiquinona reducida al citocromo *c* y el complejo IV completa el proceso transfiriendo electrones desde el citocromo *c* al O_2 y reduciéndolo a H_2O . Las reacciones que llevan a cabo los complejos I, III, IV están acopladas a la translocación de protones de la matriz al espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa para la formación de ATP a partir de ADP y P_i .

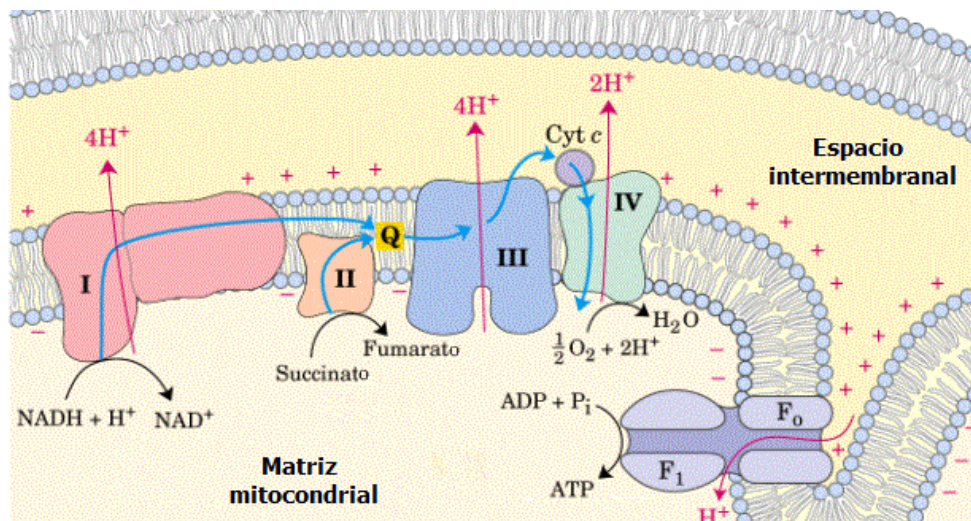
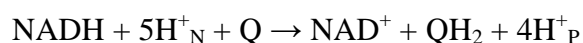


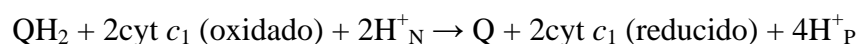
Figura 2. Complejos de la Fosforilación oxidativa. Modificada de ref. 1.

El complejo I (NADH deshidrogenasa) está compuesto por 42 subunidades incluyendo una flavoproteína con FMN y seis centros fierro-azufre (Fe-S); cataliza la transferencia de un ion hidruro del NADH hacia la ubiquinona y se considera una bomba de protones de la matriz al espacio intermembranal impulsada por las reacciones redox. La reacción global que realiza es la siguiente:



El complejo II (succinato deshidrogenasa) está ligado funcionalmente al ciclo de Krebs catalizando la oxidación del succinato al fumarato y la reducción de la ubiquinona a ubiquinol. Contiene cinco grupos prostéticos y cuatro subunidades proteicas. Las subunidades C y D contienen un grupo hemo *b* y un sitio de unión a la ubiquinona, mientras que las subunidades A y B contienen tres centros Fe-S, FAD unido y un sitio de unión al succinato.

El complejo III (ubiquinona: citocromo *c* óxido reductasa) acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*, además de translocar protones de la matriz al espacio intermembranal mediante el ciclo Q. La reacción global se muestra a continuación:



El citocromo *c* soluble transporta los electrones hasta el complejo IV.

De especial interés en este trabajo es el complejo IV (citocromo *c* oxidasa), el componente final de la cadena respiratoria, el cual es un complejo oligomérico membranal de 10-13 subunidades que contiene cuatro componentes redox: un centro binuclear Cu_A , los hemos *a* y *a*₃ y el ion cobre

Cu_B. Transporta electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular y actúa como una bomba translocando protones de la matriz al espacio intermembranal. La reacción global catalizada por el complejo es:

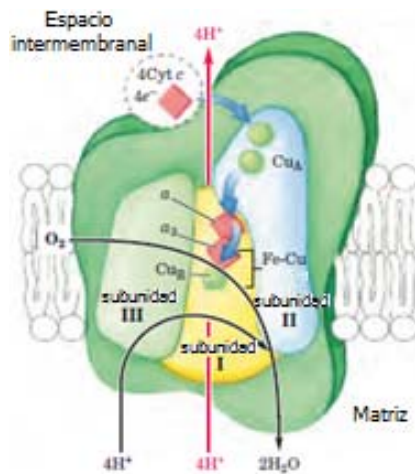
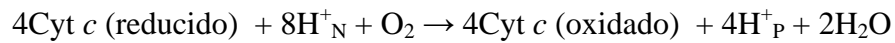


Figura 3. Complejo IV (ref. 1).

ORIGEN DE LA MITOCONDRIA

El origen de las mitocondrias se explica por la hipótesis de la endosimbiosis (2-4), en la cual se plantea que este organelo es descendiente de las α -proteobacterias de vida libre relacionadas con el grupo actual de los rickettsiales (5,6), que se integraron a un protoeucariote en una etapa temprana de la evolución (2). Evidencia filogenética respalda la idea de que todos los genomas mitocondriales son descendientes de un ancestro común, lo que indica que el genoma mitocondrial es monofilético (es decir, se originó solamente una vez en la evolución) (7).

Después del proceso de endosimbiosis, sobrevino una migración masiva de genes de la protomitocondria al núcleo (4), por lo que en la actualidad el ADN mitocondrial (ADNmt) tiende a ser en general muy pequeño, aunque es extraordinariamente diverso en tamaño, contenido de genes, organización y complejidad génica (2, 8-11). Se ha demostrado la existencia de genomas mitocondriales tanto lineales como circulares predominando el genoma circular, con variaciones en tamaño desde <6 Kb en *Plasmodium falciparum* (12) hasta >2000 Kb en algunas plantas cucurbitáceas (13). Con respecto al contenido de genes, éste es independiente del tamaño del genoma mitocondrial, debido a la presencia de regiones no codificantes. Por ejemplo, en la mayoría de los protistas el ADNmt es compacto, rico en genes y con menos de 10% de espacios intergénicos (14), mientras que en plantas, el contenido de genes estructurales es únicamente del 10 al 20% del ADNmt (15).

En la mayoría de los organismos, el genoma mitocondrial codifica para ARN ribosomales, ARN de transferencia y contiene 13 genes para proteínas de la membrana interna mitocondrial, que están involucradas en la fosforilación oxidativa: *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, y *nad6* (que codifican las subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6 de NADH:ubiquinona oxidoreductasa), *cob* (que codifica el citocromo *b* del complejo *bc₁*), *cox1*, *cox2*, y *cox3* (que codifican las subunidades COX I, COXII y COXIII de la citocromo *c* oxidasa) y *atp6* y *atp8* (que codifican las subunidades *a* y A6L de la porción F₀ del ATP sintasa).

Un ejemplo de un genoma mitocondrial reducido, lo constituyen las algas de la familia Chlamydomonadaceae, en la cual se encuentra *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. Estas algas carecen de los genes mitocondriales *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6* y *atp8* (16-18), siendo un rasgo característico de dicha familia, ya que estos genes migraron al núcleo.

MIGRACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES AL NÚCLEO

Los datos sugieren que la migración de genes mitocondriales al núcleo es un proceso evolutivo continuo. Se cree que dicha transferencia podría ser ventajosa desde el punto de vista evolutivo porque favorece la recombinación y minimiza las mutaciones (19). Los genes nucleares tienen un menor porcentaje de mutación que los mitocondriales y el núcleo parece tener un sistema más eficiente de reparación del ADN (20).

La migración de genes de la mitocondria al núcleo involucra los siguientes pasos: (i) la exportación de la molécula de ácido nucleico (ADN o ARN) (21), (ii) la integración al núcleo por recombinación no homóloga (22), (iii) la adquisición de una presecuencia por la duplicación de secuencias “blanco” existentes (23), (IV) adquisición de un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una señal de poliadenilación (20), (v) el cambio en uso de codones (20), (vi) modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido con hidrofobicidad local y meso-hidrofobicidad disminuidas, que pueda ser fácilmente importado a la mitocondria (24), (vii) la inactivación de la copia del gen mitocondrial y (viii) pérdida del gen mitocondrial (25).

Hace algunos años se demostró que los genes *cox2* (26) y *cox3* (27) de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. se encuentran en el genoma nuclear y que la copia mitocondrial correspondiente ya desapareció. Además se comprobó la presencia de las subunidades COX2 y COX3 en el complejo de la citocromo oxidasa. Para el caso del gen *cox2*, se encontró que éste se escindió en dos genes independientes, llamados *cox2a* y *cox2b*. El gen *cox2a* codifica para la proteína COX2A correspondiente al segmento N-terminal y a los dos cruces transmembranales de la subunidad COX2 del citocromo *c* oxidasa, además de presentar una presecuencia en el

N-terminal de 130 aminoácidos. Por su parte el gen *cox2b* codifica para la proteína COX2B. Se ha propuesto que el extremo C-terminal de COX2A interactúa con el extremo N-terminal de COX2B en la membrana interna formando así a la subunidad II heterodimérica de la citocromo *c* oxidasa (26).

IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA

Entre las proteínas que constituyen a la mitocondria, solamente unas pocas son sintetizadas en su interior (alrededor de 20), por lo que las mitocondrias requieren de una maquinaria especializada para importar al menos las 1000- 1500 proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol.

PRECURSORES CITOSÓLICOS

Las proteínas codificadas en el núcleo que tienen como destino final insertarse en algún compartimento de la mitocondria son llamadas precursores o pre-proteínas. La mayoría de ellas se encuentran en una conformación desplegada y asociadas a chaperonas que permiten su estabilización y protección a la degradación y a la agregación.

Las pre-proteínas contienen señales que son reconocidas por receptores en la superficie mitocondrial. Las señales son secuencias específicas que en la mayoría de los precursores se encuentran en el extremo N-terminal y son llamadas “secuencias blanco matriciales” (MTSs), aunque en algunos casos están contenidas en su interior (señales blanco internas).

Las MTSs (presecuencias) están constituidas por 10-80 residuos de aminoácidos que forman hélices anfipáticas y tienen la función de dirigir a la proteína hasta la matriz mitocondrial.

Las proteínas que carecen de una presecuencia en la región N-terminal generalmente contienen secuencias blanco internas que permiten la dirección a cualquier compartimento submitocondrial, pero en especial, al espacio intermembranal.

MAQUINARIA DE IMPORTACIÓN

Para que los precursores de proteínas mitocondriales ingresen a la mitocondria, es necesario que sus señales sean reconocidas por los receptores en la superficie de la mitocondria. Estos receptores se encuentran conformando complejos llamados translocasas de la membrana externa (TOM) e interna (TIM) y permiten el paso de los precursores a través de sus poros transmembranales.

Complejo TOM

La translocasa de la membrana externa (TOM) permite la entrada de todas las proteínas que son importadas a la mitocondria. Se encarga del reconocimiento de los dominios desplegados de las pre-proteínas y de su transferencia a través de la membrana externa.

TOM está compuesto por siete subunidades. Tom70 y Tom20 se encargan del reconocimiento de las pre-proteínas. Tom70 reconoce preferentemente las “señales blanco

internas” de precursores hidrofóbicos e interacciona específicamente con chaperonas, mientras que Tom20 reconoce las presecuencias mitocondriales (MTS). La subunidad Tom22 interactúa con Tom20 permitiendo el reconocimiento y despliegue de los precursores. El poro de importación de TOM está constituido por Tom40 y tres pequeñas subunidades (Tom5, Tom6 y Tom7) que estabilizan el complejo.

Complejo TIM23

El complejo TIM23¹ se encarga de la translocación de todas las proteínas de la matriz mitocondrial. También permite la importación de la mayoría de las proteínas de la membrana interna y de algunas proteínas del espacio intermembranal.

TIM23 requiere de la presencia de potencial de membrana ($\Delta\Psi$) a través de la membrana interna y de la hidrólisis de ATP para su función. Es decir, el paso de proteínas a través de la membrana interna mitocondrial es un proceso que requiere de energía.

El complejo TIM23 se puede subdividir en un sector de membrana y en el motor de importación.

El sector de membrana está constituido por Tim50, Tim23¹, Tim17 y Tim21 y su función es transferir la presecuencia de los precursores en un proceso dependiente de $\Delta\Psi$. Tim50 interactúa con la pre-proteína entrante, mientras que Tim21 se une al dominio del espacio intermembranal de Tom22, lo que ha sugerido la interacción del complejo TIM23 con el complejo TOM.

¹ TIM23 es el complejo de la membrana interna mitocondrial encargado de la translocación de proteínas, mientras que Tim23 es una subunidad que constituye al complejo TIM23.

El motor de importación genera un movimiento vectorial de la cadena desplegada del precursor. Está conformado por Tim44, Tim14, Tim16, mtHsp70 y Mge1. Tim44 interactúa con mtHsp70 que contiene un dominio capaz de hidrolizar ATP en la región N-terminal. La interacción de Tim14 con mtHsp70 ó Tim44 es dependiente de la concentración de ATP, por lo que se cree que Tim14 estimula la hidrólisis de ATP en mtHsp70 liberándolo de Tim44. De esta manera, la translocación de la cadena polipeptídica es favorecida por la hidrólisis de ATP, lo que permite que mtHsp70 se una a la cadena saliente y se libere de Tim44.

Complejo TIM22

El complejo TIM22² está constituido por tres proteínas membranales: Tim22², Tim54 y Tim18, siendo Tim22 la subunidad que conforma el centro del complejo. Se encarga de la importación de las proteínas acarreadoras y de las proteínas con numerosos cruces transmembranales que exponen su región N y C-terminal hacia el espacio intermembranal.

Tim22 se encuentra interaccionando con las “pequeñas proteínas Tim” en el espacio intermembranal, las cuales juegan un importante papel en el reconocimiento de sustratos por el complejo TIM22.

² TIM22 es el complejo de la membrana interna mitocondrial encargado de la translocación de proteínas, mientras que Tim22 es una subunidad que constituye al complejo TIM22.

