

5 03081
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES.

UN CITOCROMO b MITOCONDRIAL
ESPECTROSCOPICAMENTE ATIPICO EN EL ALGA
INCOLORA *Polytomella* SPP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A

M.I.B.B. EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID

ASESOR: DR. DIEGO GONZALEZ HALPHEN.

CIUDAD UNIVERSITARIA.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1998.

260854



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.

Dedicatoria:

A mis padres:

Dr. Alfonso Gutiérrez Cirlos,
Mtra. Rosa María Madrid Hernández,

Por el amor que me han dado y la
educación para ser constante.
Por que de alguna manera, tuvieron
que ver en que me gustara la
Biología.

A mi hermano,
Dr. Carlos Alfonso Gutiérrez Cirlos
Madrid.

Por su apoyo y su cariño. Con el
deseo de que todo salga muy bien
para ti.

A mis abuelitos, por su ejemplo y
cariño.

A todos mis tíos y primos.

A mis amigos, que valen mucho
para mí.

A Carlos, con amor

Agradecimientos:

A los señores sinodales:

Dra. Marietta Tuena Sangri,
Dr. Diego González Halphen,
Dr. Javier Espinosa Aguirre,
Dr. Wilhelm Hansberg Torres,
Dr. David Jay Gómez,
Dr. Enrique Piña Garza,
Dr. Mario Soberón Chávez,

Por la revisión paciente que hicieron de este manuscrito y las sugerencias para mejorarlo y hacer un texto más coherente.

A mi tutor y asesor, Dr. Diego González Halphen, por permitirme trabajar en su laboratorio durante 10 años. Por que he aprendido muchas cosas de él, sobre todo, la paciencia al trabajo y a siempre buscar cosas interesantes.

A mis tutores, el Dr. Heliodoro Celis Sandoval y el Dr. Fernando López Casillas, quienes durante los últimos tiempos se dedicaron a mejorar mi trabajo con sus sugerencias y apoyo.

Al Dr. Carlos Gómez Lojero, por la gran colaboración que hizo en este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Miriam, Anaid, Ariane, José Luis, Adrián, Sole, Xóchitl y Violeta. Por su ayuda, amistad y los buenos momentos que hemos pasado.

A Bertha González Pedrajo y a Tere Ballado por su amistad, ayuda y apoyo en los misterios de la Biología Molecular.

A la Dra. Genoveva González Morán por su ayuda y apoyo en las clases de Biología Celular.

A mis amigos del Instituto y anexas: Bertha, Tere, Javier, Marck, Eugenia, Edgar, Ma. Elena, Erika, Aída, Irma, Celis, Lupita, Silvia, Mayra, Marcela, Rosalinda, Lourdes, Simón, Jorge, Ernesto, Rosa, etc., etc. ¡¡¡Gracias!!!.

A los Florentinos.

A las secretarías que siempre amablemente, me han ayudado: Lupita, Maru, Jeny, Domi y Lupita.

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Diego González Halphen, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M).

Durante la realización de esta tesis, recibí el apoyo de una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A.)

El proyecto de investigación en el cual se inserta el presente trabajo de tesis, fue apoyado con el donativo no. 1371-N9306 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el donativo no. IN-204595 de la D.G.A.P.A.

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

Agradezco también la ayuda técnica de la Q.F.B. Teresa Ballado Nava por la ayuda técnica prestada en la parte de Biología Molecular.

Agradezco a la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Marcela Sosa Garrocho y a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta de la Unidad de Biología Molecular del I.F.C. por la síntesis de los oligo desoxinucleótidos.

Agradezco también la ayuda técnica prestada por Jorge Sepúlveda de la Unidad de Microscopía Electrónica.

A la Unidad de cómputo, especialmente a Juan y Rodrigo.

Índice:

Resumen	1
• Abstract	2
Lista de abreviaturas	3
Introducción:	4-26
• El complejo bc_1	4
• El citocromo b del complejo bc_1	8
• El género <i>Polytomella</i>	18
• Antecedentes directos	24
• Objetivos	26
Materiales y Métodos	27-35
• Obtención del microorganismo	27
• Purificación del complejo bc_1 de <i>Polytomella</i> spp	27
• Purificación del complejo bc_1 de bovino	28
• Espectros para determinar la concentración de los citocromos c_1 y b	29
• HPLC	29
• Espectros diferenciales del complejo bc_1	30
• Espectros a baja temperatura	31
• Preparación del DBH	32
• Preparación de la antimicina y el mixotiazol	32
• Actividad de la ubiquinol citocromo c oxidoreductasa en presencia de diferentes concentraciones del mixotiazol la antimicina.	33
• Titulación redox de los hemos b del complejo bc_1 de <i>Polytomella</i> spp.	34
• Análisis por cuarta derivada y por deconvolución de los espectros diferenciales obtenidos.	35
Resultados:	36-63
• El complejo bc_1 de <i>Polytomella</i> spp.	36
• Espectros a baja temperatura	39
• El citocromo c_1 de <i>Polytomella</i> spp.	41
• Análisis por HPLC de los hemos del complejo bc_1 de <i>Polytomella</i> spp.	42
• Espectros diferenciales del citocromo b usando	

diferentes agentes reductores	46
• Análisis por 4ª derivada de los espectros anteriores	
agentes reductores	49
• La titulación redox de los hemos <i>b</i>	53
• La titulación con los inhibidores	60
<hr/>	
Discusión:	64-98
<hr/>	
• La purificación del complejo <i>bc₁</i>	64
• Los espectros con diferentes agentes reductores	67
• La titulación redox	68
• La titulación con los inhibidores	71
• Consideraciones espectroscópicas	75
• La estructura del citocromo <i>b</i>	86
<hr/>	
Conclusiones	97-98
<hr/>	
Literatura citada	99-104
<hr/>	
Apéndice I	105-114
Apéndice II	115

Resumen:

Polytomella spp. es un alga incolora de la familia de las Chlamydomonadaceas que carece de cloroplastos y de pared celular. Hemos purificado y caracterizado al complejo ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa (ó complejo bc_1) de esta alga [Gutiérrez-Cirlos y cols. (1994). J. Biol. Chem. 269, 9147-9154]. El complejo mostró una actividad alta y fue sensible a antimicina A y mixotiazol. El espectro visible del citocromo *b* de *Polytomella* spp. mostró una banda α atípica con un máximo a 567 nm, tanto en mitocondrias aisladas como en el complejo puro. El máximo α está corrido hacia el rojo 3-4 nm, comparado con los citocromos tipo *b* de otros organismos. Se hizo el análisis de los hemos *b* del complejo bc_1 por cromatografía líquida de alta precisión. Esta técnica no mostró diferencias entre los hemos *b* y la hemina en sus tiempos de retención y el espectro de absorción, por lo que se concluyó que el grupo prostético en esta alga es un protohemo. Se eliminó la posibilidad de que el corrimiento hacia el rojo se debiera a sustituciones químicas en los anillos de porfirina de los hemos b_L y b_H . Los dos hemos se caracterizaron por una titulación redox; a pH 7.8-8.0 el potencial redox medio del hemo b_L fue de -143 mV y para el hemo b_H de +25 mV. El espectro de los dos hemos se obtuvo por medio de diferentes agentes reductores, en potenciales redox seleccionados y en presencia de antimicina A, para diferenciar la contribución del hemo b_L y del b_H al espectro visible. Los dos hemos del citocromo *b* contribuyen al máximo de absorción batocrómico de la banda α del espectro. Los datos mostraron que el hemo b_L de *Polytomella* spp. es similar espectroscópicamente al de otros organismos, con dos transiciones en la banda α en 558.7 y 568.4 nm. El hemo b_H también tiene dos transiciones una a 557.2 y otra a 568.9 nm, esto difiere del espectro de los hemos b_H de otros organismos como mamíferos, plantas, levaduras y bacterias los cuales tienen una banda α de una transición localizada en 560 nm.

Abstract:

Polytomella spp. is a colorless alga of the family Chlamydomonadaceae that lacks chloroplasts and cell wall. A highly active ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (*bc₁* complex) sensitive to antimycin and myxothiazol, has been purified and characterized from this alga [Gutiérrez-Cirlos *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269, 9147-9154]. Both in mitochondrial membranes and in isolated complex, the visible spectrum of cytochrome *b* from *Polytomella* spp. exhibits an atypical α -band with a maximum at 567 nm. This maximum is shifted 3-4 nm to the red when compared with *b*-type cytochromes from other organisms. Analysis of the *b* hemes of the *bc₁* complex by high performance liquid chromatography revealed no differences in the retention time and in the absorption spectra of the *b*-type hemes from *Polytomella* spp. and hemin, indicating that the prosthetic group in this alga is protoheme, and thus, ruling out the possibility that the red shift could be due to different chemical substitutions in the popyhrin rings of the *b_L* or *b_H* hemes. The two *b* hemes were characterized by electrochemical redox titration; at pH 7.8-8.0, the midpoint potential for *b_L* was -143 mV and for *b_H* +25 mV. The spectra of the two *b*-type hemes were recorded in the presence of different reductants, at selected electrochemical potentials, and in the presence of antimycin A, to distinguish between the contribution of *b_L* and *b_H* to the visible spectrum. Both hemes *b_L* and *b_H* of the algal cytochrome *b* contribute to the observed bathochromic absorption maximum in the α -band of the spectrum. The data also show that the low potential *b_L* heme from *Polytomella* spp. is spectroscopically similar to that of other organisms, with two transitions in the α -band at 558.7 and 568.4 nm. The high-potential heme *b_H* also exhibits a spectrum with two transitions at 557.2 and 568.9 nm, which surprisingly differs from the spectra of cytochrome *b_H* of mammals, plants, yeasts, and bacteria, which all exhibit a single transition centered around 560 nm.

Lista de abreviaturas:

BCIs: bacterioclorofilas.

b_L : hemo *b* de bajo potencial redox.

b_H : hemo *b* de alto potencial redox .

DBH: decilubiquinona ó 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzohidroquinona.

EGPA-DSS: Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.

Em: potencial redox medio.

g: gravedad.

HPLC: High performance liquid chromatography, siglas en inglés de cromatografía líquida de alta precisión.

hr: hora.

LH2: Light harvesting 2. Complejo cosechador de luz número dos.

min: minutos.

mV: milivolts, milivoltios.

nm: nanómetros.

PMSF: fluoruro de fenilmeranosulfonilo, siglas en inglés. Inhibidor de proteasas.

PCR: Polimerase Chain Reaction, siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

seg: segundos.

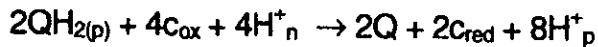
TFA: trifluoroacetic acid siglas en inglés de ácido trifluoroacético.

TLCK: N α -p-tosil-L-lisina-cloro-metilcetona, siglas en inglés. Inhibidor de proteasas.

Introducción:

El complejo bc_1 :

El complejo de citocromos bc_1 , o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, transporta los electrones donados por el ubiquinol, una molécula altamente hidrofóbica, hasta un citocromo c soluble. Se encuentra tanto en organismos Procariotos como Eucariotos, fotosintéticos y no fotosintéticos (Trumpower, 1990). Esta transferencia de electrones se realiza por medio de tres grupos oxidorreductores asociados a las proteínas: un citocromo b bihémico, un citocromo c_1 y una proteína que tiene un centro hierro-azufre (FeS). La reacción de transferencia de electrones se conoce como ciclo Q, el cual fue propuesto por Mitchell en 1976. El ciclo Q describe la vía de transferencia de electrones entre los grupos redox del complejo bc_1 y además explica el mecanismo de la translocación de protones asociado con la transferencia de electrones. La reacción implica la transferencia de 2 electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c :



Donde n = lado negativo; p = lado positivo de la membrana y ox = oxidado; red =reducido.

En el ciclo Q, que se muestra en la figura 1, ocurren las siguientes reacciones:

1.- Una molécula de ubiquinol se oxida a anión ubisemiquinona al transferir un electrón a la proteína Fe-S (1). Con esta oxidación se transfieren dos protones hacia el lado P de la membrana. Este paso significa la ionización de la ubisemiquinona a anión ubisemiquinona. A continuación la proteína Fe-S reduce el citocromo c_1 y éste reduce el citocromo c soluble. Este segmento del ciclo se lleva a cabo en el sitio Q_p -positivo- (o sitio de oxidación del ubiquinol).

2.- El anión ubisemiquinona debe de reducir inmediatamente el hemo b_L (o de bajo potencial). Con esto, el anión elimina su segundo electrón y se forma una molécula de ubiquinona.

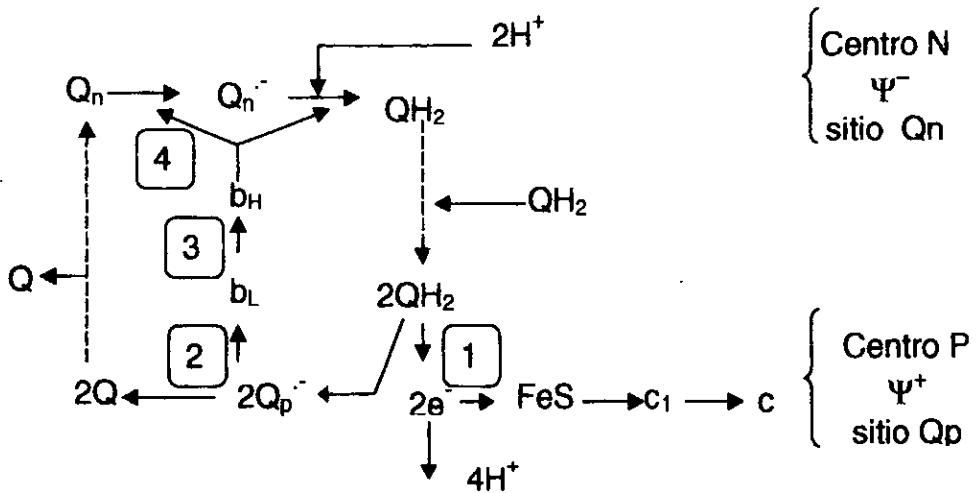


Figura 1: Esquema del ciclo Q propuesto por Mitchell (1976) para explicar el mecanismo redox del complejo bc_1 . En la figura se indican con números (1, 2, 3) los sitios en los que se transloca un electrón (1, 2, 3). Abreviaturas: QH_2 = ubiquinol; Q_n^- = anión semiquinona del lado negativo (o p=positiva); Q = quinona. FeS = subunidad hierro-azufre; c_1 = citocromo tipo c_1 ; c = citocromo c. H^+ = protones; e = electrones. b_H =hemo de alto potencial redox (high). b_L =hemo de bajo potencial redox (low)

3.- El hemo b_L reduce inmediatamente al hemo b_H , o hemo de alto potencial.

4.- El hemo b_H reduce una molécula de ubiquinona del lado N de la membrana y forma un anión ubisemiquinona. Este es el sitio Qn -negativo- o de reducción de la ubiquinona.

5.- En este momento, el ciclo está a la mitad por lo que debe oxidarse otra molécula de ubiquinol en el sitio Qp. Nuevamente, se transfiere un electrón al citocromo c vía la reducción de la proteína Fe-S y del citocromo c_1 y otro electrón al hemo $b_L \rightarrow$ hemo b_H para finalmente reducir un anión ubisemiquinona formando ubiquinol con dos protones del lado N de la membrana.

6.- El balance general de la reacción se ve en la ecuación general del ciclo Q: dos moléculas de ubiquinol se oxidan a dos ubiquinonas. Se forma una molécula de ubiquinol; 4 protones se transfieren al lado P de la membrana y dos se toman del lado N. La transferencia de electrones está necesariamente asociada a la translocación de protones por la naturaleza misma de las reacciones redox de las quinonas.

El paso de los protones de un lado a otro de la membrana ocurre por medio de un reciclaje de los electrones a través de la oxidación del ubiquinol separado de la reducción de la ubiquinona. Cada sitio, el de reducción y el de oxidación, está en diferentes zonas de la membrana, pero en la misma enzima (Gennis y Trumpower, 1994). A diferencia de la citocromo *c* oxidasa, el complejo *bc₁* no tiene un canal de protones a través del cual pasen los protones de un lado al otro de la membrana. Esto se observa en la estructura del complejo *bc₁* (Xia y cols., 1997). La translocación de protones debe ser a través de un mecanismo quimiosmótico.

El complejo *bc₁* puede estar compuesto por sólo las tres subunidades oxidorreductoras, como en el caso de *Paracoccus denitrificans* (Yang y Trumpower, 1986), o por cuatro subunidades, como en *Rhodobacter sphaeroides* y *R. capsulatus* (Ljungdahl y cols., 1987). El complejo *bc₁* de bovino y de otros mamíferos tiene hasta once subunidades (Shägger y cols., 1986; González-Halphen y cols., 1988; Vázquez-Acevedo y cols., 1993). Consta de subunidades oxidorreductoras y accesorias. Estas últimas pueden tener funciones, por ejemplo, de facilitar la unión del citocromo *c* con el citocromo *c₁* (subunidad VIII) (Kim y cols., 1989). Se ha visto que la quinona se une a la subunidad VII del complejo *bc₁* de corazón de bovino (Yu y cols., 1990). Si se elimina el gene *QCR9* que codifica para la subunidad IX del complejo *bc₁* de *Sacharomyces cerevisiae* se ha visto que la proteína hierro azufre no se ensambla (Phillips y cols., 1993). La estructura cristalográfica del complejo *bc₁* de bovino (Xia y cols., 1997) se muestra en la figura 2.

En este trabajo solamente se describirán las características del citocromo *b* del complejo *bc₁*,

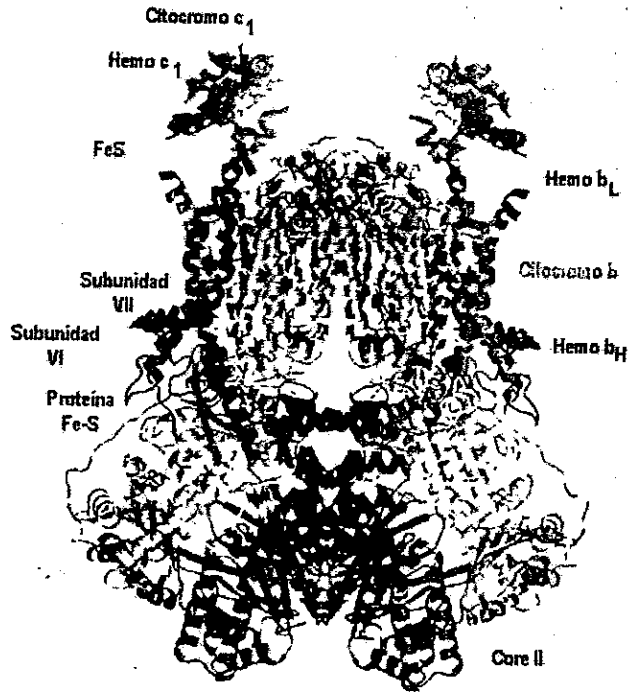


Figura 2 Esquema del complejo *bc₁* de bovino obtenido por Xia y cols. (1997) Se muestran las subunidades del complejo, su situación dentro de la membrana interna mitocondrial específicamente del citocromo *b* y del resto de las subunidades que se encuentran ancladas en la membrana ya sea viendo hacia la matriz mitocondrial o dentro del espacio intermembranal FeS centro hierro-azufre, Core subunidad estructural de alto peso molecular

El citocromo *b* del complejo *bc₁*:

El citocromo *b* es una de las subunidades que participa directamente en el ciclo Q del complejo *bc₁*. Es la subunidad más hidrofóbica del complejo, tiene 8 cruces transmembranales con estructura de alfa hélices. Es la única subunidad del complejo *bc₁* codificada en el genoma mitocondrial (Attardi y Schatz, 1988). Se conocen alrededor de 900 secuencias de este gen tanto de Eucariotos como Procariotos, fotosintéticos y no fotosintéticos (Degli Esposti y cols., 1993). En los organismos fotosintéticos, el citocromo *b* está dividido en dos polipéptidos, el citocromo *b₆* y la subunidad IV. Sumados, estos dos polipéptidos tienen una masa molecular más pequeña que la del citocromo *b* mitocondrial. El extremo carboxilo-terminal (que corresponde a la subunidad IV) es más corto, y se ha identificado que carece de la hélice IX hidrofóbica, presente en los sistemas mitocondriales (Hauska y cols., 1988; Cramer, y cols., 1994). El citocromo *b* tiene dos hemos del tipo protoporfirina IX (Berry y Trumpower, 1987). Cada uno de los hemos tiene un potencial redox específico, uno de alto potencial ó *b_H* (del inglés *high*) y el otro de bajo potencial ó *b_L* (del inglés *low*). Estos hemos pueden distinguirse además por su diferente máximo de absorción en la banda α . Por ejemplo, en el citocromo *b* de bovino, 566 nm de longitud de onda es para el hemo *b_L* y 562 nm para el hemo *b_H* (González-Halphen, 1990; Degli Esposti y cols., 1993).

En 1993, Howell y Robertson hicieron un estudio espectroscópico del citocromo *b* del complejo *bc₁* de una línea celular de fibroblastos de ratón. Los espectros se registraron a diferentes potenciales redox para obtener el espectro individual de cada hemo. La banda α del hemo *b_H* tiene un máximo a 561.6 nm; la banda α del hemo *b_L* tiene dos transiciones, una a 558.1 y otra a 565.2 nm. Para poder determinar el número de componentes de cada uno de los espectros, Howell y Robertson hicieron deconvoluciones tipo Voigt de los espectros. Estas deconvoluciones, que se ajustan con mayor exactitud a las transiciones espectroscópicas, mostraron que el hemo *b_L* tiene dos transiciones y el hemo *b_H* sólo una (como se puede ver en la figura 3). Esto refleja que cada

uno de los hemos tiene un ambiente proteico diferente, lo que se confirmó con la estructura tridimensional del complejo (Xia y cols., 1997).

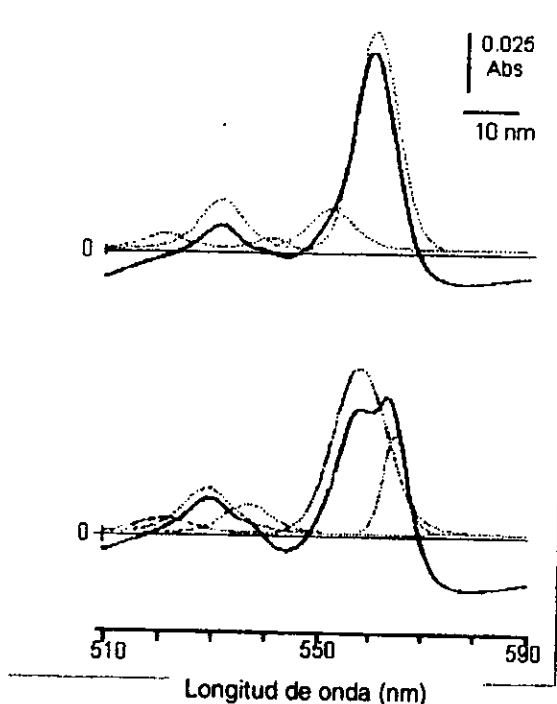
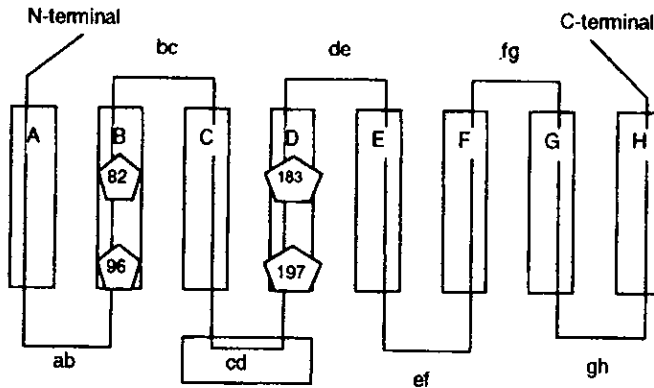


Figura 3: Espectros diferenciales de los hemos del complejo bc_1 de ratón obtenidos por Howell y Robertson (1993). Se muestra el espectro obtenido en línea continua y los componentes resultado de la deconvolución en línea punteada. El panel A muestra el espectro diferencial del hemo b_L obtenido en un rango de potencial de +76/+145 mV. El panel B muestra el espectro diferencial del hemo b_H tomado en un rango de potencial de -81/-5 mV. Tomado de Howell y Robertson, 1993.

Crofts y cols., (1987) propusieron un modelo del citocromo b con ocho cruces transmembranales para el citocromo b , como se muestra en la figura 4. El asa cd , tiene características anfipáticas y queda expuesta fuera de la membrana. El citocromo b tiene 8 hélices alfa transmembranales repartidas de la siguiente manera, de acuerdo con la proteína de levadura (Dégli Esposti y cols., 1993): la hélice A, que comprende del aminoácido 30 al 54; la B, del 78 al 104; la C, del 113 al 132; la D, del 176 al 204; la E, del 226 al 246; la F, del 286 al 307; la G, del 317 al 340 y la H, del 552 al 376. El resto de los aminoácidos comprenden las regiones amino y carboxi terminales y las aspas que unen a las alfa hélices. Se cuenta con la estructura del complejo bc_1 a una resolución de 2.6 Å (Xia y cols., 1997). De la

estructura tridimensional se puede obtener una idea más clara de como están arregladas las ocho hélices en el espacio de la membrana y la relación de las mismas con los hemos del citocromo *b*. Este arreglo se puede apreciar en las siguientes figuras (4 y 5).

Lado N, matriz mitocondrial



Lado P, espacio intermembranal

Figura 4. Esquema de los ocho cruces transmembrales del citocromo *b* de levadura. El orden de las hélices se muestra con letras mayúsculas y las asas en minúsculas. Se muestra además la posición de las histidinas conservadas que unen a los hemos del citocromo y la orientación del citocromo *b* en la membrana interna mitocondrial.

En la estructura cristalográfica, los extremos amino y el carboxilo terminales están situados del lado de la matriz mitocondrial. Las hélices A, B, C, D y E forman un subgrupo separado de las hélices F, G y H. Lo anterior se observa en los modelos propuestos por Link y cols., (1994) y Degli Esposti y cols., (1993) y en la estructura tridimensional del complejo bc_1 . El primer subgrupo rodea a los dos hemos del citocromo *b*. Link y cols., (1994), propusieron un modelo del citocromo *b* de levadura basados en el estudio de la mínima relajación necesaria de la estructura. El modelo resultante mostró que el hemo b_L está situado en

una cavidad más cerrada que el hemo b_H , lo que se confirmó en la estructura cristalográfica.

En la figura 5 se muestra el modelo de la estructura de las hélices que rodean a los hemos (Link y cols., 1994) y un diagrama de cómo están situadas las hélices en el cristal y su relación con los dos hemos. Cabe resaltar que los dos modelos coinciden en que las hélices A, B, C y D están más cercanas al hemo b_L que al hemo b_H , formando una cavidad más compacta en el primero. El resto de las hélices también tienen una disposición diferente.

Degli Esposti y cols., 1993, hicieron la comparación de las secuencias del citocromo *b* de alrededor de 800 especies, tanto de bacterias como de Eucariotos y de organismos fotosintéticos y no fotosintéticos. El resultado de esta comparación mostró que las hélices B, C y A son las más conservadas (en orden decreciente de conservación). Les siguen las hélices D y F y finalmente, las E y H son las menos conservadas:

$$B \geq C \geq A \gg D \geq F \gg EH$$

Sólo un tercio de los aminoácidos más conservados están distribuidos en el lado negativo de la membrana. El resto de los aminoácidos conservados no guardan una distribución especial.

Los dos hemos están unidos a la proteína por medio de enlaces de coordinación a 4 histidinas altamente conservadas, situadas en las α hélices B y D del citocromo *b*. Para el hemo b_H son las histidinas 96 y 197 y para el hemo b_L las histidinas 82 y 183, de acuerdo a la numeración usada para el citocromo *b* de levadura (Saraste, 1984). Existen además 4 glicinas que son importantes para que embonen los hemos. Estas son la 33 y 47 (de la hélice A) y la 117 y 131 (de la hélice C). Las glicinas están separadas entre sí por 13 aminoácidos, y están colocadas de manera simétrica a ellas (igual que las histidinas que unen a los hemos). Estas glicinas son esenciales para el empaquetamiento de los hemos (Hauska y cols., 1988 y

Tron y cols., 1991). Por ejemplo, la mutación Gly33Ser desestabiliza el ensamblaje del complejo y del hemo (Crofts y cols., 1992; Yun y cols., 1992).

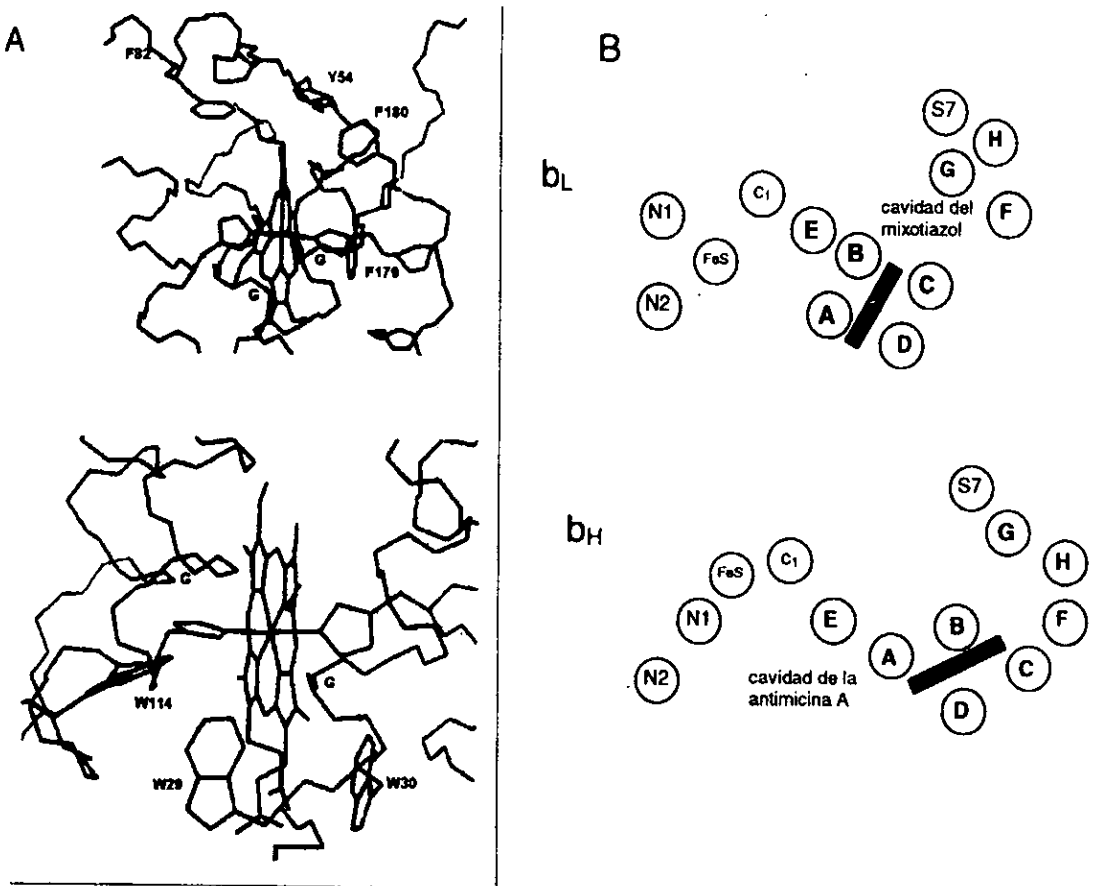


Figura 5: Arreglo de las hélices alrededor de los hemos del citocromo *b* de bovino. En el **panel A** se ilustra la predicción hecha por Link y cols., 1994, en el que se muestran los aminoácidos más cercanos a cada uno de los hemos b_h y b_L . Se puede apreciar en los dos casos, las histidinas que coordinan a los hemos además de las glicinas cercanas que también tienen que ver con su estabilización. El **panel B** ilustra el modelo propuesto por Xia y cols., 1997, para las hélices situadas alrededor de cada uno de los hemos. En este caso, cada una de las posiciones de las hélices se obtuvo de la estructura tridimensional del complejo bc_1 . La barra negra representa al hemo. Abreviaturas: N = hélices cuya identidad no ha sido determinada. S7 = subunidad 7 del citocromo *b*. C1 = citocromo tipo *c*. Los círculos vacíos representan a la proteína Hierro-azufre. En la figura superior se observan las hélices desde el espacio intermembranal (correspondiente al hemo b_L) y en la inferior desde la matriz mitocondrial (correspondiente al hemo b_H).

Además de los residuos involucrados en la unión de los hemos a la proteína, el citocromo *b* tiene varios residuos de aminoácidos que son importantes para la unión de casi todos los inhibidores de la actividad del complejo. Estos inhibidores son moléculas análogas a la ubiquinona. Los sitios donde se unen éstos corresponden a los sitios Qn y Qp, donde se realiza la reducción y la oxidación de la ubiquinona, respectivamente. En este caso, los inhibidores del sitio Qn bloquean la reoxidación del citocromo *b* y desestabilizan la semiquinona unida. El inhibidor más potente es la antimicina A (von Jagow y Link, 1986). Este es un antibiótico que proviene del hongo *Streptomyces*. Es un ácido 3-formamidosalicílico unido por un enlace amido a un anillo alquil-acil-dilactona (C₂₈H₄₀N₂O₉). La forma de este inhibidor es semejante a la de la quinona. El inhibidor causa un corrimiento hacia el rojo de la banda α del espectro del hemo *b_H* (Kamensky y cols., 1985; Howell y Robertson, 1993). Esto es indicativo de que la antimicina A tiene un sitio de unión muy cercano a los hemos del citocromo *b*, específicamente al hemo *b_H*. Xia y cols., 1997, obtuvieron cristales del complejo *bc₁* con antimicina y en ellos se puede ver como el inhibidor se une en una cavidad de la región transmembranal del citocromo *b*, muy cerca del hemo *b_H* (ver figura 6). La antimicina ocupa el sitio donde se une la quinona en el sitio de reducción (Qn). Todos los aminoácidos que han sido sustituidos y que le confieren al citocromo *b* un cambio de sensibilidad a los inhibidores están localizados en las hélices A, D y E. Los aminoácidos sustituidos que confieren un cambio en la afinidad por la antimicina, son residuos voluminosos que impiden que ésta se una correctamente. En la figura 7 se muestran los aminoácidos más importantes cuya sustitución confiere resistencia a los inhibidores del sitio Qn.

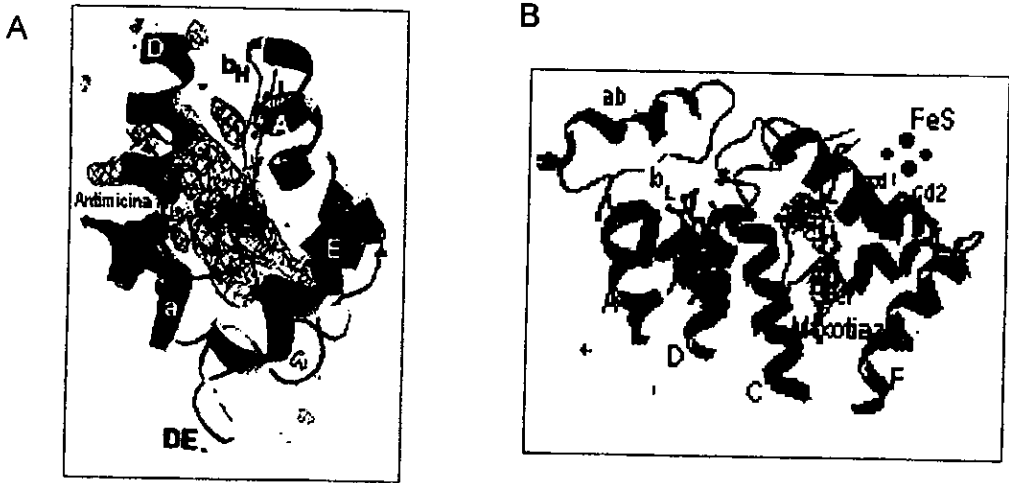


Figura 6: A.- Esquema que muestra algunas de las hélices del citocromo *b* de bovino y el inhibidor antimicina A unido al mismo. Se puede apreciar que el inhibidor está muy cerca del hemo b_H . B.- En este esquema se muestra el mixotiazol dentro del citocromo *b* se puede ver que el inhibidor está más lejos del hemo b_H . Tomado de Xia y cols., 1997.

Los inhibidores del centro Qp bloquean la oxidación del ubiquinol. Impiden que la proteína FeS y el hemo b_L del citocromo *b* se reduzcan. Cuando se usa antimicina (o un inhibidor del sitio Qn, que bloquee al hemo b_H) se produce lo que se conoce como "la reducción del citocromo *b* inducida por un oxidante". Cuando se añade ferricianuro (un oxidante) a este complejo así inhibido se oxida al citocromo *c*, y a la proteína hierro-azufre y el citocromo *b* se reduce rápidamente. Para el sitio Qp, el mixotiazol, un antibiótico que pertenece al grupo de los metoxiacrilatos, es el inhibidor más utilizado (von Jagow y cols., 1984; von Jagow y Link, 1986) (ver figura 6b). Es una molécula compleja que tiene dos anillos tiazoles. La parte que se une a la proteína es la amida del metoxiacrilato. El mixotiazol altera el espectro del hemo b_L del citocromo *b*, principalmente haciendo más ancha la banda α (Howell y Robertson, 1993). Además de este grupo de inhibidores, también existen las hidroquinonas, como el UHDBT, inhiben la reoxidación del centro hierro-azufre y de la reducción del hemo b_L (Bowyer y cols., 1982; von Jagow y Link, 1986).

Existen otros inhibidores llamados crónicos como la estigmatelina, que alteran la señal de EPR de la proteína FeS y además causan cambios en el espectro del citocromo *b* (von Jagow y Link, 1986; Brandt, 1991; Ding, 1992). Los aminoácidos que confieren resistencia a los inhibidores del sitio Qp se encuentran en dos dominios de la proteína. El primero en la hélice C y parte del asa *cd* que contiene dos terceras partes de los sitios de resistencia. El segundo dominio se encuentra en el principio y el final del asa *ef* y en la hélice F. Este dominio muestra menor resistencia que el primero. La figura 7 muestra los aminoácidos que confieren cambios en la sensibilidad de los inhibidores de los centros Qn y Qp.

El espectro de absorción de los hemos del citocromo *b* puede ser alterado por la unión de los diferentes inhibidores. El trabajo de Howell y Robertson (1993) es el estudio más detallado que se ha hecho de estos cambios. Algunos inhibidores no sólo ocasionan cambios en el espectro de absorción de los hemos, sino que también alteran su potencial redox medio (Em). La tabla I resume los efectos de los inhibidores utilizados en ese estudio. El espectro del hemo *b_H* puede ser doblemente alterado, cuando se ponen simultáneamente un inhibidor del sitio Qn y otro del sitio Qp. Para el hemo *b_L* se obtiene un mayor corrimiento hacia el rojo de la banda de menor energía cuando se pusieron los dos inhibidores.

El resumen de estos datos pretende mostrar que el espectro de cada uno de los hemos es alterado por la unión de los inhibidores al complejo. Las alteraciones que causan cerca del ambiente de los hemos son tales, que se detectan en el Em, o en el máximo de la banda α .

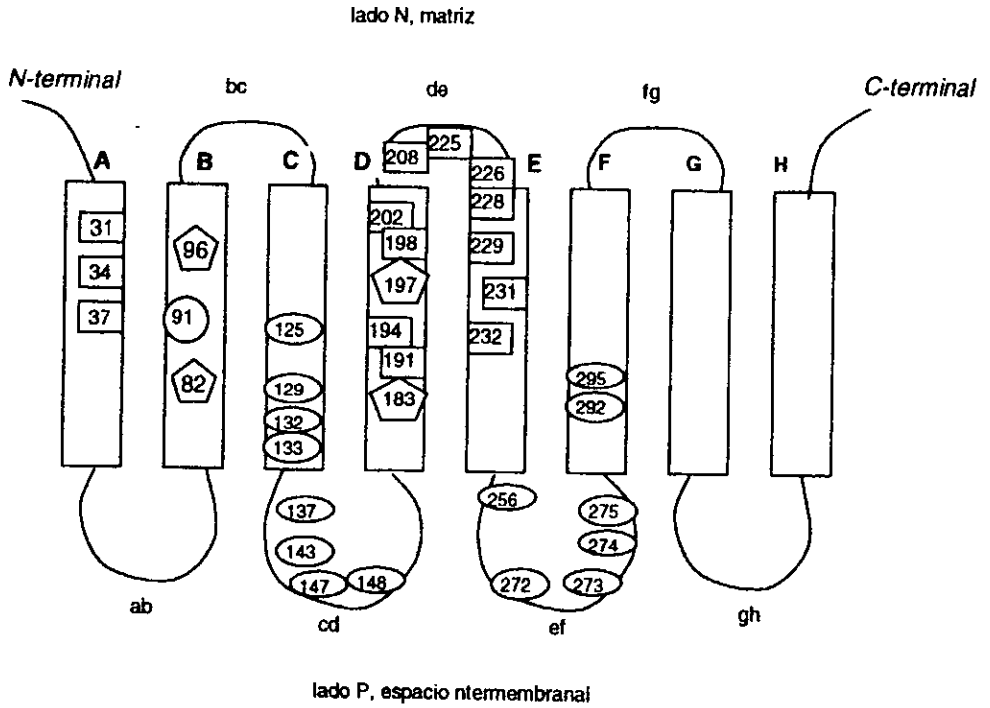


Figura 7: Esquema del citocromo *b* con sus ocho cruces transmembranales en los que se indican los aminoácidos que cambian la sensibilidad a los inhibidores del complejo *bc*; la numeración corresponde al citocromo *b* de levadura. En cuadros se muestran los aminoácidos que pertenecen al sitio *i* y en círculos los aminoácidos que pertenecen al sitio *o*. Los pentágonos muestran en donde están las histidinas que unen a los hemos. Tomado de Degli Esposti y cols., (1993).

Tabla I: Tipo de cambio provocado por los inhibidores del bc₁ en la banda α de los hemos b_H y b_L del citocromo b y en el potencial redox. Los datos fueron tomados de Howell y Robertson (1993).

b_H			
Inhibidores del sitio Qn		Inhibidores del sitio Qp.	
Antimicina A	Corrimiento hacia el rojo, la banda se hace más ancha	Estigmatelina	Se hace más angosta la banda. No altera el Em ni el máximo de absorción.
Funiculosina	Diferentes efectos: Sube el Em mas de 100 mV, la banda se hace más angosta.	Mixotiazol	Aumenta el Em 15-25 mV. El espectro se hace más ancho

b_L			
Inhibidores del sitio Qn		Inhibidores del sitio Qp	
Antimicina A	La transición de mayor energía se hace más angosta. La de menor energía se corre al azul	Estigmatelina	Corrimiento hacia el rojo del componente de mayor energía. Cambios en el área relativa de las dos transiciones.
Funiculosina	El componente de menor energía se hace más angosto y se corre hacia el azul. El de menor energía se hace más ancho.	Mixotiazol	El Em se incrementó un poco. La transición de menor energía se hace más ancha.

El género *Polytomella*:

Los individuos del género *Polytomella* son unicelulares, miden aproximadamente 17 μm de largo y 11 μm de ancho. Los flagelos de *Polytomella* están organizados en un brazaletes, en la parte anterior de la célula, al igual que el género *Chlamydomonas* (Brown y col., 1976a). *Polytomella*, carece de cloroplastos y de pared celular, como se muestra en la figura 8. Por carecer de cloroplastos, se ha hecho difícil su clasificación, ya que se puede incluir dentro del grupo de algas incoloras por su forma semejante a las *Chlamydomonas*, o simplemente como un protozooario flagelado. Su clasificación se describe en la tabla II.

Tabla II: Clasificación del género *Polytomella*:

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

Este género pertenece al orden Chlamydomonadales. En general, los organismos del orden Chlamydomonadales tienen dos ó cuatro flagelos, cuya base es en forma de brazaletes. Pueden tener o no pared celular de glucoproteínas. Tienen un solo cloroplasto, que contiene un pirenoide y que actúa como centro de formación del almidón y en el cual se ha medido actividad de ribulosa bifosfato carboxilasa. Además, tienen una mancha ocular, o estigma, el cual es una estructura pigmentada y sensible a la luz. Las algas incoloras de este orden carecen de cloroplastos y contienen amiloplastos. La reproducción de estos organismos puede presentar una fase sexual por isoogamia ó por oogamia. La fase asexual es por bipartición. El género *Polytomella* fue descrito por primera vez por Aragao en 1910. En 1955, Pringsheim aisló, de diferentes localidades, 6 especies de éste género, que difieren en características morfológicas menores (figura 8).

Como forma de reserva de energía, estas algas incoloras presentan gránulos de almidón, separables por centrifugación isopícnica y teñibles con iodo. Durante el crecimiento de cultivos, se observa que la cantidad de almidón en las células aumenta de forma constante hasta el final de la fase de crecimiento logarítmico (Sheeler y col., 1968).