Complejo TOB/SAM

El complejo TOB/SAM permite la inserción en la membrana interna de proteínas de membrana con estructura de barril β y está constituido por tres subunidades Tob55 (Sam50/Tom50), Mas37 (Sam37/Tom37) y Tob38 (Sam38/Tom38).

RUTAS DE IMPORTACIÓN

La figura 4 resume las diferentes rutas de importación para las proteínas dependiendo del compartimento mitocondrial al que se dirigen.

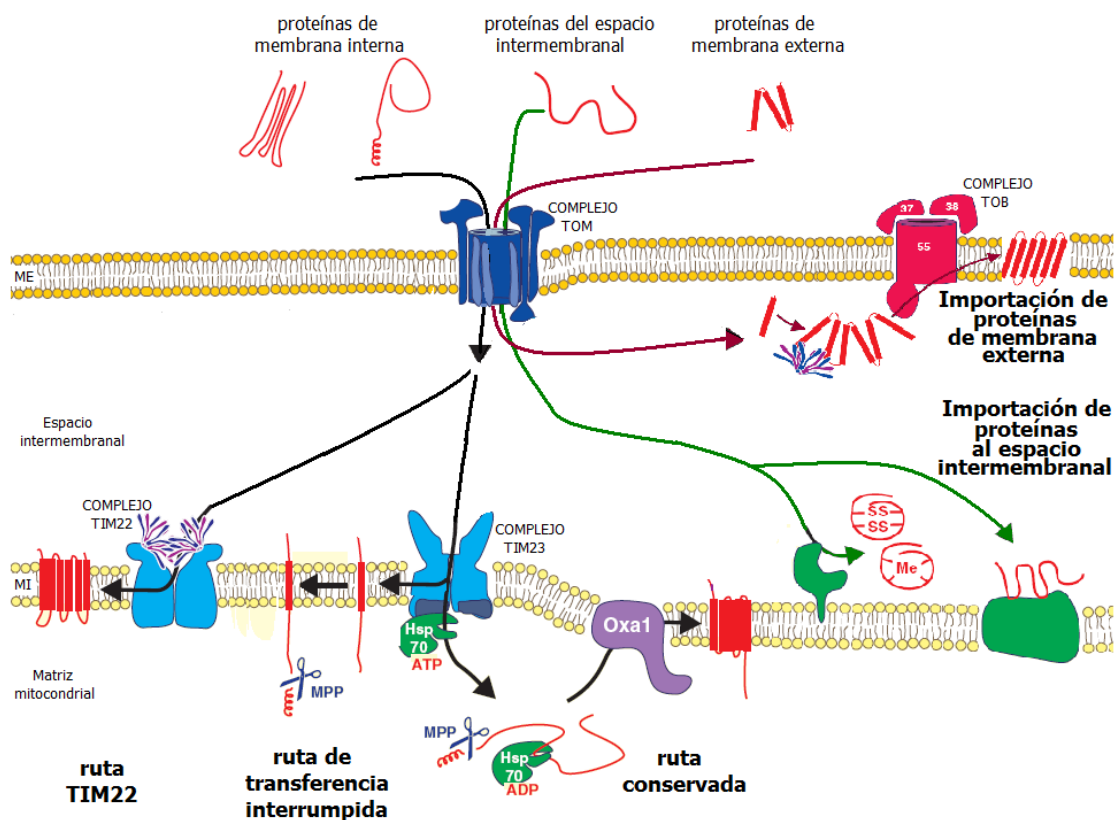


Figura 4. Rutas de importación mitocondrial (Modificada de ref. 28).

Importación de proteínas de membrana externa

Las proteínas de la membrana externa, por ejemplo las proteínas precursoras de barriles β interactúan inicialmente con la subunidad Tom20 del complejo TOM y enseguida atraviesan el poro. A continuación el complejo de las “pequeñas proteínas Tim” guían al precursor desde el complejo TOM al TOB como un proceso acoplado. Finalmente el precursor pasa a través de Tob55, facilitando la inserción en la membrana externa y el ensamblaje de las proteínas tipo barril- β .

Importación de proteínas de membrana interna

Ruta TIM22

Las proteínas acarreadoras y las subunidades del complejo TIM23 son importadas a la mitocondria por la ruta TIM22. Inicialmente, estas proteínas se unen a chaperonas citosólicas como Hsp70. A continuación, son reconocidas y atraviesan el complejo TOM permitiendo la interacción con las “pequeñas proteínas Tim” en el espacio intermembranal. En seguida, las proteínas son dirigidas al complejo TIM22 e insertadas en la bicapa lipídica de la membrana interna en un proceso dependiente del potencial de membrana.

Ruta conservada

Las proteínas con más de un cruce transmembranal y con presecuencias llevan a cabo su importación por medio de esta ruta.

Las proteínas son translocadas a la matriz mitocondrial mediada por la acción de TOM y TIM23 por lo que este mecanismo depende del potencial de membrana e hidrólisis de ATP. En la matriz, las pre-proteínas sufren un corte de la presecuencia por la acción de “peptidasas de procesamiento mitocondrial” (MPP) permaneciendo sólo la proteína madura, la cual se pliega e inserta a la membrana interna mediante la acción del complejo Oxa1.

Ruta de transferencia interrumpida

Las proteínas precursoras que contienen MTSs y un sólo dominio transmembranal son importadas por este mecanismo.

El proceso de importación involucra a los complejos TOM y TIM23 y depende del potencial de membrana e hidrólisis de ATP. La pre-proteína es translocada y detenida a nivel de la membrana interna en donde se promueve la inserción lateral del dominio transmembranal, mientras que la presecuencia en el extremo N-terminal es cortada por peptidasas de procesamiento mitocondrial en la matriz mitocondrial.

Importación de proteínas al espacio intermembranal

Las proteínas de bajo peso molecular que participan en reacciones metabólicas y bioenergéticas ingresan directamente al espacio intermembranal al ser reconocidas por el complejo TOM.

En el espacio intermembranal se promueve el plegamiento de las proteínas por la adquisición de cofactores o por la formación de puentes disulfuro, mientras que en algunos casos las proteínas se asocian con otras subunidades en el espacio intermembranal.

ALGAS CLOROFÍCEAS

Chlamydomonas reinhardtii

El alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* es utilizada como modelo de muchos procesos biológicos. Ha permitido el estudio de la biogénesis de cloroplastos (29) y el aislamiento de complejos de la fosforilación oxidativa (30 y 31), ya que puede ser manipulada genética y bioquímicamente. Una de sus principales características es que tiene la capacidad de crecer con luz como única fuente de energía (fotosíntesis) y en la obscuridad utilizando acetato como fuente de carbono (respiración).

Polytomella sp.

Polytomella sp. es un alga cuadriflagelada cercana al género *Chlamydomonas* con base en estudios morfológicos (32, 33), genético moleculares (34-37) y bioquímicos (38). El alga incolora se encuentra principalmente en estanques de agua dulce y zanjas en praderas (39) y se reproduce por fisión binaria y reproducción sexual (40). Contiene mitocondrias altamente organizadas cuando crece en un medio rico en sales, tiamina y acetato como fuente de carbono (41, 42).

A diferencia de *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. carece de pared celular y cloroplastos (43), por lo que ha sido utilizada para caracterizar complejos de la fosforilación oxidativa ya que facilita la purificación de mitocondrias libres de membranas tilacoidales (38,44).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Las algas clorofíceas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. tienen un genoma mitocondrial reducido que carece de los genes *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, y *atp8* (16-18). Todos estos genes migraron al núcleo.

A pesar de la ausencia del gen *cox2* en el genoma mitocondrial de *Polytomella* sp., estudios bioquímicos demostraron la presencia de subunidades COX2 en la citocromo *c* oxidasa. Asimismo se encontró que el gen *cox2* se escindió en dos genes independientes llamados *cox2a* y *cox2b*, los cuales se hallan localizados en diferentes cromosomas del genoma nuclear. El gen *cox2a* codifica a la proteína COX2A, correspondiente a la región N-terminal y a los dos cruces transmembranales de la subunidad COX2 de la citocromo *c* oxidasa, mientras que el gen *cox2b* codifica a la proteína COX2B, correspondiente a la región C-terminal de la subunidad COX2 ortodoxa. Ambas proteínas se sintetizan en el citosol, se internalizan en la mitocondria y se ensamblan junto con otras 10 subunidades para formar el complejo maduro de la citocromo oxidasa. Las subunidades COX2A y COX2B presentan extensiones atípicas de 20 aminoácidos en la región C-terminal de COX2A y de 42 aminoácidos en la región N-terminal de COX2B, por lo que se ha propuesto que la extensión C-terminal de COX2A podría interactuar con la extensión N-terminal de COX2B dando lugar a la subunidad COX2 heterodimérica de la citocromo *c* oxidasa. Además, se encontró que la subunidad COX2A, presenta un precursor con una secuencia blanco mitocondrial (MTS) de 130 aminoácidos (26).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se han descrito numerosas enfermedades mitocondriales provocadas por mutaciones de genes localizados en el ADNmt, para las cuales no existen hasta el momento terapias efectivas. El estudio de la importación de proteínas a la mitocondria juega un papel muy importante, ya que en un futuro será posible utilizar la información de esta investigación para el desarrollo de terapias génicas que involucren expresión alotópica. Teóricamente, se podría insertar una secuencia que codifique una secuencia blanco mitocondrial al gen de interés, permitiendo su transcripción y su posterior traducción en el citosol, para después dirigir a la proteína para su correcta importación al interior de la mitocondria. De esta manera, sería posible contrarrestar los efectos de un gen mitocondrial mutado, expresando a la proteína mitocondrial correspondiente desde el citosol. Antes de abordar este tipo de estrategias, resulta indispensable conocer más a fondo cual es el mecanismo de importación de aquellas proteínas cuyos genes migraron durante la evolución de la mitocondria al núcleo. Por eso, en este trabajo, abordamos el estudio de importación *in vitro* de las subunidades COX2A y COX2B de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* sp., para entender cuál es su ruta de internalización en la mitocondria.

HIPÓTESIS

La pre-proteína COX2A ingresa a las mitocondrias de *Polytomella* sp. en donde es editada su presecuencia. El proceso de importación es dependiente de $\Delta\Psi$.

La proteína COX2B ingresa al espacio intermembranal de las mitocondrias de *Polytomella* sp. pudiendo interactuar con la parte hidrofílica de COX2A para formar la subunidad COX2 heterodimérica de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* sp.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la ruta por la cual se lleva a cabo la importación a la mitocondria de las proteínas COX2A y COX2B, que constituyen la subunidad COX2 heterodimérica de la citocromo *c* oxidasa del alga *Polytomella* sp.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Clonar el gen *cox2a* en el vector de expresión adecuado.

Clonar el gen *cox2b* en el vector de expresión adecuado.

Sintetizar *in vitro* la proteína COX2A marcada con [S^{35}] metionina.

Sintetizar *in vitro* la proteína COX2B marcada con [S^{35}] metionina.

Obtener mitocondrias de *Polytomella* sp. que muestren control respiratorio, que generen potencial de membrana y que sean capaces de internalizar las pre-proteínas correspondientes.

Importar *in vitro* la proteína COX2A marcada en mitocondrias acopladas de *Polytomella* sp. e investigar su posible ruta de internalización.

Importar *in vitro* la proteína COX2B marcada en mitocondrias acopladas de *Polytomella* sp. e investigar su posible ruta de internalización.

Estudiar el papel del gradiente electroquímico y de la integridad membranal en la internalización de las proteínas COX2A y COX2B a las mitocondrias.

MATERIALES Y MÉTODOS

CLONACIÓN DE LOS GENES *cox2a* Y *cox2b* EN EL VECTOR PSP64

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los cDNAs de los genes *cox2a* (GenBankTM con el número de acceso AF305078) y *cox2b* (GenBankTM con el número de acceso AF305079).

Oligonucleótidos cebadores para amplificar *cox2a*

Cox2a_Forward 5'- TAT CTA GAA TGC TCG CCC AGC GTA TCT CT -3'

Cox2a_Reverse 5'- GCG AGC TCT ATC GGT GAT AGT CTT CTC AG -3'

Oligonucleótidos cebadores para amplificar *cox2b*

Cox2b_Forward 5'- TAC TGC AGA TGT CGG ATG CTA AGG ACC AG -3'

Cox2b_Reverse 5'- GCG GAG CTC TTA CTG AAT CCA CTT CTT GAC -3'

Condiciones de PCR

| | | |
|---------------------------|-------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 min |
| Desnaturalización | 94 °C | 1 min |
| Alineamiento | 55 °C | 1 min |
| Elongación | 72 °C | 1 min |
| Elongación final | 72 °C | 10 min |

Para la amplificación de *cox2a* y *cox2b* por PCR se programaron 35 ciclos de las condiciones antes mencionadas con mezclas de reacción que contenían 1 μ L de la genoteca de *Polytomella* sp. para *cox2a* y 1 μ g del plásmido pBluescript conteniendo el cDNAs de *cox2b*, independientemente. A cada reacción se adicionó 2 μ L de dNTPs 10 mM , 5 μ L de amortiguador 10X con 15 mM MgCl₂, 10 μ L de amortiguador Q, 2 μ L de oligonucleótidos (200 ng/ μ L), 1 μ L de la enzima Taq polimerasa ACCUZYME de Bioline y agua a un volumen final de 50 μ L. El producto de la reacción de PCR se cargó a un gel de agarosa al 1 % (1 g de agarosa disuelta en 100 mL de TAE 1X) en presencia de 1 μ L de bromuro de etidio (1%) y amortiguador TAE 1X (ver apéndice) y se sometió a electroforesis.

Las bandas amplificadas fueron purificadas mediante la utilización del protocolo “QIAquick Gel Extraction kit” de Qiagen. El ADN obtenido fue sometido a la adición de adeninas en los extremos para poder ser ligados al vector pGEM T-easy de Promega (Figura 5), en un medio de reacción que contenía el producto de PCR, amortiguador 10X con 15 mM MgCl₂, dNTPs 10 mM, 1 μ L de Taq polimerasa y agua a un volumen final de 35 μ L. La reacción se incubó durante 30 min a 72°C y se purificó siguiendo el protocolo “QIAquick PCR Purification Kit” de Qiagen.