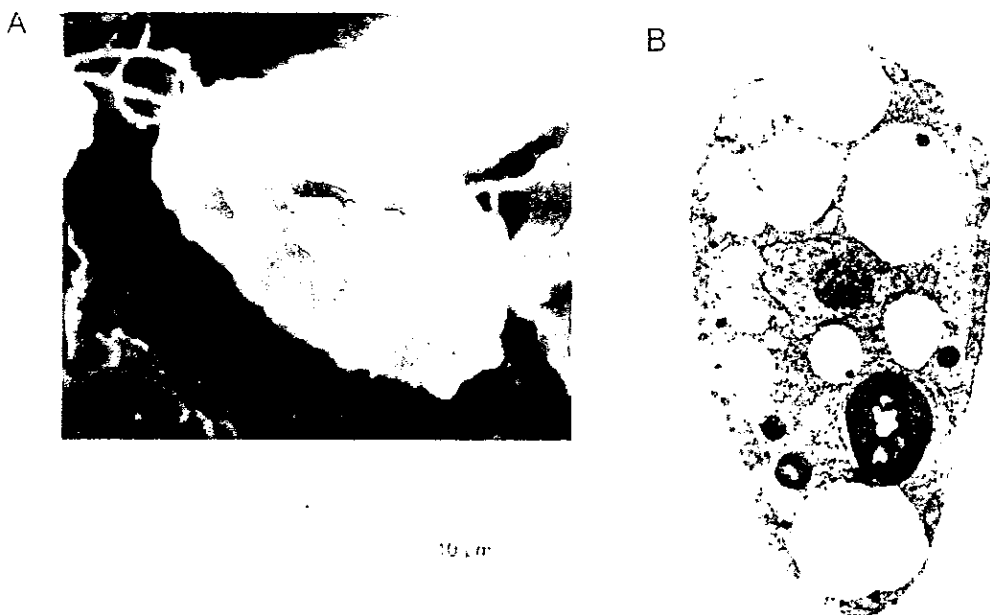


Figura 8: Fotografía de microscopía electrónica de barrido de una célula de *Polytomella* spp. crecida en el laboratorio. B: Sección longitudinal media de *Polytomella agilis*. En ella se ven las mitocondrias alargadas en la periferia de la célula (Tomado de Burton y Moore, 1974).

En cultivos axénicos, a 25 °C y con pH's cercanos a 7.0, *Polytomella* puede crecer con acetato como única fuente de carbono. También puede utilizar propionato, butirato, valerato, alcohol amílico, alcohol butílico, DL-gliceraldehído ácido α -cetoglutarico y etanol (Wise, 1955). Se ha observado que, en ausencia de tiamina (vitamina B₁) y cianocobalamina (vitamina B₁₂), provoca que las células presenten mitocondrias de menor tamaño y de forma ovoide, cuyo contenido de citocromos tipo *a* y *b* se reduce en un 80 a 90 % y el de citocromos tipo *c* en un 40% (Cantor y Burton, 1975).

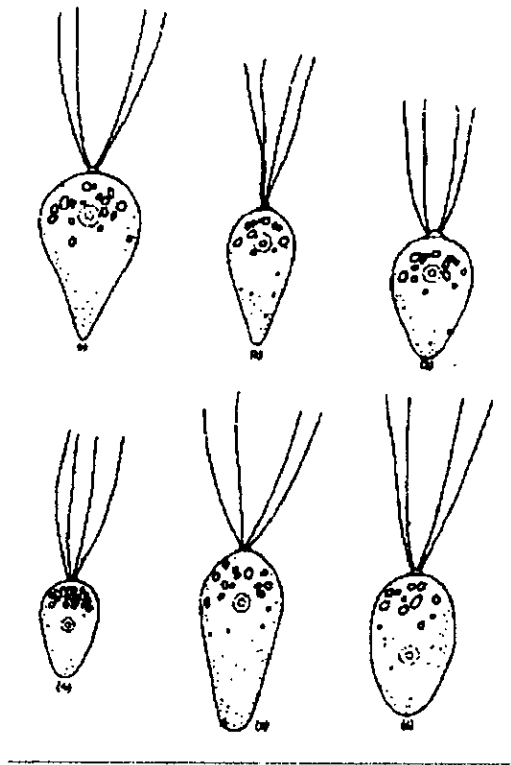


Figura 9: Diferentes especies de *Polytomella* aisladas por Pringsheim en 1955: 1.- *P. caeca*, 2.- *P. caeca* var *minor*. 3.- *P. papillata*. 4.- *P. parva*. 5.- *P. magna*. 6.- *P. capuana*. Cada una de estas especies fue colectada en diferentes sitios (Tomada de Pringsheim, 1955).

El ciclo de vida de *Polytomella* se muestra en la figura 10. Este ciclo presenta dos alternativas de reproducción, una asexual por fisión binaria y otra sexual por isogamia y meiosis (Lewis y cols., 1974). La reproducción asexual ocurre desde el momento en que se siembra el inóculo hasta el crecimiento estacionario en un cultivo axénico. El plano de división de las células es postero-anterior comenzando en la parte contraria a los flagelos como se muestra en la figura 10. Las células hijas tienen dos flagelos durante la división celular y al final de la misma se observan tetraflageladas.

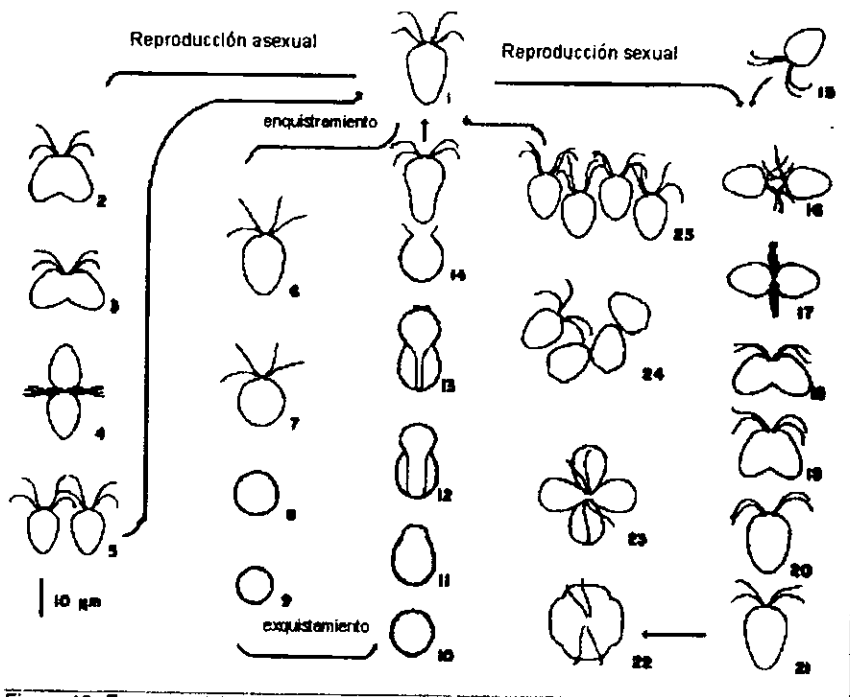


Figura 10: Esquema del ciclo de vida de *Polytomella caeca*. Este organismo tiene una fase de reproducción sexual (números 15 a 25) y otra de reproducción asexual, en la que las células se dividen por bipartición (números 1 a 5). La fase de enquistamiento puede ocurrir durante todo el ciclo de vida (números 6 al 9) aunque generalmente ocurre después de las 48 hrs de crecimiento. La fase sexual ocurre en la etapas tardías del crecimiento del cultivo. Tomado de Lewis y cols., 1974.

La reproducción sexual ocurre en la fase exponencial del crecimiento del cultivo, cuando la población es más densa. Los gametos (en este caso, isogametos, pues son indistinguibles morfológicamente) hacen contacto y enrollan sus flagelos como se muestra en la figura 10 y se fusionan por la parte anterior. El cigoto resultante tiene sólo cuatro flagelos. Esta etapa dura de 3-3.5 hrs. La división del cigoto forma cuatro células hijas, una de las cuales hereda los cuatro flagelos de la célula madre, mientras que las otras los regeneran rápidamente.

Como parte del ciclo de vida y además como forma de latencia se presenta la formación de quistes. Al llegar el cultivo a la fase estacionaria, la población está compuesta por 80% de células enquistadas. Las células pierden sus flagelos y

comienzan a adquirir una forma redondeada. El quiste maduro contiene 4 capas de pared celular depositadas secuencialmente sobre la membrana plasmática (Brown y col., 1976a). Pringsheim, 1955, reportó que la pared no se tiñe con una solución de zinc-cloruro-iodo, lo que indica ausencia de celulosa. Los organelos se presentan en poca cantidad y disminuídos en tamaño. Para que ocurra el "exquistamiento" es necesaria la captación de agua (ya que se observa un aumento en el volumen) y la digestión de la pared celular (Brown y col., 1976b).

Las mitocondrias de *Polytomella caeca* se aíslan fácilmente por rompimiento mecánico de las células y centrifugación diferencial (Lloyd y Chance, 1968). El análisis espectroscópico de las mismas (ver figura 11), reveló la presencia de citocromos *b*, *c+c₁*, *a+a₃* y flavoproteínas. Así mismo, el transporte de electrones mostró ser sensible a antimicina A, rotenona, piericidina A y cianuro.

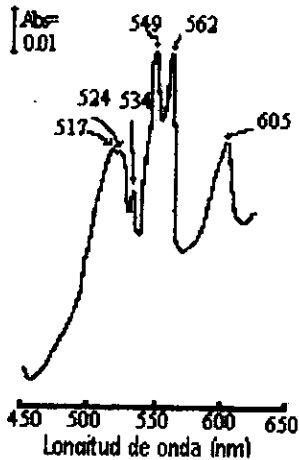


Figura 11: Espectro diferencial (reducido con ditionita-oxidado) de las mitocondrias de *Polytomella caeca* a temperatura de nitrógeno líquido. Tomado de Lloyd y Chance, (1968).

Lloyd y cols., (1969) realizaron estudios sobre el efecto del cloranfenicol (que inhibe la síntesis de proteínas y por lo tanto el crecimiento de las células eucariotas) en el crecimiento de *Polytomella caeca*.

Observaron que el tiempo de duplicación era mayor en las células que recibían el inhibidor. Así mismo, el contenido de los complejos respiratorios se veía disminuido, al igual que la óxido-reducción de los mismos al agregar succinato durante la transición de aerobiosis-anaerobiosis. El estudio de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias del género *Polytomella* sólo llegó a este punto. Hemos retomado este estudio con el presente trabajo.

En 1989, Conner y col, realizaron un estudio comparativo de los genes que codifican para la β -tubulina de *Polytomella agilis* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta proteína forma parte de la estructura del flagelo eucarioto. El uso de codones para ambos organismos es muy similar, evitando aquellos tripletes con A en la última posición. La disposición y el tamaño de los intrones en los 3 genes de β -tubulina también son muy semejantes en ambas especies. La secuencia de aminoácidos para las tres proteínas es idéntica en un 98%, así como el tamaño de las mismas en las dos especies. En las dos especies se encuentra una señal de poliadenilación TGTA, la cual se encuentra únicamente en este grupo de algas. Recientemente, en el laboratorio se ha secuenciado el gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (Antaramián y cols., 1996) y el citocromo b (Antaramián y cols., 1998 y tesis doctoral). Este gen mitocondrial mostró un 73.8% de identidad con el homólogo de *C. reinhardtii*. La secuencia nucleotídica de estos genes muestra que entre estos dos organismos hay una gran cercanía. Los dos organismos están emparentados, no sólo por su morfología, también comparten características genómicas. Round (1980) propuso que la separación de un grupo de algas del resto de la Clorofitas pudo darse por la pérdida del aparato fotosintético y de la pared celular, por lo que, probablemente, *Polytomella* surgió del grupo de *Chlamydomonas*. La discrepancia en la clasificación de *Polytomella* quedaría resuelta si este género se considera como perteneciente al grupo de las algas incoloras. Es necesario encontrar evidencias bioquímicas (fenotípicas) y genotípicas en algunas proteínas altamente conservadas de la separación de estos dos grupos durante la evolución de los mismos. Recientemente, Atteia y cols., (1997) llevaron a cabo una comparación bioquímica de las ATPasas

mitocondriales de estas algas, reforzando la hipótesis de un origen común de ambos géneros.

Una posibilidad para conocer más acerca de la relación evolutiva entre los dos organismos, se encuentra en el estudio de sus complejos respiratorios. Sin embargo, para el género *Chlamydomonas* el aislamiento de las mitocondrias libres de membranas tilacoidales ha sido muy difícil (Atteia y col, 1992). Pero, Atteia, 1994, logró la purificación de algunos de los complejos mitocondriales, como la NADH deshidrogenasa, el complejo bc_1 y la ATPasa. Las membranas mitocondriales se solubilizaron con Tritón X-100 y se centrifugaron para separar las membranas. El solubilizado se cargó en un gradiente de sacarosa del 13 al 17% para separar los complejos. Finalmente, se obtuvo una fracción enriquecida del complejo bc_1 y se caracterizó su espectro, que es semejante al del complejo bc_1 de bovino. Esta preparación fue difícil de obtener, y algunos de los complejos respiratorios tienen contaminaciones de proteínas del cloroplasto. El género *Polytomella* es un excelente organismo de estudio para poder caracterizar bioquímicamente a los complejos respiratorios. Debido a que carece de pared celular y de cloroplastos, la obtención de estos complejos respiratorios es más sencilla.

Antecedentes directos:

Hemos purificado al complejo bc_1 de *Polytomella* spp (Gutiérrez-Cirlos y cols., 1994). El complejo mostró 10 subunidades en un gel de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS). Contiene las tres subunidades redox, un citocromo b bihémico, un citocromo tipo c_1 y una proteína hierro-azufre. Este es el primer complejo, con actividad alta, purificado de un protocista (número de recambio de 350 s^{-1}). El espectro del complejo mostró dos transiciones en la banda α de los citocromos, a 553 nm, que pertenece al citocromo tipo c_1 y a 567-568 nm que fue asignada al citocromo b . En contraste, todos los citocromos b analizados hasta ahora, tienen una banda α a 560-562 nm y las transiciones de ambos citocromos no se aprecian con claridad. En el

caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, la banda α no tiene un corrimiento hacia el rojo (A. Atteia, comunicación personal). Por lo tanto, el citocromo *b* de *Polytomella* spp presenta un corrimiento hacia el rojo atípico, que no se había observado en ninguna otra especie.

Objetivos:

1.- El citocromo *b* del complejo *bc₁*, tiene dos hemos unidos por enlaces de coordinación a la proteína. El espectro de absorción resultante, se debe a la interacción del cromóforo con la proteína. Sin embargo, el hemo puede tener diferencias estructurales que propicien un espectro de absorción atípico. Nuestro primer objetivo es el de caracterizar la naturaleza química del grupo hemo del citocromo *b* de *Polytomella* spp para saber si éste puede ser el responsable directo del corrimiento hacia el rojo de la banda α .

2.- De no obtenerse un hemo atípico, entonces debemos pensar que el ambiente proteico es el responsable de este corrimiento hacia el rojo. Debido a que el citocromo *b* tiene dos hemos colocados en diferente sitio de la proteína puede ser que alguno de los dos sea el responsable del corrimiento hacia el rojo. Nuestro segundo objetivo es obtener los espectros de cada uno de los hemos (b_L como b_H) para diferenciarlos y saber si alguno de ellos (o los dos) es el responsable de este corrimiento.

3.- Además de la caracterización por medio de espectros diferenciales de los hemos del citocromo *b*, nos proponemos obtener los potenciales redox de cada uno de ellos. La finalidad es ver si existen diferencias importantes también en los valores del potencial redox que puedan tener relación con el corrimiento hacia el rojo.

4.- Pensamos estudiar las posibilidades de que el ambiente proteico que rodea a estos hemos sea el responsable del cambio en el espectro del citocromo *b*. El análisis de la secuencia de aminoácidos de diferentes citocromos que tengan un corrimiento en el espectro de absorción o una escisión de la banda α puede darnos una idea de que es lo que pasa en el citocromo *b* de *Polytomella* spp.

5.- También pretendemos hacer una búsqueda en la literatura acerca de estudios del corrimiento en el espectro de absorción de otras proteínas que tengan una porfirina como cromóforo. Sistemas como los de pigmentos fotosintéticos pueden ser de gran ayuda para este fin.

Materiales y Métodos:

Obtención del microorganismo:

El alga *Polytomella* spp. se obtuvo de la colección de la Universidad de Gotinga, Alemania (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen). Esta cepa se mantiene en la Colección del Departamento de Microbiología del CINVESTAV del I.P.N. bajo el código de registro CDBB-951. El microorganismo fue crecido en el medio de cultivo reportado por Wise (1959). El medio contiene 29.4 mM de acetato de sodio, 0.2% de bactotripton y 0.2% de extracto de levadura. A los cultivos se les añadió 0.01 mg/ml de vitamina B₁ y 0.5 µg/ml de vitamina B₁₂ (de acuerdo con Cantor y Burton, 1975). Las células se crecieron en matraces de forma ancha, de 2 litros, para tener una gran superficie de intercambio de gases, ya que los matraces se mantienen sin agitación y a temperatura ambiente durante 48 hrs (ver figura 12). El tiempo de duplicación de esta alga es de 2 hr aproximadamente.

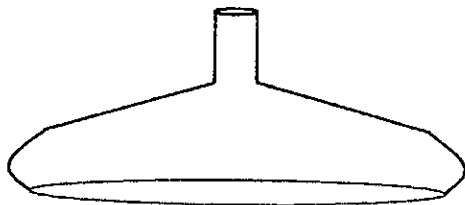


Figura 12: Esquema que muestra un matraz de forma ancha de 2 litros de capacidad.

Purificación del complejo bc₁ de Polytomella spp.:

a.- Obtención de la fracción mitocondrial:

Se cosecharon las células en fase exponencial de crecimiento (48 horas después del inóculo). Esto se hizo centrifugando los cultivos a 1,000 x g 10 min., lo que equivale a centrifugar en una centrífuga Sorvall a 3,500 r.p.m., 10 min. con un rotor GS-3. Las células se resuspendieron en un amortiguador 20 mM de Tris-HCl (pH 7.4) y 0.32 M de sacarosa, 4 mM de EDTA de potasio. Las mitocondrias se obtuvieron rompiendo a las células con un vástago de teflón. A continuación, se centrifugaron primero a baja velocidad (1,000 x g) durante 10 min. para eliminar los restos celulares y a mayor velocidad (10,000 x g) durante 10 min. para obtener a las mitocondrias en el sedimento.

b.- Obtención de una fracción enriquecida del complejo bc₁ de Polytomella spp.:

El complejo bc₁ se purificó de acuerdo con el método descrito por Lungdahl y cols, en 1987 y que consiste en la solubilización de las mitocondrias con el detergente lauril maltósido y una cromatografía de intercambio iónico. Las mitocondrias se solubilizaron con 2g de lauril maltósido por gramo de proteína mitocondrial. A

continuación, se llevó esta solución a una concentración de 10 mg/ml de proteína y 20 mg/ml de lauril maltósido, con un amortiguador 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM de $MgSO_4$ y 100 mM de NaCl (a 4 °C). Se dejó incubar 30 min., a 4 °C, con agitación, y luego se centrifugó a 80,496 x g, 15 min. (lo que equivale a centrifugar a 30,000 rpm en un rotor 50Ti, 15 min.). El sobrenadante obtenido se dializó contra 10 volúmenes de un amortiguador 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 1 mM de $MgSO_4$ durante una hora a 4 °C. Posteriormente se cargó sobre una columna de la resina DEAE-Biogel A. Esta columna fue equilibrada previamente con un amortiguador 50 mM Tris-HCl (pH 8.0 a 4 °C), 1 mM de $MgSO_4$ y 0.1 mg/ml de lauril maltósido. La columna cargada con el sobrenadante dializado se dejó lavando durante toda la noche con tres volúmenes de columna del mismo amortiguador. El volumen excluido de la columna y el lavado se colectó en fracciones de 100 gotas por tubo (2.5 ml aproximadamente) en un colector Gilson. Después de este lavado exhaustivo, se corrió la columna con el mismo amortiguador, pero ahora adicionándole 100 mM de NaCl, 1mM de fluoruro de fenilmetanosulfonil, (PMSF siglas en inglés) y 135 μ M de N α -p-tosil-L-lisina-cloro-metilcetona, (TLCK siglas en inglés). Después de haber pasado 5 volúmenes de columna, se cambió a un amortiguador con 400 mM de NaCl, 1mM de PMSF y 150 mM de TLCK. Este segundo amortiguador se aplicó a la columna hasta que la resina se viera totalmente blanca. Con este segundo lavado se obtuvo la fracción enriquecida del complejo *bc*, de *Polytomella* spp. Todas las fracciones se colectaron a razón de 100 gotas (2.5 ml aproximadamente) por tubo. Las fracciones se leyeron a 280 nm de longitud de onda para localizar la presencia de proteína y a 415 nm para detectar citocromos.

Purificación del complejo bc₁ de bovino:

Se obtuvo a las mitocondrias de corazón de bovino por medio del procedimiento descrito por Löw y Vallin (1963). El método consistió en limpiar de tejido conectivo a los corazones frescos de res, después se pasaron por un molino de carne. A continuación la carne molida se licuó 5 seg. con intervalos de descanso de 5 seg. hasta completar 30 seg. de licuado. El amortiguador empleado fue 250 mM de sacarosa, 5 mM de Tris-Cl, pH 7.5 y 2 mM de EDTA. El licuado se centrifugó a 755 x g durante 10 min. en un rotor GS-3 (Sorvall). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una doble capa de gasa y se centrifugó a 7,500 x g durante 10 min. con un rotor GSA (Sorvall). El sedimento obtenido se resuspendió en un amortiguador con 250 mM de sacarosa y 5 mM de Tris-HCl (pH 7.5). Se homogeneizó la preparación con un vástago de teflón y se centrifugó de nuevo a 7,273.5 x g durante 10 min. El sedimento se resuspendió en el segundo amortiguador y se guardó a -70 °C.

El complejo *bc*, de bovino se obtuvo mediante el procedimiento publicado por Ljungdahl y cols, (1987). Todos los pasos se llevaron a 4°C. El proceso de purificación es semejante al del complejo *bc*, de *Polytomella* spp. con algunas modificaciones. Las mitocondrias se solubilizaron con una proporción de 1 mg de lauril maltósido/mg de proteína mitocondrial. Para obtener el complejo *bc*, se

hizo un gradiente de 100 a 300 mM de NaCl y el complejo se obtuvo aproximadamente a 290-300 mM de NaCl, al lavar con un gradiente continuo.

Espectros para determinar la concentración de los citocromos c_1 y b :

En este caso se hicieron espectros diferenciales del complejo bc_1 purificado totalmente oxidado y totalmente reducido con ditionita. Se usaron cubetas de vidrio de 1 cm de paso de luz y de 400 μ l de volumen. Estos espectros se hicieron en un espectrofotómetro tipo Shimadzu modelo UV160U. El proceso fue el siguiente: se tomó una alícuota del complejo bc_1 y se diluyó 1:2. Se corrió el espectro de absorción desde 350 hasta 600 nm de longitud de onda. Este espectro del complejo bc_1 oxidado se usó como línea base para poderla restar al del complejo bc_1 reducido con unos pocos granos de ditionita. Con el espectro diferencial se obtuvo la absorbencia a 553 nm y a 568 nm (que corresponden a la banda α del citocromo c_1 y del resultante citocromo b bihémico, respectivamente). Para determinar la concentración del citocromo tipo c_1 se utilizó el coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon$ (553-541nm) = 17.5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtenido para el citocromo c_1 aislado de corazón de bovino. Para el caso del citocromo b se utilizó el coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon$ (562-575nm) = 25 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ de bovino (Degli Esposti y cols, 1984). Este mismo tipo de espectro diferencial se hizo con la fracción mitocondrial obtenida.

HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución):

Esta cromatografía se realizó en un aparato Beckman de dos bombas y con un controlador de gradiente automático. Se utilizó una columna Supelco C-4 de 250 X 4.6 mm para una cromatografía de fase reversa. La columna se equilibró con una solución de 65% ácido trifluoroacético TFA al 0.1% en agua (solución A) y 35% de 2:1 de acetonitrilo:isopropanol conteniendo 0.1% de TFA (solución B). Todas las proteínas se trataron con 8M de urea, poniendo un volumen de la solución de urea por volumen del complejo bc_1 . Antes del HPLC, las muestras se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf y se descartó el material insoluble. Todas las muestras se cargaron en la columna C-4 con un inyector marca Rheodyne en un asa de 500 μ l. Las proteínas fueron lavadas de la columna con un flujo de 1.5 ml/min. de acuerdo con el siguiente programa: de 0 a 4 min. con 65% de la solución A y 35% de la solución B; de 4 a 44 min. un gradiente lineal hasta 35% de la solución A y 65% de la solución B; de 44 a 50 min. un gradiente lineal hasta 100% de la solución B; de 50 a 57 min. un gradiente lineal de regreso hasta 65% de la solución A y 35% de la solución B y de 57 a 60 min. se mantuvo a 65% de la solución A y 35% de la solución B. Los datos se captaron por medio de un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) modelo Waters 966. Los datos se almacenaron y procesaron en una computadora NEC (NEC Power Mate 433) con el programa Millenium 2010. Los espectros se registraron de 250 a 700 nm cada 4 segundos.

Espectros diferenciales del complejo bc₁:

Los espectros se hicieron para caracterizar mejor al citocromo *b* del complejo *bc₁* de *Polytomella* spp. El complejo se utilizó a una concentración final de 5.5 μ M de citocromo *c₁*. El amortiguador utilizado fue: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM de MgCl₂; 0.1 mg/ml de lauril maltósido, 10% de glicerol, 50 mM de NaCl. Se utilizó ascorbato 1M (pH 7.0) en agua como uno de los reductores. El 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzohidroquinona ó decilubiquinona (DBH) se redujo con el método descrito por Trumppower y Edwards (1979), que será descrito más adelante y se obtuvo a una concentración de 4.4 mM en etanol. Se utilizó también la ditionita (Na₂S₂O₄) como tercer reductor, en este caso, solo se utilizaron unos granos de ditionita. Estos espectros diferenciales se registraron con un espectrofotómetro de longitud de onda dual DW-2a™ Aminco modificado por ON-Line Instrument System Co. Este programa utiliza una paquetería de Outstanding Laboratory Instrument and Software- Rapid Scanning System (OLIS-RSM).

Los espectros se realizaron de la siguiente manera:

El complejo *bc₁* de *Polytomella* spp. se diluyó 1:2 en un volumen final de 400 μ l para la cubeta de muestra del espectrofotómetro; la cubeta de referencia tuvo 400 μ l del amortiguador usado para diluir al complejo. El primer espectro se registró con el complejo oxidado contra el amortiguador. A continuación se añadió al complejo 8 μ l de ascorbato 1M (para una concentración final de 0.02 M). La siguiente reducción se hizo añadiendo a la cubeta 5 μ l de DBH 4.4 mM (para una concentración final de 0.055 mM). Finalmente, se pusieron unos cuantos granos de ditionita a la cubeta de muestra. En cada uno de los pasos descritos, se corrió un espectro de absorción desde 500 a 600 nm de longitud de onda.

Se registraron los mismos espectros para el complejo *bc₁* de bovino con una concentración final de 6.7 μ M. Se hicieron diferentes controles para poder tomar en cuenta la posible dispersión del espectro de absorción causada por los reductores. Se registró un diferencial solamente del amortiguador tanto en la cubeta de muestra como en la de referencia. Después se le añadieron 8 μ l de ascorbato 1 M. A continuación se añadieron 5 μ l de DBH 4.4 Después se añadieron otros 3 μ l de DBH 4.4 mM. A continuación, se colocaron unos cuantos granos de ditionita a la cubeta de muestra. En cada adición se tomó un espectro de absorción. Una vez registrados tanto los controles como los espectros de absorción tanto del complejo de *Polytomella* spp., como el de bovino, se hicieron las restas de espectros de cada reducción contra los controles correspondientes. Después de esto, se restaron de cada uno de los pasos de reducción. Tanto para el complejo *bc₁* de *Polytomella* spp. como para el de bovino, se hicieron las siguientes restas de espectros:

- a.- reducido con ascorbato menos oxidado,
- b.- reducido con DBH menos reducido con ascorbato,
- c.- reducido con ditionita menos reducido con ascorbato,
- d.- reducido con ditionita menos reducido con DBH.

Cabe señalar que también se hicieron los espectros controles del amortiguador y de la adición de los reductores. En primer lugar, se hizo un espectro diferencial del amortiguador, puesto tanto en la cubeta de referencia como de muestra. A continuación se añadió ascorbato a la cubeta de muestra y se corrió un espectro. Después se hizo la adición de 8 μ l de DBH (4.4 mM) y después se hicieron varias adiciones más del DBH para tomar en cuenta la posible dispersión que causa al espectro la adición del DBH. Finalmente, se añadió ditionita (en polvo) a la cubeta de muestra y se corrió el espectro.

Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro de doble monocromador DW-2a™ Aminco modificado por ON-Line Instrument System Co. El análisis y los espectros diferenciales se hicieron con la paquetería de OLIS-RSM.

Espectros a baja temperatura.

Estos espectros se hicieron con la finalidad de poder separar cada uno de los componentes del espectro del citocromo *b*. Los espectros se hacen con un sistema de "dedo frío" que consiste en un portaceldas con dos celdillas de 0.2 mm de paso de luz y un volumen de 1 ml. Este portaceldas es de metal y se enfría sumergido en nitrógeno líquido (ver figura 13). El complejo *bc₁* de *Polytomella* spp. y de bovino se diluyeron en un amortiguador: 0.05M de Tris-HCl (pH 8.0), 0.05 M de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0.01 mg/ml de lauril maltósido y 50% de glicerol.

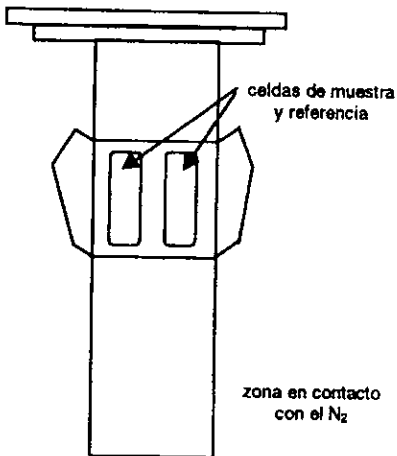


Figura 13: Esquema que muestra un "dedo frío", hecho de metal y que tiene una zona larga que se pone en un baño con N₂ líquido. Tiene dos celdillas, para la muestra y la referencia

Los espectros se hicieron partiendo de una mezcla con 2.46 ml del complejo *bc₁*, a 12.2 μ M, se añadió 4.8 ml del amortiguador y 0.9 ml de glicerol al 100%. En la celda de referencia se puso solamente el complejo *bc₁*, sin reductor. A continuación se puso el portaceldas en un baño de nitrógeno líquido hasta cerca del borde de las celdas. Una vez que se

congelaron las dos mezclas se pasó a un vaso tipo Dewar con nitrógeno líquido hasta por debajo del borde interior de la celdilla y se procedió a correr el espectro de absorción de 500 a 600 nm. El siguiente espectro se hizo colocando en una de las celdas al complejo reducido con 50 μ l de ascorbato 1M. En la otra celda se redujo al complejo con 40 μ l de DBH 4.4 mM. El tercer tipo de espectro fue colocar al complejo *bc*, reducido con ditionita menos el reducido con ascorbato. Cada uno de los espectros diferenciales se hizo poniendo una nueva mezcla del complejo con los respectivos agentes reductores. A continuación se enfrió la muestra a temperatura de nitrógeno líquido y posteriormente se hizo el registro del espectro. Se utilizó el mismo espectrofotómetro con el aditamento del vaso tipo Dewar.

Preparación del DBH (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona):

Esta metodología está basada en la descrita por Trumpower y Edwards, 1979, y consiste en lo siguiente:

De una botellita de 25 mg de DBH (Sigma) se extrajo todo el contenido con etanol hasta completar 5 ml colocados en un tubo de vidrio de 25 ml con tapa de rosca. Se añadió al tubo 10 ml de un amortiguador de 25 mM de fosfatos de potasio (pH 7.2) y 25 μ M de EDTA disódico. Esta mezcla se agitó para mezclar completamente. Luego, se agregó poco a poco ditionita en polvo hasta que la solución quedó de un color amarillo pálido y turbia. Después se añadió un poco de polvo de borohidruro de sodio ($\text{Na}(\text{BH}_4)$) hasta que la solución quedó amarilla transparente. Si quedaba aún de color naranja fuerte, se añadió un poco de etanol. Una vez hecho esto, se hicieron extracciones con ciclohexano, 4 veces con 4 ml cada vez y se pasaron las fracciones del sobrenadante a otro tubo de vidrio. Las fracciones de ciclohexano se lavaron con el mismo amortiguador usado y luego se descartó el amortiguador. Se juntaron las fracciones y el ciclohexano se evaporó mediante un flujo de nitrógeno. Una vez que se evaporó todo el ciclohexano, se resuspendió el DBH en etanol al 100% (2 ml) y se le agregó 200 μ l de 0.1 M de HCl.

Para finalizar, se tomaron 10 μ l de los 2 ml anteriores y se pusieron en una cubeta de cuarzo del espectrofotómetro. Se diluyeron con 3 ml de etanol y se hizo un espectro de 250 a 320 nm, corriendo previamente una línea base con etanol solo. Se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{289} = 16.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, reportado en el mismo trabajo de Trumpower y Edwards (1979).

Preparación de la antimicina y el mixotiazol:

Los dos inhibidores se solubilizaron en etanol. Se pesó la cantidad específica del mixotiazol para tener una concentración de 50 mM y se disolvió en etanol. Para determinar la concentración del mixotiazol con mayor exactitud, se hizo una dilución 1:10 con etanol. El espectro se corrió de 280 a 400 nm utilizando cubetas de cuarzo. La línea base se corrió con etanol. El coeficiente de extinción utilizado para determinar la concentración fue el reportado por von Jagow y Link (1986): 10.5

$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 313 nm de longitud de onda. Del mismo modo, se preparó la antimicina. En este caso, el espectro de absorción se corrió de 250 a 400 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de $4.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 320 nm de longitud de onda, reportado por von Jagow y Link (1986). Los espectros se hicieron en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu, modelo UV160U.

Actividad de la ubiquinol citocromo c oxidorreductasa en presencia de diferentes concentraciones del mixotiazol y la antimicina:

El método está basado en el descrito por Kubota y cols. (1992). Consiste en activar el complejo una hora antes en un amortiguador 50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 660 mM de sacarosa; 1mM de L-histidina y 0.01% de Tween-20. El complejo bc_1 debe quedar diluido a una concentración de 1 μM . Se incubó en hielo sin agitar. Una vez pasada una hora, el complejo bc_1 se diluyó 10 veces (0.1 μM) con el mismo amortiguador. El ensayo de actividad se hizo de la siguiente manera: en la cubeta se colocó DBH para una concentración final de 15 μM , más citocromo c oxidado de caballo a una concentración final de 30 μM . El volumen final en la cubeta del espectrofotómetro fue de dos ml con el amortiguador que contiene: 55 mM de Tris-HCl, pH 7.4 (4 °C); 2 mM de NaN_3 ; 0.5 mM de EDTA de sodio; 0.01% de Tween-20 y 20 mM de MgCl_2 . La cubeta se puso en el espectrofotómetro con una barra de agitación magnética. Una vez que los componentes quedaron uniformemente mezclados, la reacción se disparó agregando el complejo bc_1 a una concentración final de 5 nM. Se siguió la reducción del citocromo c (550-540 nm) a través del tiempo con el espectrofotómetro de doble longitud de onda DW-2a™ Aminco, en el modo dual. Este programa utiliza la paquetería de análisis OLIS-RSM. Después de medir la actividad del complejo sin inhibidores, por triplicado, se procedió a añadir el inhibidor (ya sea antimicina A o mixotiazol) a la mezcla del complejo bc_1 0.1 μM . Se tomó en consideración que la concentración del complejo bc_1 en el ensayo fuera siempre de 5 nM final. Las concentraciones de mixotiazol utilizados fueron (en orden de su colocación): 50 nM; 55 nM; 62.5 nM; 71.4 nM; 83.3 nM; 200 nM y 500 nM. Las concentraciones de antimicina utilizadas fueron: 10.5 nM; 16.0 nM; 21.8 nM; 28.1 nM; 41.4 nM; 55.7 nM; 94.2 nM; 135.8 nM; 181.3 nM; 281.3 nM; 503.3 nM y 1.1 μM final.

Titulación redox de los hemos b del complejo bc₁ de *Polytomella* spp.:

La titulación se hizo para obtener los potenciales redox y sus espectros de absorción de los hemos del citocromo b. Esta se llevó a cabo de la siguiente manera:

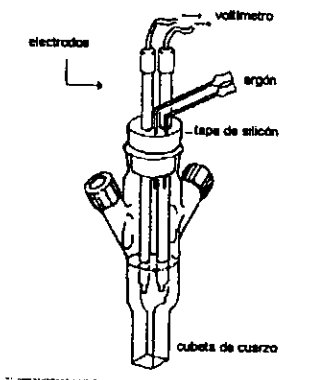


Figura 14: Esquema de una celdilla para medir potenciales redox de 5 ml aproximadamente de volumen. En este esquema no se muestra el agitador magnético que debe llevar para mezclar las soluciones.

En una celdilla para medir potenciales (ver figura 14), se hizo una mezcla que contenía: 2 ml del complejo bc₁ de *Polytomella* spp., a una concentración final de 5 μ M. Se añadieron los siguientes mediadores redox (en concentraciones finales): 15 μ M de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 75 μ M duroquinona; 50 μ M de 2,3,5,6-tetrametil-p-fenilendiamina; 40 μ M de 1,4-benzoquinona; 40 μ M 1,4-naftoquinona, 25 μ M N-metildibenzopirazina metasulfato. Todos los mediadores se prepararon en soluciones 10 veces más concentradas y disueltos en dimetil sulfóxido.

El amortiguador utilizado fue: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (4 °C); 1 mM MgCl₂; 0.1 mg/ml de lauril maltósido, 10 % de glicerol; 30 mM NaCl. El volumen final de la mezcla fue de 6 ml.

En la celdilla se colocaron los electrodos para medir el potencial (en volts). Se utilizó un electrodo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Además de esto se adaptó una manguera para pasar argón y eliminar el dióxigeno en la mezcla. Al inicio se burbujeó el argón durante dos min y se midió el potencial. Luego se realizaron las adiciones de los reductores. En primer lugar, se añadió ascorbato 1M ($E_{m7} = +60$ mV), a continuación DBH 4.4 mM ($E_m = 0$ mV) y finalmente ditionita en adiciones (solución fresca) (E_m cercano a -400 mV). Los potenciales redox se midieron con un potenciómetro Beckman $\Phi 32$. Con cada adición se midió el potencial y se tomó un espectro de absorción (de 500-600 nm) en el mismo espectrofotómetro de doble monocromador. La titulación se hizo en ambos sentidos, de reducción y de oxidación.

Un ejemplo de la titulación en el sentido de la reducción de los hemos es la siguiente:

- titular con adiciones de 20 μ l de ascorbato 1M, medir el potencial cada 10 min durante 40 minutos.
- titular con adiciones de 20 μ l de DBH 4.4 mM medir el potencial después de 10 min.

c.- añadir cantidades crecientes de ditionita en solución, desde 0.0025M hasta 0.05M. Las soluciones de ditionita se hicieron en el momento, para evitar en lo posible que ésta se oxide.

Un ejemplo de la titulación en el sentido de oxidación es la que sigue:

a.- una vez hechas las mezclas del complejo bc_1 , los mediadores y el amortiguador, se burbujeó el argón en la celdilla y se midió el potencial. A continuación, se agregaron 100 μ l de ascorbato 0.01 M. El potencial se midió cada 10 minutos durante una hora aproximadamente y después se agregó ascorbato 0.01 M en cantidades crecientes hasta tener una concentración final de 0.44 mM final de ascorbato en la cubeta. Después se utilizó una concentración mayor (0.04 M) y también se añadieron diferentes volúmenes de esta solución hasta tener 1.9 mM final de ascorbato.

b.- Luego se añadió 50 μ l de ditionita 0.02M (fresca). Se dejó que el complejo se oxidara lentamente por el oxígeno y se tomaron lecturas del potencial cada 10 min. durante 4-5 horas.

Análisis por 4a derivada y por deconvolución de los espectros diferenciales obtenidos:

Todo el análisis se realizó con la paquetería Microcal Origin versión 3.73, de Microcal Software Inc. Los espectros obtenidos con el programa OLIS se guardaron en el idioma ASCII y se importaron al programa. Para cada espectro diferencial (en el caso de los que se obtuvieron con diferentes reductores) se obtuvo la 4a derivada, ya que de acuerdo con Buttler y Hopkins (1970) este análisis es el más adecuado para saber el número de componentes de un espectro complejo. Se pudieron apreciar el número de picos que se podían esperar en cada espectro y además la longitud de onda máxima de cada uno de ellos. Para los diferenciales obtenidos en la titulación redox, se hizo la deconvolución de los espectros, en primer lugar se buscó un ajuste por medio de curvas de tipo Gauss (el programa está incluido dentro de la paquetería Microcal Origin versión 3.73. Es necesario tener los datos ya en una tabla y escoger la opción de ajuste (fit) con la cual se obtiene el menú de ajuste tipo Gauss o Lorentz para uno o más picos. El tipo de ajuste Gauss no resultó ser el adecuado para ajustar los máximos de absorción, por lo que se decidió buscar el ajuste por medio de curvas de tipo Lorentz, que dieron un mejor ajuste $[Y=Y_0/(1+((2(X-X_0)/(\Delta X_{1/2}))^2)]$. Para realizar este proceso es necesario fijar la zona del espectro que se va a ajustar. La zona escogida fue de los 540 nm a los 580 nm de longitud de onda. Se trazó una línea base y se le restó al espectro. Una vez normalizada la zona del espectro, se pidió un ajuste para más de una curva Lorentziana. Se marcan los dos posibles centros de cada pico a analizar y a continuación se pide el ajuste. El programa proporcionó los datos de: centro del pico (o longitud de onda máxima), área del pico (en unidades de absorbencia por nm) y ancho del pico (en nm). Estos datos se vaciaron en una tabla y se sacó el promedio de estos con su desviación estándar (DS).