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de ligación del producto de PCR en el vector pGEM T-easy de Promega (50 μ g/ μ L) en una relación 3:1 con la utilización de la enzima T4 DNA ligasa y amortiguador de ligación 2X. La reacción se incubó a 4°C durante 12 horas y el producto obtenido se utilizó para transformar en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α mediante un choque de temperatura. A continuación, se sembró en cajas con LB, ampicilina 100 μ g/mL, IPTG y X-gal, lo cual permitió identificar las colonias que contenían el inserto deseado.

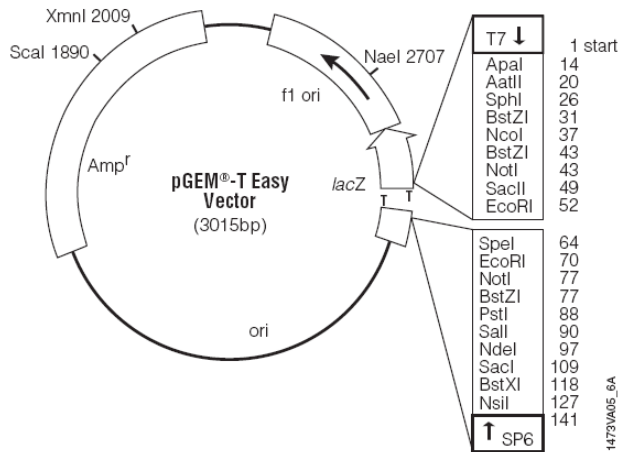


Figura 5. Vector pGEM®-T Easy de Promega

Los cDNAs de los genes *cox2a* y *cox2b* ligados al vector pGEM®-T Easy de Promega se sometieron a digestión para *cox2a* con las enzimas XbaI y SacI y para *cox2b* con PstI y SacI y fueron ligados al vector pSP64 Poly(A) de Promega (Figura 6) independientemente.

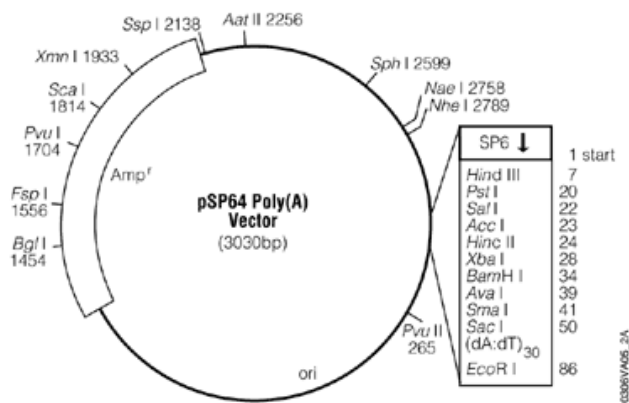


Figura 6. Vector pSP64 Poly(A) de Promega con el promotor SP6.

SÍNTESIS *in vitro* DE PROTEÍNAS

Los genes *cox2a* y *cox2b* clonados en el vector de expresión pSP64 Poly(A) de Promega, con el promotor SP6, fueron usados como templado para la correspondiente síntesis *in vitro* de las proteínas COX2A y COX2B marcadas radioactivamente mediante la utilización del sistema de reticulocitos de conejo TNT® de Promega, que acopla la transcripción y traducción de proteínas. Este sistema contiene reticulocitos de conejo, ARN polimerasa, inhibidor de ribonucleasas y una mezcla de aminoácidos. Las proteínas fueron marcadas con [³⁵S] metionina para determinar la síntesis peptídica por medio de geles y autorradiografía.

La reacción se llevó a cabo adicionando 40 µL de la solución del sistema comercial, 1 µg/µL de plásmido, entre 1-2 µL de [³⁵S] metionina y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µL. La reacción se incubó durante 90 min a 30°C e inmediatamente después se adicionó metionina no marcada incubando por 10 min en hielo. La proteína obtenida con este procedimiento se menciona en el resto del texto con el nombre de “proteína sin precipitar”.

En algunos casos se precipitó a la proteína recién sintetizada adicionando 100 µL de sulfato de amonio saturado por cada 50 µL de reacción de síntesis. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm y el botón obtenido se resuspendió con 50 µL de urea 8 M en amortiguador Tris-maleico 10 mM (pH 6.8), e inmediatamente después, se refrigeró a -70°C (La proteína tratada con sulfato de amonio se menciona en esta tesis con el nombre de “proteína precipitada”).

CULTIVO DEL ALGA *Polytomella* sp.

Primeramente, para el cultivo del alga *Polytomella* sp., se adicionaron 200 μ L de la solución estéril de vitaminas a 2 litros de medio Mes (ver apéndice), contenidos en un matraz de fondo ancho con capacidad de 2.5 litros. Un pre-cultivo de *Polytomella* sp. fue inoculado en dos contenedores de este tipo e incubada entre 48 - 60 hr. a 25 °C sin agitación mecánica.

OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE *Polytomella* sp.

Se aislaron mitocondrias de *Polytomella* sp. mediante una modificación del método enzimático descrito para *Sacharomyces cereviceae* (45), desarrollado en colaboración con el laboratorio del Dr. Salvador Uribe (IFC, UNAM).

Primeramente las células se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos en el rotor JA-10 BECKMAN utilizando la centrífuga Avanti J-26 XP BECKMAN. El botón obtenido se resuspendió en el amortiguador A que contiene sorbitol y manitol como estabilizadores osmóticos. Se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos y las células se resuspendieron en el amortiguador A con PMSF 200 mM y EDTA 0.5 M (pH 8.1) en relación 0.5 g de peso húmedo/mL y se rompieron mecánicamente con la ayuda del homogeneizador de vidrio DOUNCE de 7 mL, pasando el vástago 3 veces sin hacer espuma.

El producto obtenido se sometió a centrifugación diferencial (46), primeramente, a 1,500 rpm durante 10 min y, a continuación, el sobrenadante se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a 4 °C en el rotor JA-25.50 de BECKMAN. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces, obteniendo

así un botón de mitocondrias, el cual se resuspendió cuidadosamente con la ayuda de un pincel en 200 μL de amortiguador A.

Se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteína de las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. mediante el método de Biuret (47), con mediciones por triplicado a 540 nm en el espectrofotómetro SHIMADZU UV-160A. La celda de cada reacción contenía 25 μL de mitocondrias aisladas, 125 μL de desoxicolato de sodio al 5% y reactivo de Biuret hasta un volumen final de 2500 μL , la reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

OXIMETRÍA

Para conocer si las mitocondrias eran capaces de generar y mantener un potencial electroquímico se midió el consumo de oxígeno. Mediante el uso del oxímetro (Oxygen Meter 782, Strathkelvin Instruments, Uk), se realizaron mediciones utilizando un medio con Manitol 0.6 M - Mes 5 mM (pH 6.8), H_3PO_4 30 mM, MgCl_2 200 μM y NAD 2 mM, así como también 2 mg de mitocondrias de *Polytomella* sp., ADP 200 μM y etanol o malato como sustratos oxidables. Las reacciones se realizaron a 25°C en un volumen final de 100 μL . De esta manera, como medida del acoplamiento de las mitocondrias aisladas, se determinó el consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de un sustrato oxidable (estado II) y en el estado activo (estado III) en presencia de ADP, en donde se promueve el aumento de la transferencia de electrones, consumo de oxígeno y síntesis de ATP. Es importante señalar que en este trabajo, se asumió que la tasa de respiración en el estado II es similar al estado IV, por lo que el control respiratorio mitocondrial (C.R.) se calculó al obtener la relación del consumo de oxígeno del estado III y el estado IV (II).

El cultivo, la obtención de mitocondrias, la medición de la concentración de proteína y la oximetría se realizaron previo a cada ensayo de importación, ya que las mitocondrias del alga son incapaces de mantener el control respiratorio después de ser congeladas y descongeladas.

ENSAYOS DE IMPORTACIÓN *in vitro*.

Se realizaron ensayos de importación *in vitro* modificando condiciones y la adición de sustratos.

En los ensayos de importación se puso en contacto la proteína sintetizada *in vitro* (25 μ L o 37.5 μ L) y las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. (250 μ g prot/mL). Las reacciones se llevaron a cabo a 25° C durante 30 min, en presencia de amortiguador de transporte 1X y la adición de sustratos como ATP 2 mM, GTP 2 mM, NAD 2mM, etanol o malato 10 mM, fosfocreatina 10mM y cinasa de creatina (25 unidades).

Se probaron diferentes condiciones tal como la adición de una mezcla de antimicina, valinomicina y oligomicina (AVO), quedando a una concentración de 0.8 mM, 0.1 mM y 2 mM respectivamente. Estos reactivos son ionóforos e inhibidores de la cadena respiratoria y de la síntesis de ATP y, en conjunto, aseguran que no habrá fosforilación oxidativa y por lo tanto, tampoco se formará un gradiente electroquímico. También, se llevaron a cabo ensayos de importación en un medio desprovisto de osmolitos en el que se agregó únicamente Hepes 20 mM pH 7.2 (en ausencia de amortiguador de transporte 1X) ocasionando el rompimiento parcial de las mitocondrias por choque osmótico. Este control indica que, en ausencia de membranas integras, la importación de proteínas no se llevará a cabo.

Cómo control de importación, las reacciones fueron divididas en dos y a una de ellas se les adicionó proteinasa K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubó durante 15 min en hielo, permitiendo la degradación proteolítica de la proteína que no ingresó a las mitocondrias. Al final de la proteólisis, se agregó a la mezcla 2.5 μL de PMSF 200 mM y se incubó en hielo durante 10 min.

Cada par de reacciones se centrifugaron 5 minutos a 14,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 900 μL de amortiguador de lavado, se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm y al botón obtenido se le adicionó 30 μL de amortiguador de carga para geles desnaturalizantes de SDS (48), se incubó 5 minutos a 65°C y se cargaron en un gel de acrilamida al 14% (ver apéndice).

Después de la corrida electroforética, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF utilizando una cámara de transferencia semihúmeda. Primeramente, se mojaron 3 cuadros de papel filtro Whatman de 11.5 x 17.5 cm en el amortiguador del ánodo, los cuales se colocaron en la cámara, después se humedeció la membrana de PVDF en metanol, se sumergió en el mismo amortiguador y se procedió a colocarla sobre los papeles filtro en la cámara. En seguida se humedeció el gel junto con 3 pedazos de papel filtro Whatman en el amortiguador del cátodo y se colocaron, primeramente, el gel sobre la membrana de PVDF y a continuación, los papeles filtro. La transferencia se realizó durante 90 min a 1 mA/cm^2 de la membrana. Posteriormente, la membrana se secó y se dejó exponiendo en la pantalla de detección de fosforescencia marca Amersham Biosciences durante aproximadamente 20 h y se digitalizó la señal en el Typhoon 9400 de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

RESULTADOS

CONSTRUCCIÓN DE CLONAS

El cDNA del gen *cox2b* presente en el vector pBluescript fue transferido al vector pGEM®-T Easy y al vector pSP64 Poly(A) de Promega.

El cDNA del gen *cox2a* fue amplificado de la biblioteca de cDNA genómico del alga *Polytomella* sp. y clonado en el vector pGEM®-T Easy y al vector pSP64 Poly(A) de Promega.

OXIMETRÍA

Para la determinación de la integridad de las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp., se midió el consumo de oxígeno en el estado III y IV (Figura 7), la relación entre ellos nos indica si las mitocondrias al respirar forman un gradiente de protones que es aprovechado por la ATP sintasa para formar ATP a partir del ADP y Pi. En el caso de que se encuentren acopladas, al adicionar ADP en presencia del sustrato respiratorio, se estimula el consumo de oxígeno, lo que indica que las mitocondrias se encuentran formando un gradiente electroquímico, capaz de permitir la síntesis de ATP. Este gradiente electroquímico también es indispensable para que se lleve a cabo la importación de proteínas, ya que su cruce a través de la membrana interna es dependiente del $\Delta\Psi$.

Los datos obtenidos del control respiratorio (C.R.) oscilan de preparación a preparación entre 1.5 y 3.0, lo cual nos indica que tenemos mitocondrias intactas que respiran y que son capaces de generar un potencial de membrana, que es necesario para los ensayos de importación *in vitro*. Las preparaciones mitocondriales que no mostraban control respiratorio se desecharon.

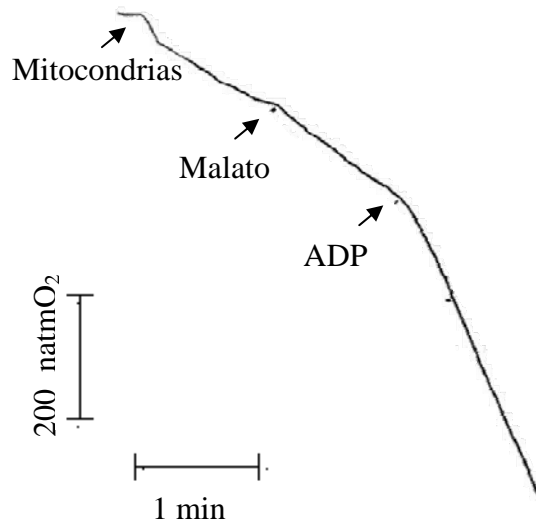


Figura 7. Control respiratorio de mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.

Con el objetivo de obtener un extracto de mitocondrias íntegras y, por tanto, con mayor control respiratorio, el extracto crudo de mitocondrias de *Polytomella* sp. se sometió a centrifugación en un gradiente de Percoll (figura 8). Para ello a 2.2 mL de sacarosa, se colocaron suavemente 6.55 mL de Percoll y a éste, 12.25 mL del amortiguador B (sorbitol 0.75M, manitol 0.4M y Tris-maleico 10mM) y se adicionaron 150 μL del extracto crudo de mitocondrias aisladas (Figura 8). A continuación se centrifugó durante 40 minutos en el rotor sw40Ti a 18,400 rpm. Se recuperó la banda de interés y se le agregaron 10 volúmenes del amortiguador B, para después centrifugar 15 minutos en el rotor SS34 a 10,000 rpm. El botón obtenido, correspondiente a la fracción mitocondrial, se resuspendió nuevamente en 50 μL del amortiguador B y se caracterizó en un ensayo de oximetría (Figura 9).