Resultados:

El complejo bc_1 de *Polytomella* spp:

La figura 15 muestra el espectro de absorción de las mitocondrias de *Polytomella* spp, reducidas con ditionita menos el espectro de las mitocondrias aereadas, en el cual se pueden apreciar las bandas de absorción de los citocromos: los máximos de absorción del complejo bc_1 son los siguientes: 432, 553 y 567 nm. Los máximos de absorción observados para la citocromo c oxidasa son 446 y 603 nm. La banda α de los citocromos $b-c_1$ tiene dos picos de absorción, uno a 553 nm y el otro a 567 nm. Hemos asignado la absorción a 553 nm al citocromo tipo c_1 , ya que tiene el máximo de absorción típico para este citocromo en los complejos bc_1 , y la absorción a 567 nm, al citocromo tipo b , que se presenta corrido hacia el rojo. Se obtuvo una fracción altamente enriquecida del complejo utilizando una cromatografía de intercambio iónico. La pureza se verificó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (DSS) y espectroscópicamente. El complejo muestra 10 bandas polipeptídicas en una electroforesis de poliacrilamida-DSS y tiene una actividad de 300 s^{-1} (Gutiérrez-Cirlos y cols., 1994). El corrimiento hacia el rojo de la banda α se mantiene en el complejo puro, como se muestra en el espectro diferencial del complejo reducido con ditionita menos el espectro que se obtuvo al salir de la cromatografía (ver figura 16A). En este caso, se presentan las bandas de absorción características de los citocromos de este complejo. En primer lugar, a 436 nm está la banda γ o Soret, en la región de los 530 a 540 nm la banda β y en la región de los 553-668 nm, la banda α . En comparación, la banda γ está a 436 nm en el complejo puro, pero en las mitocondrias a 432 nm. Probablemente este valor en las mitocondrias se deba a la presencia de la citocromo c oxidasa (cuyo máximo se sobrepone al del citocromo b). La zona de la banda α del complejo bc_1 puro mostró dos picos, uno a 553 nm y el otro a 567-8 nm. La banda α del citocromo b está corrida hacia el rojo, igual que en el

FALTA PAGINA

No. 37

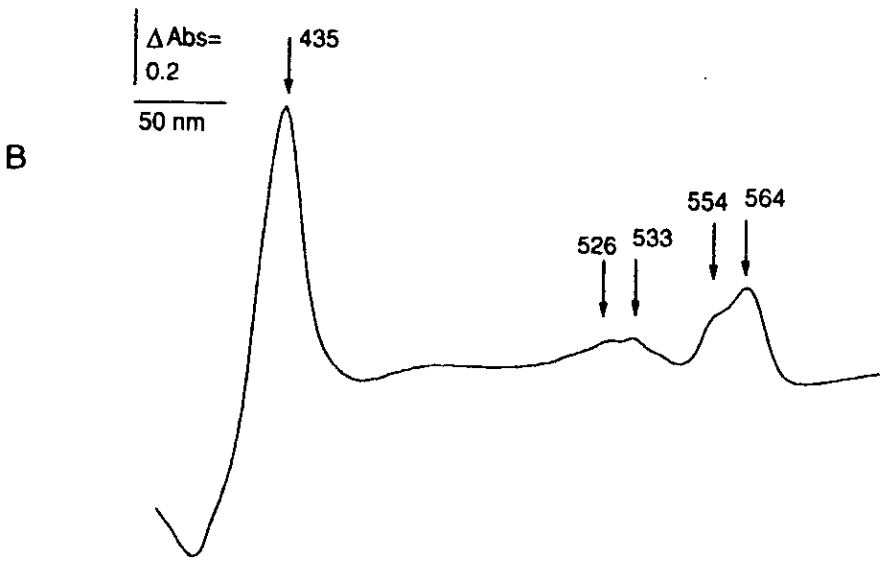
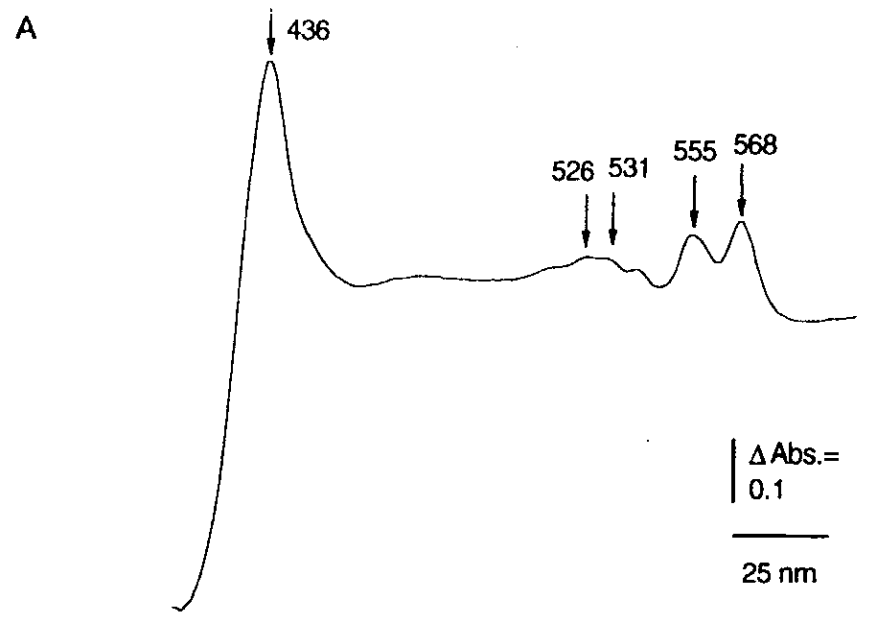
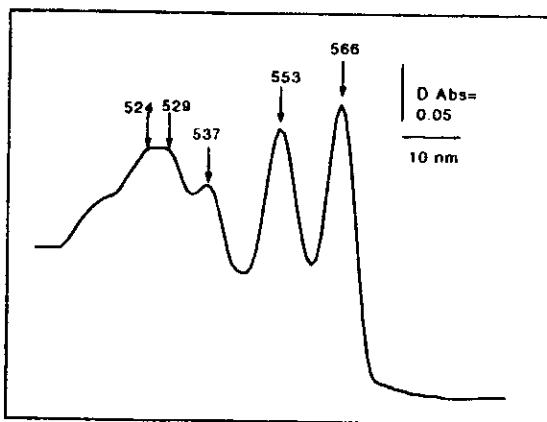


Figura 16A: Espectro diferencial (espectro reducido con ditionita menos el oxidado) a temperatura ambiente del complejo *bc*, aislado de *Polytormella* spp. B.- Espectro diferencial (espectro reducido con ditionita menos el oxidado) a temperatura ambiente del complejo *bc*, aislado de bovino.

Espectros a baja temperatura:

Estos espectros se hicieron para apreciar cada uno de los máximos de absorción de un espectro de manera más fina. La vibración de las moléculas se reduce y por lo tanto se obtienen transiciones más delgadas en el espectro. Cada uno de los máximos puede apreciarse como una sola transición y un sólo componente en la mayoría de los casos. El espectro diferencial (reducido con ditionita menos el oxidado) a baja temperatura, se muestra en la figura 17 panel A. Se observa una sola banda α a 566 nm y otra a 553 nm, que corresponden a la banda α del citocromo *b* y al citocromo *c₁*, respectivamente. El resto de los picos se identificaron como pertenecientes a la banda β de los citocromos. A continuación, se hizo el análisis por 4a derivada de este espectro para poder determinar si cada uno de los máximos de absorción tenía o constituía un sólo componente (ver figura 17 panel B). Se observó que el máximo a 566 nm tiene un sólo componente, pero el máximo a 553 nm parece ser el resultado de la sobreposición de varios picos. El mayoritario, se observó a 550.7 nm que puede ser el citocromo tipo *c₁*.

A



B

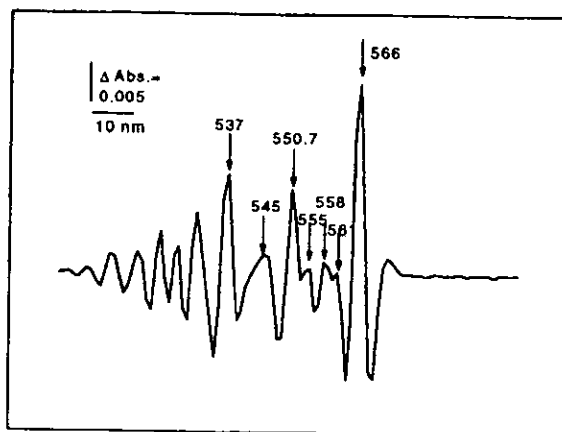


Figura 17: Espectro diferencial (reducido con ditionita menos el oxidado) del complejo *bc*₁ de *Polytomella* spp. En el panel A se muestra el espectro tal cual se obtuvo y en el panel B se muestra el análisis por 4a derivada que se hizo a este espectro.

El citocromo c_1 de *Polytomella* spp:

Como parte de la caracterización realizada del complejo bc_1 , se obtuvo un fragmento del gene del citocromo c_1 de *Polytomella* spp por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). El fragmento amplificado tiene 860 pares de bases, contiene dos intrones que fueron identificados por la secuencia consenso de inicio y de fin del intrón (Susuki y cols., 1989). En este fragmento encontramos la región de unión del hemo a la proteína que tiene la secuencia consenso CXXCH y que para *Polytomella* spp fue CAACH. Esta secuencia es característica de los hemos que tienen dos uniones covalentes a la proteína y está de acuerdo con el dato espectroscópico, ya que este citocromo tiene una banda α a 553 nm, que es característica de estos hemos. El Apéndice I muestra la metodología que se siguió para este proceso, el análisis de la secuencia de nucleótidos y de la deducida de aminoácidos del fragmento amplificado por PCR.

El análisis por HPLC de los hemos del complejo bc_1 de *Polytomella* spp:

Debido a que la diferencia entre la absorción de la banda α del citocromo b de *Polytomella* spp y de otros citocromos b reportados en la literatura, decidimos caracterizar los hemos de este citocromo. Pensamos que el corrimiento hacia el rojo de la banda α podía deberse a que el hemo fuera diferente, esto es que tuviera sustituyentes diferentes en la protoporfirina. Una manera de caracterizar los hemos del complejo bc_1 es la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC, siglas en inglés). En esta cromatografía se puede separar las subunidades del complejo bc_1 . El patrón de lavado en el HPLC obtenido para el complejo bc_1 de *Polytomella* spp se incluye en la figura 18. El trazo muestra el tiempo de retención de cada fracción seguida durante 60 min. y por su absorbencia a los 400 nm. En la cromatografía del complejo se obtuvieron tres tipos de hemos, el primero, con un tiempo de retención de 18.2 min., en proporción de 72.7% del área total. El segundo, con un tiempo de retención de 33 min., en una proporción de 18.1% y el tercero, con un tiempo de retención de 37.6 min., y en una proporción sólo de 4.6%. El resto son componentes que mostraron menos de 0.01 unidades de absorbencia. A continuación, se hizo una cromatografía en las mismas condiciones que la anterior, pero únicamente con hemina comercial, (cloroprotoporfirina IX, hierro III) (figura 18B). En este caso, se obtuvo un pico a 17.66 min., de tiempo de retención y pequeños contaminantes. El panel C muestra la cromatografía de la mezcla hecha con el complejo bc_1 y la hemina. En esta cromatografía se obtuvieron los tres picos de absorción de la primera cromatografía mostrada, el primero (18.7 min., de tiempo de retención) tiene la suma de las absorciones del primer pico y de la hemina. Los últimos dos están a 35.4 y a 39.7 min., de tiempo de retención.

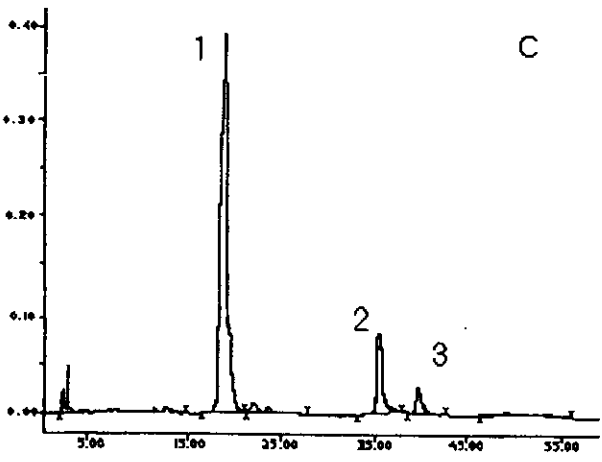
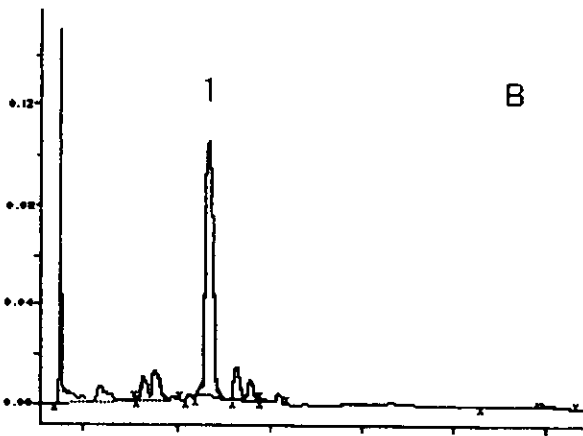
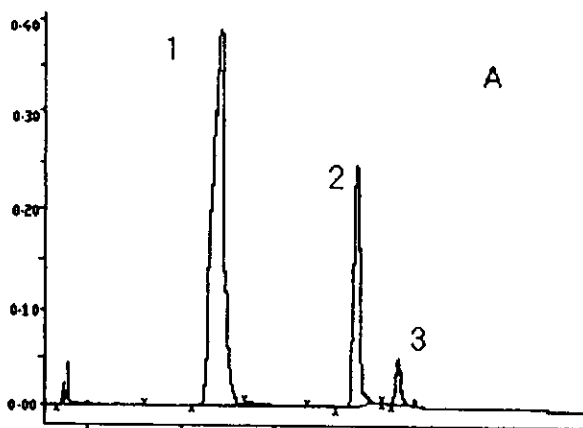


Figura 18: HPLC del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. A: cromatografía del complejo bc_1 . B: cromatografía de la hemina comercial. C: cromatografía de una mezcla del complejo de *Polytomella* spp y la hemina comercial.

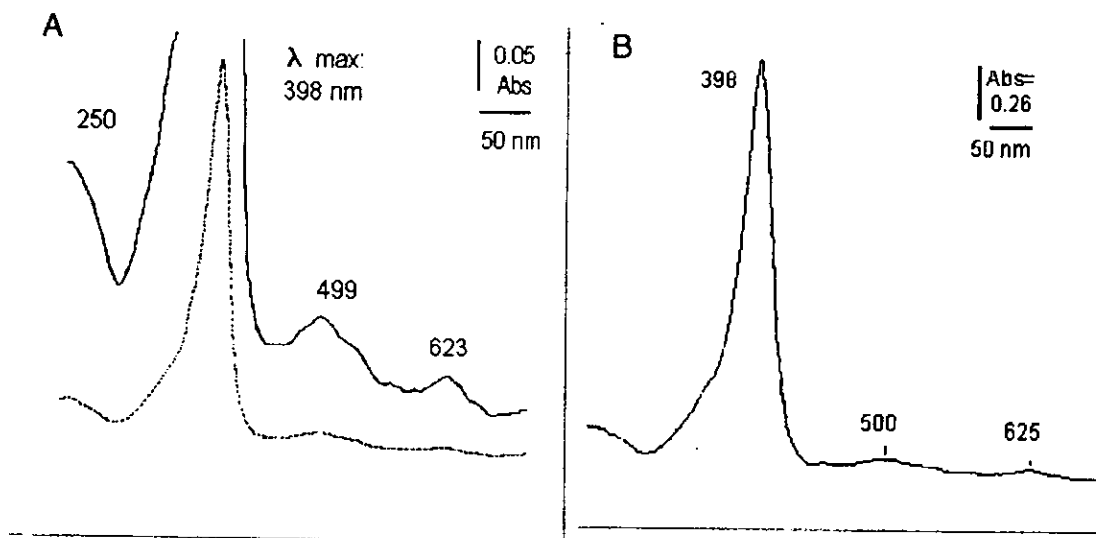


Figura 19: A.- Espectro de absorción del pico 1 de la cromatografía de HPLC del complejo *bc*, de *Polytomella* spp. La línea punteada muestra el espectro sin amplificar y la línea continua el espectro amplificado. B.- Espectro de absorción de la cromatografía de la hemina comercial

El detector acoplado al HPLC es un sistema de arreglo de diodos (PDA, siglas en inglés) que permite obtener los espectros sin distorsión directamente de los picos obtenidos en la cromatografía (de 250 a 700 nm de longitud de onda). Este análisis se muestra en las figuras 19 y 20. La banda Soret muestra una longitud de onda máxima a 398 nm. Con la amplificación del espectro (línea continua) se vio la absorbencia cercana a los 250 nm y otros picos a los 499 y 623 nm de longitud de onda. Cuando se compara este espectro con el de la hemina pura (figura 19B) se ve identidad entre ambos. El espectro de absorción mostró que éste es un hemo que no está unido a una proteína debido a que no hay absorbencia en los 280 nm de longitud de onda, donde absorben los aminoácidos aromáticos de una proteína. Por lo anterior, el primer pico obtenido en la cromatografía del complejo *bc*, es de un hemo tipo *b* no unido a proteína.

La segunda fracción obtenida presentó un espectro de absorción con los siguientes máximos: a 278, 398, 459 y 622 nm (ver figura 20A). En este caso, la amplificación mostró que la absorbencia a 278 nm es de consideración, por lo

que se concluyó que es un hemo unido a una proteína. Por lo tanto, este segundo pico se asignó al citocromo tipo c_1 .

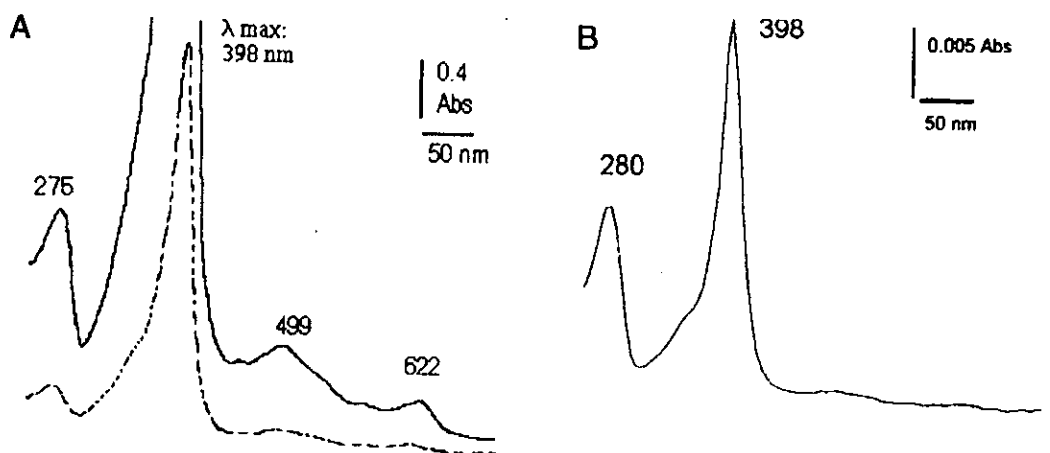


Figura 20: Panel A.- Espectro de absorción del segundo pico obtenido en la cromatografía del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. Este pico corresponde al citocromo c_1 . Panel B.- Espectro de absorción del citocromo c de caballo, para fines de comparación.

Como control, se corrió una muestra con citocromo c de caballo, el cual se obtuvo a 12 min. de tiempo de retención. También presentó absorción de proteína y su cociente de absorbencia A_{400}/A_{275} fue de 8.44, mientras que el segundo pico obtenido en el complejo bc_1 , presentó un cociente de 1.93. Estos valores están de acuerdo con la masa molecular que tiene cada citocromo ya que el citocromo tipo c_1 es un polipéptido de 32,500 Da, mientras que el citocromo tipo c es de 12,000 Da. El tercer pico obtenido en la cromatografía del complejo bc_1 tuvo dos máximos de absorción: uno a 407 nm y otro a 547 nm (figura 21). Se hizo el HPLC de la citocromo c oxidasa de bovino y se obtuvo el espectro de absorción. Con este espectro se comparó el del tercer pico obtenido en la cromatografía del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. El tiempo de retención es característico de los hemos con sustituyentes más hidrofóbicos, como los grupos farnesilos. Podemos concluir que el tercer pico corresponde al hemo a de la citocromo c oxidasa. La citocromo c oxidasa representa menos del 5% del

área del primer pico por lo que se considera una contaminación no detectada por los espectros de absorción hechos con anterioridad. Estos datos mostraron que el hemo con el primer tiempo de retención era un hemo, tipo protohemo IX, por lo tanto, el hemo del citocromo *b* *per se* no es el que ocasiona el corrimiento en el espectro hacia el rojo. Lo anterior sugirió que este corrimiento se debe al ambiente proteico que rodea a los hemos del citocromo *b* de *Polytomella* spp.

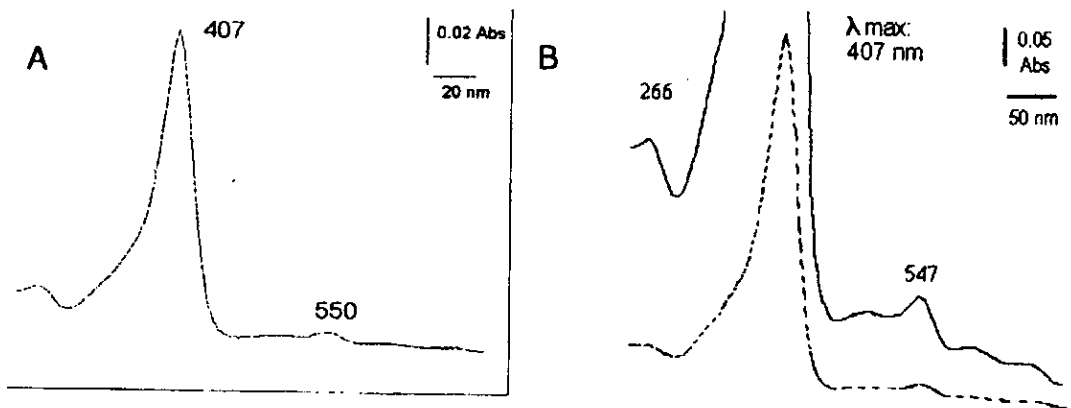


Figura 21: Panel A.- Espectro de absorción de la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* spp. en este espectro se muestran los máximos de absorción más importantes. Panel B.- Espectro de absorción de la citocromo *c* oxidasa de bovino para comparar los espectros, se muestra una amplificación de las diferentes bandas de este hemo.

Espectros diferenciales del citocromo *b* usando diferentes agentes reductores.

La figura 22 muestra los espectros diferenciales hechos con diferentes reductores del complejo bc_1 . Estos reductores son ascorbato ($E_m = +60$ mV), DBH (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona; E_m cerca de 0 mV) y ditionita (E_m mayor a -400 mV). La columna de la izquierda (A,C,E) muestra los espectros diferenciales del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. La columna de la derecha (B,D,F) muestra los espectros diferenciales del complejo bc_1 aislado de corazón de

bovino. Estos últimos espectros se hicieron para poder comparar lo que ocurre en el citocromo *b* de bovino, un citocromo representativo de todos los *b* reportados, y el citocromo *b* de *Polytomella* spp., que tiene un corrimiento hacia el rojo en la banda α . Los espectros se hicieron en la zona entre 500 y 600 nm solamente, para seguir la banda α de los citocromos. El primer espectro diferencial (reducido con ditionita menos el reducido con ascorbato) muestra el espectro de los dos hemos del citocromo *b*, ya que el ascorbato tiene el potencial suficiente para reducir al citocromo *c*, (panel A y B para *Polytomella* spp y bovino, respectivamente). La banda α del citocromo *b* de *Polytomella* spp mostró dos transiciones, una a 558 nm y la otra a 568 nm. En cambio, la banda α del citocromo *b* de bovino mostró una sola transición a 565 nm. A continuación se muestra el espectro diferencial reducido con ditionita menos reducido con DBH (el panel C es de *Polytomella* spp y el D de bovino). Con los potenciales de estos reductores se pretendió obtener el espectro del hemo de bajo potencial (hemo b_L). La banda α muestra también dos transiciones una a 558 nm y la otra a 568 nm. En la banda α del citocromo *b* de bovino se puede ver un pequeño hombro a 558 nm y el pico a 565 nm. El último espectro diferencial se hizo con el espectro del complejo reducido con DBH menos el espectro del complejo reducido con ascorbato. En este caso, los potenciales de los reductores deben mostrar el espectro del hemo de alto potencial (hemo b_H). En el caso de *Polytomella* spp la banda α tiene dos transiciones (558 y 568 nm) y para el de bovino la banda α tiene una sola transición a 564 nm.

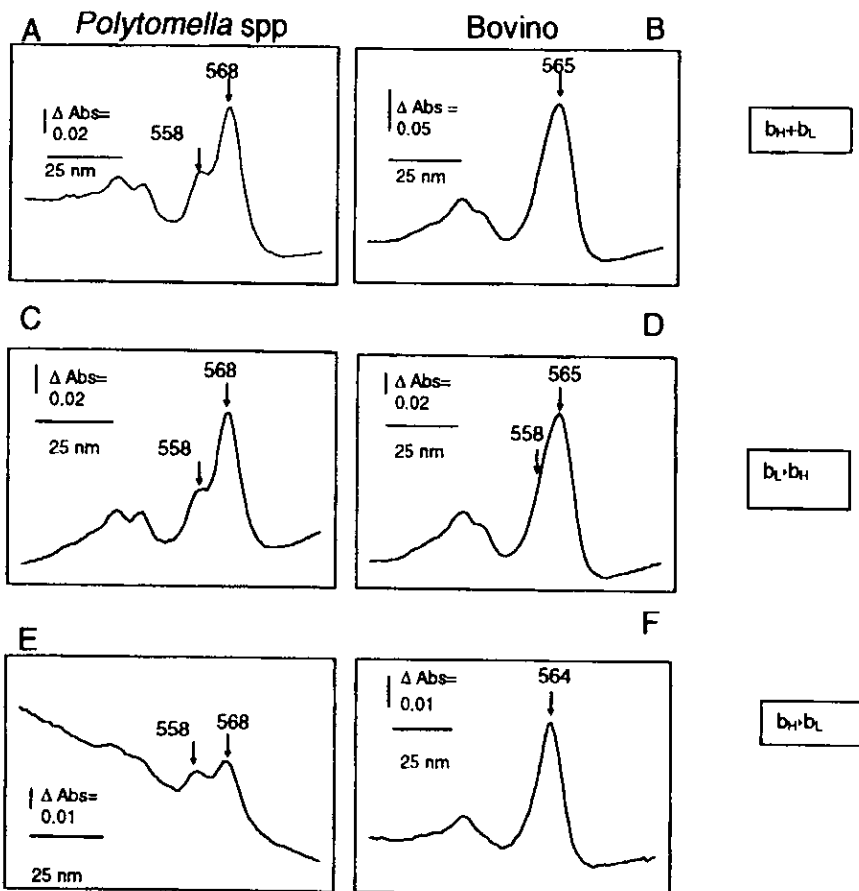


Figura 22: Espectros diferenciales del complejo bc_1 de *Polytomella* spp (A, C, E) y de bovino (B, D, F), utilizando diferentes reductores. Los paneles A y B son los espectros diferenciales reducidos con ditionita-reducido con ascorbato. Los paneles C y D son los espectros diferenciales reducido con ditionita menos el reducido con DBH. Los paneles E y F son los espectros diferenciales reducido con DBH menos el reducido con ascorbato.

Análisis por 4a derivada de los espectros anteriores:

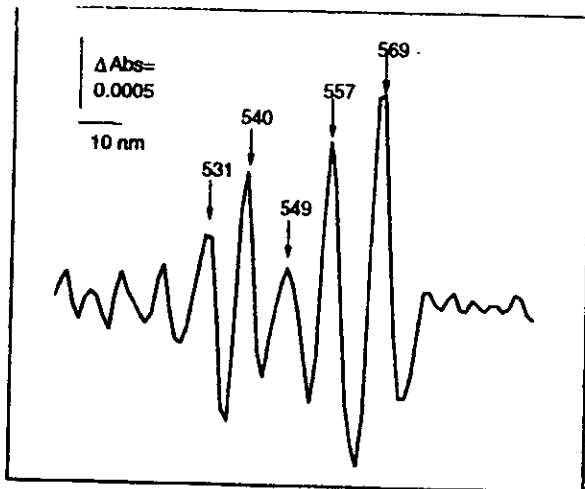
Se hizo el análisis de la 4a derivada para poder distinguir los máximos de cada uno de los hemos del citocromo *b* de *Polytomella* spp y compararlos con los máximos de los hemos del citocromo *b* de bovino (figura 23). Cada uno de los análisis corresponde a los espectros diferenciales de la figura anterior. En la primera parte de la figura están los análisis de 4a derivada para los espectros diferenciales del citocromo *b* de *Polytomella* spp. La segunda parte muestra la 4a derivada obtenida para los espectros diferenciales del citocromo *b* de bovino. Se hizo este tipo de análisis para saber el número de componentes que integran un espectro complejo como el del citocromo *b*. En el caso del espectro diferencial ditionita-ascorbato, deben estar participando al menos dos especies en la formación del espectro: el hemo b_H y el hemo b_L . En los diferenciales DBH-ascorbato y ditionita-DBH el potencial del DBH no es suficiente para reducir totalmente a uno de los hemos y dejar completamente oxidado al otro. La 4a derivada muestra en los espectros diferenciales el número máximo de componentes o de especies participantes en el espectro de absorción. Para todos los casos, sólo se muestra la región de interés de las bandas α y β (500 a 600 nm de longitud de onda).

La 4a derivada del diferencial ditionita-ascorbato de *Polytomella* spp muestra dos componentes uno a 557 y otro a 569 nm (figura 23A). En cambio, la región de la banda β tiene más de dos componentes que no someteremos a análisis. El mismo diferencial en bovino también muestra dos componentes, uno a 559 nm y otro a 566 nm (figura 23D). Sin embargo, la contribución de cada componente es diferente, para *Polytomella* spp es casi la misma, $557 \approx 569$ y para bovino es diferente, $566 > 559$. Las figuras 23B y E muestran la 4a derivada de los espectros diferenciales reducido con ditionita menos reducido con DBH para *Polytomella* spp y bovino, respectivamente. En los dos espectros diferenciales se obtuvieron dos componentes. Para *Polytomella* spp, la proporción de los dos componentes es casi la misma ($567 \approx 557$ nm) pero para bovino, la proporción es parecida a la del diferencial anterior ($566 > 559$ nm). La 4a derivada del espectro diferencial de bovino

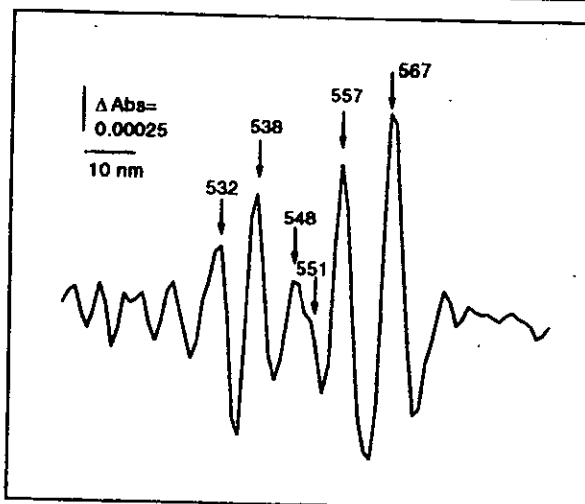
(reducido con ditionita menos reducido con ascorbato) muestra dos componentes en la zona del máximo α . Sin embargo, las proporciones de estos dos componentes son diferentes. En esta misma zona, aparecen un tercer componente a 551 nm en la 4a derivada de los diferenciales de bovino ya analizados. Este componente corresponde al citocromo c_1 , que no se reduce al 100% con ascorbato. La 4a derivada del último diferencial (reducido con DBH menos reducido con ascorbato) se muestra en la figura 23C y F. Para *Polytomella* spp, se obtienen dos componentes en casi la misma proporción (568 \approx 557 nm, ver figura 23C). En bovino, se ve la desaparición del componente a 559 nm y muy claramente, al componente en 564 nm. Este es el hemo b_H de bovino. En la 4a derivada del espectro diferencial de *Polytomella* spp aparece un componente muy claro a 550 nm que se ve como un hombro en el espectro diferencial reducido con ditionita menos reducido con DBH. Este es el citocromo c_1 , que no se reduce al 100% con ascorbato.

Figura 23: Análisis por 4a derivada de los espectros diferenciales hechos con diferentes reductores. Los espectros A-C son los de *Polytomella* spp y los D-F son los de bovino. En este caso los espectros A y D son los diferenciales reducido con ditionita-reducido con ascorbato. Los paneles B y E son los diferenciales reducido con ditionita-reducido con DBH. Los paneles C y F son los diferenciales reducido con DBH-reducido con ascorbato.

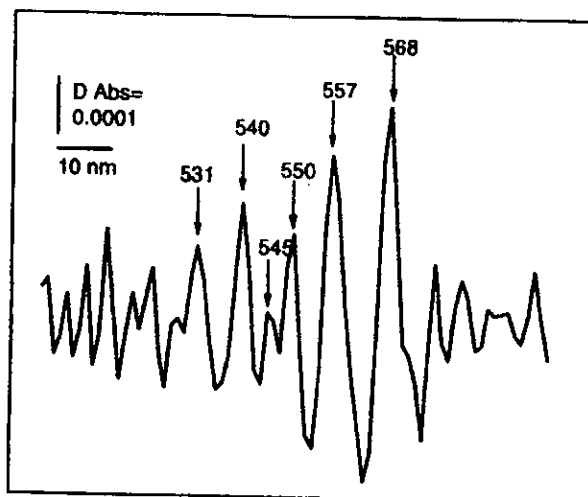
A



B

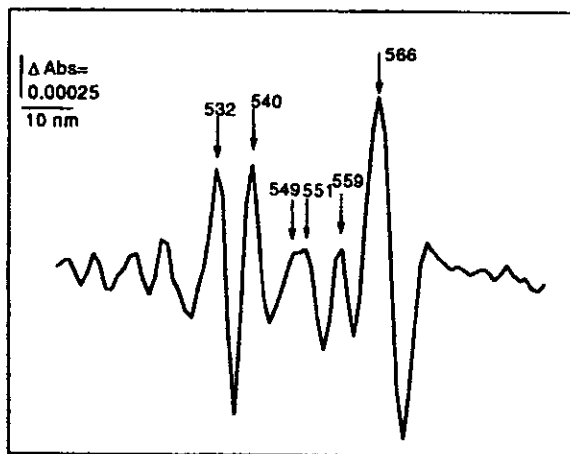


C

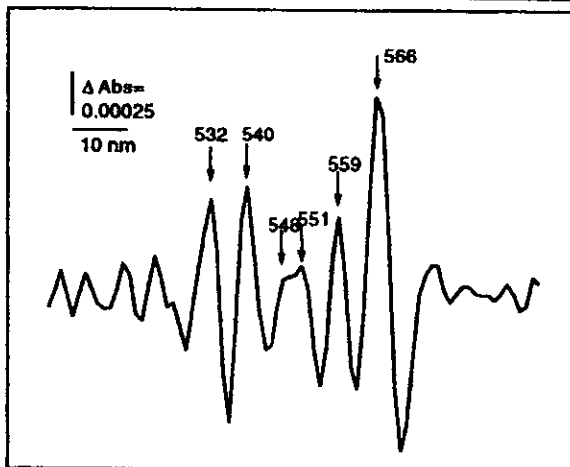


Polytomella

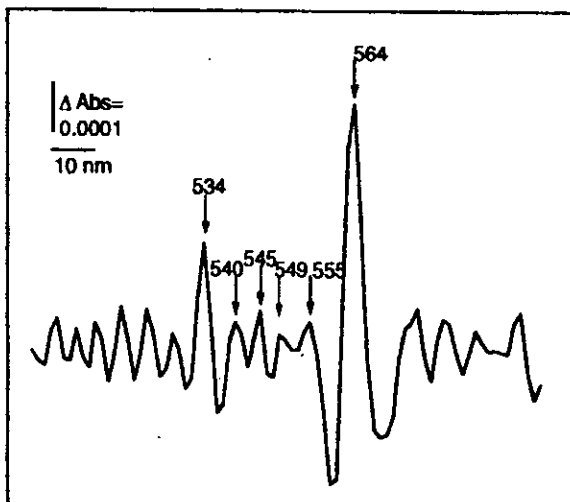
D



E



F



Bovino

La titulación redox de los hemos *b*:

Debido a que los potenciales de cada uno de los componentes no corresponden con el de los agentes reductores, los espectros diferenciales no mostraron exactamente los espectros de cada uno de los hemos. La forma de obtener los espectros de cada componente es fijando los potenciales de éstos sin sobreposición. Para ello, decidimos hacer la titulación redox. La figura 24 muestra la gráfica de la titulación redox de los hemos del citocromo *b* de *Polytomella* spp. Se graficó el voltaje obtenido en mV de cada una de las lecturas hechas contra la absorbencia del citocromo *b* que se obtuvo. La titulación se hizo tanto en el sentido de la reducción como en el sentido de la oxidación. Se obtuvieron tres componentes por medio del ajuste que se hizo con la ecuación de Nernst, la ecuación final se muestra también en la figura 24. Se partió de la ecuación de Nernst (a), se sacó la ecuación para cada una de las especies, y se despejó para obtener la contribución de cada uno de los componentes reducidos (b):

$$E = E^0 - (RT/nF) \log [Ox]/[Red] \quad (a)$$

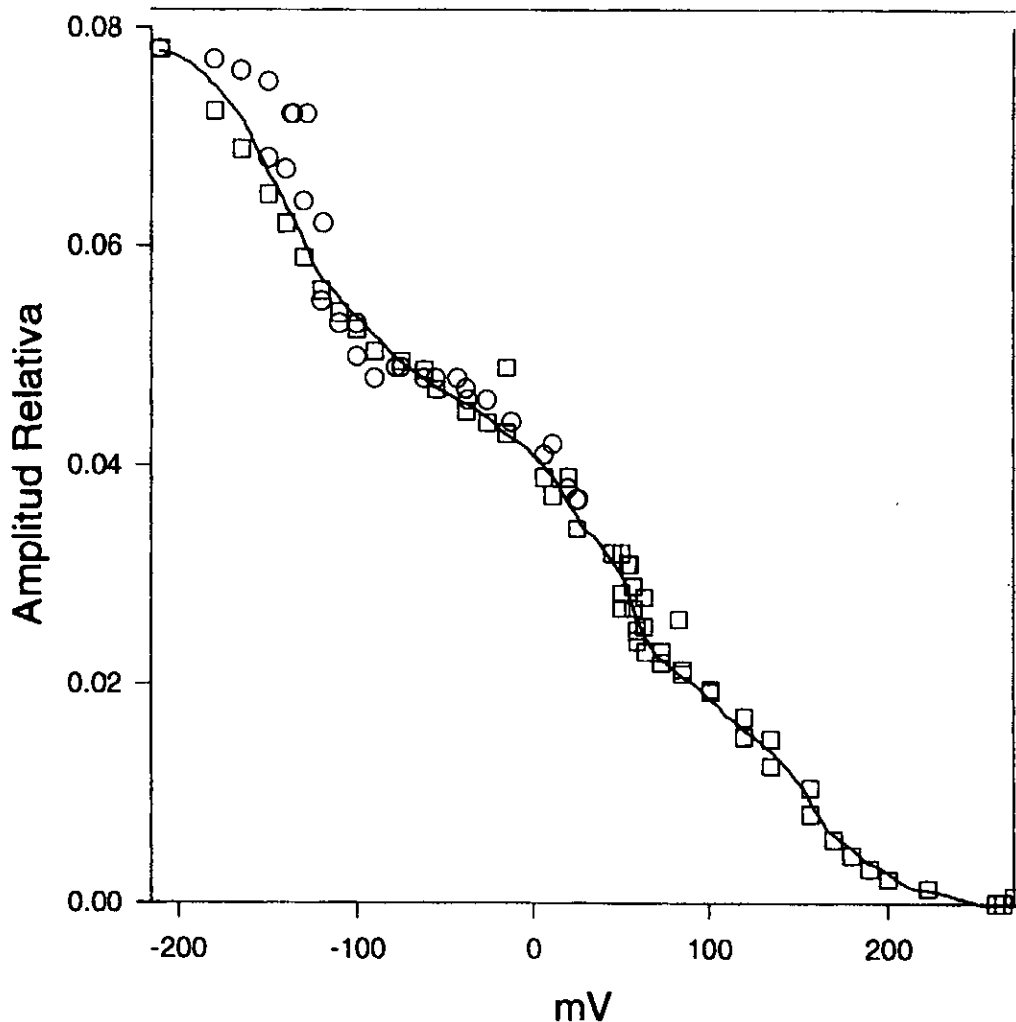
$$Red = 1/10 \exp(E^0 - E/0.06), \quad (b)$$

donde E = potencial resultante en cada punto, E^0 = potencial experimental, R = constante de los gases,

T = temperatura de 25 °C, n = número de electrones involucrados en la reacción, Ox = especie oxidante, Red = especie reductora.

El 100% de reducción lo constituye la suma de las diferentes especies que se obtuvieron en la titulación. El ajuste se logró probando los porcentajes de cada una de las tres especies, así como ajustando el potencial redox medio de las mismas, hasta que se obtuvo el mejor ajuste. Se identificó a la especie con un potencial redox medio de -143 mV y que contribuye con un 39% como el hemo b_L o hemo de bajo potencial. La siguiente especie, con un E_m de +25 mV, que contribuye en un 34%, se identificó como el hemo b_H o hemo de alto potencial. La tercera especie, con un E_m de +146 mV en un 27%, se identificó como un hemo b_{150} descrito por Rich y cols. (1989). Una vez hecho el ajuste, se hicieron

los espectros diferenciales tomando en cuenta las zonas en las que, de acuerdo con la titulación, se encontraron cada una de las tres especies sin sobreponerse. Un espectro de cada especie se muestra en la figura 25. A cada uno se le hizo un análisis por medio de deconvoluciones tipo Lorentz (de los cuales se muestran dos ejemplos es la figura 26) y los datos se vaciaron en tablas. Se anotó la longitud de onda del centro del pico (máximo 1 ó 2), el ancho total del pico a la mitad de la altura (ATMA) y el área del pico. Los datos se promediaron y se sacó su desviación standard (DS). La tabla III muestra los datos para el hemo b_L y la tabla IV para el hemo b_H .



$$\% \text{ reducción} = 27 \cdot [1/10 \cdot (E_{p^0} - E/0.6)] + 34 \cdot [1/10 \cdot (E_{h^0} - E/0.6)] + 39 \cdot [1/10 \cdot (E_{l^0} - E/0.6)]$$

donde: E_{p^0} , E_{h^0} y E_{l^0} son los potenciales redox experimentales de cada hemo y E es el potencial obtenido en cada punto.

Figura 24: Titulación redox de los hemos del citocromo b de *Polytomella* spp. Se muestra la titulación en sentido de reducción (cuadros vacíos) y en sentido de la oxidación (círculos vacíos). El hemo b_1 tiene un potencial redox medio de -143 mV (39%); el hemo b_2 de 25 mV (34%) y el hemo b_{150} de 146 mV (27%).

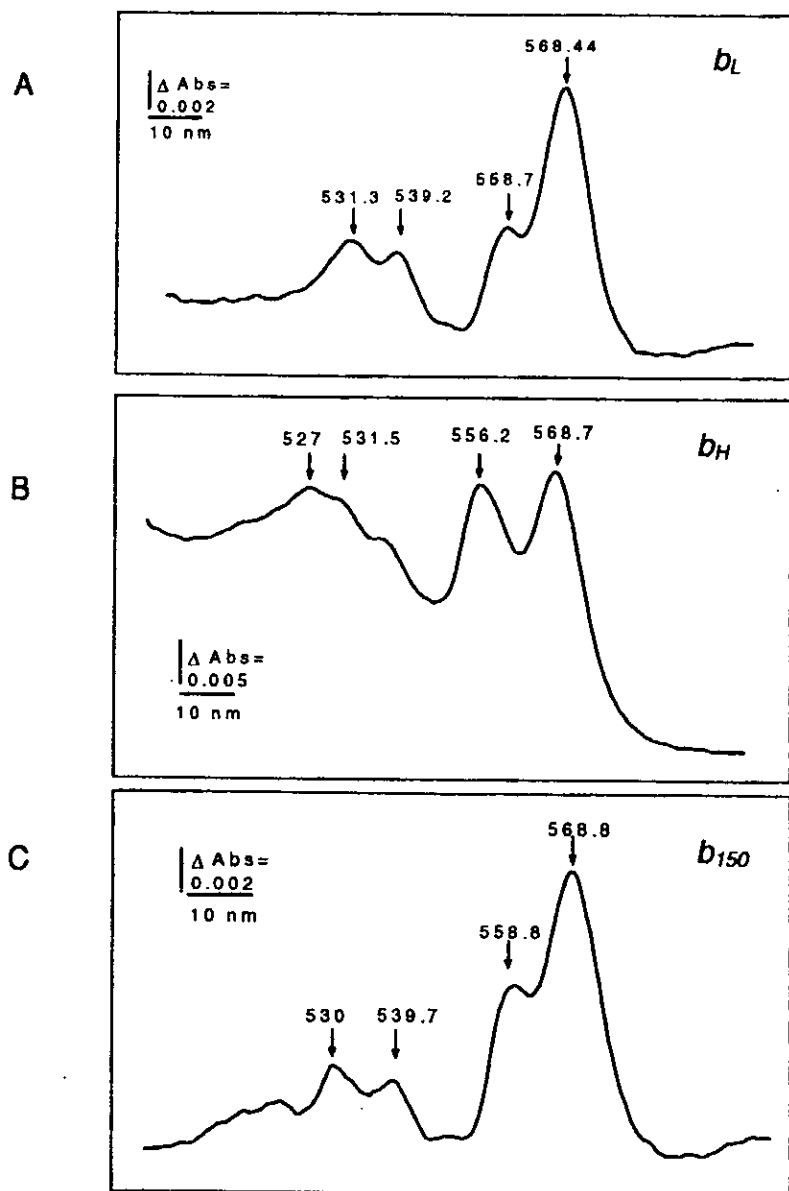
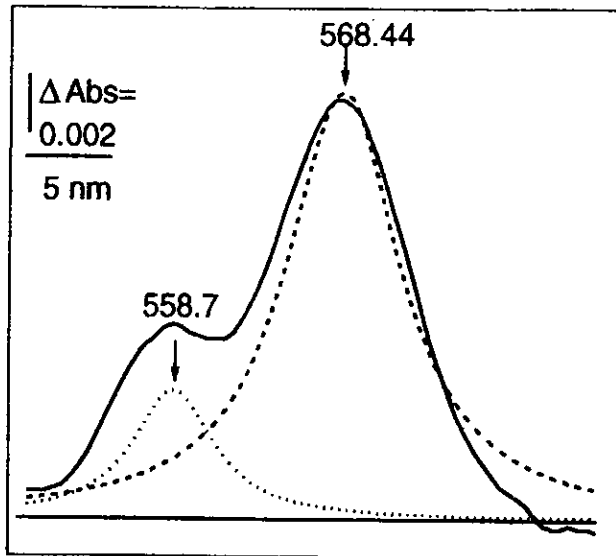


Figura 25: Espectros diferenciales de los diferentes hemos obtenidos por medio de la titulación redox. Panel A es el espectro diferencial del hemo b_L (potencial redox medio = -143 mV). Panel B: espectro diferencial del hemo b_H ($E_m = +25 \text{ mV}$). Panel C: diferencial del hemo b_{150} ($E_m = +146 \text{ mV}$).