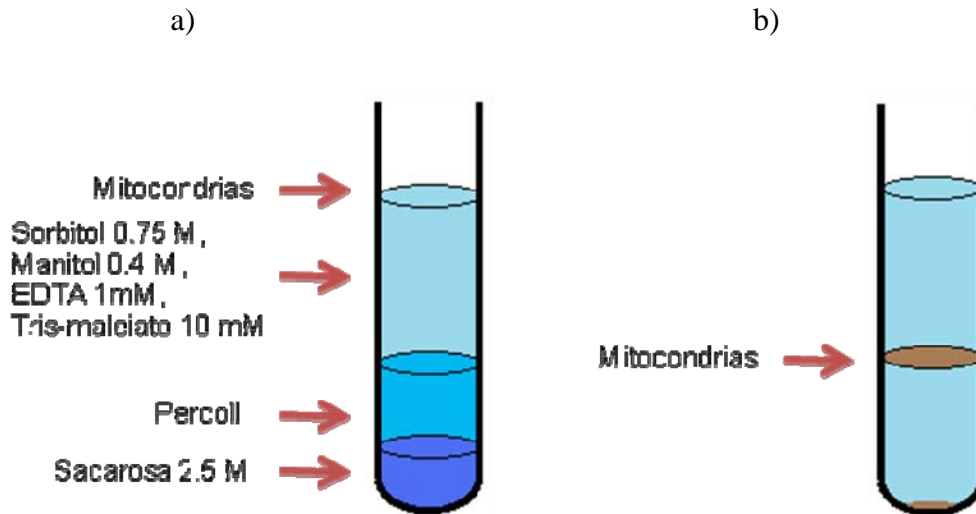


Figura 8. a) Esquema de las fases observadas para el gradiente de Percoll del extracto crudo de mitocondrias de *Polytomella* sp. b) Banda obtenida de mitocondrias integras.

Se midió el control respiratorio tanto del extracto crudo como del extracto purificado a través del gradiente de Percoll. Se observó que el extracto crudo de mitocondrias presentó un control respiratorio de 2.4 y 1.21 usando malato y etanol como sustratos respectivamente, mientras que las mitocondrias obtenidas después del gradiente de Percoll presentaron un control respiratorio de 1.32 y de 1.0 con malato y etanol como sustratos, respectivamente (figura 9).

El tratamiento del extracto crudo de mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. con el gradiente de Percoll ocasiona una disminución en su control respiratorio, a pesar de que aumenta la pureza de la fracción mitocondrial. En experimentos subsecuentes, se optó por no utilizar el fraccionamiento en gradientes de Percoll.

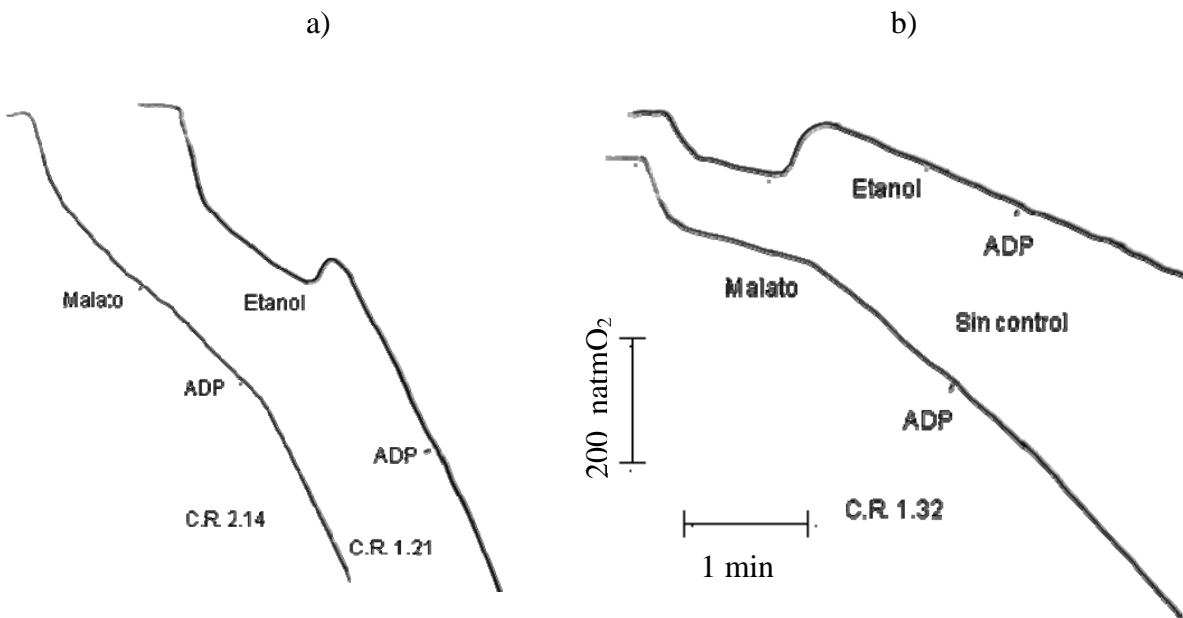


Figura 9. Oximetría de a) extracto crudo b) extracto tratado con gradiente de Percoll de mitocondrias de *Polytomella* sp.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS *in vitro*.

La síntesis de proteínas se llevó a cabo con el sistema de reticulocitos de conejo de la compañía de Promega. La pre-proteína ALDH de rata se sintetizó bajo la regulación del promotor T7, mientras que las proteínas pre-COX2A, COX2A (madura) y COX2B lo hicieron bajo la regulación del promotor SP6.

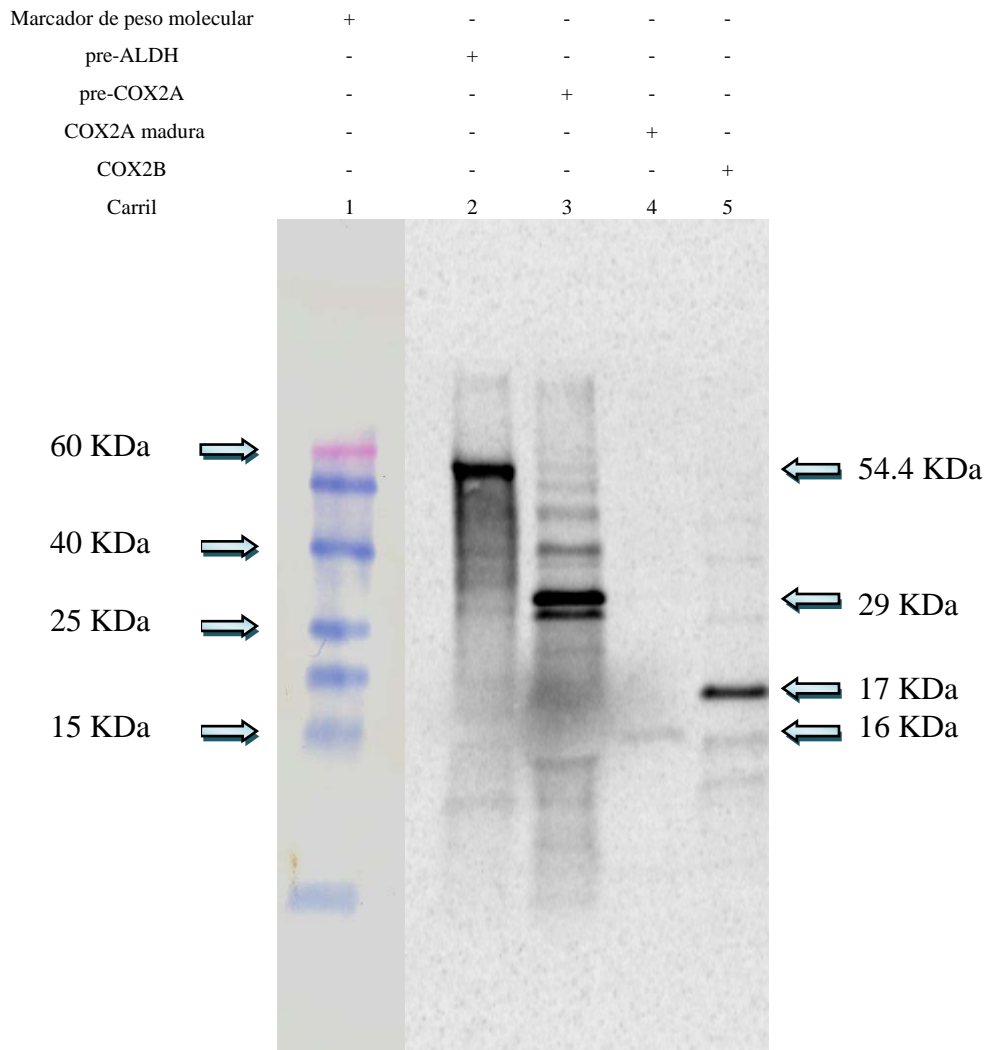


Figura 10. Autorradiografía de la síntesis de proteínas en el sistema de reticulocitos de conejo. Carril 1: marcador de masa molecular; 2: pre-ALDH; 3: pre-COX2A; 4: COX2A (madura); 5: COX2B

En la figura 10 se muestra el patrón electroforético de las proteínas utilizadas en los ensayos de importación, corridas en un gel de acrilamida al 14%. En el carril 1 se muestra el patrón del marcador de masa molecular para proteínas, mientras que en los carriles 2 al 5 se muestra la marca radioactiva de las proteínas sintetizadas *in vitro*. Los pesos moleculares obtenidos de cada proteína son similares a los teóricos.

También se probó la síntesis de COX2A y COX2B en el sistema TNT[®] con extracto de germen de trigo, que acopla la transcripción y traducción en el mismo sistema. Las proteínas se marcaron con [³⁵S] metionina.

En la figura 11 se compara la síntesis de COX2A y COX2B en los dos sistemas de Promega, observando que la síntesis más limpia (con menos bandas contaminantes) se obtiene utilizando el extracto de germen de trigo. Las proteínas sintetizadas *in vitro* fueron tratadas con proteinasa K, observando que todas son susceptibles a proteólisis. En la gran mayoría de los experimentos de importación se utilizaron proteínas sintetizadas en el sistema de reticulocitos de conejo, ya que en general, el rendimiento de la proteína marcada era mayor.

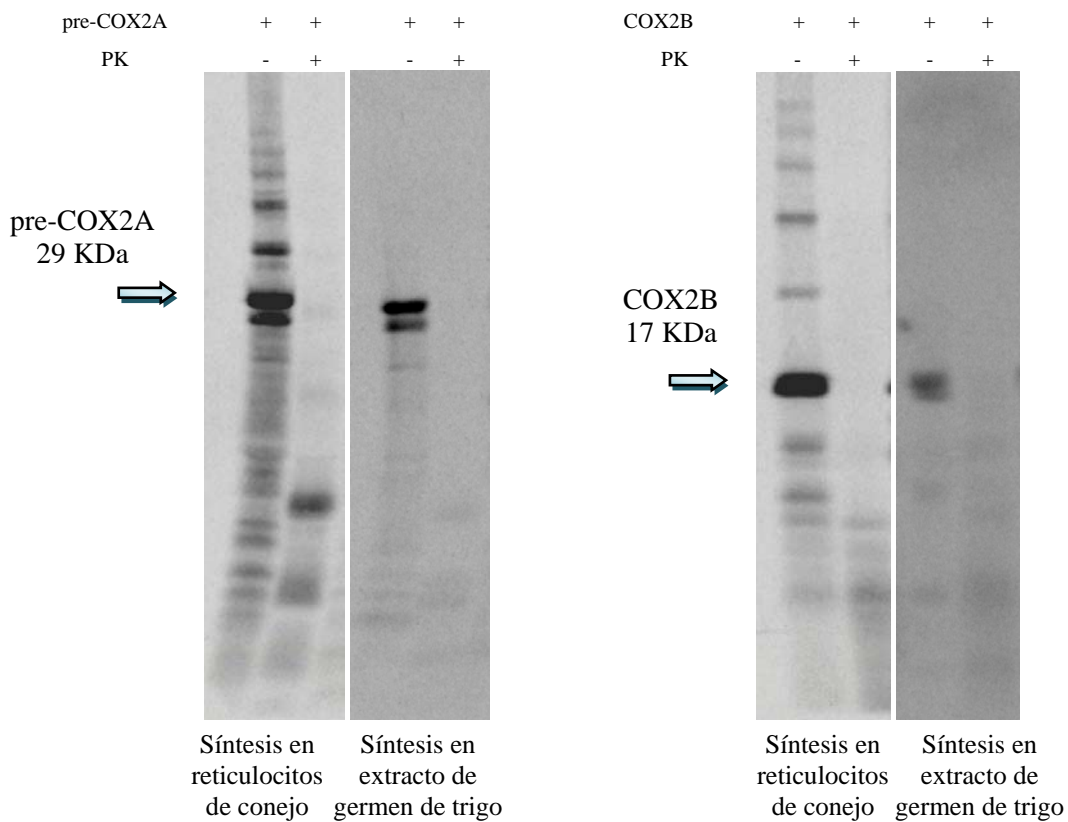


Figura 11. Autorradiografía de la síntesis de COX2A y COX2B en el sistema de reticulocitos de conejo y extracto de germen de trigo.

IMPORTACIÓN

Se llevaron a cabo ensayos de importación con diferentes proteínas, en diferentes condiciones, como se describe enseguida:

Se realizaron ensayos clásicos de importación en donde se mantiene viables a las mitocondrias (en presencia de sustratos oxidables). Además, se realizaron ensayos adicionando una mezcla de antimicina, valinomicina y oligomicina (AVO) que ocasiona el abatimiento del potencial de membrana de las mitocondrias, lo cual inhibe la importación de aquellas proteínas que cruzan la membrana interna e ingresan hasta la matriz mitocondrial. Así mismo, se realizaron reacciones en ausencia de osmolitos, lo que promueve el rompimiento de las mitocondrias por choque osmótico. La ruptura de las membranas mitocondriales debe exponer a las proteínas que se importaron a la acción de las proteasas. Cada una de las reacciones realizadas bajo las tres condiciones de importación mencionadas son divididas en dos alícuotas. Una de ellas es tratada con proteinasa K, la cual remueve toda aquella proteína que se encuentre fuera de la mitocondria. Es precisamente la protección a la proteólisis, en los ensayos de importación, lo que nos indica una internalización exitosa de la proteína a la mitocondria.