A



B

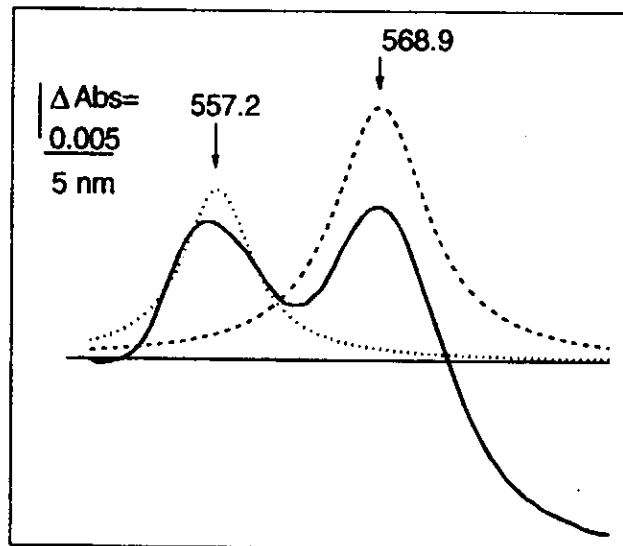


Figura 26: Deconvolución lorentziana de los espectros diferenciales del hemo b_H y del hemo b_L de la figura anterior. Panel A: diferencial del hemo b_1 ($E_m = -143$ mV). Panel B: diferencial del hemo b_4 ($E_m = +25$ mV).

Tabla III: Propiedades espectroscópicas del hemo b_L :

Ventana de Eh (mV)	Máximo1 (nm)	ATMA* (nm)	Area1 (UAxnm)	Máximo2 (nm)	ATMA* (nm)	Area2 (UAxnm)
-460/-328	558.06	7.18	0.062	568.55	8.05	0.20
-400/-325	558.91	5.45	0.064	568.47	7.59	0.42
-431/-325	558.94	5.50	0.064	568.48	7.63	0.41
-415/-328	559.06	5.94	0.074	568.25	7.91	0.46
-617/-325	558.52	5.72	0.038	568.45	7.94	0.18
Promedio (DS)	558.7 (0.37)	5.96 (0.64)	0.06 (0.01)	568.44 (0.1)	7.82 (0.18)	0.33 (0.12)

La relación de área que se obtuvo fue de 1:5 (área 1: área 2).

El área se obtuvo con la multiplicación de la altura (unidades de absorbencia) por la base del pico en nm.

*ATMA: ancho total a la mitad de la altura del máximo.

Tabla IV: Propiedades espectroscópicas del grupo hemo b_H :

Ventana de Eh (mV)	Máximo1 (nm)	ATMA* (nm)	Area1 (UAxnm)	Máximo2 (nm)	ATMA* (nm)	Area2 (UAxnm)
-328/187	558.02	5.87	0.11	568.62	7.98	0.36
-288/-196	556.87	6.37	0.16	568.88	8.14	0.30
-325/-230	556.80	6.57	0.11	569.12	8.86	0.21
-305/-205	555.98	7.88	0.25	569.00	8.14	0.32
-293/-190.7	558.30	6.46	0.11	568.88	7.80	0.32
Promedio (DS)	557.19 (0.85)	6.63 (0.67)	0.15 (0.06)	568.90 (0.17)	7.80 (0.36)	0.30 (0.05)

La relación de área que se obtuvo fue de 1:2 (área 1: área 2).

El área se obtuvo con la multiplicación de la altura (unidades de absorbencia) por la base del pico en nm.

*ATMA: ancho total a la mitad de la altura del máximo.

Para caracterizar al hemo b_{150} se hicieron también cinco espectros con los que se obtuvieron datos similares a los otros de los dos hemos. Estos datos espectroscópicos se muestran en la tabla V.

Tabla V: Propiedades espectroscópicas del hemo b_{150} :

Ventana de Eh (mV)	Máximo1 (nm)	ATMA* (nm)	Area 1 (UAXnm)	Máximo 2 (nm)	ATMA* (nm)	Area 2 (UAXnm)
176.8/+20	556.60	7.65	0.23	568.88	8.19	0.37
-165/-28	559.42	6.09	0.12	569.01	8.26	0.36
-149/-93	559.30	6.22	0.06	568.83	8.57	0.18
-176.8/11.5	559.28	5.66	0.06	568.67	8.63	0.21
-165/-93.0	559.55	5.83	0.04	568.80	8.62	0.16
Promedio (DS)	558.83 (1.12)	6.29 (0.71)	0.10 (0.07)	568.84 (0.11)	8.45 (0.19)	0.26 (0.26)

La relación de área que se obtuvo fue de 2.6 (área 1:área 2).

El área se obtuvo con la multiplicación de la altura (unidades de absorbencia) por la base del pico en nm.

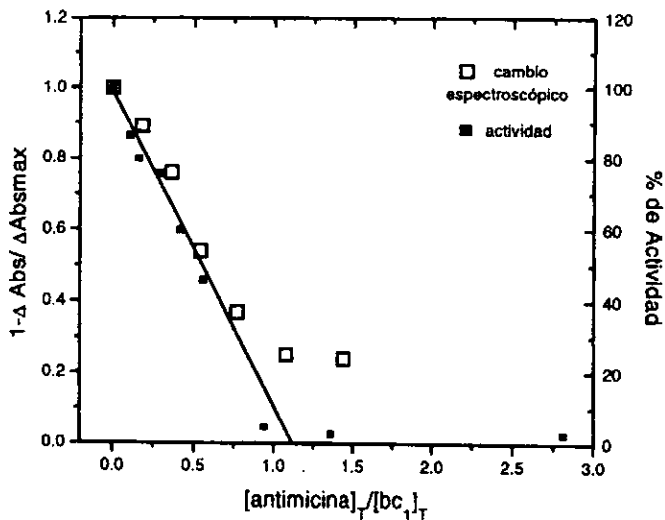
*ATMA: ancho total a la mitad de la altura del máximo.

La titulación con los inhibidores:

Los inhibidores antimicina y mixotiazol se unen en sitios muy cercanos a los hemo del citocromo *b*. La antimicina bloquea el flujo de electrones desde el hemo b_H hasta la ubiquinona y el mixotiazol bloquea el flujo de electrones desde el ubiquinol, hasta el centro hierro-azufre. Estos inhibidores también causan algunas perturbaciones en el espectro de absorción del citocromo *b*. La antimicina causa un corrimiento hacia el rojo en la banda α y el mixotiazol un ensanchamiento en dicha banda (Howell y Robertson, 1993). La figura 27 muestra la titulación hecha con antimicina. La gráfica muestra tanto el efecto sobre la actividad del complejo como la magnitud del corrimiento de la banda α (0.39-2.88 μM). En la gráfica se aprecia la gran afinidad del complejo por la antimicina. En el panel B se presentan los espectros diferenciales hechos al añadir antimicina al complejo bc_1 reducido con ditionita. Al aumentar la cantidad de antimicina, se distinguen las dos transiciones con mayor claridad, en la región de la banda α del hemo b_H . A mayor cantidad de antimicina (0.72 μM), se aprecia más el cambio espectroscópico a 568 nm. Esta es la magnitud que se graficó en el panel A. En la titulación se muestra que, al aumentar el cociente $[\text{antimicina}]_{\text{total}}/[\text{bc}_1]_{\text{total}}$, el cambio espectroscópico se acerca a su máximo. El segmento de la curva tiene un comportamiento lineal que es extrapolable a cero, sin embargo, se vuelve asintótico. El mismo comportamiento se obtiene al graficar el % de actividad contra la cantidad de $[\text{antimicina}]_{\text{total}}/[\text{bc}_1]_{\text{total}}$. La extrapolación a cero del cambio espectroscópico (ó a 0% de actividad) da una relación $[\text{antimicina}]_{\text{total}}/[\text{bc}_1]_{\text{total}}$ de 1.13. Este valor expresa la relación molar antimicina/ bc_1 que da lugar al máximo cambio espectroscópico (o a la inhibición total de la actividad). La fracción (por arriba de la unidad, 0.13) es la fracción de inhibidor libre cuando todo el complejo bc_1 utilizado en la titulación está en la forma del complejo [inhibidor- bc_1]. La figura 28 muestra la titulación realizada con el mixotiazol. En el panel B se observa que el mixotiazol sólo provoca un blanqueo en el espectro. La extrapolación a cero en la gráfica de la titulación da

un valor de 1.19, lo que indica que debe haber una fracción del inhibidor libre (0.19) cuando tenemos todo el complejo *bc*, unido al inhibidor.

A



B

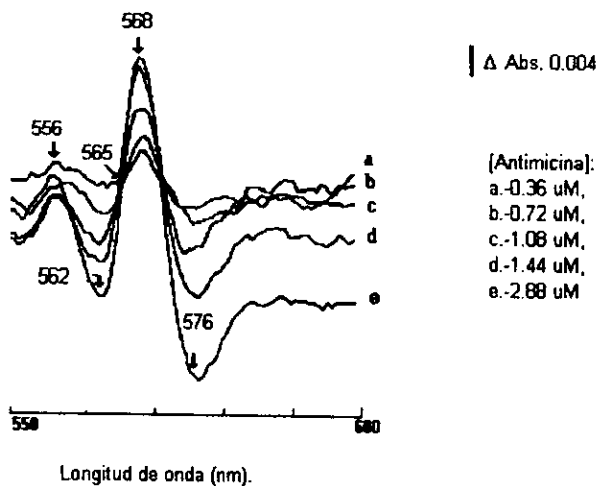


Figura 27: Titulación con antimicina. El panel A muestra la titulación con antimicina tanto del cambio espectroscópico como de la actividad del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. El panel B muestra los espectros diferenciales del espectro reducido con ditionita en presencia de antimicina (en cantidades crecientes) menos el reducido con ditionita.

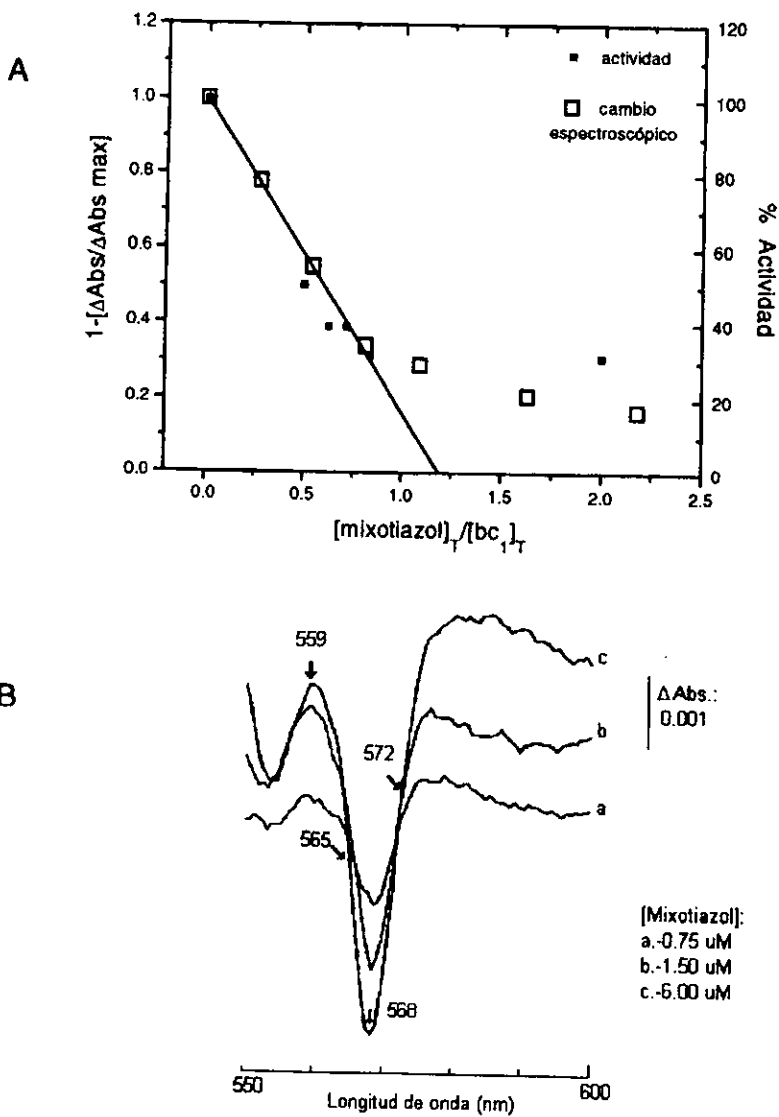


Figura 28: Titulación con el mixotiazol. El panel A muestra la gráfica de titulación del cambio espectroscópico y de la actividad contra la relación inductor total contra *complejo bc*, total. El panel B muestra los espectros diferenciales del espectro del complejo reducido con ditionita en presencia de mixotiazol menos el espectro del complejo reducido con ditionita.

Discusión:

La purificación del complejo bc_1 :

El complejo bc_1 de *Polytomella* spp. fue purificado por el método descrito por Gutiérrez-Cirlos y cols. (1994). La purificación mostró un complejo con un alto grado de pureza, lo cual se puede apreciar en el espectro diferencial del complejo bc_1 reducido con ditionita menos el oxidado (figura 16A). En este espectro sólo se ven la bandas de absorción de los citocromos b y c_1 . Además, el método de purificación dio un complejo activo (300 seg^{-1}), que es la actividad cercana a muchas preparaciones del complejo bc , aislado de mitocondrias de bovino (394 s^{-1} , Kubota y cols., 1992). Nos llamó la atención, que la zona de la banda α mostró dos transiciones en el espectro completamente reducido con ditionita. Lo que se había observado en las preparaciones de los complejos bc_1 , reportados era una sola transición en la banda α de los citocromos b y c_1 . En el espectro de absorción del complejo bc_1 de *Polytomella* spp., la banda a 553 nm de longitud de onda se identificó como del citocromo tipo c_1 típico que tiene un hemo unido covalentemente a la proteína por medio de dos enlaces a cisteínas. Esto se comprobó al secuenciar un fragmento del gene del citocromo c_1 , obtenido por amplificación por PCR en el cual se encontró la región CXXCH característica de estos citocromos (Gutiérrez-Cirlos y cols., 1994). La otra banda α (a 567 nm) pertenece a los hemos del citocromo b . Ningún otro citocromo b del complejo bc_1 , aparte del citocromo b de *Polytomella* spp., presenta una banda α a los 568 nm de longitud de onda. Este corrimiento hacia el rojo nos llevó a la caracterización espectroscópica del citocromo b de *Polytomella* spp.

Este corrimiento hacia el rojo se puede observar aún en los espectros diferenciales de las mitocondrias aisladas de *Polytomella* spp. (figura 15). Las dos bandas α , una a 553 nm y la otra a 568 nm presentan los mismos máximos que los del complejo bc_1 aislado. Este dato muestra que el corrimiento hacia el

rojo de la banda α del citocromo *b* está presente aún en el complejo inmerso en la membrana interna mitocondrial. Esto nos indica que el corrimiento no es provocado por algún efecto artificial o de desnaturalización durante la purificación del complejo.

Lo primero que se hizo para caracterizar al citocromo *b*, fue estudiar que tipo de hemos contenía. Una diferencia en los hemos podía explicar el corrimiento hacia el rojo, es decir que los hemos no fueran del tipo protohemo con los sustituyentes conocidos para el hemo tipo *b* (ver figura 29) sino que fueran otros, como del tipo del citocromo *a* de la citocromo *c* oxidasa, con un farnesilo en la posición 2, donde va un vinilo o algún sustituyente no conocido. También cabía la posibilidad de un formilo en la posición 2 (hemo espirográfico); (Cramer y Knaff, 1991; Lübben, 1995). Estas modificaciones en los hemos provocan que tengan tiempos de retención diferentes. Para poder constatar que teníamos un hemo diferente, o igual que los otros citocromos *b*'s, utilizamos como control la hemina pura para conocer el tiempo de retención del hemo tipo *b* típico. La cromatografía a 400 nm mostró tres picos para el complejo *bc*, (figura 18A). El primero fue identificado como un hemo tipo *b* por su estequiometría y debido a que su tiempo de retención fue igual al tiempo de retención de la hemina purificada y a que se sobrepuso en la mezcla (complejo *bc*-hemina), como se ve en el panel C de la figura 18. Debido a que el hemo del citocromo *b* no tiene ninguna diferencia con el hemo ya conocido, entonces el corrimiento hacia el rojo podía ser ocasionado por el ambiente que rodea a los dos hemos. Entonces, se quiso saber si el cambio en el ambiente era en ambos hemos, o sólo en uno, lo cual representaría diferencias de ambiente en ambos. Esto nos llevó a realizar la caracterización espectroscópica detallada de los hemos del citocromo *b* de *Polytomella* spp.

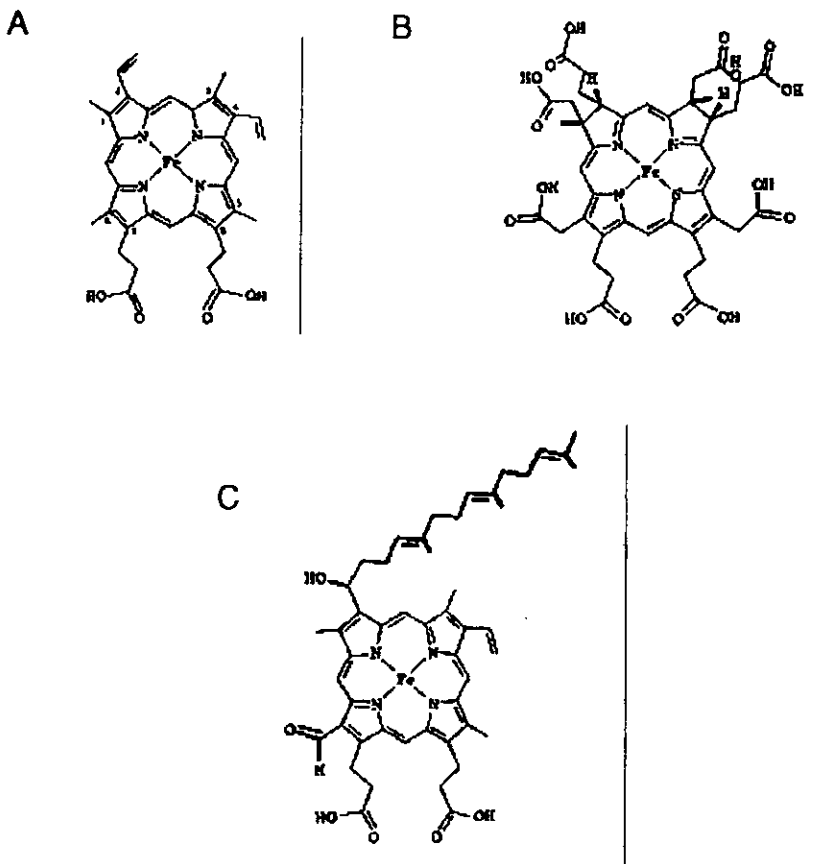


Figura 29: Estructura de diferentes hemos comparados con el hemo del citocromo *b* para ver los diferentes sustituyentes que puede tener un hemo y en consecuencia, dar un espectro diferente. El panel A muestra el hemo *b*, que se une por enlaces de coordinación con residuos de histidinas. El panel B muestra un sirohemo de sulfito y nitrato reductasas. El panel C muestra el hemo *a* de la citocromo *c* oxidasa que tiene un hidroxilo y un farnesilo en la posición 2 del primer anillo de pirrol.

Los espectros con diferentes reductores:

Una manera de caracterizar cada uno de los hemos del citocromo *b* es la de conocer su espectro de absorción por medio de agentes reductores. Al mismo tiempo se hicieron los espectros diferenciales para el citocromo *b* de bovino a modo de comparación, pues en este citocromo no hay un corrimiento hacia el rojo. Además, se hicieron los análisis de la 4a derivada de cada uno de estos espectros para saber el número de componentes en cada espectro diferencial. Este tipo de análisis es importante, ya que se debe considerar que estamos trabajando con dos especies, el hemo b_H y el hemo b_L , y que cada hemo puede tener más de una transición, como en el caso del hemo b_L del citocromo *b* de ratón (Howell y Robertson, 1993). El análisis por 4a derivada permite resolver el máximo de componentes individuales en los espectros complejos, sobre todo, cuando uno o más componentes del espectro se sobrelapan (Aguirre-Gómez, 1996). De este análisis inicial y superficial se puede presumir que el espectro del hemo b_L en *Polytomella* spp. es semejante a los reportados de ratón (Howell y Robertson, 1993) y de bovino (Rich y cols., 1989) confirmando en nuestras manos, que tiene dos transiciones en la banda α . El espectro diferencial reducido con DBH menos el reducido con ascorbato se hizo para tratar de obtener el espectro del hemo b_H . Sorprendentemente, el hemo b_H de *Polytomella* spp. muestra un espectro con dos transiciones, y el de bovino sólo muestra una transición a 564 nm, ratificado por el análisis de la 4a derivada. La 4a derivada muestra un pico a 555 nm, que puede ser la banda α del citocromo c_1 que no estaba totalmente reducido por ascorbato. Por lo tanto, este diferencial no nos dió sólo al hemo b_H , ni el otro diferencial nos da el hemo b_L puro, sino b_L más algo de b_H . Por eso fue necesario hacer una titulación redox para poder obtener los espectros de cada hemo en su potencial redox correspondiente.

La titulación redox:

La titulación se hizo en el de reducción y en el de oxidación, para poder diferenciar mejor los potenciales redox y así hacer los espectros a los potenciales redox específicos y conocer el potencial medio de óxido-reducción de cada componente. Las mejores titulaciones se realizaron en presencia de argón, cuyo contenido de dióxígeno es menor que el que traen los tanques de nitrógeno. La titulación mostró tres transiciones diferentes, que se pueden ver en la figura 24. Los potenciales medios que dieron un mejor ajuste de la curva fueron -143 mV, $+25$ mV y $+146$ mV. Por el potencial se pudieron identificar a los hemos del citocromo *b*. Si se comparan los potenciales con otros hemos se puede observar que los potenciales obtenidos para los hemos de *Polytomella* spp. caen entre los límites reportados, como puede verse en la tabla VI que muestra los potenciales de los hemos de diferentes citocromos *b* comparándolos con los que se obtuvieron para *Polytomella* spp.

Tabla VI: Potenciales redox de los hemos b_L y b_H de diferentes citocromos *b* y b_6 (de *Chlamydomonas reinhardtii*). En esta tabla también se muestran los máximos de absorción de cada uno de los hemos.

Especie	hemo b_L		hemo b_H		ΔEm (mV)	Referencia
	Em (mV)	Pico (nm)	Em (mV)	Pico (nm)		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> b_6	-158	564	-84	564	74	Pierre y cols. (1995)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-87	559, 566	52	560.5	139	Yun y cols. (1991)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	-89	558, 565	40	560.5	129	Robertson y cols. (1993).
<i>Sacharomyces sereviciae</i>	-20	555, 562	145	561	165	Siedow y cols. (1978)
papa	-78	557.6, 565.6	48	560	126	Berry y cols. (1991)
ratón	-31	558.5, 565.2	92	561.5	123	Howell y Robertson, (1993).
<i>Polytomella</i> spp.	-143	558.7, 568.4	25	557.2, 568.9	168	Este trabajo.

En todos los casos, la diferencia de potencial que se obtiene es semejante (a excepción de los hemos del complejo b_6f de *Chlamydomonas*). Sin embargo, el b_6 es diferente del citocromo b , ya que está escindido en dos subunidades, una que contiene a las histidinas y a las hélices A, B, C y D y otra que contiene a las hélices E, F y G (subunidad IV); (Cramer y cols., 1994). Sin embargo, es interesante que los hemos b_L de *C. reinhardtii* y *Polytomella* spp. tienen un Em muy negativo aunque es difícil explicar la causa. La dispersión de los de los potenciales medios valores es muy grande, sin embargo, el Δ resultante permite el bombeo de protones en todos los casos. Los Ems obtenidos para *Polytomella* spp. son los adecuados, ya que el potencial redox del hemo b_L (-143 mV) debe ser mayor que el de la semiquinona (-330 mV) para ser reducido. En cambio, para el hemo b_H (+25) el potencial debe ser menor que el hemo b_L para poder reducir al ubiquinol (+30 mV) (Crane y Barr, 1985). Por lo anterior, podemos ver que a pesar de que existe un corrimiento en el espectro de absorción del citocromo b el potencial no se ha alterado. Esto es muy interesante, ya que quiere decir que si bien pueden existir cambios en los aminoácidos cercanos a los hemos del citocromo b de *Polytomella* spp., estos no han alterado la función redox de la proteína.

La tercera especie con un potencial medio de +143 mV, fue identificada como el hemo b_{150} , reportada por Rich y cols. (1989), en partículas submitocondriales de bovino. Este hemo es el hemo b_H que tiene unida una molécula de ubiquinona. Esta unión provoca que el potencial redox del hemo cambie y se forme entonces una tercera especie titulable. Rich mostró que, al hacer la titulación a pH ácido, se disocia la quinona y desaparece el hemo b_{150} . El pH con el que se inicia la titulación del citocromo b de *Polytomella* spp., es de 8.0 terminó y termina en un pH de 7.86. La de bovino termina en un pH de 6.81. Sin embargo, no se detectó la tercera especie en la titulación del complejo bc_1 de bovino y si en la de *Polytomella* spp.. Llama la atención, que la cantidad de detergente utilizada para la extracción del complejo de *Polytomella* spp. es muy elevada (2g de lauril maltósido/g de proteína) comparada con la solubilización del complejo bc_1 de bovino que utiliza la mitad de

detergente. Aparentemente, esta cantidad de detergente no elimina la quinona del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. y por lo tanto se conserva al hemo b_{150} y, en el caso del bovino, no. La concentración micelar crítica (CMC) del lauril maltósido es de 0.05-0.3 mM (Marshak y cols., 1996). Para la solubilización de las mitocondrias de *Polytomella* spp. utilizamos hasta 7.8 mM del detergente, por lo que estamos muy por encima de la CMC. Esto parece paradójico, ya que, al poner una gran cantidad de micelas, se esperaría que se solubilizara el complejo bc_1 sin la quinona. Pensamos que esta tercera especie puede ser eliminada del complejo bc_1 de *Polytomella* spp., pues los experimentos de titulación con inhibidores mostraron que este complejo bc_1 tiene gran afinidad por la antimicina. Si se repite la titulación redox en presencia de antimicina se puede prevenir la formación de esta especie, pues la antimicina A desplaza a la quinona. La unión de este complejo se forma cuando el pH de la muestra es básico.

Aunque se requiere de más experimentos para entender los potenciales redox de los hemos de *Polytomella* spp., se pudo, con la titulación, obtener los diferentes espectros de cada especie (figura 25). El hemo b_L mostró una banda α con dos transiciones claramente definidas, una de alta energía (558.7 nm) y una de baja energía (568.4 nm). La relación de área de estas dos transiciones es de 5.50 ($A_{568.4}/A_{558.7}$). Este hemo es semejante a los hemos tipo b_L reportados, que tienen dos transiciones en la banda α . Sin embargo, el cociente de áreas es mayor. En el ratón el cociente es de 0.23 (Howell y Robertson, 1993). Esto significa que es pequeña la contribución al espectro de la transición de menor energía. En cambio, en el espectro del hemo b_L de *Polytomella* spp., la transición de menor energía tiene una contribución muy importante. Además, la transición de menor energía está situada tres nm hacia el rojo en comparación con la del hemo b_L de ratón.

El hemo b_H de *Polytomella* spp. presenta una banda α diferente de las conocidas, con dos transiciones una de alta energía y otra de menor energía. Se pueden comparar estos datos en la tabla VI donde se muestran las bandas α de

los mismos. Los hemos tipo b_H conocidos hasta ahora tienen una sola transición entre 560-564 nm. La relación de las áreas de las dos transiciones es de 2 (A_2/A_1). También, en este caso, la transición de baja energía contribuye de manera importante al espectro. La banda α está corrida hacia el rojo 7 nm, en comparación con el hemo b_H de ratón que está a 561.6 nm. Comparando lo anchos de las bandas, la de menor energía es más ancha que la de mayor energía (ver la tabla IV). Esto pasa en los dos hemos del citocromo b de *Polytomella* spp. El ancho de la banda indica la probabilidad de que ocurra la transición. Sin embargo, sólo en el caso del hemo b_L de ratón, la transición de alta energía es más ancha que la de menor energía y es la que contribuye en mayor proporción al espectro.

De esta caracterización podemos concluir que los dos hemos del citocromo b de *Polytomella* spp. tienen un espectro de absorción semejante en la región de la banda α . Además que, el hemo b_H de *Polytomella* spp. es un hemo diferente a los ya caracterizados pues tiene dos transiciones en lugar de una sola (una en el rojo lejano y otra en el rojo cercano). En los dos casos, el componente de menor energía (rojo lejano) contribuye en mayor proporción al espectro. El hemo b_H tiene un corrimiento mayor que el hemo b_L sin embargo, los dos presentan un corrimiento hacia el rojo. El cociente del hemo b_L es mayor que el del hemo b_H , que se puede expresar como $b_L^{rc}/b_L^{rl} > b_H^{rc}/b_H^{rl}$ (donde rc=rojo cercano y rl=rojo lejano).

La titulación con los inhibidores:

Es conocido que los inhibidores del complejo bc_1 , causan cambios en el espectro de absorción de los hemos (von Jagow y Link, 1986). En el citocromo b de ratón, la antimicina A provoca un corrimiento hacia el rojo y el mixotiazol provoca un ensanchamiento en la banda α (ver Howell y Robertson, 1993). Hicimos una titulación con antimicina midiendo el cambio espectroscópico para saber si el corrimiento hacia el rojo en la banda α del citocromo b de *Polytomella*

spp. era debido exclusivamente al corrimiento en uno de los hemos o que el espectro de uno de los hemos era diferente a los reportados en la literatura. Tratamos de corroborar nuestros datos de afinidad no sólo con el cambio espectroscópico, sino midiendo los cambios en la actividad del complejo. En primer lugar, analizaremos las titulaciones y a continuación los cambios en el espectro. Como se puede observar en la gráfica de la titulación, la actividad del complejo y el cambio en el espectro caen razonablemente en la misma recta (panel A, figura 27). Al aumentar la relación $\text{antimicina}_{\text{total}}/\text{bc}_{\text{total}}$, la actividad se pierde y el cambio espectroscópico tiende a su máximo. En el caso del mixotiazol, la titulación de la actividad muestra que este inhibidor también se une con gran afinidad al complejo, inhibiendo su actividad. El cambio espectroscópico también se incrementa al aumentar la concentración del inhibidor. Los dos inhibidores disminuyen la actividad y hacen un cambio en la banda α , cada uno con diferente afinidad. La extrapolación a cero de la actividad indica que todo el complejo bc_7 está unido al inhibidor $[\text{I}-\text{bc}_7]$.

- Para el caso de la antimicina, el valor en la extrapolación es de 1.13 y este número es igual a $[\text{I}_{\text{total}}]/[\text{bc}_{\text{total}}]$. Este valor indica que se requiere sólo una fracción por arriba de la cantidad del complejo para que todo el complejo bc_7 esté unido, lo que pone de manifiesto la gran afinidad del complejo por los inhibidores.

- La conclusión es que tenemos una fracción de inhibidor libre que debe haber cuando todo el complejo bc_7 tiene unido al inhibidor. Si resolvemos la ecuación anterior, esto se traduce en que por cada 8 moléculas que se unen al complejo bc_7 , hay una libre. La relación es menor en el caso del mixotiazol, por cada molécula de mixotiazol libre hay cinco moléculas de mixotiazol unidas al bc_7 . Lo anterior muestra que existe gran afinidad del complejo por los inhibidores y que esta afinidad es mayor en el caso de la antimicina que del mixotiazol.

Por otro lado, como puede verse en el panel B de la figura 28, a mayor cantidad de antimicina hay un cambio mayor en el espectro, esto es, el corrimiento hacia el rojo se hace más evidente. Otra característica interesante es que el diferencial muestra dos transiciones en la región de la banda α . Si uno compara este espectro con el espectro diferencial del citocromo b de bovino (figura 30), se puede apreciar un corrimiento hacia el rojo, pero no se presentan dos transiciones en la banda α . Además, el corrimiento en *Polytomella* spp. es mayor. Esto es consistente con las dos transiciones mostradas por el hemo b_H de *Polytomella* spp. y una transición en el de bovino. En el caso del mixotiazol, el efecto aparece como un blanqueo en la absorción a 568 nm, que puede interpretarse como un ensanchamiento y disminución de la altura de la banda al ir añadiendo cada vez más mixotiazol (Howell y Robertson, 1993). Podemos concluir que el espectro de absorción del hemo b_H es alterado por la antimicina. El corrimiento hacia el rojo es mayor que en el de bovino y se pueden ver claramente dos transiciones en la banda α . Sin embargo, en el caso del mixotiazol el efecto no es muy conspicuo y no nos da una mayor información acerca del hemo b_L .

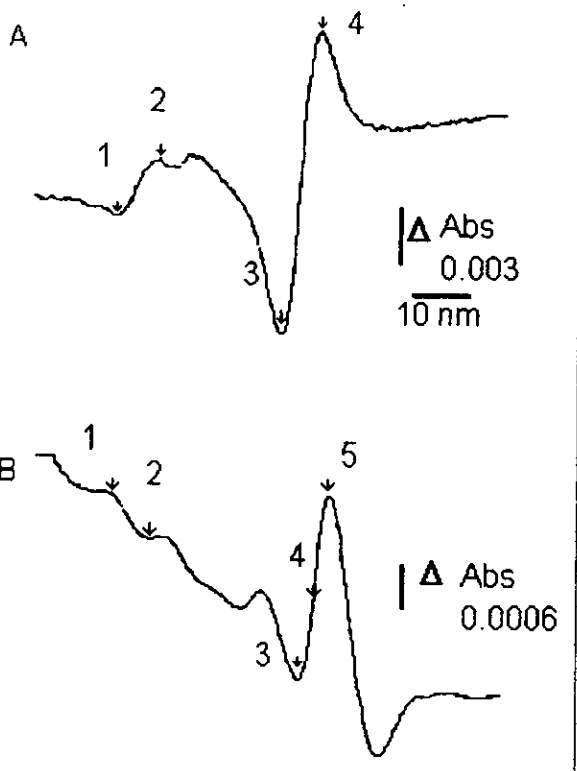


Figura 30: A.- Espectro diferencial del complejo *bc*, de bovino (reducido con ditionita en presencia de antimicina menos el espectro reducido con ditionita) para mostrar el corrimiento hacia el rojo causado por la unión del inhibidor al citocromo *b*. Los siguientes máximos de absorción se muestran a modo de comparación con el espectro del panel B: 1.- 530 nm; 2.- 537 nm; 3.- 559 nm; 4.- 566 nm B.- espectro diferencial del complejo *bc*, de *Polytomella* spp. (reducido con ditionita en presencia de antimicina menos el reducido con ditionita) para ver el corrimiento causado por la unión del inhibidor y compararlo con lo que ocurre con el citocromo *b* de bovino. Los siguientes máximos de absorción se indican a modo de comparación con el espectro del panel A: 1.- 529 nm; 2.- 536 nm; 3.- 562 nm; 4.- 566 nm; 5.- 568 nm.

Consideraciones espectroscópicas:

La banda α del espectro de absorción del citocromo *b* de *Polytomella* spp. presenta un corrimiento hacia el rojo y está conspicuamente escindida. Para poder explicar estas características, es necesario revisar las posibilidades por las cuales el espectro de un hemo puede mostrar un corrimiento hacia el rojo, y dos componentes en la banda α . En primer lugar, se discutirán algunas consideraciones acerca de los orbitales de energía que contiene el hemo, así como de los posibles cambios en su estructura. A continuación, se discutirán las estructuras de algunas proteínas que son las que forman el microambiente de los hemos y que tienen que ver con los cambios en los máximos del espectro de absorción del citocromo *b*.

Para poder explicar la escisión de la banda α , tenemos que recordar que el hemo es una molécula que tiene tanto electrones π (degenerados) del macrociclo del hemo y electrones "d" del hierro. La nube electrónica del hemo tiene dos transiciones dipolares equivalentes en el eje x y el eje y (como se muestra en la figura 31).

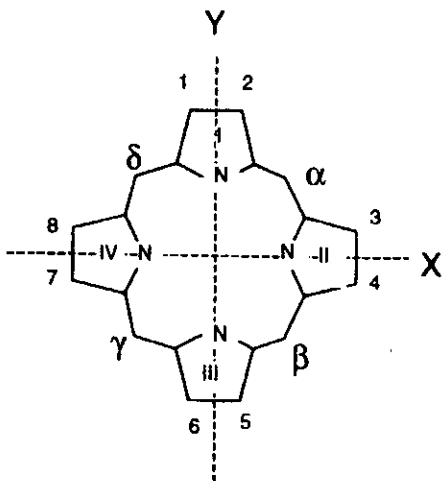


Figura 31: Esquema de una protoporfirina para mostrar los ejes de simetría X y Y (en líneas punteadas) que tiene el macrociclo. Se muestran los anillos de pirrol sin sustituyentes. Cualquier alteración en la nube electrónica causará un desplazamiento de la misma en cualquiera de los ejes en donde sea ejercido este cambio.

El eje "x" corre a través de los anillos II y IV y el eje "y" a través de los anillos I y III. Al excitar los electrones π a un orbital LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), aparecen en el espectro de absorción de la porfirina dos máximos, uno de alta energía (denominado B, en la región de los 400 nm) y otro de baja energía (denominada Q, en la región de los 500-600 nm). Si no existe una perturbación sobre la nube electrónica, los dos ejes de simetría son equivalentes (o simétricos), se sobrelapan y por lo tanto sólo se obtiene una banda Q y una B en el espectro de absorción. Sin embargo, si existe una perturbación asimétrica sobre la nube electrónica de la porfirina, entonces los dos ejes de simetría ya no son equivalentes y el espectro presenta dos transiciones, particularmente en la banda Q de menor energía. Al aumentar la degeneración (o la diferencia) entre los ejes de la porfirina, se puede causar la formación de dos transiciones en la banda α de un citocromo. En general, estas diferencias entre los ejes se deben a cambios en el ambiente polar que rodea la porfirina o a cambios en la estructura de la proteína que favorecen el acercamiento de grupos iónicos.

El corrimiento hacia el rojo en una banda de absorción puede estar determinado ya sea por la estructura del cromóforo o por factores externos. Los cambios en la estructura de la molécula de porfirina son capaces de hacer cambios en el espectro de absorción y en el potencial redox. Se han realizado algunos estudios importantes con la molécula de bacterioclorofila (BCl), que es una protoporfirina IX con Mg^{2+} en lugar de hierro. La BCl *a* tiene un etanoilo en el anillo I, a diferencia de la clorofila *a* que tiene un vinilo (etenilo) en la misma posición. Barkigia y cols. (1988), estudiaron las conformaciones que puede adquirir una bacterioclorofila sin Mg^{2+} , (denominada bacteriofórbido δ) pero con sustituyentes en los cuatro anillos de pirrol. Si la estructura del bacteriofórbido se desdobra y se coloca de manera lineal, es posible observar que los diferentes sustituyentes en la estructura la apartan de un eje de simetría en comparación con la molécula sin sustituyentes (ver figura 32). Cada uno de los anillos puede darle un torsión a la molécula y por lo tanto cambiar el espectro de absorción y el potencial redox. Estos datos pueden obtenerse de la molécula disuelta en un

solvente orgánico. Se puede poner como ejemplo a la tetrafenil octaetilporfirina de zinc (ZnTPOEP), que tiene una forma de silla. Si se compara con otros dos compuestos semejantes, la tetrafenil porfirina de zinc (ZnTPP) y la octaetilporfirina de zinc (ZnOEP) se obtiene lo siguiente: la λ máxima del primer compuesto es de 637 nm, para el segundo de 586 nm y para el tercero de 569 nm. Los potenciales redox medios de cada uno son: -1.54, -1.35 y -1.63 V (Barkigia y cols., 1988).

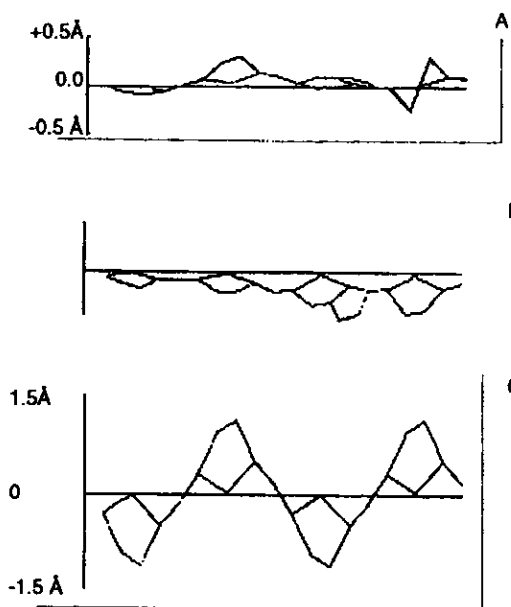


Figura 32: Desviaciones del plano del esqueleto de varios derivados de porfirinas. El plano está definido por los nitrógenos de las moléculas. El panel A muestra al bacteriofórbido (4,5-diethyl-metil-bacteriofórbido) y el panel B el bacteriofórbido 4-neopentenil, 5-etil-metilbacteriofórbido. El panel C presenta a otro derivado pero que contiene además Zinc, el Zinc tetrafenil octaetilporfirina. Tomado de Barkigia y cols. (1988).

Gudowska-Nowak y cols. (1990), hicieron un estudio de las 7 bacterioclorofilas (BCI) de la antena de *Prosthecochloris aestuarii* cuya estructura cristalográfica ya está resuelta. Cada BCI está situada en diferente parte de la proteína. Las siete BCIs mostraron diferente grado de desviación del plano de los átomos de carbono de la porfirina o de los átomos de nitrógeno (ver figura 32). Cada una de ellas tiene diferente espectro de absorción y potencial redox. En el trabajo se simularon las BCIs con todos sus sustituyentes o sin ellos, con esto se vio que los sustituyentes no conjugados tienen un efecto pequeño sobre la energía de

excitación de cada BCI, hay un corrimiento de menos de 200 cm^{-1} (12.5-13 nm) hacia el rojo o el azul. Sin embargo, al eliminar uno de los ligandos axiales de la porfirina, el corrimiento puede ser de más de 400 cm^{-1} (26.4 nm) hacia el rojo o de menos de 200 cm^{-1} (24.8 nm) hacia el azul. Si se elimina el grupo acetilo del anillo I, entonces se provoca un corrimiento hacia el azul de 600 a 1000cm^{-1} (36.6-59.3 nm).

El grado de torsión de cada una de las BCIs modelo, también interfiere en el cambio de la longitud de onda de excitación. En general, la transición afectada por los cambios estructurales es la Q_y (que corresponde a la banda de menor energía en el espectro de una porfirina, en el eje de simetría y). Esto está definido por que la contribución al espectro proviene de pasar de un orbital molecular más bajo a uno más alto (HOMO→LUMO). Esta configuración solamente puede ser acoplada al estado basal por luz polarizada orientada en el sentido del eje y (bajo las reglas de selección de dipolo eléctrico) por esto se designó como transición Q_y . Entre mayor sea la diferencia de energía entre los orbitales moleculares, mayor será la energía de excitación de Q_y . Los anillos I y III de la porfirina son especialmente sensibles a los cambios de sustituyentes y a la deformación que estos les causen. En estos orbitales los signos de los HOMO y LUMO varían en cada una de las BCI estudiadas. Los aminoácidos con carga alrededor de las BCIs pueden causar los mismos efectos que causan la orientación de un grupo acetilo en el anillo en las BCIs aisladas (Gudowska-Nowak y cols., 1990).