Para comprobar si el sistema de importación *in vitro* es capaz de internalizar proteínas, se llevó a cabo la importación de la proteína aldehído deshidrogenasa (ALDH) de rata en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. (figura 12). Esta proteína ha sido utilizada en diversos estudios clásicos de importación en mitocondrias aisladas de rata.

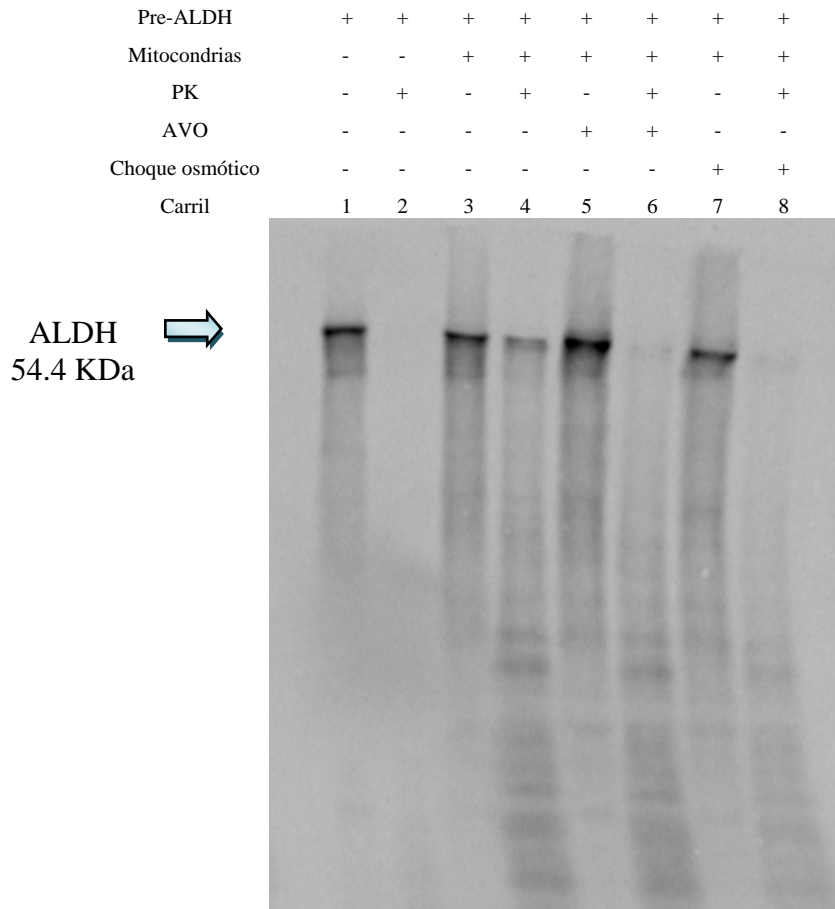


Figura 12. Autorradiografía del ensayo de importación de ALDH de rata en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.. Carriles 1 y 2: síntesis de ALDH; 3 y 4: reacción clásica de importación; 5 y 6: reacción en presencia de AVO; 7 y 8: reacción en ausencia de osmolitos; 2, 4, 6 y 8: tratamiento con proteinasa K.

En la figura 12 se muestra la proteína ALDH sintetizada *in vitro* (carril 1), la cual al ser tratada con proteinasa K (carril 2) es completamente degradada. Al realizar un ensayo de importación clásico se obtuvo que la ALDH de rata ingresa a mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. (carriles 3 y 4), ya que una porción de la proteína adquiere resistencia a la acción de la proteinasa K. Al adicionar AVO y eliminar el potencial de membrana se pierde la resistencia a proteasa (carriles 5 y 6) indicando que la importación de la ALDH hasta la matriz mitocondria requiere de un gradiente electroquímico. En el ensayo de importación con rompimiento de mitocondrias por

choque osmótico no existe resistencia de la ALDH a la proteinasa K, como es de esperarse cuando las membranas no se encuentran íntegras.

La pre-proteína ALDH de rata contiene una presecuencia y se ha observado su procesamiento al internalizarse hasta la matriz mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Al realizar ensayos de importación en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. fue posible observar un comportamiento similar, aunque la presecuencia no es procesada. La internalización de esta proteína control nos indica que el sistema es funcional en la importación de proteínas, pero que las proteasas que remueven las presecuencias de los precursores del alga, no reconocen el sitio de procesamiento de la proteína de rata.

ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CON COX2B

La importación *in vitro* de COX2B en mitocondrias de *Polytomella* sp. se llevó a cabo en diferentes condiciones experimentales, como se muestra en la figura 13. En ella se presenta la autorradiografía de un ensayo de importación de la proteína precipitada COX2B (en condiciones desnaturalizantes), utilizando mitocondrias con un control respiratorio de 1.43 con etanol como sustrato, observando un comportamiento similar al de la importación de ALDH. En el carril 1 se encuentra como control la proteína sintetizada *in vitro*, mientras que en carril 2 se corrió dicha proteína tratada con proteinasa K, en donde se demuestra que el polipéptido de COX2B es completamente susceptible a proteólisis.

La protección a la degradación por proteólisis en los ensayos de importación nos indica la internalización de la proteína COX2B, como se puede observar en los carriles 4 y 6 (Figura 13). Este fenómeno ocurre aún en ensayos en ausencia de un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial (carriles 5 y 6), por lo que se propone que la subunidad COX2B ingresa solamente al espacio intermembranal y no requiere de potencial de membrana para internalizarse a las mitocondrias. También se observó un decremento importante de la proteína internalizada después de someter a las mitocondrias a un choque osmótico (carriles 7 y 8).

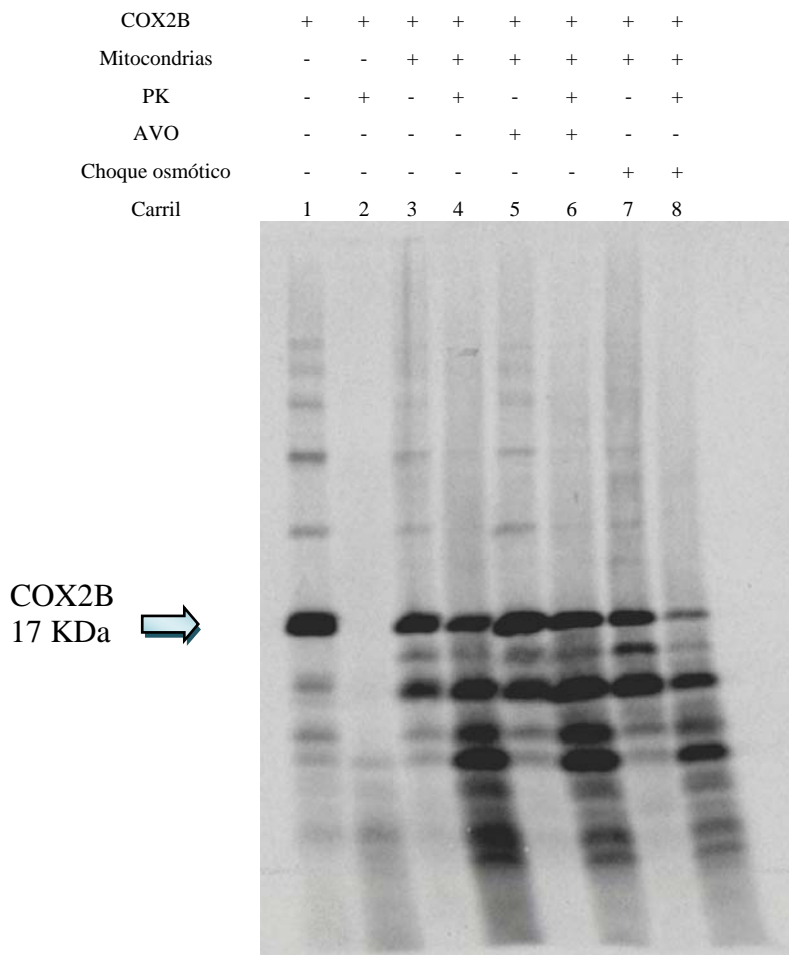


Figura 13. Autorradiografía del ensayo de importación de COX2B precipitada en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.. Carriles 1 y 2: síntesis de COX2B; 3 y 4: reacción clásica de importación; 5 y 6: reacción en presencia de AVO; 7 y 8: reacción en ausencia de osmolitos; 2, 4, 6 y 8: tratamiento con proteinasa K.

Para corroborar el compartimiento mitocondrial al que ingresa COX2B, se realizaron ensayos de importación a diferentes concentraciones de digitonina para permeabilizar la membrana externa mitocondrial (figura 14), con la idea de exponer a la proteína que ingresó hasta el espacio intermembranal a la acción de la proteinasa K.

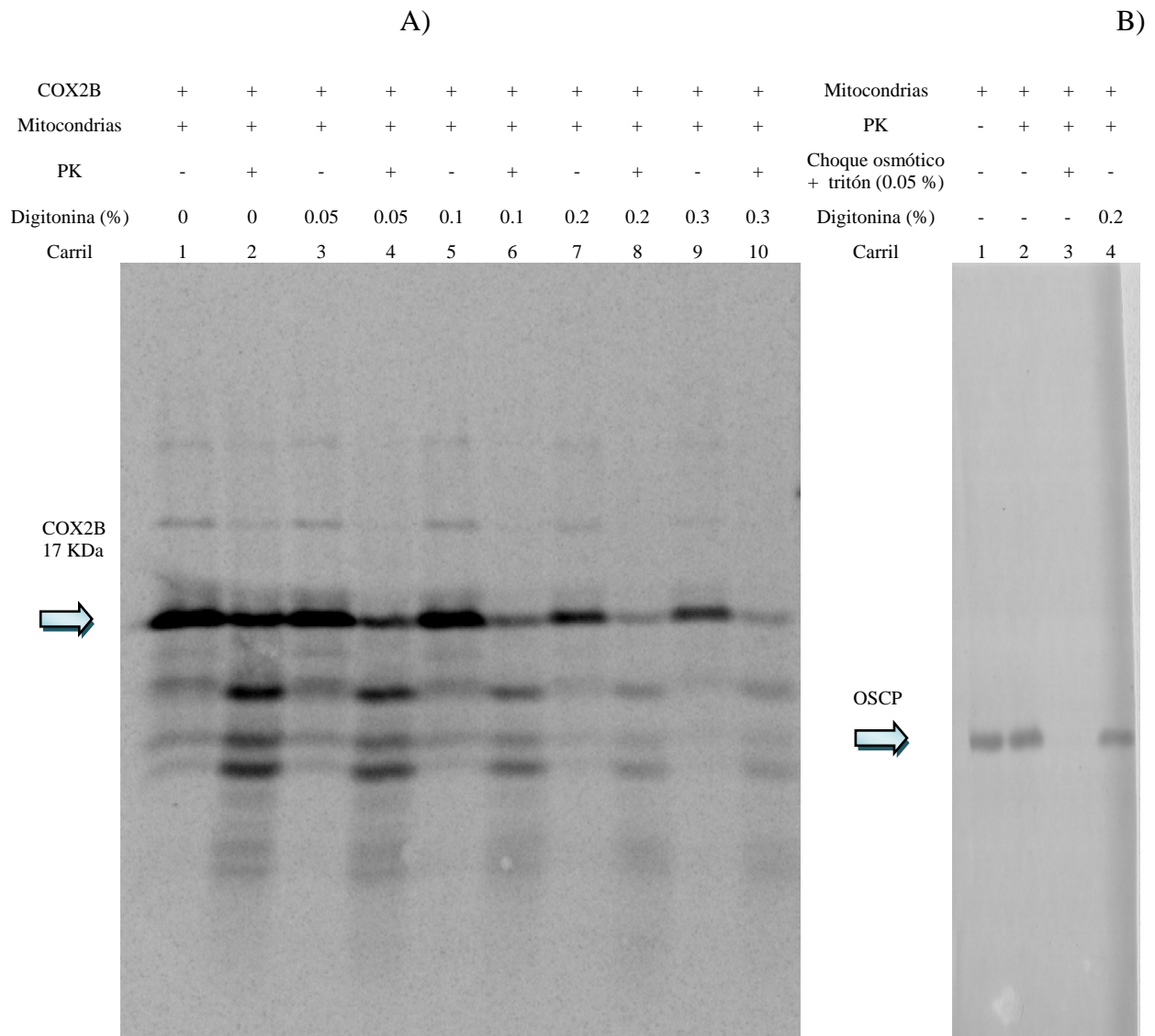


Figura 14. A) Autorradiografía del ensayo de importación de COX2B precipitada en mitocondrias aisladas de *Polytomella sp.* adicionando diferentes concentraciones de digitonina. B) Inmunodetección de la proteína de matriz mitocondrial (OSCP) en las condiciones indicadas.

En la figura 14 panel A, se presenta la autorradiografía de ensayos de importación de la proteína COX2B con diferentes concentraciones de digitonina. Se realizaron ensayos clásicos de importación incubando cada reacción durante 30 min a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se adicionó diferentes concentraciones de digitonina a cada reacción y se incubó durante 30 min en hielo. Al finalizar se adicionó proteinasa K para degradar a las proteínas que no se internalizaron. De esta manera se observó que al aumentar el porcentaje de digitonina, la protección a proteólisis de COX2B es menor. Al adicionar 0.05% de digitonina ya es posible observar la disminución de la banda de COX2B en presencia de proteasa (carril 4) en comparación a la reacción carente de detergente (carril 2). En las reacciones con 0.1, 0.2 y 0.3 % de digitonina es posible observar un poco de la proteína (carriles 6, 8 y 10), sin embargo la cantidad de ésta en comparación con el carril 2 es mínima (de la misma manera que sucede en el caso del carril 8 en la figura 14).