Prince y cols. (1997) realizaron un análisis de la apoproteína del complejo cosechador de luz 2 o complejo cosechador de luz periférico (LH2=light harvesting 2) de *Rhodospseudomonas acidophila*. El complejo está formado por ocho oligómeros de dos péptidos cortos (α y β) y algunas moléculas bacterioclorofila a y carotenoides ensamblados no covalentemente a la proteína. Las BCIs tienen diferentes máximos de absorción cerca del infrarrojo en 800 y 850 nm de longitud de onda. En comparación, una clorofila monomérica en

acetona absorbe a 777 nm (Weigl, 1953). Citando a los autores: "el ambiente de los cromóforos en el complejo cosechador de luz es gobernado por la proteína. La proteína crea las condiciones que determinan la disposición relativa de los pigmentos y contribuye al ambiente local, lo cual modula su espectro de absorción." Cada una de las BCIs está situada dentro de la proteína con un ángulo diferente, por ejemplo, las B850 (BCI con máximo de absorción a 850 nm) está situada de tal modo que la cadena de fitilo se dirige desde el plano de la bacterioclorina hacia una hélice transmembranal. Las BCI interactúan entre sí, con los carotenoides y con la apoproteína. La distancia entre los aminoácidos más cercanos y la BCI es variable (entre 4.36-2.35 Å), sin embargo, varios aminoácidos pueden tener una influencia importante en la orientación de la molécula o en la torsión de la misma. Un ejemplo de cómo las BCIs son afectadas por los aminoácidos que los rodean, se encuentra en los resultados de la cristalografía de la figura 33. En este caso, la β BCI850 aparece doblada formando una especie de silla, al contrario de las BCI800 y α 850, que sólo presentan una ligera torsión cerca del anillo I. Una diferencia interesante es que las dos B850 están coordinadas por una histidina del lado "frontal" de la BCI, pero la B800 está coordinada por la formil metionina del lado de atrás de la molécula. Las dos B850 tienen un campo eléctrico complejo alrededor del anillo III, debido a que, no sólo los aminoácidos de las cadenas α ó β conforman este ambiente, sino que, otros pigmentos están superpuestos. Este análisis permite estudiar con cuidado cuales son las verdaderas interacciones del pigmento con la proteína y con otros pigmentos. Podemos ver que los cambios en el espectro del cromóforo son una combinación de la torsión de la molécula y del campo eléctrico establecido por la proteína.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

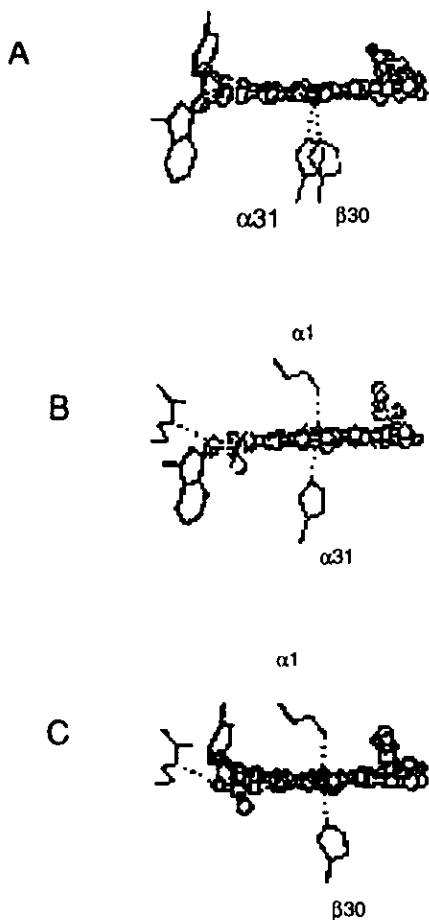


Figura 33: Sobreposición de las diferentes bacterioclorofilas del LH2. Semuestran la α B850 (gris); la β B850 (negro) y la B800 (blanco). El panel A compara a la BCl α 850 con la β 850. El panel B, la α 850 con la B800 y finalmente, el panel C a la β 850 con la B800. En los tres casos se muestran los aminoácidos más cercanos y el grado de torsión a que dan lugar en las tres moléculas. La torsión que se observa es en el anillo I, para las BCl B850, el ángulo de torsión es de $194^\circ/159^\circ$ de α/β y para B800 de -30° . Tomado de Prince y cols. (1997).

Además del grado de torsión del hemo, es posible medir los efectos sobre el espectro que provocan las cargas cerca del hemo. Hanson y cols. (1987) mostraron que las cargas a una distancia de 3-4 Å pueden causar un corrimiento hacia el rojo de la banda Qy en la BCl g. Mediante el uso de un programa de computación, se modeló el efecto de poner una carga (positiva o

negativa) a 3.4 Å cerca del nitrógeno de cada anillo en el eje "x" ó "y" de la BCl g. Una carga positiva cerca del anillo I ó una carga negativa cerca del anillo III provocan un corrimiento hacia el rojo. Si se invierte el signo de la carga, negativa en el anillo I y positiva en el anillo III se provoca un corrimiento hacia el azul (Hanson y cols., 1987) (el mayor corrimiento es de 115 nm hacia el azul, una carga negativa sobre el anillo I). La magnitud del corrimiento en los dos casos, es mayor en el eje "y" que en el "x" (hasta de dos órdenes de magnitud). En contraste, colocar un ligando axial al macrociclo, poner un puente de hidrógeno o de orientar un grupo acetilo no da lugar a un corrimiento muy grande (el mayor es de 56 nm hacia el rojo). Por lo anterior, Hanson y cols. (1987)

concluyen que es más importante el efecto de una carga puntual a 3.4 Å del nitrógeno, que el resto de efectos sobre el macrociclo.

La explicación más sencilla es la siguiente: un ambiente que favorezca una atracción de electrones π (localización) provoca que se requiera usar longitudes de onda pequeñas (de mayor energía) para excitar a los electrones π . En cambio, un ambiente no polar daría pie a la utilización de longitudes de onda grandes (de menor energía) para excitar a los electrones π (Gouterman, 1961; Howell y Robertson, 1993). El corrimiento hacia el rojo o hacia el azul depende del signo y la localización de las cargas con relación al estado basal y excitado de los momentos dipolares de la porfirina (Goudowska-Novak y cols., 1990).

Un buen ejemplo acerca de la influencia del ambiente formado por las proteínas sobre el hemo, son los citocromos pequeños tipo *b* y *c'* de ciertas bacterias. El citocromo *c'* de bacterias fotosintéticas y desnitrificantes tiene un peso molecular de 14 kDa, forma dímeros *in vivo*, aunque se desconoce su función. Este citocromo tiene la secuencia de aminoácidos consenso para la unión al hemo (CXYCH). Se ha obtenido la estructura cristalográfica del citocromo *c'* de *Rhodospirillum rubrum* a 2.5 Å de resolución (Weber y cols., 1981). La estructura terciaria se muestra en la figura 34A junto con la estructura del dímero (fig. 34B). El monómero está formado por cuatro alfa hélices paralelas (denominadas A-D) y el hemo se une covalentemente a las cisteínas 118 y 121 y está cubierto por el asa bc (residuos 56-78). El sitio en el que está el hemo es asimétrico, la parte frontal está muy empacada por las hélices A y B y la cara posterior está expuesta parcialmente al solvente. El hemo está coordinado por la His¹²² y por la Met¹⁶. Los aminoácidos aromáticos más cercanos son Phe⁸², Trp⁸⁶ y Phe¹²⁵. El espectro a baja temperatura mostró que la banda α tiene un pico a 547 nm y un hombro a 545 nm (Flatmark y cols., 1970).

El otro citocromo modelo es el citocromo *b₅₆₂* de *Escherichia coli*. Este citocromo es un monómero y tiene una masa molecular de 12 kDa (figura 34 C y

D). Su función se desconoce pero se piensa que puede funcionar como un acarreador de electrones soluble. El hemo está estabilizado por la Met7 y la His102. Tiene muy pocos residuos aromáticos los cuales están situados muy cerca del hemo, ellos son dos His, dos Phe, dos Tyr y no tiene triptofanos. La estructura cristalográfica de este citocromo se ha obtenido a 2.5 Å de resolución y muestra que está formado por cuatro alfa hélices casi antiparalelas (denominadas A-D) (Mathews y cols., 1979). También el sitio en el que está el hemo es asimétrico. Por la cara frontal (cerca de la Met7) tiene un ambiente hidrofóbico y la cara posterior (His 102) está expuesta al solvente. El espectro de absorción a baja temperatura mostró una banda α con un pico a 558 nm y un hombro a 550 nm (Itagaki y Hager, 1966).

Estos dos citocromos coinciden en que tienen cuatro alfa hélices que rodean a un solo hemo. Para poder entender los cambios espectroscópicos en el citocromo *b* de *Polytomella* spp., se puede tomar a las cuatro alfa hélices que rodean al hemo con las hélices de estos citocromos pequeños. Los dos citocromos muestran una banda α con dos componentes en el espectro obtenido a baja temperatura. Además tienen residuos aromáticos que tienen las mismas posiciones cerca del hemo, estos son Phe 61, Phe 65 y Tyr 105 (para el citocromo *b*₅₆₂) y los residuos Phe82, Trp 86 y Phe125 (para el citocromo *c*). La figura 35 muestra una comparación de las estructuras de los dos citocromos y en ella puede verse los aminoácidos que están muy cercanos al hemo. El papel de estos aminoácidos parece ser el de mantener un ambiente muy compacto alrededor del hemo.

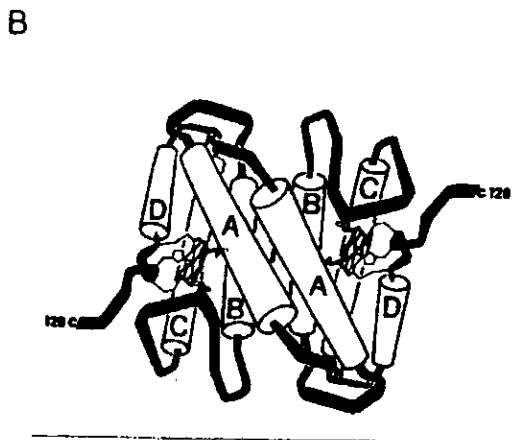
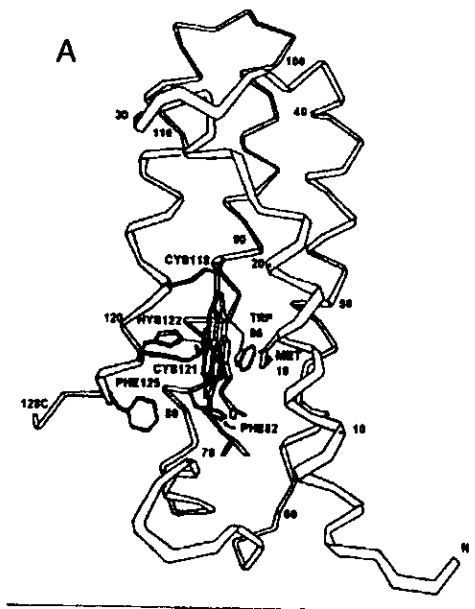
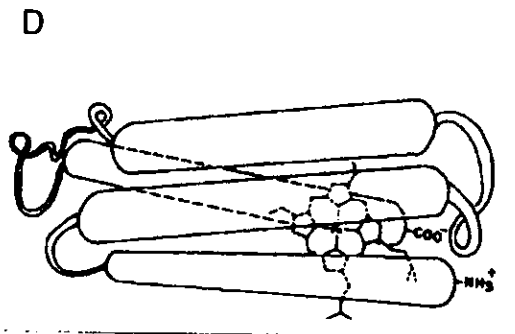
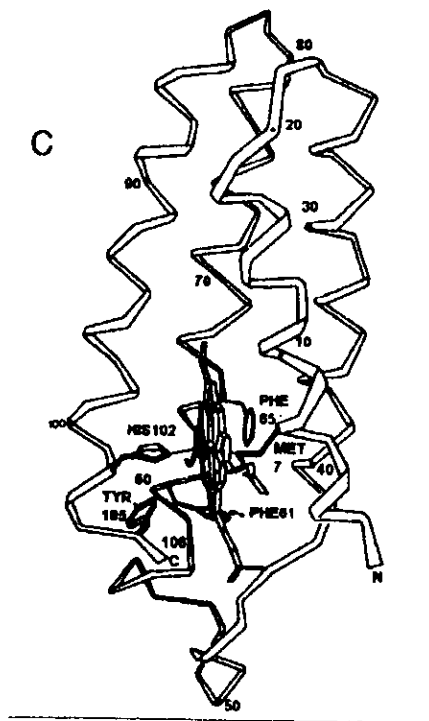


Figura 34: Dos citocromos pequeños. El citocromo *c'* de *Rhodospirillum rubrum*, se muestra en el panel A de acuerdo a la estructura cristalográfica obtenida a 2.5 Å de resolución. El panel B muestra un modelo del dímero del citocromo *c'*. En el panel C se muestra la estructura cristalográfica del citocromo *b₅₆₂* de *Escherichia coli* obtenida a 2.5 Å de resolución y el panel D muestra un modelo de las cuatro hélices rodeando al hemo de este citocromo. En los dos casos se señalan los aminoácidos que rodean al hemo. Tomado de Mathews (1985).



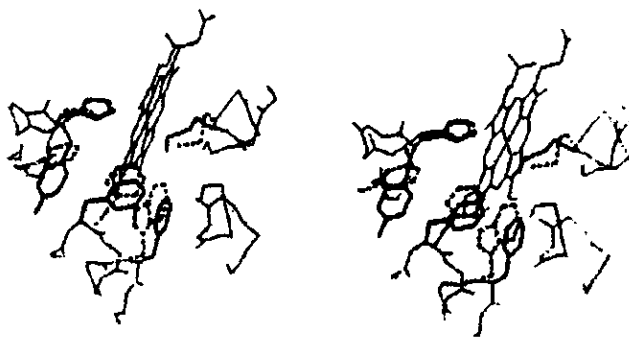


Figura 35: Visión estereoscópica de la superposición de los citocromos b_{592} y c' para tener una idea de las posibles semejanzas de ambiente que rodea a los hemos. El citocromo b_{592} se muestra en línea continua y el citocromo c' en línea punteada. Tomado de Mathews (1985).

Con estos datos, podemos especular un poco acerca de las causas por las que la banda α del citocromo b de *Polytomella* spp. es atípica. En primer lugar, el ambiente que rodea a los dos hemos debe ser tal que cause una distorsión en el anillo. Los diferentes grados de torsión de este anillo pueden hacer un corrimiento hacia el rojo en el espectro, como ya se ha mostrado con los datos anteriores. En segundo lugar, tenemos que explicar la escisión de la banda. En este caso, los datos anteriores muestran que, si la nube electrónica del macrociclo no es simétrica en los ejes x - y , se pueden generar dos componentes en la banda Q (Gouterman, 1961; Howell y Robertson, 1993) (ver figura 36).

Además del corrimiento y escisión de la banda α apreciamos también que el ancho de los componentes es diferente. El ensanchamiento de la banda, medido a la mitad de la altura (ATMA=ancho total a la mitad de la altura), para el hemo b_L tiene un valor de 6.63 nm para el máximo. En cambio, el máximo1 del hemo b_H es de 5.96 nm (ver las tablas II y IV). El máximo2 tiene casi el mismo valor para los dos hemos. Howell y Robertson (1993) discuten que el ensanchamiento de la banda puede ser el resultado de varios factores actuando simultáneamente sobre el hemo. Por ejemplo, la torsión de la unión entre las

histidinas y el hierro pueden hacer que el hemo quede liberado y permitir que se mueva. También por cambios en los ejes x-y o por conformaciones de la proteína. Los efectos de estos factores son más frecuentes en el hemo b_L . Pearlstein y Hemenger (1978) postularon que el ensanchamiento de las bandas en un espectro de absorción se debe a interacciones de tipo "excitón". A modo de comparación, se puede usar el espectro del hemo b_L de ratón (Howell y Robertson, 1993), que tiene dos componentes y el de mayor energía es más ancho. El componente más ancho también es el que contribuye en mayor proporción a formar la banda α . En la banda α de *Polytomella* spp., el componente de menor energía contribuye en mayor proporción al espectro que el de mayor energía. Si suponemos que el componente de menor energía corresponde al componente y (Qy) de la banda α , podemos pensar que los electrones situados en el eje "y" del hemo son los que están siendo alterados y, por lo tanto, se pierde la simetría y en consecuencia, el hemo se escinde. La diferencia entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO del hemo b_L de ratón es considerable y se necesita una mayor energía de transición, comparada con la que se requiere para la transición del componente corrido hacia el rojo en *Polytomella* spp.. La diferencia entre el ancho del componente de menor energía del hemo b_L de ratón y el de *Polytomella* spp. es de 2.2 nm. Si la primera suposición es correcta, entonces la nube electrónica del macrociclo está desviada hacia el eje y.

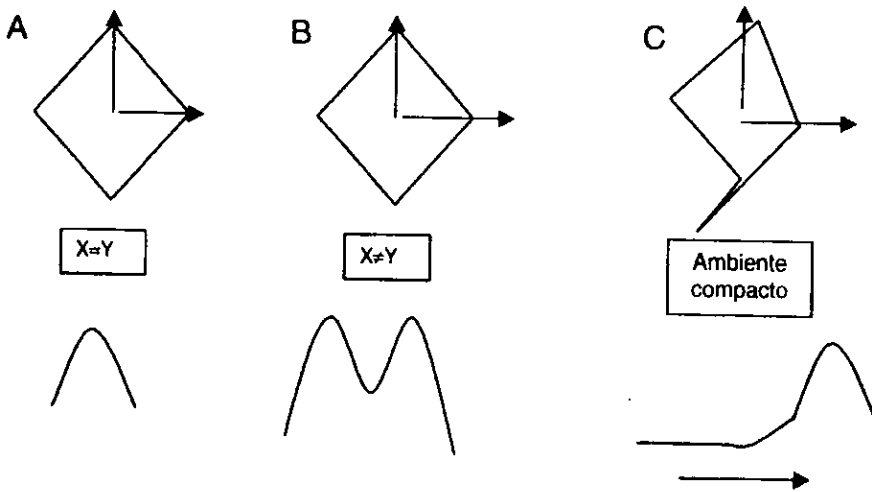


Figura 36: Esquema que muestra las diferentes posibilidades de alteración en un hemo debido a su ambiente. El primer esquema (A) muestra al hemo sin alteración, por tanto, los ejes x/y son equivalentes y se obtiene una banda α con un sólo componente. El segundo esquema (B) muestra que el ambiente puede quedar asimétrico, provocando una escisión en la banda. El tercero (C) muestra que la torsión del hemo puede causar un corrimiento hacia el rojo de la banda.

La estructura del citocromo *b*:

Para completar este panorama es necesario referirnos a la estructura del citocromo *b*. Afortunadamente, ya contamos con la estructura cristalográfica del complejo *bc_L*, de bovino (Xia y cols., 1997). Además en el laboratorio se obtuvo la secuencia del gene del citocromo *b* de *Polytomella* spp. (Antaramian y cols., 1998 y Antaramian, tesis doctoral). La comparación de estas secuencias con la del citocromo *b* de *Polytomella* spp., nos puede dar una idea de por qué están alterados los dos hemos del citocromo *b* de *Polytomella* spp. Se trató de encontrar en la literatura mutaciones en el citocromo *b* cercanas a los hemos de algún organismo que dieran lugar a un corrimiento en el espectro. Nos interesaban sobre todo las mutaciones que provocan un corrimiento hacia el rojo

en la banda α del espectro de absorción. La tabla VII muestra las mutaciones que se encontraron en la literatura y el efecto que provocan.

Tabla VII: Cambios de aminoácidos que alteran los hemos del citocromo *b*.

Mutación Procarionte	Mutación Eucarionte	Propiedades Procariontes	Propiedades Eucariontes	Características	Referencias
G48V		Modificación de b_L y b_H		La oxidación del b_H está bloqueada.	Gennis y cols. (1993)
	rG33A		b_H corrido	Corrimiento de 1 nm hacia el rojo.	Coppée y cols. (1994). Brasseur y cols. (1995).
Q58L		Modificación de b_L			Gennis y cols. (1993).
	F129L		b_L modificado		Colson, (1993)
G146A,V		b_L modificado			Gennis y cols. (1993).
	C133Y		b_L modificado		Lemsle-Meunier y cols. (1993.)
	S206L		b_H corrido	Corrimiento de 1.5 nm hacia el rojo	Lemsle-Meunier y cols. (1993).

r= revertante.

Se puede observar que las mutaciones provocan un corrimiento de menos de dos nm hacia el rojo en la banda α del hemo b_H . Las otras mutaciones repercuten más en la unión del hemo o, en algunos casos en su estabilización. Estas mutaciones cambian el Em de los hemos. No hay ninguna que provoque un corrimiento hacia el rojo de más de dos nm, como el que se ve en la banda α del citocromo *b* de *Polytomella* spp.. Estas mutaciones dan una idea de la importancia de algunos aminoácidos que son importantes en para la estabilización de los hemos, proporción una base para diseñar mutantes para el citocromo *b* de *Polytomella* spp..

Una de las características en la estructura cristalográfica del citocromo *b* de bovino, es que las cavidades del hemo b_L y del hemo b_H son diferentes. La del hemo b_L es más compacta que la del hemo b_H . Esto se puede ver también en el

modelo hecho por Link y cols. (1994). El hemo b_L está cercano a las asas cd y ab , que forman un "techo" sobre este hemo (ubicado en el lado del espacio intermembranal). Las hélices A, B, C y D están muy cercanas al hemo, tal que, parecería que podrían torcerlo o, al menos, ejercer cierta tensión sobre él, como se ve en el modelo de Link y cols. (1994) (ver figura 5). El hemo b_H está próximo al asa bc , probablemente a un segmento del N- terminal y parte del asa de . Estos segmentos forman el "piso" del hemo (en el lado de la matriz mitocondrial). La cavidad formada por las hélices A, B, C y D es más abierta y el hemo se ve menos tenso. Con estos datos de la estructura del citocromo b de bovino podemos explicar los datos espectroscópicos que se han obtenido para este citocromo y para el de ratón. El hemo b_L está situado en una cavidad mucho más compacta, lo que propicia un hemo con un espectro de dos componentes. Las asas que están en contacto con este hemo pueden proporcionarle un ambiente de mayor polaridad y una torsión del hemo que causen una escisión de la banda α . Podemos predecir que la transición Q_y está siendo afectada por este ambiente, lo que causa una desigualdad en la nube electrónica del macrociclo.

Es importante recordar que, en el citocromo b de *Polytomella* spp. los dos hemos presentan una banda α con dos componentes y un corrimiento hacia el rojo. Podemos anticipar que el ambiente que rodea a los dos hemos debe ser parecido, lo cual es una novedad, ya que, en los otros hemos caracterizados, los ambientes de cada hemo son muy diferentes. Los datos citados muestran que el hemo puede presentar diferencias espectroscópicas debidas a los cambios en su estructura (ya sea por torsiones causadas por sustituyentes o por diferencias en el ambiente del hemo que cambien los planos del cromóforo). Estos fenómenos deben presentarse en los hemos del citocromo b de *Polytomella* spp. Con el fin de encontrar una explicación a estos cambios espectroscópicos, decidimos comparar la secuencia de aminoácidos del citocromo b de *Polytomella* spp. con la de bovino. Sólo se mostrará la comparación hecha con las primeras 4 hélices transmembranales y las asas que las unen ya que éstas

forman el subgrupo de la estructura del citocromo *b* que rodea a los hemos (figura 37).

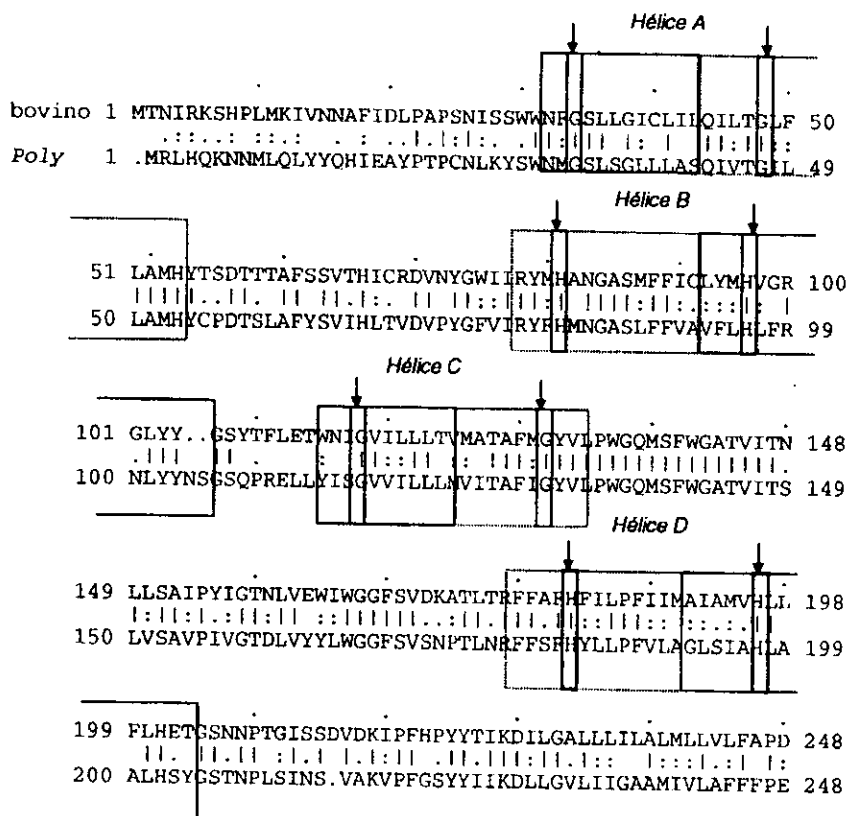


Figura 37: Comparación de las secuencias del citocromo *b* de bovino y *Polytomella* spp., las flechas marcan a las histidinas y glicinas conservadas. Las hélices están marcadas con cuadrados. La mitad de la hélice que está en contacto con el hemo *b_h*, está marcada con línea punteada y la que está en contacto con el hemo *b_l*, con línea continua. Poly = *Polytomella* spp.

Para el análisis, se tomaron los aminoácidos que forman las hélices de acuerdo con Degli Esposti y cols. (1993). Se hizo también un análisis "en ruedas" para poner los aminoácidos más cercanos en la α hélice. El análisis se muestra en la figura 38. Con base al estudio anterior, para las hélices B y D se tomó como centro de cada hélice las histidinas y para las hélices A y C las

glicinas que son importantes para formar la cavidad del hemo. Se tomaron en cuenta sólo los aminoácidos más cercanos a estos residuos. También se tomó en cuenta los aminoácidos diferentes, el tipo de cambio (conservado, no conservado y semiconservado) y al final se trató de buscar el tipo de ambiente final que causan. La tabla VIII muestra el resumen de este análisis.

Los resultados que se presentan en esta tabla muestran que, en general, la cavidad que rodea al hemo b_L de *Polytomella* spp. es hidrofóbica, probablemente más que la de bovino. Además, tiene una zona con una cierta polaridad dada por los cambios de T60S, C70T, N148S, D173S, T178N y K174N. Estos aminoácidos están situados en el "techo" del hemo y, de acuerdo a la estructura del complejo bc_1 , estas asas están muy cercanas al hemo b_L por lo que se tomaron en cuenta para el análisis. Además de esto, los aminoácidos que están muy cercanos a las histidinas y a las glicinas dan un ambiente no polar, hidrofóbico. Esto habla de que el hemo b_L de *Polytomella* spp. está situado, al igual que el de bovino, en una cavidad muy cerrada. La escisión de la banda α puede estar dada por uno de los aminoácidos con una polaridad ácida, que atrae a los electrones del macrociclo. El hecho de que la cavidad del hemo b_L esté muy cerrada puede ocasionar un cambio en la torsión del hemo, puede ocasionar un corrimiento hacia el rojo. La tabla IX muestra el análisis de aminoácidos más cercanos para el hemo b_H . La tabla muestra que en casi todos los cambios entre *Polytomella* spp. y bovino, el ambiente que se genera es más hidrofóbico en *Polytomella* spp. que el de bovino.

Casi todos los aminoácidos cercanos a las histidinas y a las glicinas dan un ambiente más hidrofóbico. Algunos aminoácidos cercanos proporcionan polaridad a la cavidad como los cambios W30S ó L37S y G101N. Llama la atención que en el "piso" del hemo hay muchos cambios en un asa muy pequeña que es el asa bc . Los 7 aminoácidos están cambiados y casi todos son cambios no conservados. El asa cambia de un carácter casi completamente no polar a uno polar hidrofóbico y un poco negativo. Este cambio puede ser de gran

importancia para hacer una cavidad más hidrofóbica en el hemo b_H y más cerrada y que por lo tanto forme mayores distorsiones en el hemo dando lugar al corrimiento y a la escisión de la banda. La figura 39 muestra, como conclusión, un esquema de como las cuatro hélices deben estar en el citocromo b de *Polytomella* spp. y cómo están situados los dos hemos en la proteína. Además, el panel B presenta los aminoácidos más importantes que están cambiados en la secuencia del citocromo b de *Polytomella* spp. con respecto a los de bovino y se puede apreciar que hay mayor cantidad de cambios en la zona del hemo b_H con respecto a la del hemo b_L .

¿Cuál es la función que puede tener un citocromo b con un corrimiento hacia el rojo?. Sus hemos son componentes redox de parte del ciclo Q, que bombea protones utilizables por la ATPasa. Los potenciales redox medios para los hemos b_H y b_L , logran una diferencia de potencial que permite el funcionamiento del complejo bc_1 de *Polytomella* spp. La velocidad con la que se reduce el complejo es semejante a la que tiene el complejo de mitocondrias de corazón de bovino (Gutiérrez-Cirlos y cols., 1994). A pesar de que no hemos medido su capacidad para bombear protones, pensamos debe hacerlo de manera eficiente y rápida. Los mismos cambios que provocaron el corrimiento hacia el rojo y la escisión de la banda α , también pudieron alterar el potencial redox. Este cambio ha permanecido en la proteína por que no ha impedido que bombee los protones. Parte del trabajo del laboratorio está encaminado a caracterizar a las mitocondrias de *Polytomella* spp., para saber que tan eficientes son y de qué manera está regulada la fosforilación oxidativa en ellas. Sería interesante conocer más a fondo la cinética del ciclo Q en este complejo y reconstituirlo en liposomas para caracterizar la actividad redox y de bombeo de protones. Sabemos que *Polytomella* spp. tiene amiloplastos que pudieron ser cloroplastos en algún tiempo, es interesante saber si la pérdida de la capacidad fotosintética pudo influir sobre las mitocondrias y en particular, sobre la actividad de algún complejo respiratorio.

Tabla VIII: Cambios de aminoácidos alrededor del hemo b_L . Se muestra primero el aminoácido del citocromo b de bovino y la siguiente letra es el cambio que se encontró en el citocromo b de *Polytomella* spp.

Cambio	Tipo	Cambio de ambiente	Resultado
Histidina 83			
L94V	C	No polar hidrofóbico	No polar hidrofóbico
C93A	SC	Polar s/carga → no polar hidrofóbico	
M82F	C	No polar hidrofóbico	
Histidina 183			
I190V	C	No polar hidrofóbico → no polar hidrofóbico	No polar hidrofóbico
I186L	C	No polar hidrofóbico → no polar hidrofóbico	
I194L	C	No polar hidrofóbico → no polar hidrofóbico	
I191L	C	No polar hidrofóbico → no polar hidrofóbico	
Glicina 48:			
Hélice A todos conservados			
Glicina 132:			
V124M	C	No polar hidrofóbico.	No polar
L121I	C	No polar hidrofóbico.	
Techo del b_L			
Asa ab: de 24 aa 50% conservados.			
T61L	NC	No polar hidrofóbico	Polar s/carga
S64Y	NC	Polar s/carga	
R71V	NC	Polar básico → no polar hidrofóbico	
N74P	NC	Polar s/carga → no polar hidrofóbico	
T56C	SC	Polar s/carga	
S57P	SC	Polar s/carga → no polar	
T60S	SC	Polar s/carga	
T67I	SC	Polar s/carga → no polar	
C70T	SC	Polar s/carga	
Asa cd de 44 aa 70% conservados:			
E164Y	NC	Polar ácido → polar s/carga	Polar s/carga
N148S	SC	Polar s/carga → polar s/carga	
Y155I	SC	Polar s/carga → no polar	
D173S	SC	Polar ácido → polar s/carga	
K174N	SC	Polar básico → polar s/carga	
T178N	SC	Polar s/carga → polar s/carga	

C=conservado; NC=no conservado; SC=semiconservado.

Tabla IX: Cambios de aminoácidos para el hemo b_H . Se muestra primero el aminoácido que corresponde al aminoácido del citocromo b de bovino y la siguiente letra es el cambio que se encontró en el citocromo b de *Polytomella* spp.

Aminoácido	Tipo	Cambio de ambiente	Cambio total
Histidina 97:			
C93A	SC	Polar s/carga→no polar	Hidrofóbico, polar (-)
G101N	SC	Polar s/carga→ polar sin carga	
L94V	SC	No polar hidrofóbico→no polar hidrofóbico.	
Histidina 196:			
T203Y	NC	Polar s/carga→polar s/carga	No polar hidrofóbico
M192A	NC	No polar hidrofóbico→no polar hidrofóbico	
F199A	NC	No polar hidrofóbico→no polar hidrofóbico	
Glicina 34:			
L49I	C	No polar hidrofóbico	Hidrofóbico más polar (-)
I42A	C	No polar hidrofóbico	
W30S	SC	No polar hidrofóbico→polar s/carga	
L37S	NC	No polar hidrofóbico→no polar hidrofóbico	
Glicina 118:			
W115Y	C	No polar hidrofóbico→polar s/carga	
V125M	C	No polar hidrofóbico→no polar hidrofóbico	
Piso del b_H (asa bc):			
Y109Q	NC	Polar s/carga→polar s/carga	no polar
T110P	SC	Polar s/carga→no polar hidrofóbico.	
F111R	NC	Polar hidrofóbico→polar básico	
L112E	NC	No polar hidrofóbico→polar ácido	
E113L		Polar ácido→no polar hidrofóbico	
T114L	NC	Polar s/carga→no polar	

C=conservado; NC=no conservado; SC=semiconservado.

Figura 38: Representación de las cuatro alfa hélices que rodean al citocromo *b* de *Polytomella* spp. Se muestra a los aminoácidos del citocromo *b* de bovino. Entre paréntesis se muestran sólo los aminoácidos de *Polytomella* spp. que son diferentes a los de bovino. La barra representa al hemo b_H o al hemo b_L . En los rectángulos se muestran los aminoácidos de bovino que forman las asas que unen a las alfa hélices y afuera los cambios que se obtuvieron en el citocromo *b* de *Polytomella* spp. Las histidinas conservadas están encerradas en un cuadrado y las glicinas en un círculo. El panel A representa al hemo b_H y los aminoácidos que la rodean. El símbolo * marca a los aminoácidos que están cerca del hemo b_L . El panel B muestra al hemo b_L y los aminoácidos que la rodean. El símbolo * marca a los aminoácidos cerca del hemo b_H . La disposición de las hélices se tomó de Xia y cols. (1997).

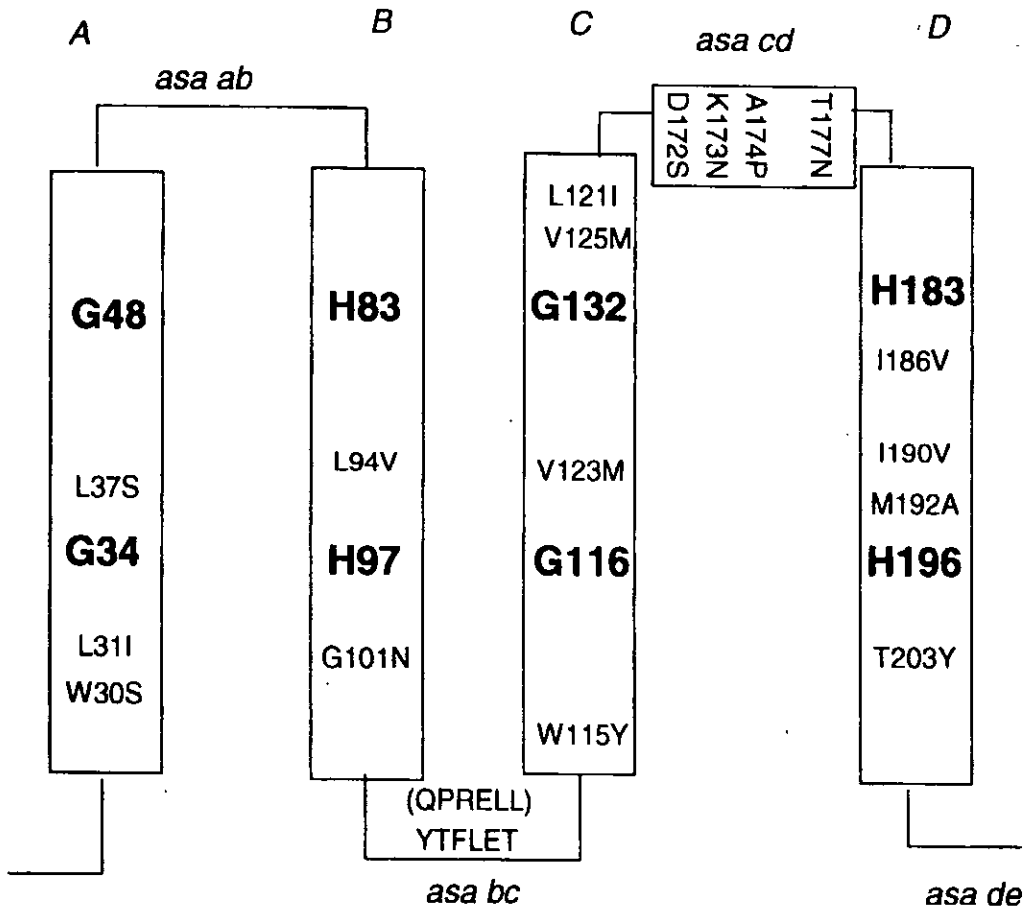


Figura 39 A: Esquema que muestra las cuatro alfa hélices que rodean a los dos hemo del citocromo *b* de *Polytomella* spp. Se muestran las histidinas y glicinas conservadas, así como los aminoácidos que puede tener algún efecto importante sobre el espectro de absorción de los dos hemo. Las histidinas y glicinas que estabilizan al hemo b_L y al hemo b_H están en **negritas**. Entre paréntesis están los aminoácidos de *Polytomella* spp. en el asa bc.

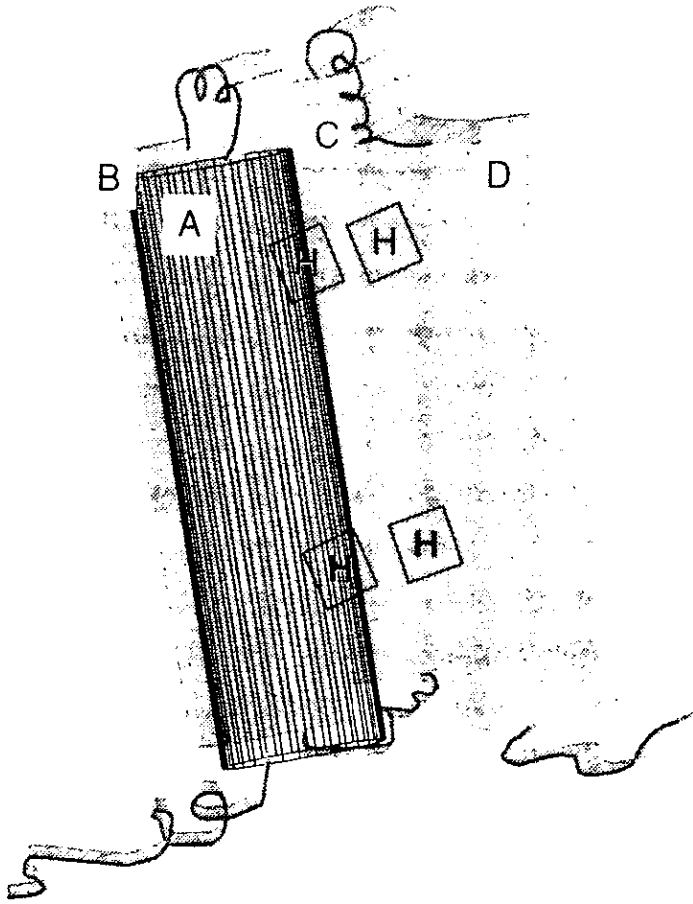


Figura 39B: Esquema que muestra la disposición de las cuatro alfa hélices que rodean a los hemos de *Polytomella* spp. En este caso, el esquema trata de mostrar el empaquetamiento de las hélices alrededor de los hemos (basado en la estructura propuesta por Xia y cols., 1997)

Conclusiones:

- El citocromo tipo *b* de *Polytomella* spp. tiene una banda α corrida hacia el rojo en el espectro diferencial de todo el complejo bc_1 (espectro reducido con ditionita menos el oxidado).
- El análisis realizado por HPLC mostró que el hemo del citocromo *b* de *Polytomella* spp. es una protoporfirina IX que tiene hierro. Por lo tanto, podemos concluir que no hay ningún tipo de sustituyentes químicos en el hemo que provoque el corrimiento hacia el rojo de la banda α de absorción.
- Los espectros diferenciales usando reductores del complejo bc_1 y el análisis por 4a derivada de los mismos mostraron, que el espectro del citocromo *b* tiene dos componentes en la banda α .
- Al hacer la titulación redox pudimos obtener los potenciales específicos de cada hemo y también sus espectros de absorción. La titulación mostró una tercera especie (el hemo b_{150}) que corresponde al hemo b_H con una quinona unida lo cual altera el potencial redox de este hemo.
- Los espectros de absorción de los dos hemos obtenidos por medio de la titulación redox, tienen una banda α con dos componentes, uno de alta energía y uno de baja energía.
- En particular, el hemo b_H difiere del resto de los hemos b_H conocidos que tienen una banda α de un solo componente.
- En los dos hemos, el componente de baja energía es el componente más importante del espectro de cada hemo. En particular, en el hemo b_H esta proporción es significativamente mayor que en el hemo b_L .
- Podemos concluir que la banda α del citocromo *b* de *Polytomella* spp. es el resultado de la superposición de los espectros de sus dos hemos, el hemo b_L y el hemo b_H .
- La titulación con los inhibidores específicos del complejo mostró diferencias importantes para el hemo b_H en el cual fue posible obtener un espectro con dos transiciones aun con la antimicina pegada. El complejo mostró una afinidad mayor por antimicina que por mixotiazol.
- Para poder explicar la escisión y el corrimiento hacia el rojo en la banda α del citocromo *b* de *Polytomella* spp., se analizaron otros citocromos pequeños en los cuales se ha podido ver una banda α escindida. También se revisaron los estudios que se han hecho en las diferentes BCI de los

sistemas cosechadores de luz en las bacterias. La explicación más interesante es que el ambiente generado por los aminoácidos más cercanos al hemo son responsables de estos dos fenómenos.

- La comparación de la secuencia de aminoácidos del citocromo *b* entre *Polytomella* spp. y bovino se hizo en la región que comprende las hélices A, B, C y D. Se obtuvieron algunos cambios en los aminoácidos cercanos a las histidinas que unen al hemo y a las glicinas altamente conservadas que pueden explicar el corrimiento en el espectro. Los cambios llevan a formar una cavidad más hidrofóbica y por lo tanto más estrecha para los hemos. Esta cavidad puede dar una torsión específica sobre el macrociclo. También hay algunos aminoácidos que proporcionan una cierta polaridad en la cavidad del hemo.

Literatura citada:

Aragao, H. (1910). Pesquisas sobre a *Polytomella agilis n.g.n.sp.* **Mem. Inst. Oswald Cruz.** 2, 42-57.

Aguirre-Gómez, R. (1996). Identification of phytoplankton pigments from absorption and reflectance spectra. Tesis doctoral en Filosofía. Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias, Universidad de Southampton.

Antaramian, A., Coria, R., Ramírez, J. y González-Halphen, D. (1996). The deduced subunit I from cytochrome *c* oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*. **Biochem. Biophys. Acta.** 1273, 198-202.

Antaramian, A., Funes, S., Vázquez-Acevedo, M., Atteia, A., Coria, R. y González-Halphen, D. (1998). Two unusual amino acid substitutions in the cytochrome *b* of the colorless alga *Polytomella* spp.: correlation with the atypical spectral properties of the *b_H* heme. **Arch. Biochem. Biophys.** en prensa.

Antaramian, A. (1998). Caracterización del gen nuclear COX2 y del gen mitocondrial *citb* que codifican para subunidades de los complejos respiratorios del alga *Polytomella* spp. Tesis doctoral en Investigación Biomédica Básica. U.A.C.P. y P. del C.C.H. U.N.A.M.

Attardi, G. y Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. **Ann. Rev. Cell Biol.** 4, 289-333.

Atteia, A. (1994). Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **C.R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie.** 317, 11-19.

Barkigia, K.M., Chantranupong, L. Smith., K.M. y Faher, J. (1988). Structural and theoretical models of photosynthetic chromophores. Implications for redox, light absorption and vectorial electron flow. **J. Am. Chem. Soc.** 110, 7566-7567.

Berry, E.A. y Trumpower, B.L. (1987). Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. **Anal. Biochem.** 161, 1-5.

Berry, E.A., Huang, L-S. y DeRose, V.J. (1991). Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase of higher plants. **J. Biol. Chem.** 266, 9064-99077.

Brandt, U., Haase, U., Shägger, H. y von Jagow, G. (1991). Significance of the "Rieske" Iron-sulfur protein for the formation and function of the ubiquinol-oxidation pocket of mitochondrial cytochrome *c* reductase (*bc₁* complex). **J. Biol. Chem.** 266, 19958-19964.

Bowyer, J.R., Edwards, C.A., Ohnishi, T., Trumpower, B.L. (1982). An analogue of ubiquinone which inhibits respiration by binding to the iron-sulfur protein of the

cytochrome *b-c₁* segment of the mitochondrial respiratory chain. **J. Biol. Chem.** 257, 8321-8330.

Brown, D.L., Massalski, A., Patenaude, R. (1976a). Organisation of the flagellar apparatus and associated cytoplasmic microtubules in the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. **J. Cell. Biol.** 69, 106-125.

Brown, D.L., Leppard, G.G. y Massalski, M. (1976b). Fine structure of encystment of the quadriflagellate alga *Polytomella agilis*. **Protoplasma.** 90, 139-154.

Buttler, W.L. y Hopkins, D.W. (1970). An analysis of fourth derivative spectra. **Photochem. Photobiol.** 12, 451-456.

Cantor, M.H. y Burton, M.D. (1975) Effects of thiamine deprivation and replacement on the mitochondrion of *Polytomella agilis*. **J. Protozool.** 22, 135-139.

Conner, T.W., Thompson, M.D. y Siffow, C. (1989). Structure of the three β -tubulin-encoding genes of the unicellular alga *Polytomella agilis*. **Genes** 84, 345-358.

Cramer, W.A. y Knaff, D.B. (1991). Energy transduction in biological membranes. A textbook of bioenergetics. Springer-Verlag, Nueva York. p.p. 141-171.

Cramer, W.A., Martínez, S.E., Huang, D., Tae, G-S., Everly, R.M., Heymann, J.B., Cheng, R.H., Baker, T.S. y Smith, J.L. (1994). Structural aspects of the cytochrome *b_{6f}* complex; structure of the lumen-side domain of cytochrome *f*. **J. Bioenerg. Biomem.** 26, 31-47.

Crane, F.L. y Barr, R. (1985). Chemical structure and properties of coenzyme Q and related compounds. En: Coenzyme Q. Biochemistry, bioenergetics and clinical applications. Lenaz, G. (Ed). John Wiley and sons. G.B. p.p. 1-37.

Crofts, A., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S. y Berry, E. (1987). En Cytochrome systems: molecular biology nad bioenergetics. (Papa, S., Chance, B., y Ernster, L. Eds). Plenum Press, Nueva York. p.p. 617-624

Crofts, A., Hacker, B., Barquera, B., Yun, C.H. y Gennis, R. (1992). Structure and function of the bc-complex of *Rhodobacter sphaeroides*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1101, 162-165.

Degli Esposti, M., Rotilio, G., y Lenaz, G. (1984). Effects of dibromothymoquinone on the structure and functions of the mitochondrial *bc₁* complex. **Biochim. Biophys. Acta.** 767, 10-20.

Degli Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Partanello, T. y Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. **Biochim. Biophys. Acta.** 1143, 243-271.

Ding, H., Robertson, D.E., Daldal, F. y Dutton, P.L. (1992). Cytochrome *bc₁* complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q_o site: a double occupancy Q_o site model. **Biochem.** 31, 3144-3158.

Flatmark, T., Dus, K., deKlerk, H. y Kamen, M.D. (1970). Comparative study of physicochemical properties of two *c*-type cytochromes of *Rhodospirillum rubrum*. **Biochem.** 9, 1991-1996.

González-Halphen, D., Lindorfer, A. y Capaldi, R. (1988). Subunit arrangement in beef heart complex III. **Biochem.** 27, 7021-7031.

González-Halphen, D. (1990). El complejo *bc₁* de la cadena respiratoria mitocondrial. **Clencia.** 41, 133-152.

Gutiérrez-Cirlos, E.B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. y González-Halphen, D. (1994). A highly active ubiquinol-cytochrome *c* reductase (*bc₁* complex) from the colorless alga *Polytomella* spp., a close relative of *Chlamydomonas*. **J. Biol. Chem.** 269, 9147-9145.

Gutiérrez-Cirlos, E.B. (1994). Aislamiento y caracterización del complejo *bc₁* mitocondrial del alga inolora *Polytomella* spp. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. U.A.C.P. y P. del C.C.H., U.N.A.M.

Goudowska-Novak, E., Newton, M.D. y Fajer, J. (1990). Conformational and environmental effects on bacteriochlorophyll optical spectra: correlations of calculated spectra with structural results. **J. Phys. Chem.** 94, 57985-5801.

Gouterman, M. (1961). Spectra of porfirins. **J. Mol. Spec.** 6, 138-163.

Hanson, L.K., Thompson, M.A. y Fajer, J. (1987). Environmental effects on the properties of chlorophylls in vivo. Theoretical models. En: Progress in photosynthesis research. Vol I. Biggens, J. (éd.) Martinus Nijhoff Pub. Holanda. p.p. 1.3.311-1.3.314.

Hauska, G., Nitschke, W. y Herman, R.G. (1988). Aminoacid identities in the three redox center-carrying polypeptides of cytochrome *bc₁/b₆f* complexes. **J. Bioenerg. Biomembr.** 20, 211-227.

Howell, N y Robertson, D.E. (1993). Electrochemical and spectral analysis of the long range interactions between the Q_o and Q_i sites and the heme prosthetic groups in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. **Biochem.** 32, 11162-11172.

Itagaki, E. y Hager, L.P. (1966). Studies on cytochrome *b₅₆₂* of *Escherichia coli*. I. Purification and crystallization of cytochrome *b₅₆₂*. **J. Biol. Chem.** 241, 3687-3695.

Kamensky, Y., Konstantinov, A.A., Kunz, W.S. y Sukov, S. (1985). Effects of *bc₁* site electron transfer inhibitors on the absorption spectra of mitochondrial cytochromes *b*. **FEBBS Lett.** 181, 95-99.

- Kim, Ch. H., Yench, A.J., Bunker, G., Zhang, G., Chance, B. y King, T.E. (1989). Effect of the hinge protein on the heme iron site of cytochrome *c₁*. **Biochem.** 28, 1439-1441.
- Kubota, T., Yoshikawa, S. y Matsubara, H. (1992). Kinetic mechanism of beef heart ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase. **J. Biochem.** 111, 91-98.
- Lewis, E., Munger, G., Watson, R. y Wise, D. (1974). Life cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, Polyblepharidae). **J. Protozool.** 21, 647-649.
- Link, T.A., Wallmeier, H. y von Jagow, G. (1994). Modelling the three-dimensional structure of cytochrome *b*. **Biochem. Soc. Trans.** 22, 197-204.
- Lloyd, D. y Chance, B. (1968). Electron transport in mitochondria isolated from the flagellate *Polytomella caeca*. **Biochem. J.** 107, 829-837.
- Lübber, M. (1995). Cytochromes of archael electron transfer chains. **Biochim. Biophys. Acta.** 1229, 1-22.
- Lungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumppower, B.L. (1987). Purification of highly active cytochrome *bc₁* complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. **Biochim. Biophys. Acta.** 891, 227-241.
- Marshak, D.R., Kadonaga, J.T., Burgess, R.R. Knuth, M.W., Brennan, W.A. Jr. y Lin, S-H. (1996). Strategies for protein purification and characterization. Cold Spring Harbour Laboratory Press. E.U.A. 296 p.p.
- Mathews, F.S., Bethge, P. y Czerwinski, E.W. (1979). The structure of cytochrome *b₅₆₂* from *Escherichia coli* at 2.5 Å resolution. **J. Biol. Chem.** 254, 1699-1706.
- Mathews, F.S. (1985). The structure, function and evolution of cytochromes. **Prog. Biophys. Molec. Biol.** 45, 1-56.
- Mitchell, P.(1975).Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c₁* in the respiratory chain: protonmotive ubiquinol cycle.FEBS Lett. 56, 1-6.
- Pearlstein, R.M. y Heminger, R.P. (1978). Bacteriochlorophyll electronic transition moment directions in bacteriochlorophyll *a* protein. **Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.** 75, 4920-4924.
- Phillips, J.D., Graham, L.A. y Trumppower, B.L. (1993). Subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* *bc₁* complex is required for insertion of EPR-detectable iron-sulfur cluster into the Rieske iron-sulfur protein. **J. Biol. Chem.** 267, 20188-20195.
- Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D. y Popot, J.-L. (1995). Purification and characterization of the cytochrome *b_{6f}* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. **J. Biol. Chem.** 270, 29342-29349.

- Prince, S.M., Papiz, M.Z., Freer, A.A., McDermott, G., Hawthornwaite-Lawless, A.M., Cogdell, R.J. y Isaacs, N.W. (1997). Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions. **J. Mol. Biol.** 268, 412-423.
- Pringsheim, E.G. (1955). The genus *Polytomella*. **J. Protozool.** 2, 137-145.
- Rich, P.R., Jeal, A.E., Madgwick, S.A. y Moody, A.J. (1989). Inhibitor effects on the redox-linked protonations of the *b* haems of the mitochondrial *bc₁* complex. **Biochim. Biophys. Acta.** 1018: 29-40.
- Robertson, D.E., Ding, H., Chelminski, P.R., Slaughter, C., Hsu, J., Moomaw, C., Tokito, M., Daldal, F. y Duton, P.L. (1993). Hydroubiquinone-cytochrome *c₂* oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*. Definition of a minimal isolated preparation. **Biochem.** 32, 1310-1317.
- Round, F.E. (1980). The evolution of pigmented and unpigmented unicells: a consideration of the protista. **Biosystems.** 12, 61-69.
- Saraste, M. (1964). Location of haem-binding sites in the mitochondrial cytochrome *b*. **FEBS Lett.** 166, 367-372.
- Shägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. (1986). Isolation of the eleven protein subunits of the *bc₁* complex from beef heart. **Methods Enzymol.** 126, 224-231.
- Sheeler, P., Moore, J., Cantor, M. y Granick, R. (1968). The stored polysaccharide of *Polytomella agilis*. **Life Sciences.** 7, 1045-1051.
- Siedow, J.N., Power, S., de la Rosa, I.F. y Palmer, G. (1978). The preparation and characterization of highly purified, enzymatically active complex III from baker's yeast. **J. Biol. Chem.** 253, 2392-2395.
- Suzuki, H., Hosokawa, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. (1989). Structural organization of the human mitochondrial cytochrome *c₁* gene. **J. Biol. Chem.** 264, 1368-1374.
- Tron, T., Crimei, M., Colson, A.-M. y Degli-Esposti, M. (1991). Structure/function relationships in mitochondrial cytochrome *b* revealed by the kinetic and circular dichroic properties of two yeast inhibitor-resistant mutants. **Eur. J. Biochem.** 199, 753-760.
- Trumpower B.L. y Edwards, C.A. (1979). Purification of a reconstitutively active iron-sulfur protein (oxidation-factor) from succinate cytochrome *c* reductase complex of bovine heart mitochondria. **J. Biol. Chem.** 254: 8697-8706.
- Trumpower, B.L. (1990). Cytochrome *bc₁* complex of microorganisms. **Microbiol. Rev.** 54, 101-129.

- Usui, S., Yu, L. y Yu, C.A. (1990). The small molecular mass ubiquinone-binding protein (QPc-9.5 kDa) in mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase: isolation, ubiquinone-binding domain and immunoinhibition. **Biochem.** 29, 4618-4626.
- Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N. y González-Halphen, D. (1993). Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome *bc₁* complex from liver and heart. **J. Bioenerg. Biomembr.** 25, 401-409.
- von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Graf, P., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1984). An inhibitor of mitochondrial respiration which binds to cytochrome *b* and displaces quinone from iron-sulfur protein of the cytochrome *bc₁* complex. **J. Biol. Chem.** 259, 6318-6326.
- von Jagow, G. y Link, T.A. (1986). Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc₁* complex. **Methods Enzymol.** 257: 9335-9344.
- Weber, P.C., Howard, A., Xuong, N.G. y Salemme, F.R. (1981). Cristalographic structure of *Rhodospirillum molischianum* ferricytochrome *c'* at 2.5 Å resolution. **J. Molec. Biol.** 153, 399-424.
- Weigl, J.W. (1953). Concerning the absorption spectrum of bacteriochlorophyll. **J. Am. Chem. Soc.** 75, 999-1000.
- Wise, D.L. (1955). Carbon sources for *Polytomella caeca*. **J. Protozool.** 2, 156-158.
- Wise, D.L. (1959). Carbon nutrition and metabolism of *Polytomella caeca*. **J. Protozool.** 6, 19-23.
- Xia, D., Yu, C-A., Kim, H., Xia, J-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. y Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome *bc₁* complex from bovine heart mitochondria. **Nature.** 277, 60-66.
- Yang, X. y Trumpower, B.L. (1986). Purification of a three subunit ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. **J. Biol. Chem.** 261, 12282-12289.
- Yun, C.H., Wang, Z.G., Crofts, A.R. y Gennis, P.B. (1992). Examination of the functional roles of 5 highly conserved residues in the cytochrome *b* subunit of the *bc₁* complex of *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Biol.Chem.** 267, 5901-5909.

Apéndice I:
La secuencia de nucleótidos de un
fragmento amplificado del gene del
citocromo *c*₁ de *Polytomella* spp.

Apéndice I:

Metodología:

Secuencia de un fragmento amplificado por PCR del citocromo c₁ de Polytomella spp.:

La obtención de un fragmento de gene del citocromo c₁ de *Polytomella* spp. ya fue reportada (Gutiérrez-Cirlos y cols, 1994 y Gutiérrez-Cirlos, tesis de maestría, 1994). A continuación se hará una breve descripción de como se obtuvo.

Se diseñaron dos oligo desoxinucleótidos degenerados los cuales se sintetizaron en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. El oligo desoxinucleótido sentido (forward) 5'-C CAT GGA TCC (G+A)AC (G+A)G(T+A)(G+A)GC GGG (G+A)GT)G+A)TC CTC GTA (C+A)TC-3' se diseñó por medio de la secuencia de aminoácidos obtenida directamente de la proteína (el extremo amino terminal AEAXDGLHPVSYP). El oligo desoxinucleótido contrasentido (backward) se diseñó tomando una secuencia consenso de la región carboxilo terminal de la proteína (E+D)YEDGTPA(S+T)V. El cebador correspondiente fue 5'-G GAG GGA TCC GA(U+C)CU(U+C) CA(U+C) CCC GU(U+C) UC(U+C) UAC CCC-3'. Se obtuvo DNA total de *Polytomella* spp. por medio de la metodología descrita por Conner y cols. (1989).

Para obtener el amplificado se hicieron los siguientes ciclos en el termociclador: 12 min. a 94°C seguido de 50 ciclos de 30 seg. a 94°C para desnaturalizar, 40 seg. a 55 °C para la unión de los cebadores al templado de DNA y dos min. de extensión a 72°C. El fragmento fue purificado por medio de extracción de un gel usando el sistema de Gene Clean. Posteriormente se ligó a un vector de expresión por medio del sistema de pCRII™ (de Invitrogen). La unión del fragmento con el vector se hizo con ligasa T4 en un amortiguador específico de la enzima. Aproximadamente, 10 ng del fragmento se ligaron a 50 ng del vector, a 16 °C toda la noche. Y con este vector se transformaron células DH5α de *Escherichia coli* que se hicieron competentes sometiéndolas a un tratamiento con rubidio. Las células tienen el genotipo F φ80d*lacZ*ΔM15Δ(*lacZYA-argF*)U169*decRecA1endA1hsdR17* (r_K⁺,m_K⁺) *supE44λ thi-1gyrA96relA1* y que fueron amablemente donadas por el Dr. Roberto Coria del Instituto de Fisiología Celular.

A cada reacción de la ligasa se le añadieron 70 μl de células competentes descongeladas en hielo. Se incubaron 20 min. en hielo y se les dio un choque térmico a 42 °C durante 3 min. Se les añadió 500 μl de medio LB (1% de bacto triptona, 1% de NaCl y 0.5% de extracto de levadura). Se dejaron crecer las células a 37 °C durante 30 min. Las células se centrifugaron en un microfuga y se resuspendieron en un poco de medio LB más 40 μl de 5% de X-Gal en dimetilformamida y 200 nM de IPTG en agua. Las células se pusieron en placas de 1.5% agar con medio LB y 60 μg/ml de ampicilina. Las células se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche.

Las colonias que crecieron de color blanco se tomaron y se volvieron a crecer en placas de LB-agar con la misma concentración de ampicilina. A continuación se purificó el plásmido de cada una de ellas para ver que tuviera el inserto, por medio de la

digestión del mismo con la enzima *EcoRI*. Las clonas que tuvieron el inserto del tamaño correcto se crecieron en 50 ml de LB con ampicilina y se sometieron al tratamiento del sistema de purificación por cromatografía de Qiagen.

A continuación, se obtuvo la secuencia del producto de PCR utilizando la reacción de Sanger (1977). En primer lugar, se usaron los oligo desoxinucleótidos universales para el plásmido, hasta aproximadamente 300 nucleótidos. Para completar la secuencia, se diseñaron otros oligo desoxinucleótidos sobre la secuencia de nucleótidos que se iba obteniendo. Se obtuvo la secuencia en los dos sentidos de transcripción. El análisis de la secuencia se hizo utilizando el programa GCG (Wisconsin) que contiene una base de datos de secuencias de genes y de proteínas para realizar comparaciones. Se hizo una comparación de la secuencia de nucleótidos para saber si el fragmento amplificado correspondía a un citocromo tipo *c₁*. Una vez identificado, se tradujo la secuencia a aminoácidos y se realizaron las comparaciones de ésta con un grupo de citocromos *c₁*.

Resultados/Discusión:

La figura A1 muestra la secuencia total de nucleótidos del fragmento amplificado del gene del citocromo *c*₁ de *Polytomella* spp. El producto que se obtuvo fue de 825 nucleótidos.

```
1  ggagggatcc gatggtcttc atcccgttcc ttacccttgg tcccacgagg
51  gcatggccag ctcccttgac cactctgcc a ttcgcctgg tcaccaggt
101  tatatttaat tttatctaaa tattgataat gtttagatgg agtttaataa
151  ggttggattg atttttttcc ttatttgctt ttgtaggtgt accagcaggt
201  ttgcgctgct tgccactcca tgaactacac coattggcgt cacgttgtcg
251  gtatttgcta cactgaggat gaggccaagg ctcttgctgc tgagactgag
301  gtgtgctaga ttttttttgg cttttattat tgagcgtctt cggaaacaagt
351  ttctcttttt aagttttaaa ttttttattt ttaatcaagt atgaatattt
401  ataactatgt catttggaaa tgttgatgc ttttcattta aacaccttaa
451  aatttgcatt tttattttat tatttctaac ttgtaggtcg tcgacggccc
501  taatgatgag ggtgagatgt ttaccgcgc cggctgtctc ttcgataagt
551  tccccaatcc tttcgccaac gaacagccg cccgtttctc taacggtggt
601  gctttccccc ctgatcttcc tttgatcacc ggtgcacgtc acgattgcca
651  gaactatggt tttgcccttc ttactggcta cagggagccc cctgccggtta
701  tcgacatccg tgagggtctc tactacaacc cttatttccc tgggtggtct
751  attgctatgc ccaagatcct cgttgatgag ggtgttgatt acgaggatgg
801  cccccccgct tccgttggat ccatgg
```

Figura A1: Secuencia total del fragmento amplificado del gene del citocromo *c*₁ de *Polytomella* spp. Se han señalado las regiones de los oligo desoxinucleótidos diseñados para seguir secuenciando el amplificado (nucleótidos subrayados).

La figura A2 muestra el análisis que se hizo con la secuencia de nucleótidos para obtener su traducción. Sólo se muestra la traducción en sentido 5'-3', en los primeros 220 nucleótidos se encontró la región de unión del hemo a la proteína. Este fragmento



Figura A2: Traducción de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por PCR del gene del citocromo *c*. Se muestran los tres marcos de lectura obtenidos en la dirección 5'→3'. En **negritas** se muestran los oligo desoxinucleótidos diseñados para amplificar el gene con la técnica de PCR. En **letras itálicas y negritas**, se muestran las secuencias de nucleótidos que marcan el inicio y el fin de los dos intrones encontrados. Todo el intrón se marcó con letras itálicas. Las LETRAS MAYÚSCULAS PEQUEÑAS muestran los oligo desoxinucleótidos diseñados para continuar la secuencia en sentido 5'→3'. Las LETRAS MAYÚSCULAS GRANDES muestran los oligo desoxinucleótidos diseñados para continuar la secuencia en sentido 3'→5'.

En estos tres marcos de lectura, se buscó el que correspondiera a toda la proteína. Los dos intrones están situados uno antes de la región de unión del hemo (CAACH) y el otro después. En la figura A3 se muestran sólo los aminoácidos que forman a la proteína sin los intrones y sólo se señalan con dos flechas los sitios en donde están los dos intrones. Los intrones son de diferente tamaño el primer intrón (99 nucleótidos) es más corto que el segundo (181 nucleótidos) pero los dos tienen las secuencias de inicio y término de intrones características de los Eucariontes (figura A4).

1 EGS DGLHPVS YPWSHEGMAS SFDHSAIRRG HQVYQ↓QVCAA CHSMNYTHWR

51 HVVGICYTED EAKALAAETE V↓VVDGPNDEG EMFTRAGRLF DKFPNPFANE

101 QAARFSNGGA FPPDLSLITG ARHDCQNYVF ALLTGYREPP AGIDIREGLY

151 YNPYFPGGAI AMPKILVDEG VDYEDGTPAS VGSM

Figura A3: Secuencia de aminoácidos del fragmento amplificado del gene del citocromo c_1 de *Polytomella* spp., sin intrones. Los aminoácidos subrayados pertenecen a la región de unión del hemo a la proteína. Las flechas muestran los sitios en donde están colocados los intrones.

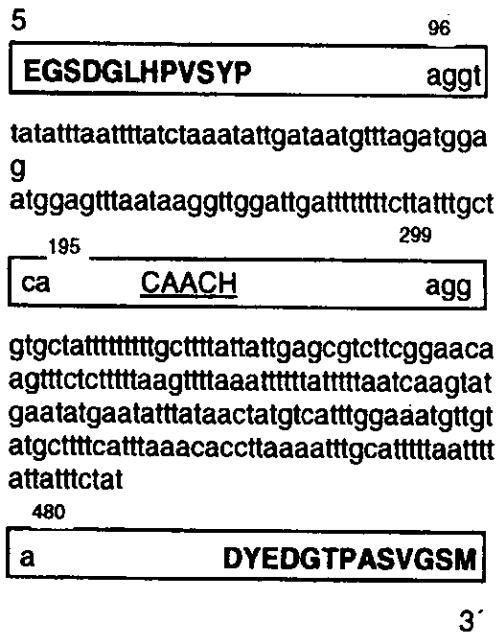


Figura A4: Análisis de los intrones del fragmento amplificado del gene del citocromo tipo c_1 de *Polytomella* spp. En las cajas se muestran los oligo desoxinucleótidos que se usaron para obtener el amplificado. En cada una de las cajas se muestran la secuencias de nucleótidos que forman el inicio y el fin de los dos intrones de este gene.

La figura A5 muestra una comparación hecha con diferentes secuencias de citocromos c_1 . Se trató de poner las secuencias más representativas para poder ver las

similitudes que tendría este fragmento. Del fragmento amplificado del gene del citocromo c_1 de *Polytomella* spp. 61 aminoácidos son totalmente idénticos en todas las secuencias comparadas. Otra característica interesante es como están separados los exones en la secuencia. Debido a que el fragmento que obtuvimos tiene intrones, decidimos compararlo con algún otro de los genes del citocromo tipo c_1 . Escogimos solamente el de humano que tiene cinco intrones que separan a la proteína en 6 exones. En la presecuencia de la proteína humana están los exones I y II, el dominio de unión del hemo a la proteína está formado por el exón III. El dominio de unión del citocromo c son los exones IV y V y el dominio de anclaje a la membrana el exón VII. Hicimos una comparación con los aminoácidos que forman cada exón en humano con los del fragmento del gene de *Polytomella* spp. y vimos que esta última puede tener al menos el exón III y el IV. En el caso de *Polytomella* spp., los exones no están separados en los mismos aminoácidos que en el humano y por tanto son un poco diferentes. En la figura A5 se muestran también los sitios de inicio de los exones de humano y de *Polytomella* spp.

Se compararon los primeros 12 aminoácidos del fragmento del gene del citocromo c_1 de *Polytomella* spp. con los de *Chlamydomonas reinhardtii*, obtenidos por la doctora Ariane Atteia (tesis doctoral, 1994). En la figura A6 se muestra la comparación entre las dos secuencias. Diez de los aminoácidos son idénticos, lo que da un 52.6% de identidad en esta región. Las secuencias de estos dos citocromos pueden ser semejantes y contribuir a aportar más datos que muestren que el género *Polytomella* es un pariente cercano y probablemente se originó del género *Chlamydomonas*. Finalmente, se hizo una comparación con la secuencia de aminoácidos de la región de unión del hemo a la proteína (figura A7). En esta figura se muestran algunos flagelados como *Euglena gracilis* y los representantes de los kinetoplástidos como *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma brucei*, etc. El citocromo c_1 de estos organismos tiene sólo una unión covalente a la proteína, por medio de un residuo de cisteína (secuencia tipo FAPCH). El segundo grupo corresponde a los organismos cuyo citocromo c_1 tiene dos uniones covalentes a dos residuos de cisteínas (secuencia tipo CXXCH). La figura muestra que aunque *Polytomella* spp. es un protozoario flagelado, la secuencia de unión del hemo a la proteína lo coloca entre los dos grupos de Eucariotos que se usaron como comparación.

BovinoSDELELH
humano MAAAAASLRG VVLGPRGAGL PGARARGLLC SARPQQLPLR TPQAVALSCK SGLSRGRKVM LSALCMLAAG GAGLAVALHS AVSASDELEH
PolytomEGSDGLH
papaMSLCK KIRIGFDGFG RINRFITRGA AORNSDKLPS RNDALKKHGLD GLCSAGSKSF RALAAGIGVY SGLLSEFATIA YSDEAPHGLE
SacharoMFSNLKRWQA QRTLSKSFYS TATGAASKSG KLTOKLVTAG VAAAGITAST LLYADSLTAE AMTAAEHGLH

100
B PPSYPWSHRG LLSSLDHTSI RRGFQVYKOV CSSCHSMDYV AYRHLVGVCY TEDEAKALAE EVE.VQDQPN EDGEMFMRRPG KLSDYFFPKPY PNPEAARAAN
b PPSYPWSHRG LLSSLDHTSI RRGFOVYKOV **CASCHSMDYV AYRHLVGVCY TEDEAKALAA** EVE.VQDQPN EDGEMFMRRPG KLFDYEFKPY PNSEARAAN
P PVSYPWSHEG MASSFDHSAI RRGHQVYKOV **CAACHSMDYV EWRHVVOICY TEDEAKALAA** ETEVVVDQPN DEGENFTRAG RLFDKFFNPF ANEQARFSN
D CPNYPWFHEG ILSSYDHASI RRGHQVYKOV CASCHSMDLI SYRDLVGVAY TEETKAMAA EIE.VVDQPN DEGENFTRPG KLSDRFPQPY ANEAARFAN
S APAYANSHNG PFETFDHASI RRGYQVYREV CAACHSMDLORV AWRTLIVGVSH TNEEVRNMAE EFVEY.DDEPD EQGNPKRRPG KLSDYIFQPY PNEQAARAAN

200
B NGALPPDLSY IVRARHGCD YVFSLLTGYC .EPPTGVSLR EGLYFNPFYP GOAIGMAPPY YNEVLEFDDG TPATMSQVAK DVCTFLRMAA EPEHDKRKM
b NGALPPDLSY IVRARHGCD YVFSLLTGYC .EPPTGVSLR EGLYFNPFYP GOAIGMAPPY YTDVLEFDDG TPATMSOIAK DVCTFLRMAA EPEHDKRKM
P GGAFPPDLSL ITGARHDCQN YVFALLTGYR .EPPAGIDIR EGLYFNPFYP GGAIAMPKIL VDEGVYEDG TPASVQSM.....
D GGAYPPDLSL ITKARHNGQN YVFALLTAYR .DPPAGVDIR EGLHYNPFYP GGAIAMPKML NDGAVEYEDG IPATEAQMGK DVVSFLLSWAA EPEMEBCKLM
S QGALPPDLSL IVRARHGCD YVFSLLTGYC DEPPAGVALP PGSNPNPFYP GGSIAMARVL FDDMVEYEDG TPATTSOMAK DVTTFLNKA EPEHDKRKL

300
B GLKMLMMGL LLPLVYAMKR HKWSVLKSRK LAYRPPK...
b GLKMLMMGL LVPLVYTIKR HKWSVLKSRK LAYRPPK...
P
D GFKWIFVLSL ALLOAAYYRR LRWSVLKSRK LVLDVNV...
S GLKTYIILSL LYLLSIWKYK FKWAGIKTRK FVENPKPKRK

Figura A5: Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto de PCR del c1 de *Polytomella* y con las secuencias de aminoácidos de otros citocromos tipo c1. La región de unión del hemo a la proteína está señalada en un cuadrado para todas las proteínas. En letras negras se ha marcado el exón III de humano, que contiene la región de unión al hemo y en letras subrayadas el exón IV que contiene uno de los sitios de unión del citocromo tipo c1. Se han señalado los mismos dos exones por semejanza de secuencias en la secuencia de *Polytomella* spp.

Apéndice II:
Artículos publicados durante la
realización de la tesis.

An Atypical Cytochrome *b* in the Colorless Alga *Polytomella* spp.: The High Potential b_H Heme Exhibits a Double Transition in the α -Peak of Its Absorption Spectrum

Emma-Berta Gutiérrez-Cirlos,* Carlos Gómez-Lojero,† Miriam Vázquez-Acevedo,*
Xochitl Pérez-Martínez,* and Diego González-Halphen*.¹

*Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, Mexico City, DF 04510, Mexico; †Departamento de Bioquímica, CINVESTAV del IPN, Mexico City, Mexico

Received October 24, 1997, and in revised form January 31, 1998

Polytomella spp. is a colorless alga of the family Chlamydomonadaceae that lacks chloroplasts and cell wall. A highly active ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (bc_1 complex), sensitive to antimycin and myxothiazol, has been purified and characterized from this alga (Gutiérrez-Cirlos *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 9147-9154). Both in mitochondrial membranes and in the isolated complex, the visible spectrum of cytochrome *b* from *Polytomella* spp. exhibits an atypical α -band with a maximum at 567 nm. This maximum is shifted 3-4 nm to the red when compared with *b*-type cytochromes from other organisms. Analysis of the *b* hemes of the bc_1 complex by high performance liquid chromatography revealed no differences in the retention time and in the absorption spectra of the *b*-type hemes from *Polytomella* spp. and hemin, indicating that the prosthetic group in this alga is protoheme and thus ruling out the possibility that the red-shift could be due to different chemical substitutions in the porphyrin rings of the b_L or b_H hemes. The two *b* hemes were characterized by electrochemical redox titration; at pH 7.8-8.0, the midpoint potential for b_L was -143 mV and for b_H +25 mV. The spectra of the two *b*-type hemes were recorded in the presence of different reductants, at selected electrochemical potentials, and in the presence of antimycin A, to distinguish between the contribution of b_L and b_H to the visible spectrum. Both hemes b_L and b_H of the algal cytochrome *b* contribute to the observed bathochromic absorption maximum in the α -band of the spectrum. The data also show that the low potential b_L heme from *Polytomella* spp. is spectroscopically similar to that of other organisms, with two transitions in

the α -peak at 558.7 and 568.4 nm. The high-potential heme b_H also exhibits a spectrum with two transitions at 557.2 and 568.9 nm, which surprisingly differs from the spectra of cytochrome b_H of mammals, plants, yeasts, and bacteria, which all exhibit a single transition centered around 560 nm. © 1998 Academic Press

Key Words: *Polytomella*; *Chlamydomonas*; mitochondria; bc_1 complex; cytochrome *b*; Chlorophyceae.

Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase, or bc_1 complex (EC 1.10.2.2), is an oligomeric membrane enzyme with three redox polypeptides, namely a bihemic cytochrome *b*, a cytochrome c_1 , and a Rieske-type iron-sulfur protein. It also contains a variable set of subunits which do not bind prosthetic groups (1). The ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity occurs through a Q-cycle mechanism (2-4) that involves two redox catalytic units. One unit is formed by the Q_n site, the low potential heme (b_L), and the Rieske iron sulfur protein; the other unit is composed of the Q_i site and the high potential heme (b_H) (5). Cytochrome *b* is the most hydrophobic protein of the bc_1 complex (6, 7). Based on sequencing data, inhibitor sensitivities, mutagenesis, and topological studies, models for the disposition of eight putative transmembrane α -helices (A to H) of cytochrome *b* have been proposed (8, 9). Four conserved histidines, two in helix B and two in helix D, at positions 82, 96, 183, and 197 (bovine numbering) coordinate the b_H and b_L hemes (10-12). X-ray data of the bovine bc_1 complex have confirmed the eight-helices structure of cytochrome *b* and shown that the two b hemes are 21 Å apart from each other (13, 14).

All known mitochondrial cytochromes *b* exhibit an α -peak close to 560 nm when fully reduced with dithio-

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 622-5611 or (525) 548-0387. E-mail: dhalphen@ifsun1.fisiol.unam.mx.

nite (8). Electrochemical and high resolution spectral analysis of the mouse bc_1 complex indicated that the b_H heme is characterized by a single α -band peak, while the b_L heme exhibited an overlapped, double α -band absorption peak (5).

A highly active, antimycin A-sensitive, ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (bc_1 complex) has been previously purified from *Polytomella* spp., a colorless alga closely related to the photosynthetic *Chlamydomonas* lineage (15). The cytochrome b from *Polytomella* spp., both in mitochondrial membranes and in the purified bc_1 complex, shows a maximum in the α -band shifted toward the red, at 567 nm. In this work the b -type hemes from the algal bc_1 complex were characterized spectroscopically, electrochemically, and by HPLC analysis. Our results indicate that the b_L and b_H hemes of cytochrome b from *Polytomella* spp. are protohemes, that both contribute to the observed red-shifted α -band, and that the high potential heme b_H of this colorless alga has a split α -band different from the one obtained with mammalian, plant, yeast, or bacterial bc_1 complexes.

MATERIALS AND METHODS

Strains. The colorless alga *Polytomella* spp. (198.80, E.G. Pringsheim), originally obtained from the algae collection at the University of Göttingen (Germany), was maintained at the Microbiological Collection of the Department of Biotechnology (CINVESTAV del IPN, Mexico) under the register number CDBB-951. The algae were grown and harvested as previously described (15).

Purification of bc_1 complexes and activity measurements. The bc_1 complex from *Polytomella* spp. was purified as described by Gutiérrez-Cirlos *et al.* (15). Beef heart mitochondrial bc_1 complex was prepared as described by Ljungdahl *et al.* (16). All complexes were kept at -70°C until used. Cytochrome b , cytochrome c_1 , and horse heart cytochrome c were quantified spectrophotometrically (6). Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase activity was measured as described previously (17). Protein concentrations were determined according to Lowry *et al.* (18) with the modifications of Markwell *et al.* (19).

High performance liquid chromatography (HPLC).² Runs were performed using two Beckman pumps and an automated gradient controller. Prior to HPLC, samples were centrifuged in an Eppendorf table-top centrifuge and the insoluble material discarded. Proteins were loaded on a μ -Bondapak C-4 column (250 \times 4.6 mm) with a Rheodyne injector and a 500- μ l loop, and eluted at a constant flow rate of 1.5 ml/min. Two buffer systems were prepared: buffer A contained 0.1% TFA in water, while buffer B contained 0.1% TFA in a 2:1 acetonitrile:isopropanol mixture. The column was equilibrated in the presence of 65% buffer A and 35% buffer B, and the samples were eluted with the following profile: an initial wash with 65% buffer A and 35% buffer B (4 min), an upward linear gradient to 35% buffer A and 65% buffer B (40 min) followed by a second upward linear gradient to 100% buffer B (6 min), a downward linear gradient to 65% buffer A and 35% buffer B (7 min), and a final wash with 65% buffer A and 35% buffer B (2 min). Spectra were recorded from 250 to 700 nm at 4-s intervals with a Waters 966 photodiode array detector. Data were processed in a 486 PC (NEC Power Mate 433) with the chromatographic software Millennium 2010.

Difference spectra of the bc_1 complex. Spectra were recorded using a bc_1 complex concentration of 2.0–5.0 μM of cytochrome b . Spectra taken in the presence of inhibitor were carried out as follows: the baseline was made by reducing bc_1 complex with dithionite in both reference and sample cuvetts; then, 0.6 μM antimycin A was added to the sample cuvet. Other difference spectra were made using a few grains of dithionite, or 20 mM of ascorbate, pH 7.0, or 55 μM DBH added from an ethanolic stock solution. Deconvolution of the difference spectra was carried out with the Microcal Origin program, version 3.73 (Microcal Software, Inc.). Spectra were obtained with a DW-2a UV/Vis SLM-Aminco spectrophotometer modified with the OLIS DW2 Conversion and OLIS software (On-line Instrument System Inc.). Bilateral curved slits with a spectral bandpass of 3 nm were used and a scanning speed of 5.0 nm/s. The medium response of the photomultiplier was of 185 ms. Wavelength calibration was made with a holmium oxide standard.

Redox titrations. The bc_1 complex was present in a concentration range from 2.0 to 4.0 μM (based on cytochrome c_1 concentration). Redox mediators and buffer conditions were as described by Howell and Robertson (5). Electrochemical titrations were carried out in a buffer containing 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 30 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mg/ml of lauryl maltoside, and 10% glycerol in the presence of the following mixture of redox mediator dyes: 15 μM 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 75 μM duroquinone, 50 μM 2,3,5,6-tetra-methyl-*p*-phenylenediamine, 40 μM 1,2-naphthoquinone, 25 μM *N*-methylidibenzopyrazine methosulfate, 40 μM 1,4-benzoquinone, and 40 μM 1,4-naphthoquinone, and an anaerobic atmosphere was maintained under a stream of argon. These mediators were added from stock solutions made in dimethyl sulfoxide. The titration was started by adding 0.5 mM ascorbate, followed by increasing concentrations up to 4.5 mM, and then fresh dithionite solution in increasing concentrations. At each E_h value, absorbance data were acquired between 500 and 600 nm and analyzed using the software package developed by OLIS. After each addition of reducing agent, a 10-min incubation time was allowed for electrochemical equilibration. Titrations were carried out in both the reductive and the oxidative directions. Samples were placed in a bottom-stirred redox cuvet and redox potentials were measured with a Radiometer Model P101 platinum electrode and a Ag/AgCl reference electrode. The electrodes were standardized with commercial horse heart cytochrome c (Sigma), considering an E_m of +220 mV. The ratios of absorbance units of the cytochromes were plotted against redox potential, and best-fitting Nernstian curves were drawn through the resulting points.

RESULTS

Spectral characterization of the *Polytomella* spp. bc_1 complex. The reduced minus oxidized difference spectra of the bc_1 complex of *Polytomella* spp., both in mitochondrial membranes (Fig. 1A) or in its purified form (15), exhibited absorption maxima in their α -peaks at 553 nm for cytochrome c_1 and at 567 nm for cytochrome b . This gave rise to a double peak spectrum in the α -band region of the bc_1 complex, where the absorption maximum of cytochrome c_1 is completely resolved from that of cytochrome b at room temperature, a spectroscopic feature not seen in bc_1 complexes from other organisms, where the absorption spectra of cytochrome c_1 appears as a shoulder of the cytochrome b spectrum. The atypical spectrum of the dithionite-reduced bc_1 complex frozen with liquid nitrogen in a Dewar flask, and in contact with a cold finger with liquid nitrogen, is shown in Fig. 1B. This spectrum exhibits α -bands with absorption maxima at 553 nm for cytochrome c_1 and at 566 nm for cytochrome b .

² Abbreviations used: DBH, 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzoquinone; HPLC, high performance liquid chromatography; TFA, trifluoroacetic acid.

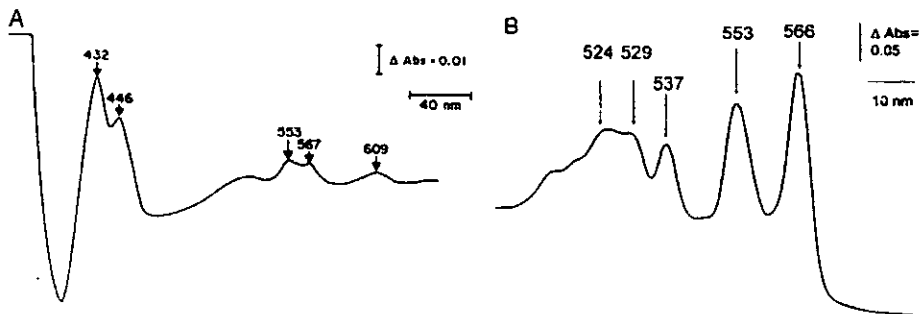


FIG. 1. Visible spectra of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. and *C. reinhardtii*. (A) Difference spectrum of *Polytomella* mitochondrial fraction (reduced with dithionite minus oxidized). The absorption peaks shown are all of cytochromes: 432 and 446 nm gamma peaks of cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase, respectively; 553 nm, α -peak of cytochrome c_1 ; 567 nm β -peak of cytochrome *b* and 609 nm α -peak of cytochrome *c* oxidase. (B) Difference spectrum of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. (reduced with dithionite minus oxidized) frozen in liquid nitrogen.

Thus, the *b*-type hemes from *Polytomella* spp. uniquely exhibit a red-shift of 3–4 nm in the α -band, with respect to other bc_1 complexes.

Characterization of the hemes from the bc_1 complex of *Polytomella* spp. The possibility that the *b*-type hemes from *Polytomella* spp. could be structurally different from the ones found in the bc_1 complexes of other organisms was explored. The bc_1 complex from the alga was denatured by urea and subjected to HPLC in a C_4 column; the resulting fractions were identified by comparing their retention times and spectra with those obtained from purified components. The reverse-phase HPLC profile of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. exhibited three peaks absorbing at 400 nm (Fig. 2A). Peak 1, with a retention time of 18.2 min (Fig. 2A), had a maximum absorption peak at 398 nm, and two secondary broad peaks at 499 and 623 nm, but no defined peak at 280 nm (Fig. 3A). This peak exhibited the same retention time of hemin (chloroproporphyrin IX iron (III), Aldrich Chemical Co.) (Fig. 2B). The spectrum of pure hemin showed maxima at 398, 499, and 623 nm (data not shown), identical to those of the *b*-type heme fraction shown in Fig. 3A. When a mixture of *Polytomella* spp. bc_1 complex with pure hemin was loaded on the HPLC column, a single peak with a retention time of 18.2 min was obtained (Fig. 2C). The HPLC profiles confirmed the comigration of peak 1 with hemin and allowed its unambiguous identification as a *b*-type heme. Peak 2 (retention time of 33.1 min) (Fig. 2A), was assigned to the covalently bound heme c_1 , on the basis of its spectra, which exhibits an absorption maximum at 278 with three additional absorbance peaks at 398, 459, and 622 nm (Fig. 3B). When horse heart cytochrome *c* was applied to the column and run under the same HPLC conditions, it exhibited a peak with a retention time of 12 min, and its visible spectrum was identical to the one obtained for cytochrome c_1 (data

not shown). Differences were observed in the absorbance ratios A_{400}/A_{275} , which had a value of 8.4 for horse heart cytochrome *c* and 1.9 for cytochrome c_1 . These values are in agreement with the molecular mass of the polypeptides covalently bound to the *c*-type hemes. Peak 3, a minor signal with a retention time of 38.3 min (Fig. 2A) had an absorption maximum at 407 nm with an α -peak at 547 nm. This component exhibited the same retention time as hemes of purified bovine cytochrome *c* oxidase (Fig. 3C). Due to its longer retention time, this last peak was identified as heme *a* of *Polytomella* spp., and attributed to the residual presence of cytochrome *c* oxidase aa_3 in some bc_1 complex preparations. The results of HPLC analysis thus confirm that cytochrome *b* of *Polytomella* spp. bears protohemes identical to those of other bc_1 complexes. Therefore, the observed red-shift in the dithionite-reduced spectrum of *Polytomella* spp. bc_1 complex could not be attributed to the presence of different chemical substituents in the tetrapyrrole rings of the *b*-type hemes.