Con el fin de comprobar la integridad de la membrana interna en los experimentos con digitonina, se realizó una inmunodetección de la proteína OSCP (subunidad de la ATP sintasa que se encuentra en la matriz mitocondrial) en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. bajo diferentes condiciones (figura 14, panel B). La proteína OSCP fue detectada en las mitocondrias integras de *Polytomella* sp. en presencia (carril 2, panel B) y en ausencia (carril 1, panel B) de proteinasa K. Sin embargo, cuando se promovió el rompimiento de la mitocondrias en un amortiguador carente de osmolitos y en presencia del detergente Tritón X-100 al 0.05%, no fue posible detectar a la proteína OSCP (carril 3, panel B). Las mitocondrias tratadas con 0.2 % de digitonina contienen a la proteína OSCP (carril 4, panel B), lo cual permite inferir la presencia de la membrana interna intacta a esta concentración de detergente.

Las imágenes de la figura 14 muestran que en concentraciones menores al 0.2 % de digitonina, la proteína COX2B está expuesta a la acción de la proteasa, lo cual apoya la idea de que COX2B ingresa solamente hasta el espacio intermembranal.

ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CON COX2A

Se llevaron a cabo ensayos de importación de la proteína COX2A en las mismas condiciones en la que se observó importación de COX2B como se muestra a continuación:

En la figura 15 se presenta la autoradiografía de un ensayo de importación de la proteína COX2A sin precipitar. En estas reacciones no se logra observar resistencia a proteólisis en el carril 4 de la reacción clásica, lo que indica que COX2A no está ingresando a las mitocondrias de *Polytomella* sp., ya que se esperaría encontrar una banda de 16 KDa (peso molecular esperado para COX2A madura) resistente a la acción de la proteínasa K.

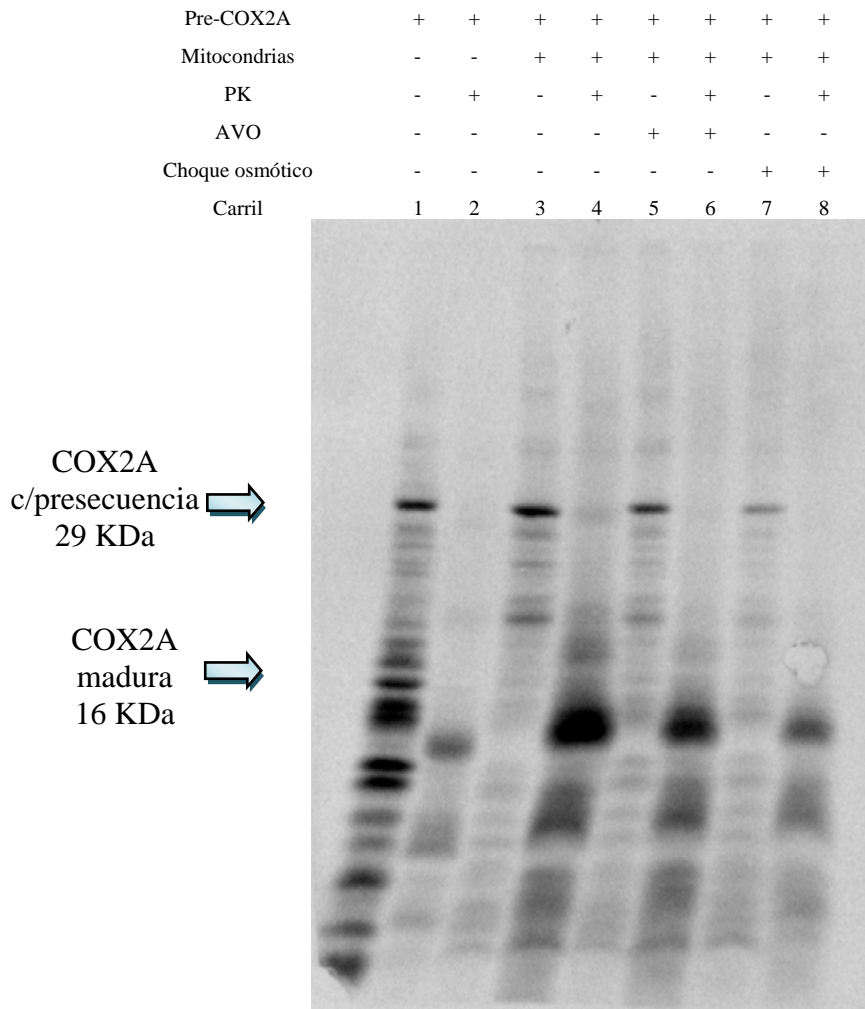


Figura 15. Autorradiografía del ensayo de importación de COX2A en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.. Carriles 1 y 2: síntesis de COX2A; 3 y 4: reacción clásica de importación; 5 y 6: reacción en presencia de AVO; 7 y 8: reacción en ausencia de osmolitos; 2, 4, 6 y 8: tratamiento con proteinasa K.

UTILIZACIÓN DE EXTRACTO CITOSÓLICO DE *Polytomella* sp.

Ya que COX2A es una proteína hidrofóbica, con dos cruces transmembranales, pensamos que su internalización a la mitocondria podría requerir de elementos citosólicos específicos del alga (alguna chaperona, por ejemplo).

Para determinar la probable acción de alguna chaperona de *Polytomella* sp. necesaria para la importación de COX2A, se obtuvo un extracto citosólico del alga y se concentraron sus componentes utilizando un filtro Amicon ultra de 10,000 MWCO.

Se probaron diferentes condiciones de importación para la proteína COX2A utilizando la proteína sintetizada con reticulocitos de conejo o extracto de germen de trigo, ya sea precipitada o sin precipitar. Además se llevó a cabo la adición de extracto citosólico durante la síntesis e importación de COX2A (Tabla 1). En ninguna de estas pruebas se logró observar resistencia a proteasa de la proteína COX2A o lo que es lo mismo, nunca observamos internalización de COX2A en las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.

Tabla 1. Diferentes condiciones de ensayos probadas para la importación de COX2A

| Reacción | Síntesis | | COX2A | | Extracto citosólico (chaperonas) | |
|----------|----------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|----------------------------------|---------------------|
| | En Reticulocitos de conejo | En extracto de germen de trigo | Sin precipitar | Precipitada | Durante síntesis | Durante importación |
| 1 | Sí | | Sí | | | |
| 2 | Sí | | | Sí | | |
| 3 | Sí | | Sí | | Sí | |
| 4 | Sí | | Sí | | | Sí |
| 5 | Sí | | | Sí | | Sí |
| 6 | | Sí | Sí | | | |
| 7 | | Sí | Sí | | Sí | |
| 8 | | Sí | Sí | | | Sí |

ENSAYOS DE IMPORTACIÓN CO-TRADUCCIONALES

Es conocido que algunas proteínas son importadas a los organelos mientras que son sintetizadas, en un proceso de importación co-traduccional. Con esta idea, se realizaron ensayos para determinar si COX2A se importaba co-traduccionamente en las mitocondrias de *Polytomella* sp.

Se intentó acoplar el sistema de síntesis *in vitro* con el de importación. Para ello, se probó la síntesis de COX2A en presencia de los sustratos y el amortiguador de importación, encontrando que aún diluyendo la reacción del sistema de síntesis tanto de reticulocitos como de germen de trigo es posible seguir sintetizando a la proteína *in vitro*. Además, se determinó el efecto del sistema de síntesis de reticulocitos de conejo y del extracto de germen de trigo sobre la capacidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias, obteniendo que dichos sistemas modifican ligeramente el C.R. Por lo anterior, se procedió a realizar los ensayos de importación poniendo en contacto las mitocondrias aisladas, la reacción con los sustratos necesarios para la síntesis de COX2A, el amortiguador de transporte y los sustratos indispensables para la importación de proteínas.

Los resultados de estos ensayos tampoco mostraron importación de la proteína COX2A en las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.

ENSAYOS DE IMPORTACIÓN DE COX2A CON GTP

Debido a la ausencia de importación de COX2A en las diferentes condiciones exploradas, se buscaron nuevas condiciones que permitirán la internalización de COX2A. Uno de las principales modificaciones fue la utilización de una preparación mitocondrial más pura. Anteriormente se había estado trabajando con extractos mitocondriales con residuos de almidón (proveniente de los amiloplastos del alga) que posiblemente afectan la reacción de importación, de esta manera, se realizaron lavados ulteriores de las mitocondrias para eliminar el exceso de almidón en las muestras. Asimismo, se llevo a cabo la adición de una mezcla de ATP/GTP 2 mM en los ensayos de importación. Los cambios mencionados nos permitieron observar por primera vez la

internalización de la proteína COX2A en las mitocondrias de *Polytomella* sp. y la edición de la presecuencia mitocondrial, al realizar ensayos de importación utilizando la proteína COX2A sin precipitar (proteína COX2A en contacto con reticulocitos de conejo).

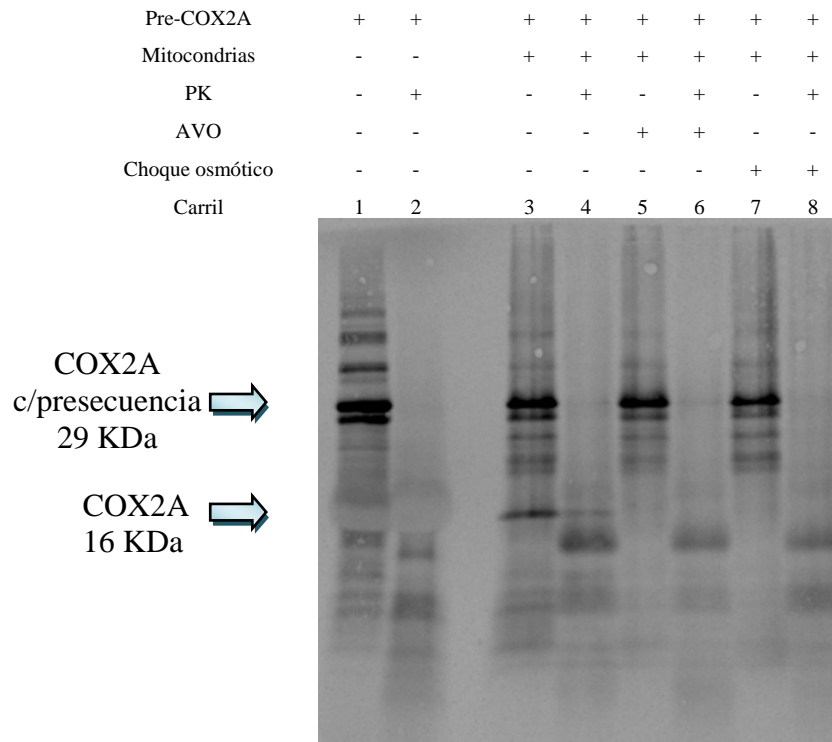


Figura 16. Autorradiografía del ensayo de importación de COX2A sin precipitar en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp.. Carriles 1 y 2: síntesis de COX2A; 3 y 4: reacción clásica de importación; 5 y 6: reacción en presencia de AVO; 7 y 8: reacción en ausencia de osmolitos; 2, 4, 6 y 8: tratamiento con proteinasa K.

En la figura 16 se observa la síntesis de COX2A (carril 1) susceptible a proteólisis (carril 2). En el ensayo de importación clásico se observa la presencia de una banda cercana al peso molecular esperado de la proteína madura de 16 KDa. Al ser tratada con proteinasa dicha banda no es degradada completamente, lo que indica que COX2A ingresó a las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. y en el proceso se removió la presecuencia de 130 aminoácidos (carriles 3 y 4).

En la reacción con adición de desacoplantes no se observa el mismo patrón que la reacción clásica al no estar presente la banda de 16 KDa, lo cual revela que la internalización de COX2A requiere del potencial de membrana, sugiriendo también que COX2A ingresa hasta la matriz mitocondrial (carriles 5 y 6). En la reacción que promueve el rompimiento de las mitocondrias (carriles 7 y 8) no se observa resistencia a proteasa indicando ausencia de importación, cuando los organelos no se encuentran intactos.

DISCUSIÓN

HIDROFOBICIDAD DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES CODIFICADAS EN EL NÚCLEO

Polytomella sp. es un alga clorofícea que carece del gen *cox2* en el genoma mitocondrial. Dicho gen se fragmentó en dos genes (*cox2a* y *cox2b*), los cuales migraron independientemente al núcleo y, probablemente, se encuentran actualmente en diferentes cromosomas. Este fue un evento de interés desde el punto de vista evolutivo, ya que la transferencia de genes que codifican para proteínas con dos o más cruces transmembranales suele ser poco común debido a la dificultad de importar a las proteínas correspondientes a la mitocondria (24, 49, 50). El mecanismo por el cual se llevó a cabo con éxito la migración de una subunidad hidrofóbica con una función indispensable para la fosforilación oxidativa, es aún desconocido, no obstante, la fragmentación del gen presumiblemente pudo haber facilitado tanto la migración de los genes como la subsecuente importación a la mitocondria de sus productos proteicos correspondientes.

El gen *cox2a* en el genoma nuclear de *Polytomella sp.* muestra ciertas características comúnmente adquiridas en el proceso de migración de genes mitocondriales al núcleo. El gen *cox2a* codifica para una proteína con una hidrofobicidad menor en comparación con las proteínas COX2 codificadas en la mitocondria (26). Experimentos de importación *in vitro* en mitocondrias de legumbres (51) e *in vivo* en *S. cerevisiae* (52), demostraron que el simple cambio de uno o dos aminoácidos en el primer cruce transmembranal de la proteína COX2, reducen la hidrofobicidad local y permiten la importación de dicha proteína a las mitocondrias.

***Chlamydomonas reinhardtii* Y *Polytomella* sp.**

La fragmentación del gen *cox2* en *cox2a* y *cox2b*, así como su migración al genoma nuclear es una característica tanto del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* como del alga incolora *Polytomella* sp.

Ensayos de importación *in vitro* realizados en mitocondrias aisladas de *C. reinhardtii* han permitido la importación con éxito de la subunidad α y β de la ATPsintasa y de la proteína FeS de Rieske (53). Sin embargo, el estudio de la importación *in vitro* de COX2A y COX2B en *Polytomella* sp. presenta ventajas técnicas adicionales, ya que, al carecer esta alga de pared celular y cloroplastos, facilita el rompimiento de las células y la obtención de una preparación mitocondrial con control respiratorio y libre de cloroplastos.