Difference spectra of the two *b*-type hemes from *Polytomella* spp. The reduced minus oxidized difference spectra of the *Polytomella* spp. *b* hemes were compared to the corresponding spectra of the bovine enzyme. The optical absorption bands of both *b*-type hemes (b_H plus b_L) from *Polytomella* spp. were observed in the dithionite-reduced minus ascorbate-reduced spectrum (Fig. 4A). This spectrum shows a maximum at 568.8 nm and a broad shoulder at 558.8 nm with an $A_{568.8}/A_{558.8}$ ratio of 2.0, the highest absorbance ratio so far obtained for a cytochrome *b*. In contrast, the same differential spectrum obtained for the beef-heart bc_1 complex exhibited a maximum at 565 nm, with an A_{565}/A_{558} ratio of only 1.4 (Fig. 4B). The fourth derivative analysis of the dithionite minus ascorbate differential absorption spectrum of *Polytomella* spp. exhibited four compo-

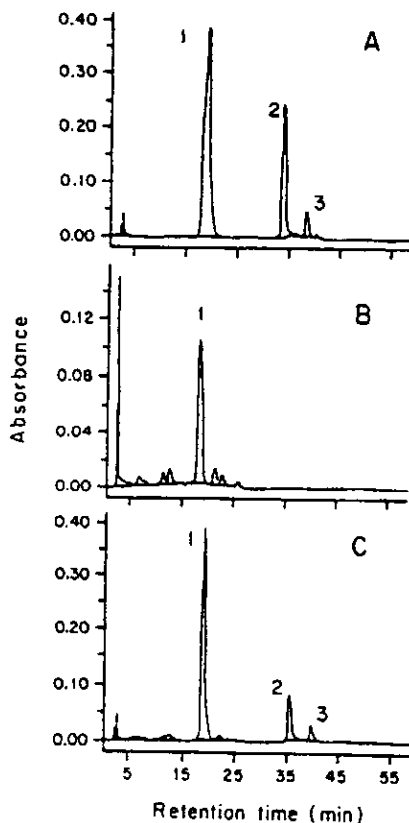


FIG. 2. High performance liquid chromatography of the urea-denatured bc_1 complex from *Polytomella* spp. (A) HPLC profile obtained for the bc_1 complex preparation of *Polytomella* spp. The peaks recorded at 400 nm are numbered for heme b (1), cytochrome c_1 (2), and heme a (3). (B) HPLC profile of commercial hemin run under the same conditions. (C) HPLC of a mixture of the urea-denatured bc_1 complex from *Polytomella* spp. and the commercial hemin.

nents: the first two, at 531 and 539 nm, are characteristic of the β -band of b -type cytochromes, and the last two, at 558 and 568 nm, were ascribed to the α -band. There was no peak at 553 nm which could have indicated a possible contribution of cytochrome c_1 to the absorption (or distortion) of the b -type cytochromes spectra (data not shown). The difference spectrum (reduced with dithionite minus reduced with DBH) of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. showed two defined peaks at 568.8 and 558.8 nm; these two transitions were assigned mainly to the b_1 heme (Fig. 4C). In contrast, the same difference spectrum obtained with the bovine bc_1 complex exhibited a maximum at 565 nm with a broad shoulder at 558 nm (Fig. 4D). The

difference spectrum (reduced with DBH minus reduced with ascorbate), representing the b_H heme of *Polytomella* spp. (Fig. 4E), shows a split α -band with a small band at 559 nm and a dominant band at 569 nm. The spectrum of the b_H heme from this alga clearly differs

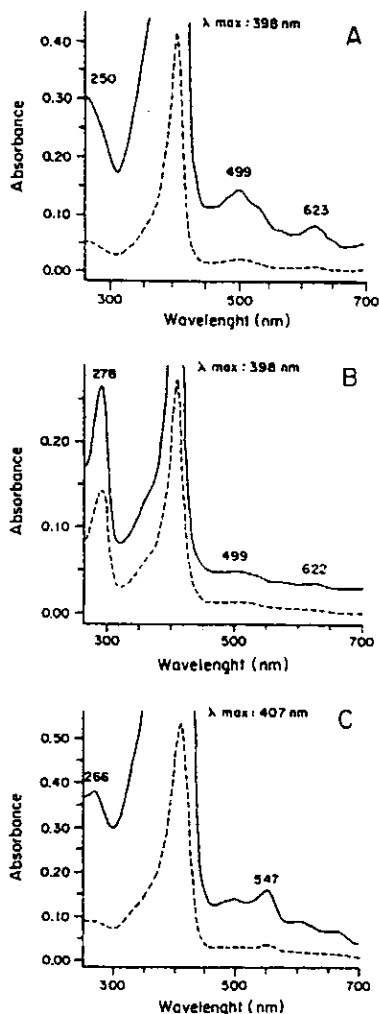


FIG. 3. Absorption spectra of the HPLC fractions. Dashed lines show the absorption spectra obtained. Solid lines show amplifications of the same spectra, showing the minor peak components. (A) Absorption spectra of peak 1 from HPLC, identified as heme b . (B) Absorption spectra of peak 2 from HPLC, identified as cytochrome c_1 . (C) Absorption spectra of heme a of bovine cytochrome c oxidase, obtained under the same HPLC running conditions.

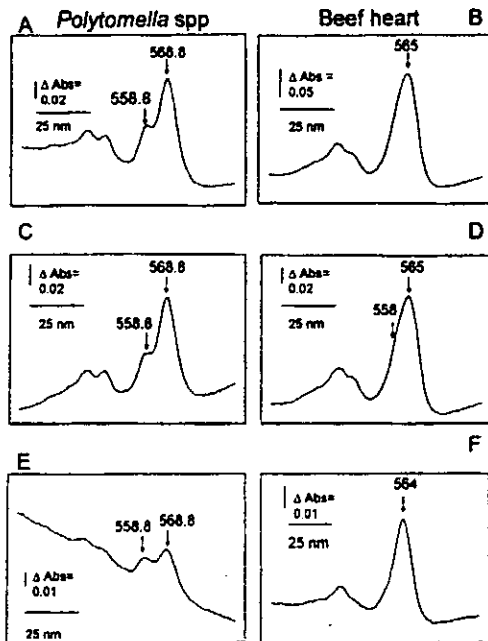


FIG. 4. Comparison of difference spectra obtained with different reductants for the bc_1 complexes from *Polytomella* spp. and from beef heart. (A) Dithionite-ascorbate difference spectrum of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. (hemes $b_L + b_H$). (B) Dithionite-ascorbate difference spectrum of the beef heart bc_1 complex (hemes $b_L + b_H$). (C) Dithionite minus DBH difference spectrum of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. (mainly heme b_L). (D) Dithionite minus DBH difference spectrum of the beef heart bc_1 complex (mainly heme b_L). (E) DBH minus ascorbate difference spectrum of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. (heme b_L). (F) DBH minus ascorbate difference spectrum of the beef heart bc_1 complex (heme b_H).

from that of the beef heart bc_1 complex, which exhibits an almost symmetric band with a maximum at 564 nm (Fig. 4F). This set of spectra clearly shows that the b -type cytochrome from *Polytomella* spp. differ from those of the beef-heart bc_1 complex, namely for the 3- to 4-nm red-shift and for the split α -band of heme b_H .

Midpoint potentials of the b -type hemes of the bc_1 complex from *Polytomella* spp. and spectra taken at selected redox potentials. The electrochemical titration of the cytochrome b hemes in the bc_1 complex from *Polytomella* spp. is shown in Fig. 5. The data indicated the presence of three species of b -type hemes. The two major components, representing 39 and 34% of the population, corresponded to the b_L and b_H hemes, respectively. At pH 7.8 (final measurement after titration), the midpoint potentials of b_L was -143 mV and of b_H $+25$ mV. A third fraction, which represented 27% of the population, exhibited a very high mid-point po-

tential of $+146$ mV. This component was identified as the b_{150} species observed by other investigators (5, 20, 21), and that probably comprises the fraction of b_H -hemes with a quinone bound at the Q_c center (21). An electrochemical titration of the beef-heart bc_1 complex was carried out in a parallel experiment at pH 6.8 (final measurement after titration), yielding midpoint potentials of -115 mV for b_L and $+75$ mV for b_H . Noteworthy, the b_{150} species was not detected in this set of experiments.

The spectra of the b_H and b_L hemes were then recorded at selected redox potentials, where the absorption contribution of other component was negligible. The spectra of the individual hemes, optimized for maximal resolution at appropriate redox potentials are shown in Fig. 6. Since redox potentials were chosen to avoid spectral overlap, the intensities of the illustrated spectra do not represent the actual concentrations of the individual components. Heme b_L from *Polytomella* spp. shows a split α -band with a maximum at 568.4 nm and a shoulder at 558.7 nm, and heme b_H also exhibits a dual α -band with maxima at 568.9 and 557.2 nm. However, the ratio 568/558 was found to significantly differ between these two hemes. Heme b_{150} also shows dual α -bands with maxima at 558.8 and 568.8 nm.

The deconvoluted reduced minus oxidized spectra of the two cytochrome b hemes are shown in Fig. 7. The optical spectra were fitted with Lorentzian functions; the reported values are the means of five different measurements. For the α -peak of the b_L heme two Lorentzian components were obtained with maxima at

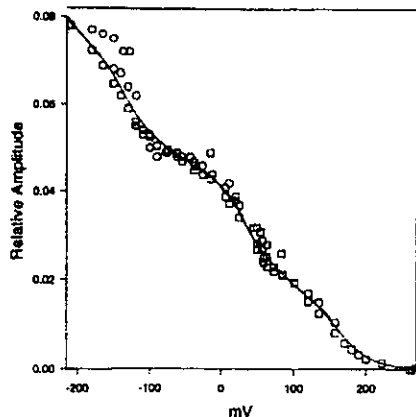


FIG. 5. Electrochemical titration of the cytochrome b hemes of the bc_1 complex of *Polytomella* spp. Data points obtained during titration in the reductive direction (\square) data points obtained during titration in the oxidative direction (\circ). The curve was fitted for considering one-electron acceptors. Three components with midpoint potentials of -143 , $+25$, and $+146$ mV were identified, comprising 39, 34, and 27% of the total cytochrome b .

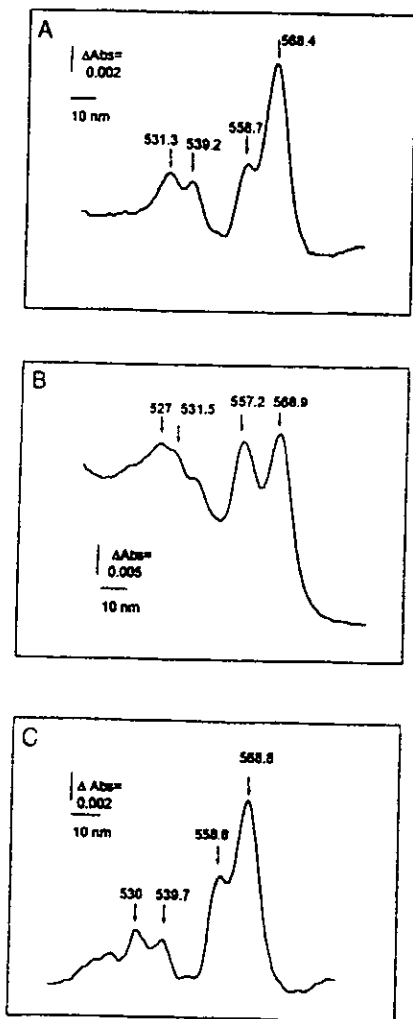


FIG. 6. Difference spectra of the three species of b hemes identified by electrochemical titration. The difference spectra were recorded at pH 7.0 and at the following redox potential spans: $-367/-75$ mV for heme b_L (A), $-38/+54$ mV for heme b_H (B), and $+101/+157$ mV for b_{150} (C).

558.7 and 568.4, with relative peak areas of 0.15 and 0.85, respectively. The full-width at half-height (FWHH) of the peaks were 5.96 and 7.82 nm, respectively. Thus, in the b_L heme the lower energy transition is more intense than the higher energy transition. Relative peak areas were about 1:5.5, which contrast with the data obtained for the b_L heme from mouse,

with relative peak areas of 4:1 (5). Two Lorentzian functions could also be fitted in the α -peak from the b_H heme, exhibiting maxima at 557.2 and 568.9 nm with relative peak areas of 0.33 and 0.67, respectively. The FWHH of the peaks were 6.63 and 7.80 nm, respectively. Thus, two spectral components of the b_H heme from *Polytomella* spp. were clearly defined, with relative peak areas of about 1:2, which strongly contrasts with the single transition for the b_H heme in mammalian preparations (5).

The spectral features described above conform to those obtained in the presence of reductants (Fig. 4), which indicates that the b_L and b_H hemes from *Polytomella* spp. exhibit different midpoint potentials, but share similar spectroscopic properties, with two transitions in their α -bands.

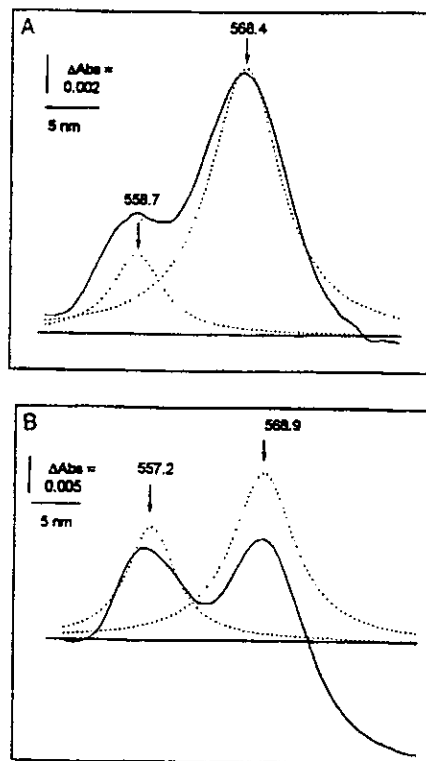


FIG. 7. Difference spectra of the *Polytomella* spp. b_L (A) and b_H (B) hemes. The difference spectra were recorded at pH 7.0 and at the following redox potential spans: $-367/-75$ mV for heme b_L and $-38/+54$ mV for heme b_H . The solid lines represent the original spectra, and the dotted lines the Lorentzian components obtained after base line correction and deconvolution.

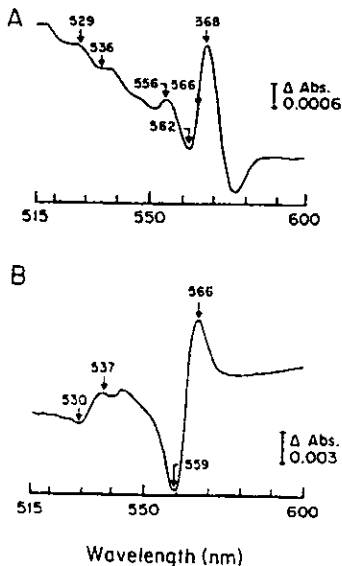


FIG. 8. Comparison between the red-shift caused by antimycin A in the spectra of the *Polytomella* spp. *bc*₁ complex (A) and the beef *bc*₁ complex (B). Difference spectra were recorded for the two purified *bc*₁ complexes (dithionite reduced in the presence of antimycin A minus dithionite reduced). The principal peaks and valleys obtained in the difference spectra for the two complexes are indicated.

A The red-shift induced by antimycin A. Antimycin A is a potent inhibitor of the ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity of the *bc*₁ complexes (22), including the one from *Polytomella* spp. (15). This inhibitor has been shown to affect the spectroscopic properties of heme *b*_H from different organisms (5, 23, 24). The effect of this inhibitor on the spectroscopic features of the *b*-type hemes from *Polytomella* spp. was therefore investigated. Fig. 8 compares the red-shift induced by antimycin A on *Polytomella* spp. and beef heart *bc*₁ complexes. The *Polytomella* spp. *bc*₁ complex difference spectrum (dithionite-reduced in the presence of antimycin A minus dithionite-reduced) exhibited a red-shift, with a maximum at 568 nm and a smaller transition at 556 nm. In contrast, the difference spectrum of the bovine *bc*₁ complex exhibited a single transition with a maximum at 566 nm, consistent with the previously described red-shifts (23, 24). It could thus be concluded that while antimycin A induces a red-shift on the single α -band transition of the *b*_H absorption spectrum of the bovine enzyme, the effect of this inhibitor is evident on the two α -band transitions of the *b*_H heme from *Polytomella* spp. in accordance with the presence of well-defined split α -band of this heme moiety.

DISCUSSION

The mitochondrial cytochrome *b* from *Polytomella* spp. exhibits a red-shifted α -band. When the difference spectrum of the reduced minus oxidized mitochondrial fraction from *Polytomella* spp. was recorded, two clearly resolved α -band peaks, with maxima at 553 and 567 nm, corresponding to cytochromes *c*₁ and *b*, respectively, were observed. These two absorption maxima were also observed in the spectrum of the purified, fully reduced *bc*₁ complex from *Polytomella* spp., with maxima at 553 and 567 nm at room temperature (15). A similar two-peak spectrum of the *bc*₁ complex was previously described in mitochondria of *Polytomella caeca* (25), with maxima at 549 nm for cytochrome *c*₁ and at 562 nm for cytochrome *b* at liquid nitrogen temperature. The corresponding spectra of other *bc*₁ complexes show overlapping bands, in which the absorption band of cytochrome *c*₁ appears as a shoulder at 553 nm of the dominant band at 563 nm of the *b* cytochrome (5, 26, 27). Cytochrome *c*₁ from *Polytomella* spp. shows a maximum in the α -band at 553 nm and contains the classical heme-binding consensus sequence CXXCH (15); therefore, cytochrome *c*₁ is similar to the corresponding cytochromes in bacteria, animals, higher plants, and fungi. In contrast, the red-shifted α -band maximum of cytochrome *b* from *Polytomella* spp. differs from the one found in all other organisms.

The cytochrome *b* of the *bc*₁ complex of *Polytomella* spp. contains protohemes as prosthetic groups. Structural homologs of *b*-type cytochromes with classical cytochrome *b* functions that bind *a*-type hemes have been identified in archaeobacteria (28). The possibility that the atypical absorption spectrum of *Polytomella* spp. *b*-type cytochrome was due to differences in the prosthetic group has been ruled out by HPLC analysis. Therefore, the unique spectroscopic properties of the cytochrome *b* from *Polytomella* spp. must be due to the amino acid environment that surrounds the heme moieties.

The *b*_H heme from *Polytomella* spp. exhibits two spectroscopic transitions in the α -band. With specific reductants the individual spectra of the *b*-type hemes of the purified *bc*₁ complex from *Polytomella* spp., showed that the *b*_L heme is spectroscopically similar to those of the corresponding cytochrome from animals, plants, yeast, or bacteria, exhibiting two transitions in the α -region. Nevertheless, the low-energy contribution is much more important in *Polytomella* spp. than in the murine enzyme (5). However, it is the *b*_H heme that exhibits the most striking spectral properties. The high resolution spectral analysis of the *b*_L and *b*_H hemes from the *bc*₁ complex from mouse (5) showed that heme *b*_L exhibits a split α -band with maxima at 558.1 and 565.2 nm, while heme *b*_H has a single band with maximum at 561.6 nm. Similar results were obtained in the spectroscopic characterization of the *b*_L (*b*₅₆₆) and the

b_H (b_{560}) hemes from potato tuber mitochondria (27). In addition, the difference spectra reported for the b -type hemes of the bc_1 complex from bacteria, also show a b_L heme with a split α -band, while the b_H heme moiety exhibits a single transition (16, 26, 29). The optical properties of the bc_1 complexes from diverse species have been reported, and generally they show consistent features for the split α -band of the b_L heme; the limited variation of the b_L spectra has been related to the more conserved protein environment predicted to surround this heme within the cytochrome b structure (30). However, the spectral differences of *Polytomella* spp. appear to be unique, particularly because in no other species a split and red-shifted high potential b_H heme has ever been observed.

The redox titration of both b -type hemes from *Polytomella* spp., yielded values of +25 mV for heme b_H and of -143 mV for heme b_L , giving a redox span of 168 mV. This span is higher than 123 mV obtained by Howell and Robertson (5) for mouse bc_1 complex, i.e., E_h of -31 mV for the heme b_L and E_h of +92 mV for heme b_H , and for the redox span of 128 mV in potato bc_1 complex, with E_h of -77 mV for the heme b_L and E_h of +51 mV for heme b_H (27). These values indicate that redox spans between 120 and 168 mV are compatible with the presence of fully active bc_1 complexes with turnover rates of 300 s⁻¹ or more. Further analysis of the residues that surround the hemes remains to be done, to understand how the protein environment modulates the midpoint potentials of these prosthetic groups.

The electrochemical titration also revealed the presence of a third b -type component, identified as b_{150} , a fraction of b_H hemes with bound quinone at the Q_i center (21). Surprisingly, the concentration of b_{150} was relatively high, considering that titrations were carried out at pH 7.8, a condition that apparently does not favor its formation (5, 21). In contrast, the b_{150} species was not observed in titrations carried out with the beef-heart enzyme in the same conditions. In addition, a relatively high concentration of lauryl maltoside (2 mg/mg of protein) was required to solubilize the bc_1 complex from *Polytomella* spp. mitochondria (15). This high number of detergent micelles should not favor the binding of the quinone to the Q_i center; an association that appears to be particularly strong in the bc_1 complex from this alga.

The spectra obtained at different redox spans confirmed that the b_H and b_L hemes from *Polytomella* spp. exhibit split α -bands with peaks close to 558 and 568 nm. Small differences were found when comparing the α -peak maxima obtained at the midpoint potentials with those obtained with single reductants. The most striking result obtained in this study is that the b_H heme shows an α -band splitting at room temperature. The deconvolution analysis demonstrated the presence of an important component at 557.2 nm, that contrib-

utes with 33% of the total absorption band of the α -peaks of this heme, and that indicates a strong decrease in the x - y degeneracy of the tetrapyrrole ring.

The effect of antimycin on the absorption spectra of the b-type cytochromes from Polytomella spp. The specific bc_1 complex inhibitors, myxothiazol and antimycin, are known to cause distortions in the absorbance spectra of the bc_1 complex. Myxothiazol binds in the vicinity of the heme b_L center, while antimycin A binds in the vicinity of the b_H center (5, 31).

Antimycin A caused a red-shift on the bc_1 complex spectrum from *Polytomella* spp. Two transitions at 556 and 568 nm were observed. This inhibitor also caused a red-shift on the gamma peak of the cytochrome (data not shown). When compared with the beef bc_1 complex, the shift in *Polytomella* spp. was 2 nm more toward the red, and it exhibited the two transitions not seen in the beef bc_1 complex. Although long-range effects on the b_L heme have been described (5, 21), antimycin A exerts its main effect on the heme b_H moiety of cytochrome b . We conclude that the red-shift induced by antimycin A on the b_H heme is consistent with the presence of two spectroscopic transitions in this prosthetic group.

From the data discussed above, we conclude that heme b_H from *Polytomella* spp. is different from the corresponding one from mammals, plants, and bacteria and that this difference makes an important contribution, along with heme b_L , to the observed red-shift of cytochrome b . Link *et al.* (32), have modeled a three-dimensional structure of cytochrome b . Differences were obtained in the distribution of aromatic residues in the vicinity of the hemes: two phenylalanines and one tyrosine were found to be perpendicular to the b_L porphyrin ring, which allows attractive electrostatic interactions. In contrast, the b_H heme is surrounded by three tryptophan residues that form a densely packed hydrophobic environment. The data obtained from the crystal structure of cytochrome b from beef heart mitochondria (14) allows us to pinpoint specific residues that surround the tetrapyrrole rings and that may contribute to the spectroscopic properties of the hemes. The b_H site is relatively loosely surrounded by a section of random coil before the beginning of helix A, helix A, helix B, the BC loop, helix C, helix D, and a portion of the DE loop. When comparing differences in the primary structures of these regions of the bovine enzyme (33), with the one of *C. reinhardtii* (34) a close relative of *Polytomella* spp. (35), the following differences were found (numbered is in accordance with the bovine sequence, followed by the substitution in *C. reinhardtii* in parenthesis): W₃₀ (S) and F₃₃ (G) in the random coil before helix A; L₃₇ (A) in helix A; C₉₃ (V) in helix B; Y₁₀₇ (G) and F₁₀₉ (R) in the BC loop, T₁₁₂ (V) in helix C; A₁₉₃ (S) and F₁₉₉ (A) in helix D; and E₂₀₂ (Q), T₂₀₃ (Y), and T₂₀₉ (L) in the DE loop. In contrast, the b_L heme pocket is tightly surrounded by helix A, the AB loop, helix B,

helix C, two portions of the CD loop, and helix D (14). When the same analysis was performed, minor but significant differences between the beef-heart and *C. reinhardtii* structures were found: W₇₇ (M) in the AB loop; K₁₇₂ (N) in the CD loop; and F₁₈₉ (Y) in helix D. Based on these structural features, we propose that in the case of the *b*_L heme from *Polytomella* spp., a set of residues surrounding this prosthetic group alters the α - γ degeneracy of the porphyrin ring and that these changes in protein conformation affect the structural anisotropy of the electronic environment around this heme, giving rise to a split and red-shifted α -band. Differences in residues that surround heme *b*_L may also contribute to the presence of a red-shifted α -maximum in its absorption spectrum.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr. Jovita Martínez from the Department of Biotechnology, CINVESTAV del IPN, who maintains the *Polytomella* spp. strain in her culture collection. The authors acknowledge Drs. A. Atteia, M. Degli Esposti, A. Gómez-Puyou, and D.W. Krogmann, for helpful discussions and critical review of the manuscript. This work was supported by Grant 2260P-N from CONACYT, Mexico, and by Grant IN-204595 from DGAPA, UNAM.

REFERENCES

1. Trumpower, B. L. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 101-129.
2. Mitchell, P. (1976) *J. Theor. Biol.* **62**, 327-367.
3. Bowyer, J. R., and Trumpower, B. L. (1981) in *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes* (Skulachev, V. P., and Hinkel, P. C., Eds.), pp. 105-122, Addison Wesley, Reading, MA.
4. Crofts, A. R. (1985) in *The Enzymes of Biological Membranes*, (Martonosi, A. N., Ed.), Vol. 4, pp. 347-382, Plenum, New York.
5. Howell, N., and Robertson, D. E. (1993) *Biochemistry* **32**, 11162-11172.
6. Gonzalez-Halphen, D., Lindorfer, M. A., and Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* **27**, 7021-7031.
7. Akiba, T., Toyoshima, C., Matsunaga, T., Kawamoto, M., Kubota, T., Fukuyama, K., Namba, K., and Matsubara, H. (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 553-561.
8. Degli Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., and Meyer, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 243-271.
9. Brasseur, G., Saribas, A. S., and Daldal, F. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 61-69.
10. Saraste, M. (1984) *FEBS Lett.* **166**, 367-372.
11. Widger, W. R., Cramer, W. A., Hermann, R. G., and Trebat, A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 674-678.
12. Crofts, A. R., Robinson, H. H., Andrews, K., Van Doren, S., and Berry, E. (1987) in *Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics* (Papa S., Chance B., and Ernster L., Eds.), pp. 617-624, Plenum, New York.
13. Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., and Deisenhofer, J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 47-53.
14. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) *Science* **277**, 60-66.
15. Gutiérrez-Cirlos, E. B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R., and González-Halphen, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9147-9154.
16. Ljungdahl, P. O., Pennoyer, J. D., Robertson, D. E., and Trumpower, B. L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **891**, 227-241.
17. Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N., and González-Halphen, D. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 401-410.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **183**, 265-275.
19. Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.
20. Dutton, P. L., Wilson, D. F., and Lee, C. P. (1970) *Biochemistry* **9**, 5077-5082.
21. Rich, P. R., Jeal, A. E., Madgwick, S. A., and Moody, A. J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 29-40.
22. von Jagow, G., and Link, T. A. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 253-271.
23. Brandon, J. R., Brocklehurst, J. R., and Lee, C. P. (1972) *Biochemistry* **11**, 1150-1154.
24. von Jagow, G., and Sebald, W. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 281-314.
25. Lloyd, D., and Chance, B. (1968) *Biochem. J.* **107**, 829-837.
26. Yang, X., and Trumpower, B. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12282-12289.
27. Berry, E. A., Huang, L., and DeRose, V. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9064-9077.
28. Lübbers, M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 1-22.
29. Andrews, K. M., Crofts, A. R., and Gennis, R. B. (1990) *Biochemistry* **29**, 2645-2651.
30. Degli Esposti, M., Palmer, G., and Lenaz, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **182**, 27-36.
31. Becker, W., von Jagow, G., Anke, T., and Steglich, W. (1981) *FEBS Lett.* **136**, 329-333.
32. Link, T. A., Wallmeier, H., and von Jagow, G. (1994) *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 197-203.
33. Anderson, W. M., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F., and Young, I. G. (1982) *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717.
34. Michaelis, G., Vahrenholz, C., and Pratz, E. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223**, 211-216.
35. Melkonian, M. (1990) in *Handbook of Protozoists* (Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J., Eds.), pp. 608-616, Johns and Bartlett, Boston.

PÉRDIDA SECUNDARIA DE LA FOTOSÍNTESIS: EL CASO DE LAS ALGAS INCOLORAS Y DE ALGUNOS PARÁSITOS

EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-243, 04510. México D.F. México. e-mail: egutie@ifscsun1.ifisiol.unam.mx

Resumen: Esta revisión pretende ilustrar un fenómeno muy interesante en la naturaleza: la pérdida secundaria de la fotosíntesis y sus efectos en los genomas del cloroplasto y de la mitocondria. Se describe cómo los genomas de los plástidos incoloros se han reducido con respecto a los de los cloroplastos que les dieron origen, perdiendo los genes que codificaban para proteínas fotosintéticas. También se ilustra lo que ocurre en el genoma mitocondrial de aquellos organismos que sufrieron una pérdida secundaria de la fotosíntesis y se propone como hipótesis que mantuvieron un mayor número de genes en el ADN mitocondrial, ya que este organelo es ahora el responsable principal de llevar a cabo el metabolismo energético en la célula.

Palabras clave: organismos incoloros, plástidos incoloros, pérdida de genes, algas incoloras.

Abstract: This review pretends to illustrate a very interesting phenomenon in nature: the secondary loss of the photosynthetic function and its effects in chloroplast and mitochondrial DNA. Here it is described how plastid DNA has been reduced losing those genes which encode for photosynthetic proteins. An example of the mitochondrial DNA of a colourless alga is also explained. An hypothesis is proposed where the number of mitochondrial genes is maintained in this colourless organisms due to the energetic demand on the organelle.

Key words: colourless organisms, colourless plastids, loss of genes colourless algae.

Dentro de los grupos de algas se encuentran clasificados organismos que son incapaces de fotosintetizar. Estos organismos también pueden agruparse como protozoarios heterotróficos semejantes a las algas. En 1980, F.E. Round hizo un análisis evolutivo para clasificar a las algas incoloras. Algunos de estos organismos podrían considerarse como "verdaderas" algas incoloras y otras definitivamente como organismos protozoarios sin relación con las algas. Cabe destacar que de acuerdo con Round, existen al menos 500 especies de algas incoloras. La mayoría de ellas se encuentran dentro de las divisiones Dinophyta, Chlorophyta y Phylum Euglenophyta (Margulis, 1990). "Una verdadera alga incolora" debería (de acuerdo con Round) mantener un vestigio de que en algún momento fue un organismo fotosintético. Una de las pruebas sería el conservar plástidos derivados de los cloroplastos como un organelo en el nuevo organismo heterótrofo. Estos organelos son la prueba de que efectivamente los ancestros de estos organismos fueron fotosintéticos. El autor propone que durante la

evolución de los Protocistas, algunos organismos con la misma morfología adquirieron cloroplastos y otros no. Aquellos que no adquirieron los cloroplastos son protozoarios "verdaderos". Probablemente, algunos de los organismos que adquirieron cloroplastos perdieron posteriormente parte del aparato fotosintético pero conservaron al organelo modificado, por lo que son las "verdaderas" algas incoloras. Hasta el momento, aunque se conocen muchas algas incoloras u organismos unicelulares no fotosintéticos, pocos han sido los que se han estudiado a profundidad.

Esta revisión pretende mostrar los casos de algunas algas incoloras y de algunos otros organismos parásitos de los cuales se han aislado y caracterizado los genomas de sus plástidos. Así mismo, se describe el genoma mitocondrial de otro organismo incoloro, con el fin de analizar qué sucede con este organelo una vez que se ha perdido la función fotosintética.

Los genomas de las mitocondrias y de los cloroplastos. Para una mayor comprensión de cuáles son los genes que

se han perdido en las algas incoloras, se hará una breve introducción de los organelos que están involucrados en este fenómeno: los cloroplastos y las mitocondrias. El orden que se establece en el artículo es el de revisar en primer lugar al genoma del cloroplasto y de los plástidos incoloros. Una vez hecho esto, se hará una revisión del genoma mitocondrial. Es preciso hablar del ADN mitocondrial (ADN mt) ya que desde el momento en el que los organismos dejan de ser fotosintéticos, el organelo que genera la mayor proporción de energía es la mitocondria.

Los cloroplastos. Son organelos que pueden tener dos y hasta tres membranas y que se encuentran en algas uní y pluricelulares, así como en plantas vasculares y avasculares. Las Chlorophyta junto con las plantas tienen cloroplastos de 2 membranas. Las Euglenophyta

(Walne, 1990) y Dinophyta (Taylor, 1990) tienen tres membranas. Los casos más extraños son las Cryptophyta que tienen cuatro membranas (Douglas, 1994). Estos organelos están compuestos de varios espacios como son el intermembranal, el estroma y el lumen del tilacoide (figura 1a). El cloroplasto tiene más de 250 proteínas de las cuales 30-40% están codificadas en el genoma del cloroplasto. Estas proteínas participan en la reducción del CO_2 , en la biosíntesis de moléculas orgánicas, el transporte y la fotosíntesis, (como se muestra en el esquema de la figura 1a). Las membranas externa e interna contienen proteínas que se encargan de la translocación de otras proteínas hacia el interior del cloroplasto (para una revisión ver Douwe de Boer y Weisbeek, 1991). En el estroma se encuentran las proteínas que llevan a cabo las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis. El ti-

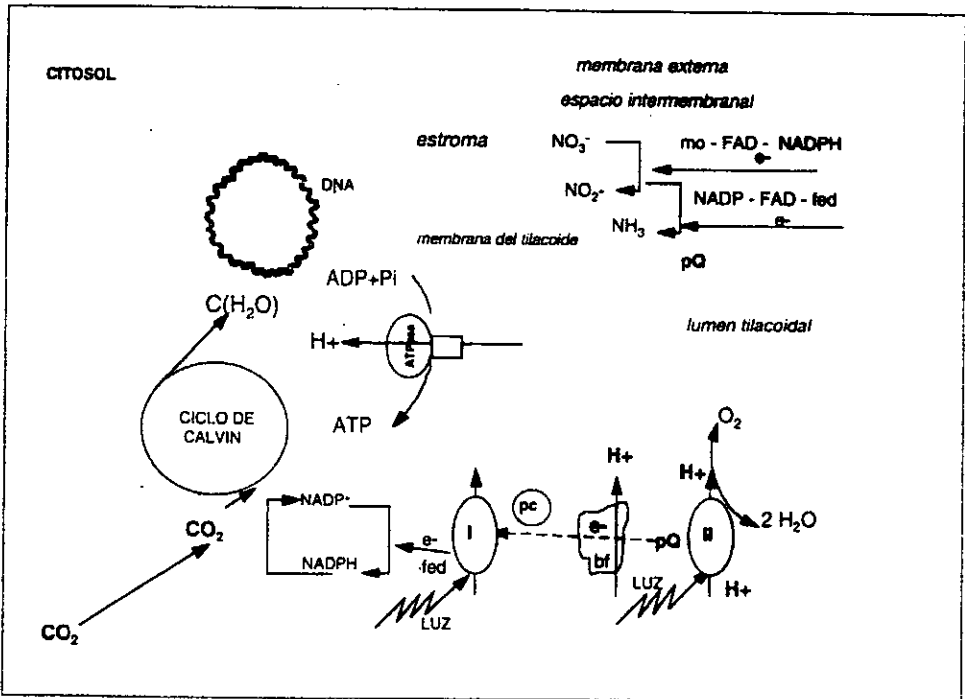


Figura 1. Se muestra la estructura del cloroplasto, organelo que sintetiza carbohidratos (entre otras cosas), a través de las reacciones del ciclo de Calvin para la reducción del CO_2 y la conversión de la energía proporcionada por la luz a energía química en la forma de NADPH y de ATP (que no se exporta al citosol). En el esquema también se ilustra la reducción de sales de nitrógeno. I: Fotosistema I; II: fotosistema II; pc: plastocianina; pQ: plastoquinona, que es el aceptor de electrones de la flavoproteína; $\text{C}(\text{H}_2\text{O})$: carbohidratos, fed: ferredoxina, mo: molibdeno. NOTA: El ADN del cloroplasto es circular.

lacoide alberga a las proteínas que participan en las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis, esto es, de la captación de la luz y de la conversión de ésta a energía química (Stryer, 1989). Hasta el momento, se han secuenciado totalmente los genomas de cloroplastos de: el tabaco - 156 kbs- (Shinozaki *et al.*, 1986), el arroz -135 kbs- (Hirasuka *et al.*, 1989) y de la hepática *Marchantia polymorpha* (L.)-121 kbs- (Ohyama *et al.*, 1986 a y b; 1988). También se tiene la secuencia del ADN del cloroplasto de dos algas unicelulares: *Chlamydomonas reinhardtii* Dang-196 kbs- (Boudreau, *et al.*, 1994) y de *Euglena gracilis* Klebs-143.17 kbs- (Hallick, *et al.*, 1993).

Como un ejemplo de los genes que puede tener codificado el ADN de cloroplasto (ADNcl) se muestran los genes que contiene el ADNcl de *Euglena gracilis* (Klebs) (tabla 1) y del tabaco (tabla 2).

Algunos de los genes que están codificados en el ADNcl conforman el aparato para la síntesis de proteínas. Algunas de ellas son transportadas al estroma desde el lumen tilacoidal, por un grupo de proteínas semejante al sistema Sec de bacterias (Valentín, 1993). Este es un complejo sistema de proteínas membranales que se encargan de transportar proteínas de secreción (SEC) al exterior de la célula. Sin embargo, la mayoría de las proteínas del cloroplasto son sintetizadas en el citoplasma celular e importadas. Muchas de estas proteínas tienen una presecuencia que es una señal para dirigirlas hacia la membrana externa del cloroplasto y hacia otros espacios del (Douwe de Boer y Weisbeek, 1991).

A continuación veremos ejemplos de organismos que han sufrido una pérdida secundaria de la fotosíntesis. Debido a que existe una gran cantidad de organismos que no están restringidos al reino Protista, también veremos ejemplos de plantas vasculares. Para poder situar a cada una de las especies se hará una breve descripción de la división a la que pertenecen:

El caso de *Astasia longa*, *Euglenophyta*

Los integrantes de este grupo son organismos unicelulares de forma lanceolada, cuyas células carecen de pared pero tienen un *periplasto* que se encuentra debajo de la membrana celular. Este *periplasto* está formado por tiras de glicoproteína dobladas de tal manera que le proporcionan rigidez a la célula y que están sostenidos por microtúbulos. Todos tienen un aparato de Golgi (dictiosoma). Algunos de ellos tienen una cubierta llamada lorica, que puede cubrir total o parcialmente a la célula. Esta cubierta es un mucilago que puede estar impregnado de algún mineral. La locomoción de estos organismos es por medio de uno o más flagelos situados en un reservorio o

blefaroplasto cercano al citostoma (que constituye el aparato de alimentación para los euglenoides heterótrofos). También en esta región se encuentra una mancha ocular. Las mitocondrias tienen crestas aplanadas que aparecen en forma de disco en un corte transversal. Los organismos fotosintéticos tienen cloroplastos verdes. El carbohidrato de reserva es paramilon (b-1:3 glucano). Se conocen 1 000 especies de esta División, tanto fotosintéticos como incolores. Algunos de ellos son parásitos de invertebrados y de renacuajos de anfibios. (Leedale, 1967; Sleight, 1989; Patterson y Larsen, 1991).

El género *Euglena* Ehrenberg contiene a gran parte de los organismos fotosintéticos de esta División. Otros géneros fotosintéticos son *Phacus*, *Trachelomonas*, *Cryptoglena*, etc. De los organismos incolores los géneros representativos son *Astasia*, *Cyclidiopsis*, y *Peranema*. (Patterson y Larsen, 1991).

El género *Astasia* Dujardin

Es uno de los representantes incolores más estudiado dentro de esta División. La forma celular y la estructura general son muy semejantes a los del género *Euglena*. Generalmente tiene forma de huso, aunque puede variar y un tipo de movimiento llamado metabólico característico de los euglenoides que consiste en un alargamiento y ensanchamiento de la célula al nadar. Viven en agua dulce aunque algunos de ellos son parásitos de microcrustáceos. El flagelo es tan largo como el cuerpo celular. Tiene gránulos de paramilo de forma oval y no tienen mancha ocular. No necesitan de un tipo particular de alimentación. Aparentemente tienen un citostoma, sin embargo, no es visible en el microscopio de luz.

Además de un ADN nuclear y de uno mitocondrial, se ha encontrado que *Astasia longa* Pringsheim tiene ADN en el plástido que contiene gránulos de paramilo. El ADN del plástido (ADNpt) de *Astasia longa* es de 73 kbs. De acuerdo con los estudios realizados, este ADN tiene gran similitud con el ADNcl de *Euglena gracilis* el cual es de 143 kbs (Siemeister y Hachtel, 1989). La tabla 1 lista los genes que tiene y la identidad con los mismos genes de *E. gracilis*. A modo de comparación también se incluyen los genes presentes en el ADNcl de *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. Esta última tiene incluso algunos genes más que *E. gracilis*. Tal es el caso de los genes *pet* y *ATP*. Como se puede observar en la tabla 1, el ADNpt de *Astasia longa* carece de los genes para las proteínas fotosintéticas que se encuentran en *E. gracilis* y *C. reinhardtii*.

Algunas de las peculiaridades que presentan los genes del ADNpt de *A. longa* son:

Genes ribosomales. El genoma tiene arreglados de la misma manera que *Euglena gracilis* tres operones completos y uno fragmentado con los genes 16S y 23S del ARN ribosomal (Siemeister y Hachtel, 1989, 1990b). Otro grupo de genes arreglado en tándem es el de *rpl3-rps8-rpl36-trnI-rps14-trnF-trnC-rps2* que se encuentran dispuestos de la misma manera en *E. gracilis* y *A. longa* (Hallick, et al., 1993; Siemeister et al., 1990b). Estos genes codifican para ARNs de transferencia y para subunidades proteicas del ARN ribosomal.

Los genes que codifican para el aparato traductor de proteínas del cloroplasto incluyen a 3 ARN ribosomales, 17 tARNs, 13 proteínas ribosomales y un factor de alargamiento de la traducción (Gockel et al., 1994). Estos genes tienen una identidad del 68% al 90% con los mismos genes de *E. gracilis*. El arreglo en el que se encuentran dispuestos estos genes es semejante al que tienen en el ADN del cloroplasto de *E. gracilis*. El ADN pt está activo, ya que el grupo de Gockel encontró transcritos del ARN ribosomal 23S. Otro de los hallazgos interesantes es que las proteínas ribosomales de *Astasia longa* tienen un alto contenido de lisinas (hasta un 24%), como en *E. gracilis*.

Astasia longa también comparte con *Euglena gracilis* el tener intrones de la clase III y carece de intrones en los genes que codifican para los ARNs de transferencia (Siemeister y Hachtel 1990 a, b).

Genes para el estroma. A pesar de que el ADNpt no codifica para ningún gene involucrado en la transferencia de electrones de la fotosíntesis, sí codifica para la subunidad grande de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa o RubisC/O (*rbcL*) (Siemeister y Hachtel, 1990a). Este gene está activo, debido a que se ha encontrado el ARN mensajero correspondiente (Gockel et al., 1994).

Otros genes que ha retenido el ADN pt de *Astasia longa* son *clpP*, *accD*, *orf1738*, y *orf 2216*. Se sabe que *clpP* es homóloga a la subunidad b de una proteasa dependiente de ATP. El gene *accD* codifica para una proteína homóloga a la subunidad b del componente con actividad de carboxiltransferasa de la acetil CoA. (Gockel, et al., 1994). Algunos de los segmentos de ADNpt con marco de lectura abierta (ORF) son muy largos y se ha detectado el ARNm de uno de ellos. Esto indica que algunos de los genes de los que se desconoce su función pueden ser de gran importancia para *A. longa*. Algunos de ellos pueden estar involucrados en la síntesis de paramylon, por ejemplo. Otra característica de este ADN es que no ha perdido los genes que codifican para el aparato traductor en el genoma de cloroplasto. Esto incluye las subunidades para ARN ribosomales, para los ARN de transferencia, proteínas ribosomales, factores de transferencia y hasta

una ARN polimerasa (al menos una de las subunidades) (Gockel et al., 1994). La existencia de estos genes muestra que este organelo aún sintetiza sus proteínas y que éstas son de utilidad para *A. longa*.

En resumen, el ADNpt de *Astasia longa* presenta una gran identidad con el genoma del cloroplasto de *Euglena gracilis*, lo cual es prueba significativa de que en algún momento éste fue un organismo fotosintético. Esto se comprobó al encontrar al gene de la subunidad grande de la RubisC/O. Sin embargo, aún no se sabe si esta subunidad se ensambla en una RubisC/O funcional. Podemos concluir que *A. longa* tiene un genoma homólogo al genoma de los cloroplastos de *E. gracilis*, pero reducido, ya que ha perdido todos los genes correspondientes al aparato fotosintético, como son *psa*, *psb*, *pet*, *atp* y *chl* (ver tabla 1).

Los datos anteriores apoyan fuertemente la hipótesis de Round, sugiriendo que *Astasia longa* se separó de los Euglenoides por un proceso evolutivo que significó la pérdida secundaria del aparato fotosintético.