MITOCONDRIAS DE *Polytomella* sp.

La alta calidad de la preparación mitocondrial es indispensable para ensayos de importación *in vitro*. En este trabajo aislamos mitocondrias de *Polytomella* sp. acopladas que exhibieron controles respiratorios (C.R.) de entre 1.5 y 3.0. Aunque los C.R. conseguidos son menores a los obtenidos con mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, hígado de rata o corazón de bovino, éstos son comparables con el C.R. de 2.4 en mitocondrias aisladas de *Chlamydomonas reinhardtii* (54); las cuales al ser sometidas a ensayos de importación *in vitro*, permitieron la internalización de diferentes proteínas (53). Las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. también mostraron ser viables para ensayos de importación *in vitro*, ya que son capaces de importar la ALDH de rata, una proteína usada ampliamente como un indicador del proceso de importación dependiente de potencial de membrana de la mitocondria.

MAQUINARIA DE IMPORTACIÓN EN *Polytomella* sp.

Se han estudiado las subunidades que participan en la importación de proteínas a la mitocondria, así como también las rutas o mecanismos que siguen algunas proteínas para su ingreso tomando como sistema de estudio a *Saccharomyces cerevisiae*. Figueroa-Martínez y col. (2008), identificaron varios componentes de la maquinaria de importación mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* al realizar una comparación del genoma del alga con el genoma de *S. cerevisiae*. De esta manera se logró identificar la presencia de las subunidades que constituyen a los TOM (Translocadores de la membrana externa), TIM22 y TIM23 (Translocadores de la membrana interna) y la maquinaria de ensamblaje TOB/SAM (55). Algunos componentes de levadura no están presentes en el alga, lo que sugiere que algunos receptores pueden haber divergido en secuencia y quizá también en su función.

Hasta el momento no se ha secuenciado el genoma de *Polytomella* sp., por lo que no conocemos la existencia de las TOM y TIM22 y TIM23, sin embargo, debido a su parentesco cercano con *C. reinhardtii*, inferimos que contiene una maquinaria semejante y que, por lo tanto, esta alga lleva a cabo mecanismos similares de importación de proteínas al interior de la mitocondria.

PRESECUENCIAS MITOCONDRIALES (EL CASO DE COX2A)

Una de las principales características adquiridas durante la migración de genes al núcleo es la adquisición de secuencias de bases que codifican presecuencias de aminoácidos que guían a las pre-proteínas hasta su compartimento específico en la mitocondria. Las presecuencias carecen de

una secuencia conservada de aminoácidos, pero se ha propuesto que la estructura secundaria (una alfa-hélice anfipática) es determinante para la importación de los precursores (56).

Las presecuencias que forman α hélices anfipáticas de alrededor de 30 a 70 aminoácidos son esenciales para ser reconocidas por los receptores de las translocasas (complejo TOM). En *C. reinhardtii* se ha observado la presencia de presecuencias con una longitud mayor a los 100 aminoácidos, en el caso de COX2A, COX3, ATP6 y NAD4L (57), por lo que es posible que el gran tamaño de estas presecuencias facilite la importación de las proteínas hidrofóbicas (24, 59, 60). Se ha sugerido también que estas presecuencias tan largas podrían ser procesadas varias veces, en diferentes sitios, lo que sugiere mecanismos de importación con múltiples pasos.

En los ensayos de importación *in vitro* de COX2A en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. se observó la presencia de dos bandas que no se encuentran en la mezcla de proteínas sintetizadas *in vitro* (figura 16, carril 3). Éstas bandas localizadas entre el precursor y la proteína madura sugieren la formación de dos intermediarios en el proceso de maduración de COX2A, lo que indica que la presecuencia de 130 aminoácidos podría ser cortada en tres ocasiones. Es importante hacer notar que las dos bandas no son resistentes a la proteinasa K (figura 16, carril 4), probablemente porque los intermediarios no se internalizan totalmente en la matriz mitocondrial y una parte de ellos queda todavía expuesta a la acción de la proteasa.

Resultados similares se han obtenido al estudiar la importación de la proteína COX2 de soya (60). En legumbres, el gen *cox2* que codifica para la subunidad COX2 de la citocromo *c* oxidasa, también migró del genoma mitocondrial al nuclear, pero como un gen intacto. Ya en el núcleo, adquirió una secuencia nucleotídica que codifica para una presecuencia de 136 aminoácidos. En experimentos de importación, se encontró que dicha presecuencia es editada en tres ocasiones y

que podría tener tres diferentes funciones: direccionar al precursor, eficientar la importación y permitir la correcta maduración de la proteína. El corte en tres secciones de la presecuencia se lleva a cabo tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembranal, permitiendo la inserción de COX2 en la membrana interna con sus extremos N y C-terminales expuestos en la cara de dicha membrana que está expuesta hacia el espacio intermembranal (figura 17) (60).

Los precursores de proteínas con presecuencias en la región N-terminal que requieren ser insertadas en la membrana interna y contienen más de un dominio transmembranal, preferentemente siguen la ruta de importación “conservada”. Algunos ejemplos representativos son la subunidad 9 de la F_0F_1 -ATPasa de *N. crassa*, Oxa1, así como Cox18/Oxa2, Mrs2 y Yta10 de levadura (61-64). Estas proteínas son transportadas hasta la matriz mitocondrial en un proceso en el cual participa el complejo TOM y el complejo TIM23. Así mismo, se encuentran las proteínas con presecuencias que son insertadas directamente en la membrana interna sin pasar a la matriz mitocondrial, como es el caso de COX5a en levadura (65-67). Los experimentos realizados en este trabajo no nos permiten diferenciar entre los dos procesos de importación que pudiera seguir COX2A. Sin embargo, la similitud en las características de COX2 de soya con base en la longitud de la presecuencia tripartita y el requerimiento de un potencial de membrana, sugieren que COX2A de *Polytomella* sp. podría seguir un mecanismo de importación semejante al de COX2 de soya (ver figura 17).

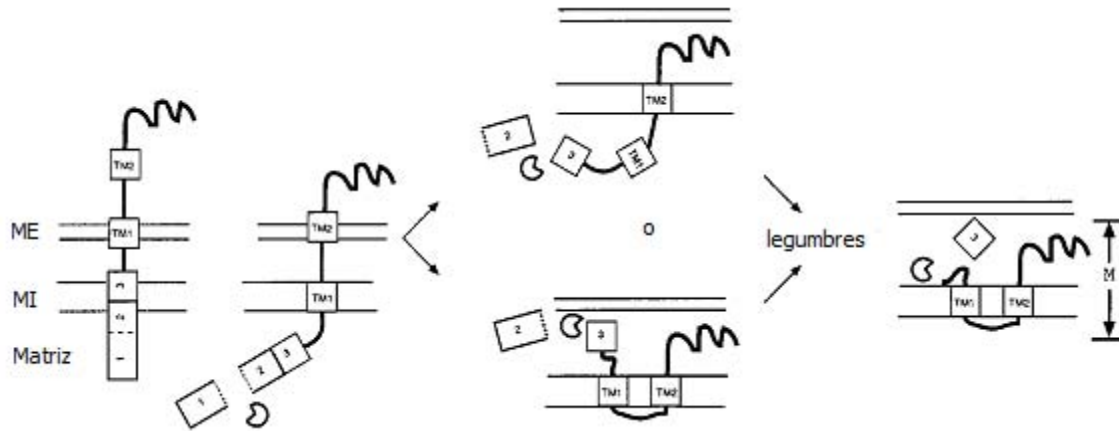


Figura 17. Mecanismo de importación de COX2 de soja con una presecuencia tripartita (Modificada de ref. 60).

IMPORTACIÓN SIN PRESECUENCIA MITOCONDRIAL (EL CASO DE COX2B)

Las proteínas que carecen de una presecuencia en el extremo N-terminal generalmente son dirigidas al espacio intermembranar. Uno de los mecanismos mejor caracterizados en la importación de proteínas al espacio intermembranar lo constituye el citocromo *c*. Experimentos de importación demostraron que el citocromo *c* ingresa a las mitocondrias como apocitocromo (citocromo *c* sin el grupo hemo) a través del complejo TOM. Al ingresar al espacio intermembranar, el apocitocromo *c* interactúa con la citocromo *c* hemo liasa (CCHL) localizada en la cara externa de la membrana interna. La unión entre estas proteínas es estable, lo que asegura el mantenimiento de la apocitocromo en el espacio intermembranar. Finalmente, la CCHL se encarga de fijar covalentemente el grupo hemo al apocitocromo promoviendo el plegamiento en su forma nativa y la disociación y liberación del citocromo *c* en el espacio intermembranar (figura 18A) (68-70). El citocromo *c*, plegado y unido covalentemente al grupo hemo, queda atrapado en el espacio intermembranar.

Experimentos de importación *in vitro* demostraron que COX2B no requiere del potencial de membrana para su ingreso a las mitocondrias de *Polytomella* sp. La proteína COX2B, al carecer de una presecuencia, es posible que contenga una señal interna que la dirija a la mitocondria y pueda ser reconocida por el complejo TOM, permitiendo su ingreso hasta el espacio intermembranal. De esta manera, COX2B podría interactuar con la parte hidrofílica de COX2A, permaneciendo anclada a esta proteína de membrana, a diferencia del citocromo *c* que es liberado al espacio intermembranal como una proteína soluble (figura 18B). Además, la proteína COX2B madura también tiene un grupo prostético, el centro de cobre diatómico Cu_A. Se desconoce en que momento del proceso se inserta este grupo prostético para formar la proteína madura.

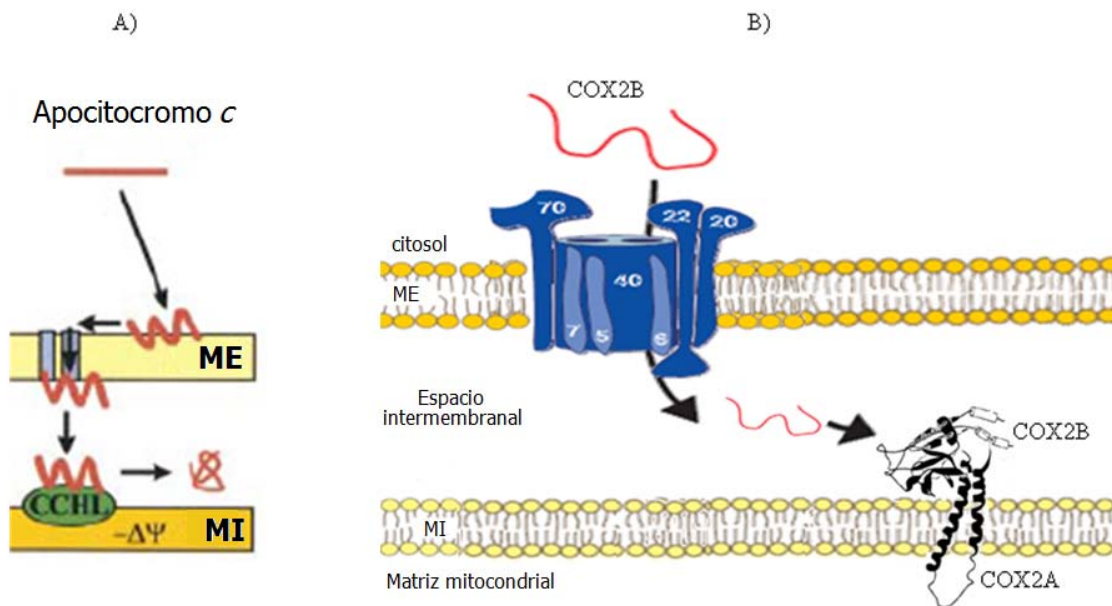


Figura 18. A) Modelo de importación del apocitocromo *c* al espacio intermembranal de la mitocondria (Modificada de ref. 68); B) Probable ruta de importación de COX2B en mitocondrias de *Polytomella* sp.

CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA IMPORTACIÓN

Las pre-proteínas varían en sus requerimientos para su importación a la mitocondria, por ejemplo, algunas de ellas se encuentran asociadas a chaperonas en el espacio intermembranal que le permiten el reconocimiento por el complejo TOM. En experimentos de importación *in vitro*, se ha observado que algunas proteínas requieren de un tratamiento con urea para poder ser importadas, mientras que otras permiten su internalización usadas directamente con la reacción de síntesis de reticulocitos de conejo, por ejemplo la subunidad β y la subunidad α de la porción de la ATPsintasa en *C. reinhardtii*, respectivamente (53).

Los ensayos de importación *in vitro* de COX2B revelaron que dicha proteína requiere de cierto estado desnaturalizado para su ingreso a las mitocondrias de *Polytomella* sp., debido a que solo se internalizó la proteína “precipitada”, es decir, la proteína requirió de un tratamiento de precipitación y resuspensión en urea previo a los ensayos de importación. Como ya se mencionó, algunas proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo no presentan una presecuencia que las guíe hacia la mitocondria, en su lugar se cree que poseen una secuencia interna que actúa como “señal” para su direccionamiento hasta el organelo. En el caso de COX2B, un previo tratamiento de desnaturalización fue requisito para su importación. Probablemente su estado desplegado puede dar acceso a la señal de internalización y ser reconocida por la translocasa de la membrana externa.

A diferencia de COX2B, la importación de COX2A se observó utilizando la proteína sin precipitar, es decir, se adicionó la proteína sintetizada con la mezcla de reticulocitos de conejo directamente a la reacción de importación. Esto sugiere que probablemente se lleve a cabo una interacción con algún componente presente en la reacción de síntesis con los reticulocitos de

conejo, que le permite a COX2A un cierto grado de plegamiento para ser reconocida por el complejo TOM. Hipotetizamos que alguna chaperona es la responsable de mantener al precursor de COX2A parcialmente desplegado, evitando al mismo tiempo su agregación.

CONCLUSIÓN

En experimentos *in vitro*, la proteína sintetizada COX2B ingresa a las mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. sin necesidad de un gradiente electroquímico, permaneciendo en el espacio intermembranal. En este espacio probablemente interactúa con el extremo C-terminal de COX2A para así conformar el complejo heterodimérico COX2.

En el caso de la proteína COX2A, los ensayos de importación *in vitro* sugieren que COX2A requiere del potencial de membrana para su importación a las mitocondrias y su presecuencia es procesada en varias ocasiones. Posiblemente, la importación de COX2A sea dependiente de GTP.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se logro obtener las condiciones *in vitro* para la importación exitosa de COX2A y COX2B, sin embargo queda por determinarse el camino específico que siguen estas proteínas al internalizarse en las mitocondrias.

Es sabido que la presecuencia juega un papel fundamental en el proceso de importación, por lo que sería importante profundizar en el estudio de los distintos dominios de esta secuencia para determinar su función específica en el proceso. Es posible que esto se pueda lograr sintetizando proteínas carentes de ciertas regiones de la presecuencia y así conocer la parte determinante en la importación de COX2A.

De igual manera, sería importante conocer las subunidades específicas de los translocadores en *Polytomella* sp. que participan en la importación de ambas proteínas. Así como también, sería interesante indagar sobre el mecanismo de ensamblaje de COX2A en la membrana interna mitocondrial (por ejemplo, ¿Es necesario que llegue primero a la matriz mitocondrial para después insertarse en la membrana interna?).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Nelson DL, Cox MM. (2005) *Lehninger principios de bioquímica*, 4^a edición, Ediciones Omega, Barcelona.
- 2 Margulis L. (1970) *The origin of Eukaryotic cells*. Yale University Press. New Haven, USA.
- 3 Gray MW, Doolittle WF. (1982) *Microbiol Rev.* **46**:1-42.
- 4 Gray MW. (1992) *Int Rev Cytol.* **141**:233-357.
- 5 Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CR. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:4443-7.
- 6 Gray MW, Spencer DF. (1996) *Evolution of Microbial Life*. Cambridge Univ. Press. pp. 109-126
- 7 Gray MW, Burger G, Lang BF. (1999) *Science.* **283**:1476-81.
- 8 Gray MW. (1989) *Annu Rev Cell Biol.* **5**:25-50.
- 9 Gillham NW. (1994) *Organelle Genes and Genomes*. Oxford University Press, New York, NY.
- 10 Leblanc C, Richard O, Kloareg B, Viehmann S, Zetsche K, Boyen C. (1997) *Curr Genet.* **31**:193-207.
- 11 Paquin B, Laforest MJ, Forget L, Roewer I, Wang Z, Longcore J, Lang BF. (1997) *Curr Genet.* **31**:380-95.
- 12 Feagin JE. (2000) *Int J Parasitol.* **30**:371-90.
- 13 Stern DB, Newton KJ. (1985) *Curr Genet.* **9**:395-404.
- 14 Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y, Burger G. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**:865-78.
- 15 Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG. (2003) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **358**:165-77.
- 16 Michaelis G, Vahrenholz C, Pratje E. (1990) *Mol Gen Genet.* **223**:211-6.
- 17 Denovan-Wright EM, Nedelcu AM, Lee RW. (1998) *Plant Mol Biol.* **36**:285-95.
- 18 Kroymann J, Zetsche K. (1998) *J Mol Evol.* **47**:431-40.
- 19 Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV. (1998) *Nature.* **393**:162-5.

- 20 Neckelmann N, Li K, Wade RP, Shuster R, Wallace DC. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:7580-4.
- 21 Adams KL, Song K, Roessler PG, Nugent JM, Doyle JL, Doyle JJ, Palmer JD. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:13863-8.
- 22 Sun CW, Callis J. (1993) *Plant Cell.* **5**:97-107.
- 23 Kadowaki K, Kubo N, Ozawa K, Hirai A. (1996) *EMBO J.* **15**:6652-61.
- 24 Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C. (1995) *Eur J Biochem.* **228**:762-71.
- 25 Grohmann L, Brennicke A, Schuster W. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**:5641-6.
- 26 Pérez-Martínez X, Antaramian A, Vazquez-Acevedo M, Funes S, Tolkunova E, d'Alayer J, Claros MG, Davidson E, King MP, González-Halphen D. (2001) *J Biol Chem.* **276**:11302-9.
- 27 Pérez-Martínez X, Vazquez-Acevedo M, Tolkunova E, Funes S, Claros MG, Davidson E, King MP, González-Halphen D. (2000) *J Biol Chem.* **275**:30144-52.
- 28 Neupert W, Herrmann JM. (2007) *Annu Rev Biochem.* **76**:723-49.
- 29 Harris EH. (2001) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **52**:363-406.
- 30 Atteia A, de Vitry C, Pierre Y, Popot JL. (1992) *J Biol Chem.* **267**:226-34.
- 31 Atteia A. (1994) *C R Acad Sci III.* **317**:11-9.
- 32 Melkonian N. (1990) in *Handbook of Protoctista*. Johns and Bartlett, Boston, MA. pp 608–616.
- 33 Mattox KR, Stewart KD. (1984) in *Systematics of the Green Algae*. Academic Press, London. pp 29–72.
- 34 Melkonian M., Surek B. (1995) *Bull. Soc. Zool. Fr.* **120**:191–208.
- 35 Conner T. W., Thompson M. D., Silflow CD. (1989) *Gene.* **84**:345-58.
- 36 Antaramian A., Coria R., Ramírez J., González-Halphen D. (1996) *Biochim Biophys Acta.* **1273**:198-202.
- 37 Nedelcu A., Spencer DF, Denovan-Wright EM., Lee RW. (1996) *J. Phycol.* **32**:103–111.
- 38 Atteia A., Dreyfus G., González-Halphen D. (1997) *Biochim Biophys Acta.* **1320**:275-84.
- 39 Pringsheim, EG. (1955) *The genus Polytomella. J. Protozool.* **2**:137-145
- 40 Lewis E, Munger G, Watson R, Wise D. (1974) *J. Protozool.* **21**:647-64
- 41 Evans DA, Lloyd D. (1966) *J. Protozool.* **13**:119
- 42 Burton MD, Moore J. (1974) *J. Ultrastruct. Res.* **48**:414-419

- 43 Round FE. (1980) *Biosystems*. **12**:61-9.
- 44 Gutiérrez-Cirlos E. B., Antaramian A., Vázquez-Acevedo M., Coria R., González-Halphen D. (1994) *J Biol Chem*. **269**:9147-54.
- 45 Guérin B, Labbe P, Somlo M. (1979) *Methods Enzymol*. **55**:149-59.
- 46 Peña A, Piña MZ, Escamilla E, Piña E. (1977) *FEBS Lett*. **80**:209-13.
- 47 Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. (1949) *J Biol Chem*. **177**:751-66.
- 48 Schägger H, von Jagow G. (1987) *Anal Biochem*. **166**:368-79.
- 49 Popot JL, de Vitry C. (1990) *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. **19**:369-403.
- 50 von Heijne G. (1986) *FEBS Lett*. **198**:1-4.
- 51 Daley DO, Clifton R, Whelan J. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:10510-5.
- 52 Supekova L, Supek F, Greer JE, Schultz PG. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**:5047-52.
- 53 Nurani G, Eriksson M, Knorpp C, Glaser E, Franzén LG. (1997) *Plant Mol Biol*. **35**:973-80.
- 54 Eriksson M, Gardestrom P, Samuelsson G. (1995) *Plant Physiol*. **107**:479-483.
- 55 Figueroa-Martínez F, Funes S, Franzén LG, González-Halphen D. (2008) *Genetics*. **179**:149-55.
- 56 Emanuelsson O, von Heijne G. (2001) *Biochim Biophys Acta*. **1541**:114-9.
- 57 González-Halphen D, Funes S, Pérez-Martínez X, Reyes-Prieto A, Claros MG, Davidson E, King MP. (2004) *Ann N Y Acad Sci*. **1019**:232-9.
- 58 Galanis M, Devenish RJ, Nagley P. (1991) *FEBS Lett*. **282**:425-30.
- 59 Claros MG, Perea J, Jacq C. (1996) *Methods Enzymol*. **264**:389-403.
- 60 Daley DO, Adams KL, Clifton R, Qualmann S, Millar AH, Palmer JD, Pratje E, Whelan J. (2002) *Plant J*. **30**:11-21.
- 61 Rojo EE, Stuart RA, Neupert W. (1995) *EMBO J*. **14**:3445-51.
- 62 Herrmann JM, Neupert W, Stuart RA. (1997) *EMBO J*. **16**:2217-26.
- 63 Baumann F, Neupert W, Herrmann JM. (2002) *J Biol Chem*. **277**:21405-13.
- 64 Funes S, Nargang FE, Neupert W, Herrmann JM. (2004) *Mol Biol Cell*. **15**:1853-61.
- 65 Glaser SM, Miller BR, Cumsky MG. (1990) *Mol Cell Biol*. **10**:1873-81.
- 66 Gärtner F, Voos W, Querol A, Miller BR, Craig EA, Cumsky MG, Pfanner N. (1995) *J Biol Chem*. **270**:3788-95.
- 67 Miller BR, Cumsky MG. (1993) *J Cell Biol*. **121**:1021-9.

- 68 Nargang FE, Drygas ME, Kwong PL, Nicholson DW, Neupert W. (1988) *J Biol Chem.* **263**:9388-94.
- 69 Diekert K, de Kroon AI, Ahting U, Niggemeyer B, Neupert W, de Kruijff B, Lill R. (2001) *EMBO J.* **20**:5626-35.
- 70 Dumont ME, Ernst JF, Sherman F. (1988) *J Biol Chem.* **263**:15928-37.

Direcciones electrónicas:

<http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/imagenesorganelos.htm>.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

SOLUCIONES PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

Gel de agarosa al 1%

| | |
|---------|--------|
| Agarosa | 1g |
| TAE 1X | 100 mL |

TAE 10X (1L)

| | |
|---------------|----------|
| Trizma base | 48.4 g |
| Ácido acético | 11.42 mL |
| EDTA | 20 mL |
| pH 8.0 | |

MEDIO DE CULTIVO PARA *Polytomella* sp.

Medio Mes (2L)

| | |
|------------------------|--------|
| Beijerincks | 10 mL |
| Elementos traza | 2 mL |
| Fosfato de potasio 1 M | 2 mL |
| Mes | 15.6 g |
| Acetato de sodio | 8 g |

Solución 100X de Beijerincks (1L)

| | |
|-------------------------------------|---------|
| NH ₄ Cl ₂ | 8 g/L |
| CaCl ₂ ·H ₂ O | 1 g/L |
| MgSO ₄ | 1.3 g/L |

Elementos traza (1L)

| | |
|---|--------|
| Cu_2SO_4 | 0.25 g |
| H_3BO_3 | 0.02 g |
| $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g |
| MnSO_4 | 0.2 g |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g |
| ZnSO_4 | 0.2 g |
| KCl | 0.05 g |

Solución de vitaminas

| | |
|-----------------|--------|
| Tiamina B1 | 2 mg |
| Cianocobalamina | 0.1 mg |

Pesar y aforar a 10 mL. Filtrar en esterilidad

AMORTIGUADORES PARA OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS

Amortiguador A

| | |
|--------------|-----------------------------|
| Sorbitol | 0.75 M desionizado. |
| Manitol | 0.4 M desionizado. |
| Tris-maleico | 10 mM. |
| BSA | 0.1 % al momento de usarse. |

diluye 1:1 con Tris-maleico 10 mM (pH 6.8)

MEDICIÓN DE PROTEÍNA

Reactivo de Biuret

| | |
|---|--------|
| Reactivo | |
| tartrato de sodio y potasio | 0.6 % |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.15 % |
| NaOH | 3 % |

AMORTIGUADORES DE IMPORTACIÓN

Amortiguador de transporte 1 X.

| | |
|--------------------------------|-------------|
| sorbitol | 0.375 M |
| manitol | 0.2 M |
| Tris-maleico | 10 mM. |
| BSA | 1 mg/ml. |
| H ₃ PO ₄ | 10 mM. |
| MgCl ₂ | 200 μM |
| metionina | 0.75 mg/ml. |

AMORTIGUADORES PARA GELES DESNATURALIZANTES DE SDS

Solución digestora (Amortiguador de carga 25 mL)

| | | |
|--------------------|--------|--------|
| SDS | 10% | 2.5 g |
| Glicerol | 30% | 7.5 mL |
| Tris-HCl | 100 mM | 1.25 g |
| Azul de bromofenol | 0.3% | 75 mg |
| DTT | 4% | 1 mL |

Amortiguador electroforético (500 mL)

| | | |
|------|------|---------|
| Tris | 3 M | 181.7 g |
| HCl | 1 N | 40.3 mL |
| SDS | 0.3% | 1.5 g |

Solución madre de acrilamida (100 mL)

| | | |
|----------------|-------|--------|
| Acrilamida | 30% | 30 g |
| Bis-acrilamida | 0.98% | 0.98 g |

*Filtrarla y guardar a 4°C

Geles de Tricina SDS-PAGE (von Jagow)

| | Acrilamida | Concentrador |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| | 14% | Grande |
| 30% Acrilamida-0.98% Bis-acrilamida | 14 ml | 1.6 ml |
| Amortiguador electroforético | 12 ml | 3 ml |
| Glicerol 79.5% | 4 ml | 0 ml |
| Agua destilada | 0 ml | 7.4 ml |
| TEMED | 10 µL | 10 µL |
| Persulfato de Amonio 10% | 100 µL | 100 µL |

Amortiguador del cátodo (3 L) (sin ajustar pH)

| | | |
|---------|------|--------|
| Tris | 0.1M | 36.3 g |
| Tricina | 0.1M | 53.8 g |
| SDS | 0.1% | 3 g |

Amortiguador del ánodo (3L) (pH 8.9)

| | | |
|----------|-------|--------|
| Tris-HCl | 0.2 M | 72.7 g |
|----------|-------|--------|

AMORTIGUADORES PARA LA TRANSFERÊNCIA ELECTROFORÉTICA

Amortiguador del cátodo

| | |
|------------------------------------|--|
| 300 mM de ácido ε-amino-n-caproico | 39.4 g/L, pH 8.5-8.7 ajustado con Tris |
| SDS 0.05% | 0.5 g/L |

Amortiguador del ánodo

| | |
|------------------|----------|
| 150 mM de Tris | 18.2 g/L |
| 50 mM de tricina | 9 g/L |
| 20% de metanol | 200 mL/L |