Plasmodium Marchiafava y Celli Phylum Apicomplexa

El género *Plasmodium* Marchiafava y Celli pertenece a un grupo de organismos parásitos estrictos, que puede vivir en la sangre de diferentes hospederos. Su ciclo de vida es complejo, ya que puede tener dos hospederos distintos, como por ejemplo un insecto y el hombre. En ellos se desarrolla sólo parte de su ciclo de vida. El origen de estos organismos es incierto, sin embargo se ha observado que algunas estructuras del parásito se encuentran también en dinoflagelados parásitos (Gardner, 1988). Uno de los aspectos interesantes del género *Plasmodium* es la pérdida masiva de genes mitocondriales.

Se han aislado dos ADNs extracromosomales de estos organismos, uno en bajo número de copias, de 35 kbs y que es circular (Gardner, 1988). El otro, tiene un tamaño de 6 kbs, y es lineal, se encuentra en muchas copias en la célula (Joseph y cols., 1989). De la molécula circular de 35 kbs, se obtuvo la secuencia de los genes que codifican para dos subunidades de una ARN polimerasa (ARNpol) (Gardner et al., 1991a). Estos genes denominados *rpoB* y *C*, tienen un alto contenido en A+T (86%). La identidad obtenida fue: para la subunidad B, de un 27% y para la subunidad C 30%, con las subunidades correspondientes de la ARNpol de *Escherichia coli* Migula. También se encontró identidad con las subunidades de la ARNpol de cloroplasto. En este caso, la identidad fue de 29% (subunidad B) y de 32% (subunidad C). Como prueba de que existe identidad entre las secuencias de esta proteína, se encontró un motivo que puede formar un dedo de zinc (estructura característica de proteínas que se

unen al ADN) en la subunidad b' de *E. coli* que también tiene la subunidad C de *Plasmodium*. La juxtaposición de los genes *rpoBC* es la misma que tienen estos genes tanto en eubacterias como en cloroplastos. Sólo los ADNs de cloroplasto tienen la información para las subunidades de una ARN polimerasa, mientras que esto no ocurre en el genoma mitocondrial.

Otros de los genes secuenciados del genoma de 35 kbs son los que codifican para las subunidades chica y grande del ARNr (SSU y LSU, del inglés small and large subunit, también denominados como *srn*, *lrrn* y/o 16S, 23S, respectivamente). Estos genes están por pares y uno de ellos está unido cabeza-cabeza con el otro en el mismo segmento del ADN de 35 kbs (Gardner *et al.*, 1991b). Estos genes tienen 80% de A+T en su secuencia. La subunidad pequeña del ARNr tiene una hélice del nucleótido GUG 84 al CAC 278 (hélice 7) que es característica de eubacterias y que está ausente tanto en arqueobacterias como en eucariotes. Las hélices que se encuentran en las posiciones 373 y 405 no están presentes en el humano. Estas características hacen muy semejantes a bacterias, plantas y plástidos. El grupo de Gardner también se ha preocupado por saber si el genoma de 35 kbs está activo, por lo que utilizando la técnica de Northern localizaron el ARNm del gene de SSU ARNr (Gardner *et al.*, 1991b). Esto indica que el o los genes de este ADN extracromosomal son transcritos y utilizados por el organismo. Además se encontró una cisteína codificada por los nucleótidos 1160-1162 del gene de SSU ARNr. En esta posición, la cisteína es una especie de firma molecular para todas las subunidades pequeñas del ARNr en cloroplastos y que no aparece en los genes mitocondriales.

Otro dato interesante fue el análisis filogenético del gene *rpoB* (subunidad B de la ARNpol), realizado por Gardner *et al.* (1994). Este trabajo, mostró que el genoma de 35 kbs y específicamente el gene *rpoB* puede agruparse dentro de los genomas de plástidos. Comparando las secuencias del gene *rpoB* de *Plasmodium* y de *Euglena gracilis* éstas sugieren que la separación de estos grupos de las plantas ocurrió después de la separación de éstos de las bacterias.

Hasta 1996 no se sabía cuál era la localización del genoma de 35 kbs en las células de estos parásitos, debido a que no se podía identificar un organelo que lo contuviera. McFadden y col. (1996) utilizaron al gene del ARN ribosomal 16S de *Toxoplasma gondii* Nicolle y Manceaux para hibridarlo *in situ* en las células del mismo organismo. Los transcritos del gene marcado con partículas de oro coloidal se acumularon en un organelo ovoidal que está situado en la parte media de la célula y anterior al núcleo. Este organelo tiene al menos dos membranas y es posible obser-

var partículas de 18 nm de diámetro semejantes en tamaño al ribosoma 70S de *E. coli*.

De lo anterior podemos concluir que el genoma de 35 kbs comparte similitud con genomas de los cloroplastos y que se encuentra compartimentalizado en un organelo celular, el cual puede ser una reminiscencia del organelo fotosintético.

Es importante mencionar que no se han encontrado homologías entre las secuencias de las dos moléculas de ADN extracromosomales por medio de la técnica de Southern.

Otras especies de *Plasmodium* se han estudiado por medio de centrifugación y también se han aislado dos ADNs extracromosomales, uno de 35 kbs y otro de 7 kbs (Wilson *et al.*, 1992). Por medio del fraccionamiento celular, utilizando la técnica de centrifugación diferencial, se pudieron aislar dos fracciones que contenían una a la molécula de 35 kbs y otra a la de 6kbs. Se utilizó la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés) con desoxioli-gonucleótidos específicos diseñados para amplificar un gene del cloroplasto (*rpoB*), de la mitocondria (la LU ARNr) o del núcleo (*MSA2*). Se pudo comprobar que para estas especies el ADN de 35 kbs no cofracciona con el de 6 kbs, por lo tanto, no están contenidas en el mismo organelo. También se comprobó que la molécula de 6 kbs no pertenece al ADN nuclear debido a que no presenta amplificación con los primeros del gene nuclear, ni tampoco con el de 35 kbs.

J.E. Feagin en 1992 secuenció la molécula de 6 kbs de *Plasmodium falciparum* Welch mostrando que este es un ADN mt reducido a su máxima expresión. Encontró los genes para ARNr (fragmentados y abreviados) y tres marcos de lectura abierta de proteínas involucradas en la respiración mitocondrial. El primero de ellos tenía un 43% de identidad con el gene *Cyb* de humano (citocromo b) que codifica a las cuatro histidinas invariables que tiene esta proteína para unir a dos hemos. El segundo tuvo una identidad entre el 51 y el 47% de identidad con el gene *cox1* de sergo y humano. Este gene codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa. También se identificó al gene que codifica para la tercera subunidad de este complejo (*coxIII*) con una identidad del 59% con el gene de humano.

Todos estos datos sugieren que el ancestro del género *Plasmodium* fue fotosintético, y que ya había adquirido a los endosimbiontes que darían lugar al cloroplasto y a la mitocondria. Este evento ocurrió durante la evolución de las plantas y la separación de los eucariotes de los procariontes. Este organismo cambió de ser autótrofo a parásito estricto, probablemente porque la fotosíntesis ya no representó un modo de vida adecuado. Uno de los aspectos intere-

santes es la extrema pérdida de genes tanto en el caso del genoma de "plástido" como el mitocondrial. El ADNcl en una planta es de alrededor de 135 kbs como en el caso del arroz. En el género *Plasmodium* el "ADNpt" tiene un tamaño de 35 kbs lo que representa una pérdida de 74.1 % del genoma. El ADN mt puede tener un tamaño de 16 kbs, como en el caso de humano, el genoma de *Plasmodium* es de solo 6 kbs, el genoma mitocondrial más pequeño conocido a la fecha. Si ambos ADNn están activos, lo que ya se ha demostrado en el caso del genoma de 35 kbs, entonces queda por saber para qué requiere *Plasmodium* estos genes. Se puede concluir que en este caso se presentan dos fenómenos de interés por un lado, la pérdida secundaria de la fotosíntesis y por otro, la reducción del genoma del cloroplasto a un genoma más pequeño de un plástido. Por otra parte, la reducción del genoma mitocondrial en organismos que funcionan como parásitos estrictos. Cabe aquí señalar que el grado máximo lo representan otros parásitos como *Giardia* Künster y *Entamoeba* Casagrandi y Barbagallo, que son eucariotes que carecen completamente de mitocondrias (Hashimoto *et al.*, 1995).

Epifagus virginiana y especies semejantes

Existen angiospermas que carecen de la actividad fotosintética y se han vuelto parásitas de otras plantas, tal es el caso de *Epifagus virginiana* (L.) Barton. Esta planta pertenece a la familia Orobanchaceae y es parásita de las raíces de los árboles. Como los grupos de protistas anteriormente descritos, *E. virginiana* es otro buen candidato para estudiar la evolución de un organelo que ha perdido su función fotosintética.

El ADNpt de *Epifagus virginiana* se ha reducido considerablemente (mide 70 kbs contra 156 kbs del ADNcl del tabaco). La tabla II muestra los genes presentes en el ADNpt de *E. virginiana* y de otra especie semejante a ella, *Cuscuta reflexa* L. También se presenta una comparación del contenido genético de los cloroplastos del tabaco y de la hepática *Marchantia* L. Con esta comparación se puede ver que algunos genes que sí están en el ADNcl del tabaco no se presentan en *Marchantia polymorpha* L. (como *rpl 33*, *psb H-N*, *ndh 7-11*) ya que estas dos líneas evolucionaron de manera separada. Esto indica que cada grupo ha evolucionado de manera separada y que puede ser que algunos genes que sí están presentes en las plantas, se hayan perdido en la hepática.

La presencia de pseudogenes y la pérdida de segmentos cortos del ADNpt de *Epifagus virginiana* en la región de repetición invertida (RI), pueden ser indicio de que las grandes pérdidas de ADN son resultado de la acumulación de la pérdida de fragmentos

pequeños (Wolfe *et al.*, 1992b). Los genes y pseudogenes que han sido retenidos por el ADNpt conservan el mismo orden relativo en *E. virginiana* que en el ADNcl de tabaco. Sin embargo, el análisis hecho en este genoma indica que la pérdida de fragmentos de ADN ha llegado a un estado estacionario, en el que ninguno de los segmentos ha perdido más genes que otro. Se ha visto que en *E. virginiana* la pérdida de fragmentos de ADN puede ser de tres tipos: por pérdida de una sola base; por pérdida de fragmentos de 20 pb o por pérdida de fragmentos de más de 100 pb.

De los ARNt utilizados por *Epifagus virginiana* faltan los ARNt para los aminoácidos alanina, cisteína, glicina, lisina, treonina y valina (Wolfe *et al.*, 1992a). En comparación, se ha observado que en el tabaco las proteínas no tienen estos aminoácidos en gran cantidad. Una de las posibilidades es que estos ARNt se importen por el plástido desde el citoplasma. La importación de ARNt a la mitocondria no es un hecho extraño ya que es posible ver *in vivo* este fenómeno en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (Tarassov y Entelis, 1992). Otra característica importante es que el ADNpt de *E. virginiana* está activo, debido a que se han identificado los transcritos de varios genes (de Pamphilis y Palmer, 1990).

Conopholis americana (L.) Wallr. es otra de las especies de plantas parásitas que ha perdido el aparato fotosintético. Pertenece a la misma familia de *Epifagus virginiana*. El ADNpl no tiene los genes fotosintéticos, sin embargo, ha retenido intactos los genes para las subunidades 16S y 23S del ARNr, los cuales se transcriben y procesan (Wimpee *et al.*, 1991). En casi todos los ADNcl estos genes están separados por los genes para el ARNt^{trn} y el ARNt^{trn} (Young *et al.*, 1979; Williamson y Doolittle, 1983). Este arreglo no existe en *C. americana* ya que los genes para los dos ARNt se han perdido y solamente quedan 49 pb del ARNt^{trn}. La región intergénica ha disminuido (de 2 080 pb en tabaco a 398 pb en *C. americana*) (Wimpee *et al.*, 1992). Un dato muy interesante es que los genes de estos ARNt no están presentes en el núcleo, ya que se buscaron con intención usando, sondas específicas por medio de análisis tipo Southern y con sobreexposición de las membranas que contenían al ADN de *C. americana*. Esto indica que no hubo una transferencia al núcleo de estos genes como podría pensarse de acuerdo con la hipótesis de que paulatinamente hubo una transferencia de genes del organelo (mitocondria o cloroplasto) hacia el genoma nuclear de su "hospedero" (Brennicke *et al.*, 1993).

Cuscuta reflexa L. es una planta parásita de los tallos de las plantas. En ella no se han perdido los genes con función fotosintética. Esta planta parece no tener todas las características de una vida parásita,

Tabla 2: Genes del cloroplasto en diferentes plantas superiores (la nomenclatura es la misma que la tabla 1)

<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Epifagus virginiana</i>	<i>Cuscuta reflexa</i> (fragmento de 6.1 kb)	<i>Marchantia polymorpha</i>
TAMAÑO: 156,000 pb	70,028 pb		121,024 pb
TRANSCRIPCIÓN: <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2</i>	Ψ <i>rpoA</i>		<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2</i>
TRADUCCIÓN: 23S, 16S, 5S, 4.5S <i>rpl</i> 2, 14, 16, 22, 23, 32 <i>rps</i> 2, 3, 4, 7, 8, 11, 16, 18, 19 26 RNAs de transferencia	23S, 16S, <i>rpl</i> 2, 16, 20, 33, 36, Ψ <i>rpl</i> 14, 23 <i>rps</i> 2, 3, 4, 7, 8, 11, 18, 19, 17 RNAs de transferencia completos, 7 RNAs de transferencia mutados		<i>rrn</i> 23S, 16S, 5S, 4.5S <i>rpl</i> 2, 14, 16, 20, 21, 22, 23, 33, <i>rps</i> 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19 37 RNAs de transferencia
FOTOSÍNTESIS: <i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaJ</i> , <i>psb</i> A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, M, N <i>pet</i> B, D, G, <i>rbcl</i> <i>atp</i> A, B, E, F, H <i>ndh</i> A, B, C, D, E, G, H, J, K (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11) Shinozaki, K. y cols., (1986)	Ψ <i>psb</i> A y <i>Ypsb</i> B Ψ <i>rbcl</i> Ψ <i>atp</i> A, <i>atp</i> B, Ψ <i>ndh</i> B, Wolfe y cols., (1992)	<i>psa</i> A <i>psb</i> A, <i>psb</i> B, <i>psb</i> C, <i>psb</i> D <i>pet</i> G <i>rbcl</i> <i>atp</i> A, <i>atp</i> B, <i>atp</i> F, Haberhausen y cols., (1992)	<i>psa</i> A, B, <i>psb</i> A, B, C, D, E, F, G <i>pet</i> A, B, D <i>rbcl</i> <i>atp</i> A, B, E, F, H, I <i>ndh</i> 1, 2, 3, 4, 4L, 5 Ohyama, K. y cols., (1986)

Ψ: pseudogene

debido a que tiene aún pequeños cloroplastos con algunas membranas tilacoidales y con un contenido bajo de clorofila. Los genes para las subunidades grande y pequeña de la Rubisco (*rbcS* y *rbcl*) y el gene *psbA* (que codifica para una proteína de 32 kDa del fotosistema II) están presentes, pero se transcriben a muy bajos niveles (Machado y Zetsche, 1990). Hasta el momento se ha secuenciado un fragmento de 6.1 kbs del ADNpt de *C. reflexa* (Haberhausen et al., 1992) y en la tabla 2 se muestran los genes presentes.

Los genes del ADNpt de *Cuscuta reflexa* presentan una alta identidad (90%) con los genes correspondientes en plantas. Sin embargo, la cantidad de transcrito del gene *rbcl* es mucho menor en *C. reflexa* que en tabaco, como lo mostró un análisis tipo Northern. Esto significa que existen menos copias del ARN correspondiente en la planta parásita, por esto mismo, la proteína RubisC/O no es detectable.

Las plantas parásitas de las que se ha hablado sirven para mostrar que en la naturaleza existen ejemplos vivos que ilustran el proceso evolutivo. *Cuscuta reflexa* sería el marcador del inicio del proceso, esta

es una planta que conserva los genes del aparato fotosintético en el cloroplasto, al menos en el segmento secuenciado. Estos genes se transcriben en muy bajo número de copias, por lo que no llega a haber una cantidad suficiente de proteína para que la planta se sostenga a sí misma. El siguiente paso en el proceso de pérdida de la función fotosintética. Al parecer, esto se produce por el rearrreglo de los genes o la pérdida de segmentos importantes para la traducción del mensaje. Esto indicaría que el promotor de la transcripción de este(os) gene(s) puede ser el que haya sido alterado. Este paso está representado por *Conopholis americana* en la que se ha perdido el segmento separador de los genes para las subunidades 16S y 23S del ARN ribosomal. Este segmento contiene dos ARNs de transferencia en plantas. Debido a que estos genes no están presentes en el núcleo, se puede suponer que su transferencia al ADN nuclear no fue exitosa y los genes no se fijaron en el ADN nuclear. La ausencia de los aminoácidos isoleucina y alanina podría haber desencadenado el proceso de que esta planta se volviera parásita. El grado máximo del cambio lo cons-

No tiene genes sobrelapados y las regiones intergénicas ocupan un 29% de la secuencia (con regiones de 100 a 150pb de largo).

La tabla 3 muestra el contenido de genes mitocondriales en organismos pertenecientes a diferentes niveles de organización. En este caso, se seleccionaron tres organismos protistas, los géneros *Prototheca*, *Acanthamoeba*, *Chlamydomonas* una planta vascular (maíz) y un mamífero superior (humano). Una de las características más notables es el tamaño tan variable de estos genomas mitocondriales. Incluso entre protistas, el tamaño más pequeño es el de *Chlamydomonas reinhardtii* (16 kbs) semejante al de humano. Los ADN mt más grandes corresponden a los de plantas. En estos genomas no está codificado ninguno de los genes para la maquinaria de la transcripción. La idea de incluir un ejemplo del genoma mitocondrial en este análisis se debe a que este organelo llevará ahora la carga de sintetizar la mayor cantidad de ATP para la célula una vez que se ha perdido la función fotosintética. Se puede apreciar que, para el caso de *C. reinhardtii* y de las plantas vasculares, el tamaño y el contenido de genes en el cloroplasto es mucho mayor que en las mitocondrias (tablas 2 y 3). Sin embargo, comparando el contenido genético de *Prototheca wickerhamii* con el de *C. reinhardtii* se puede ver que el primero conserva muchos genes y el segundo no. En cambio, al comparar a *P. wickerhamii* con la ameba del género *Acanthamoeba* Volkonsky, se observa que el contenido genético es muy similar. Por lo anterior se puede pensar que debido a que ahora la mitocondria tiene una mayor demanda energética, los genes de este organelo han sido exportados lentamente, y se han conservado muchos que en un organismo fotosintético como *C. reinhardtii* ya han sido exportados al núcleo.

De la lista anterior, se puede destacar la presencia de algunos genes como *nad7* y *nad9* que son homólogos en secuencia a las que se encuentran en el ADNn de bovino. El gene *nad9* también coincide con la secuencia de la subunidad 9 de la NADH deshidrogenasa que está codificada tanto en el ADN mt de plantas como *Marchantia polymorpha*. Las 13 proteínas ribosomales son homólogas en secuencia a las de *Escherichia coli* Migula. Las características que comparte con las plantas son que algunas de las secuencias con marco de lectura abierta (ORF) son semejantes a secuencias de ORF's de plantas. La subunidad 5S del ARNr sólo está codificada en el ADNmt en las plantas. Estas características comparadas con las plantas podrían ser de utilidad para señalar el punto donde se separaron de las plantas de las Chlorophyta.

Otras características que acercan a *Prototheca wickerhamii* con las plantas son partes de la secuencia de

la subunidad pequeña del ARNr. Por ejemplo, la región variable V7, se presenta en la secuencia de la SSURN de eubacterias, de hongos, de mitocondria, en los cloroplastos de plantas, y en *P. wickerhamii*, sin embargo, no está presente en el ADNcl de *Chlamydomonas reinhardtii* (Wolff, y Kück, 1990). Lo mismo ocurre con los nucleótidos G32 y A392. La subunidad pequeña del ARNr mostró varias características comunes a las eubacterias, las cuales se mantienen en las plantas, en hongos y en algunos plástidos (Wolff y Kück, 1990). El alineamiento de este gene de *P. wickerhamii* con otros genes indica que hay mayor distancia entre otra Chlorophyta (*C. reinhardtii*) y *P. wickerhamii* que entre esta última y las plantas.

El grupo de Wolff y Kück también estudió los intrones y exones de dos diferentes genes en *Prototheca wickerhamii*. En este caso, utilizaron las secuencias de los genes para la subunidad I de la citocromo oxidasa (*coxI*) y de la subunidad grande del ARNr. Los intrones de estos genes mostraron una similitud alta con los intrones que se encuentran en hongos y en particular, presentan una identidad del 80% con los de *Saccharomyces cerevisiae* (Wolff et al., 1994). Estos intrones pertenecen al grupo I. Cuando se realiza un alineamiento con las secuencias de los exones, *P. wickerhamii* muestra una similitud alta con las secuencias de ADNmt de plantas. Si se hace un alineamiento con estas secuencias *P. wickerhamii* aparece como si fuera el ancestro de las plantas (Wolff et al., 1994). Llama la atención que en el genoma de un mismo organelo se presenten estas diferencias entre intrones y exones.

De lo anterior se puede concluir que los genomas mitocondriales también presentan una tendencia marcada a reducirse y a exportar genes al núcleo. Esta reducción se hace más evidente en organismos que han pasado a ser parásitos estrictos. Proponemos que en el caso de los organismos unicelulares, la transferencia de genes de la mitocondria al núcleo, es un proceso que se lleva a cabo más rápidamente en aquellos organismos que aún conservan cloroplastos y su función fotosintética.

Discusión

La pérdida secundaria de la fotosíntesis constituye un fenómeno interesante, debido a que existen diversos organismos con los cuales se ha comprobado, por medio de técnicas de biología molecular, la pérdida de genes fotosintéticos. Cabe hacer notar que en un principio sólo se utilizaron pruebas morfológicas que indicaban la existencia de este fenómeno en algunos organismos. Existen organismos que tienen un amiloplasto con un sistema incompleto de tilacoides (o

poco desarrollado) como en el caso del género *Polytoma* (Ehrenberg) (van den Hoek *et al.*, 1995). Se puede pensar que estos organismos son en realidad formas primitivas y que nunca adquirieron a los endosimbiontes correspondientes. Es difícil que esto haya ocurrido en términos de la teoría endosimbionte, ya que es poco probable que se formen membranas con pseudotilacoides sin un endosimbionte. Además, *Polytoma* tiene un ANDpl que no ha sido totalmente caracterizado, pero que tiene la misma densidad y el mismo contenido de G+C que *Chlamydomonas* (Siu *et al.*, 1975). Como ya vimos, en el caso de las plantas parásitas, es posible observar que los plástidos incolores conservan un genoma suficiente para decir que perteneció a un cloroplasto, tienen en algunos casos tilacoides poco desarrollados (véase el ejemplo de *Cuscuta reflexa*). Otro ejemplo es la división Dinophyta en que el 50% de su total son especies no fotosintéticas. Aparentemente el fenómeno de la pérdida secundaria de la fotosíntesis es algo muy común en esta división (van den Hoek *et al.*, 1995). También tiene organismos que probablemente readquirieron un endosimbionte fotosintético, ya que sus cloroplastos son de tres membranas. Van den Hoek *et al.*, (1995) piensan que este proceso debe haberse llevado a cabo repetidas veces a partir de un dinoflagelado ancestral, por lo que la idea de que los cloroplastos de los Dinophyta evolucionaron varias veces es poco probable.

En esta revisión se han mostrado algunos ejemplos de organismos uni y pluricelulares incolores. Así mismo, hemos tratado de entender qué es lo que ha pasado con el otro organelo generador de energía, o sea, la mitocondria. Los organismos incolores en los cuales se ha demostrado que han perdido los genes fotosintéticos son pocos, debido a que es necesario en primer lugar identificar a un organelo parecido al cloroplasto. Es necesario tener pruebas de la presencia de ADN también en dicho organelo. Finalmente, se deben encontrar genes semejantes a los que tiene un genoma de cloroplasto. Esta es la única manera de constatar que un organismo incoloro unicelular fue en algún tiempo fotosintético. Una pregunta que surge inmediatamente es ¿por qué un organismo que ha perdido los genes fotosintéticos ha conservado al organelo con un genoma más pequeño? A continuación se presenta una pequeña discusión acerca de este proceso y algunas propuestas de qué es lo que puede estar pasando.

Al estudiar al ADNpl tanto de plantas parásitas como de protistas incolores se puede notar que los genomas de estos organismos han conservado casi todo el aparato para la síntesis de proteínas (ver tablas 1 y 3). En términos generales, podemos decir que los plástidos de estos organismos pueden realizar una

síntesis autosuficiente de proteínas, como en el caso de *Astasia longa* y de *Episagus virginiana* (Gockel *et al.*, 1994; Wolfe *et al.*, 1992a y b). Al menos 38% de sus genes codifican para proteínas que tienen que ver con la traducción de genes. En el caso específico de *E. virginiana* y de *A. longa* lo que puede decirse en favor de la conservación del organelo y del ADN es lo siguiente: a) las pérdidas de genes no son al azar sino dirigidas hacia los genes fotosintéticos (sólo aproximadamente el 5% de los genes fotosintéticos han sido retenidos). b) Se mantienen las regiones en donde hay un marco de lectura abierta (ORF), aunque se desconoce la función de los genes o de la proteína a la que codifican. Si estos genes no fueran funcionales, y por lo tanto, si no hay un motivo para que permanezcan en el ADNpl, lo que se vería es que el genoma tendría mutaciones al azar. c) Comparando con los genes de *Conopholis americana*, se observa que algunos como *nda* que codifica para una de las subunidades que tienen que ver con la fotosíntesis, se han perdido, pero que los genes ribosomales están muy conservados (Harris, *et al.*, 1994).

Una de las regiones con marco de lectura abierta (ORF) del genoma de *Episagus virginiana* se ha identificado como el gene *clpP*, el cual codifica para una proteína semejante a una proteasa dependiente de ATP de *E. coli*. Probablemente éste sea uno de los genes esenciales para la sobrevivencia de la planta (Wolfe *et al.*, 1992). Por otro lado, uno de los genes que se han utilizado como un indicador de la evolución en el caso de los organismos fotosintéticos, es el que codifica para la subunidad grande de la RubisC/O (*rbcL*). Este gene está muy conservado y tiene regiones que ayudan a un alineamiento mejor y poco ambiguo, además de que evolucionan a baja velocidad (Clegg, 1993). Este gene aún está presente en el ADNpl de *Astasia longa* (Siemeister y Hatchel, 1990a). No se sabe si esta proteína es funcional; de serlo podría intervenir en algún paso de la vía de fotorrespiración. La secuencia de esta proteína podría servir para determinar el momento de separación de *Euglena viridis* y de *A. longa*.

¿Qué tan importante es la síntesis de proteínas del cloroplasto? Al añadir antibióticos que bloquean a los ribosomas que realizan la traducción en células silvestres de *Chlamydomonas reinhardtii*, Blamire *et al.* (1974) encontraron que la replicación nuclear sí se detenía, no así la del ADN del cloroplasto. Otro de los ejemplos interesantes que ocurren en la naturaleza es que *Cuscuta reflexa* presenta una transcripción baja del gene *rbcL* no así del gene *psbA*. La conservación de la síntesis de proteínas en el cloroplasto no ocurre en todos los casos. Los cultivos de callos de tabaco resistentes a la antimicina crecen mejor en la

oscuridad y con el antibiótico, que en la luz (Harris *et al.*, 1994). Lo que se puede concluir de estos datos es que, en algunos casos, los organismos fotosintéticos requieren que la síntesis de proteínas se mantenga en el cloroplasto. Con estos datos podemos inferir que el organelo como tal sigue siendo importante para los organismos incoloros. Una de las razones más simples es que este organelo constituye un reservorio de energía (como en el caso de los amiloplastos). Sin embargo, este amiloplasto ha conservado la capacidad de almacenar información genética y en los casos estudiados, ha conservado su aparato de síntesis de proteínas casi completo.

La reducción de un genoma favorece la replicación más rápida del mismo, por lo tanto, un genoma más reducido como los del tipo de los organelos incoloros podría sobrevivir fácilmente. Se sabe muy poco sobre las funciones que un plástido incoloro puede estar cumpliendo en un organismo. Sin embargo, Bowsher *et al.* (1996) revisaron todo lo que se conoce del metabolismo de los plástidos no fotosintéticos en plantas superiores. Los plástidos más estudiados son los amiloplastos que se encuentran en las raíces. Se ha observado que son organelos donde ocurre la asimilación de nitrógeno y azufre inorgánicos, la biosíntesis de aminoácidos, de almidón y de ácidos grasos. La figura 3 sintetiza las principales vías metabólicas que ocurren en un plástido no fotosintético, así como su interrelación. Para que este plástido pueda realizar sus funciones es necesario que genere susstratos oxidables o que los importe del citosol. Las principales vías de oxidación son la glucólisis y la vía de oxidación de la pentosa fosfato. Estos organelos son capaces de generar ATP y poder reductor. Aunque es difícil identificar a todas las regiones con marco de lectura abierta (ORF) que se han encontrado en los genomas de plástidos no fotosintéticos, sería importante saber si estos genes corresponden a proteínas encargadas de algunas de las funciones antes mencionadas. Probablemente, estudiando el genoma de los plástidos incoloros que se encuentran en las plantas, se encontrarán los genes de algunas de las proteínas que intervienen en las reacciones que no necesitan de la luz.

Otro aspecto interesante, es que en *Epifagus virginiana* la composición de los codones que codifican para los aminoácidos ha variado. Ahora esta planta presenta un decremento en el contenido de G+C (de 37% en tabaco a 34% en *E. virginiana*) (Wolfe, *et al.*, 1992b). Comparativamente, el contenido de G+C en *Astasia longa* es bajo para el gene *rpl20* (12.9%) (Cockel *et al.*, 1994). En el género *Plasmodium* sucede algo parecido con la molécula de ADN de 35 kbs. Este genoma tiene un contenido de A+T de 80%. Una de

las explicaciones de este cambio es que al no haber la presión de un sistema fotosintético, ahora se utilizarán codones con mayor contenido de A+T. Sin embargo, se ha observado que también existen diferentes contenidos de A+T entre tabaco y *Marchantia polymorpha* (Wolfe *et al.*, 1992b). Para el caso de las plantas, la tendencia es a usar más codones cuya tercera posición es A o T (Clegg *et al.*, 1994). Para el caso del ADNmt se ha podido comprobar que aunado a la tendencia de hacer más pequeño al genoma, también se restringe el uso de codones y por lo tanto, el número de ARNs usado por la mitocondria es menor. Esto se puede ver también en el genoma de los plástidos analizados (Kurland, 1992). Un sistema de traducción mínimo se puede obtener cuando las condiciones del medio cambian. En este caso, se ha visto que cuando la células de *Escherichia coli* tienen una tasa de crecimiento elevada, los ARNs que traducen a la mayoría de los codones decrecen en abundancia. Lo contrario sucede cuando la tasa de crecimiento disminuye. En el caso de los ARNs de la mitocondria tanto el uso de codones como el uso de ARNs se seleccionan al mismo tiempo. Probablemente, esto fue lo que ocurrió con el genoma del ADNpl y también se hizo un reasignamiento de codones, en el cual un ARN específico para un codón en particular ahora puede reconocer hasta 4 diferentes tripletes.

En todos los casos de cloroplastos que han sido analizados, se sabe que existe una porción de genes que ha sido exportada al núcleo. Estos genes son traducidos en el citoplasma y las proteínas resultantes importadas al cloroplasto. La fracción del aparato fotosintético "nuclear" y del plástido se han perdido en el caso de los organismos incoloros. Puede pensarse que durante el proceso de cambio de autótrofo a heterótrofo (o parásito), los genes fotosintéticos fueron exportados al núcleo donde no se fijaron. Finalmente, estos genes ya no "regresaron" como proteínas al cloroplasto y se perdieron definitivamente. Una prueba de ello son los genes para los ARN^{16S} y ARN^{23S} los cuales se han perdido tanto en el genoma del plástido como en el núcleo de *Conopholis americana*. Esta asociación de cambios dio lugar a la generación de un organismo incoloro que conservara un organelo importante para su ciclo de vida. El ejemplo extremo es el género *Plasmodium* el cual conserva al organelo y al genoma, aunque muy reducido. Esto puede significar que los genes allí presentes le son de utilidad al parásito.

La idea de la conservación del plástido en una célula, se presenta en la figura 4. Aquí se muestra un modelo de lo que puede ser el intercambio establecido entre un plástido no fotosintético y el citoplasma celular. En este esquema se establece como depende

la célula del plástido incoloro, pero también como el plástido es dependiente del resto de la célula.

En esta revisión también se ha descrito al genoma mitocondrial de otra alga incolora, *Prototheca wickerhamii*. A pesar de que no se ha identificado al genoma del plástido, sí se sabe que tiene amiloplastos, por lo que probablemente sean necesarias otras técnicas para identificarlo. El genoma mitocondrial de los organismos incoloros también debe ser estudiado. La mitocondria es, aún en presencia de un organelo fotosintético, el principal aportador de ATP al citosol en los periodos de luz. Otra de las funciones importantes de la mitocondria en los organismos fotosintéticos es la de regular los niveles del poder reductor, durante el cambio de los periodos de luz a oscuridad. Se ha

observado que si la fosforilación oxidativa es inhibida, la fase de inducción a la fotosíntesis se retarda y las células pueden llegar a no adaptarse a la luz. (Cadeström, 1996). Apparently, the mitochondria has an important participation in the adaptation to stress to which an organism photosynthetic. In this case, we can think that the mitochondria of colorless organisms now is the unique organelo that provides ATP and regulates the levels of reducing power in the cell. Due to that the ADNpt has lost all the genes important for the photosynthesis and it has become more and more compact, now it is necessary that the genome of the mitochondria be the most stable. The mitochondrial genome of *P. wickerhamii* has conserved genes that have been exported for the

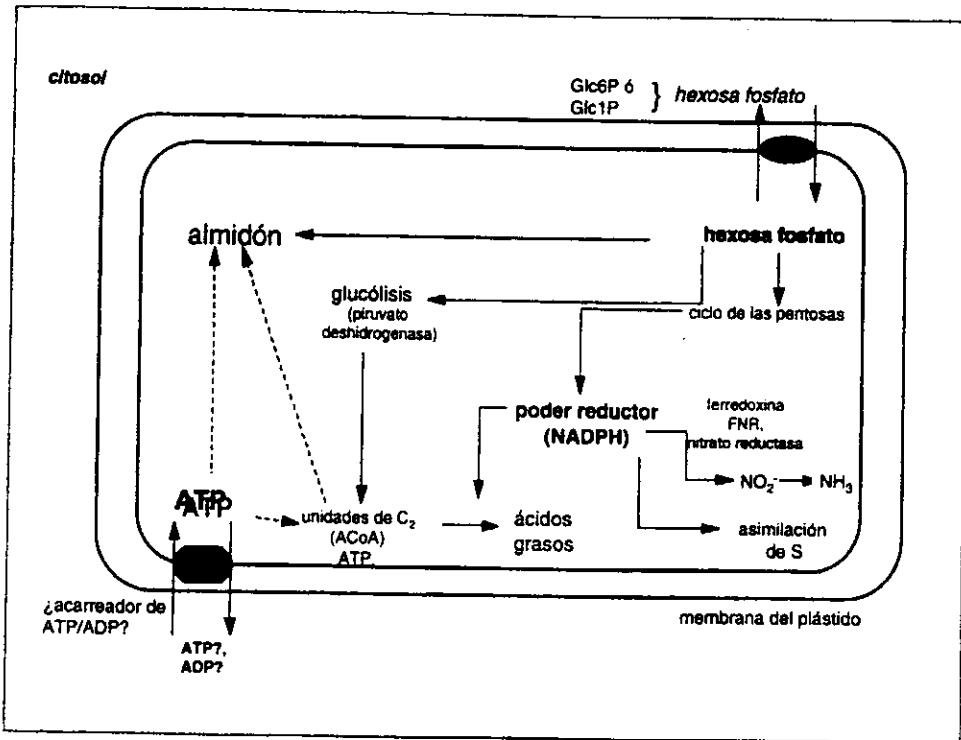


Figura 3: Esquema que muestran las vías metabólicas conocidas en los plástidos no fotosintéticos. Las flechas punteadas muestran que puede haber un ciclo de formación de almidón dependiente de la formación de unidades de dos carbonos y de ATP.

C₂: unidades de dos carbonos; S: Azufre; FNR: ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductasa. Actualmente no se sabe con exactitud si en el amiloplasto existe un transportador de adenilatos, que transporta ATP/ADP. Sin embargo, se ha obtenido un gene de *Arabidopsis thaliana* que tiene similitud con el transportador de adenilatos de la bacteria *Rickettsia prowazekii* (Bowsher et al., 1996).

genomas mitocondriales de otros organismos (incluidos organismos autótrofos y heterótrofos), como se muestra en la tabla 3.

Esta conservación de genes llama poderosamente la atención. Si uno compara el genoma mitocondrial de *Prototheca wickerhamii* con el de otra clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, uno puede ver la gran reducción del genoma de esta última y la tendencia casi exclusiva de mantener genes que codifican para proteínas muy hidrofóbicas. El genoma de *P. wickerhamii* ha conservado genes importantes para la traducción de proteínas, incluso tiene 26 ARNs diferentes y regiones de marco de lectura abierta (ORF) no identificadas (tabla 3). El genoma y la composición de genes es semejante al de *Acanthamoeba castellanii* Douglas, un protista incoloro y de forma ameboide, que está relacionado con las algas verdes y con las plantas, a la cual no se le ha asignado un sitio específico en los

árboles filogenéticos. Cuando se hace una comparación entre secuencias mitocondriales, el genoma de *P. wickerhamii* queda cercano al de las plantas y lejos del de *C. reinhardtii*. Cabe señalar que las plantas tienen gran cantidad de genes y de regiones intergénicas en el ADNmt y el genoma de *P. wickerhamii* es más parecido al de las plantas que al de *C. reinhardtii*. Sin embargo, *C. reinhardtii* ha perdido tantos genes que es difícil pensar en encontrar algún parentesco entre estas clorofitas. Y más aún, es difícil pensar que en *C. reinhardtii* se encuentren los genes ancestrales que constituyan el pasado de las plantas. Se puede concluir que el genoma de *C. reinhardtii* ha evolucionado a una mayor velocidad que el de *P. wickerhamii* mostrando una reducción más rápida de su genoma. Es posible que este organismo presente, más que *C. reinhardtii*, algunas de las características del antepasado de las plantas.

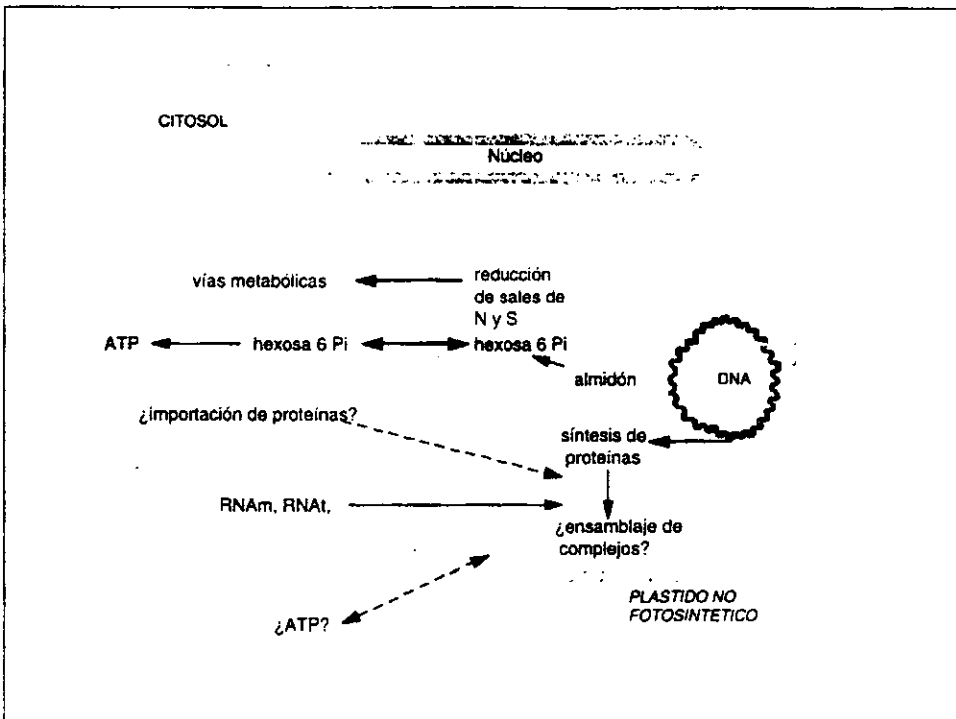


Figura 4. Se muestran las aportaciones de un plástido no fotosintético a la célula. El esquema es semejante al de la figura 3, sin embargo se ha tratado de presentar de qué manera interactúa el plástido con el núcleo y el citoplasma de la célula. N: nitrógeno, S: azufre, Pi: fosfato. ARNm: ARN mensajero, ARNt: ARN de transferencia. NOTA: el ADN de los plástidos no fotosintéticos conocidos es circular.

Otra suposición que puede hacerse es que la importación de genes al núcleo, su fijación y su posterior exportación como proteínas a la mitocondria, requiere de grandes aportes de energía. Debido a que los organismos incoloros ya no tienen el aparato para la segunda fuente de ATP, ahora deben "ahorrarse" este proceso de exportación de genes al núcleo. En el caso de *Prototheca wickerhamii*, podemos decir que este proceso se ha detenido o se hecho muy lento. Se puede concluir que un organismo que tenga dos organelos que aportan energía, como el cloroplasto y la mitocondria, tendrá un genoma mitocondrial con un número pequeño de genes. El ejemplo más conocido es el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*. Por otro lado, un organismo que pierda la capacidad de fotosintetizar, tendrá un genoma mitocondrial con un número mayor de genes, como ocurre en *P. wickerhamii*. Sin embargo, esto sólo puede aplicarse a los organismos unicelulares.

¿Cómo pudo ocurrir esta pérdida de genes? Algunos de los mecanismos que se pueden proponer son los siguientes: una de las posibles fuentes de variación en los genes del cloroplasto puede ser la expresión de los mismos. Hemos visto que en el caso de *Cuscuta reflexa* algunos de los genes fotosintéticos se expresan pero a muy bajos niveles (como el caso de *rpsL*). En el cloroplasto hay edición de ARNm, esto es el cambio, por ejemplo, de un codón ACG a AUG (que es el codón de inicio para la traducción del ARNm). Las proteínas editoras son de origen nuclear. Es probable que algunos genes en el cloroplasto de las algas incoloras o de parásitos como el género *Plasmodium* hayan sido "silenciados" por medio de este mecanismo de edición.

La presencia de regiones no traducidas en los ARNm, la unión del mensajero a la proteína, e incluso mutaciones nucleares pueden ocasionar inestabilidad en el ARN mensajero de una proteína y regular su expresión. Es posible que algunos de los factores que inician la traducción estén codificados en el núcleo y que por lo tanto, al ocurrir una mutación en estos genes, la traducción en el cloroplasto queda inhibida. Si alguno de los genes para las subunidades ribosomales del cloroplasto no existe, esto puede ser indicio de una traducción ineficiente. (Mayfield *et al.*, 1995).

Por otra parte, los genes de cloroplastos y mitocondrias se heredan por vía uniparental, materna casi siempre (Birky, 1995). Los mecanismos de cómo ocurre esto no se conocen, pero existen varios modelos, los cuales se aplican sólo a los organismos con reproducción sexual. Cabe aclarar que los géneros *Prototheca* y *Euglena* sólo tienen reproducción asexual, por lo que es necesario buscar otro tipo de modelo.

a) Precigóticos: en los que uno de los gametos pierde a los organelos, por exclusión, durante la división.

b) Durante la fertilización: el propio cigoto excluye a los organelos de uno de los gametos, o bien no hay intercambio de organelos.

c) Determinación del cigoto: por degradación de los genes de los organelos de uno de los padres, por ejemplo.

d) Estocástica: ocurre al azar y puede ser que uno de los tejidos elimine a los organelos de uno de los gametos.

Una de las propuestas de la ventaja de que ocurra una herencia uniparental es que así se pueden eliminar "ADNs egoístas" que podrían causar problemas al organismo que los heredara. Lo mismo se aplica para un genoma de organelo completo o para plásmidos que se encuentran dentro del genoma. Un gene nuclear mutado que favoreciera a uno de los mecanismos de herencia uniparental podría aumentar su frecuencia y hacer que toda la población de organismos herede sólo el genoma del organelo de uno de los padres. Incluso se piensa que un gene por sí solo puede promover su fijación y provocar que se favorezca la presencia de los organelos de uno de los progenitores sobre el otro.

Asimismo sólo uno de estos mecanismos de la pérdida de la función fotosintética, puede ser muy complicado. Sin embargo, es posible que alguno de los genes nucleares mutara y favoreciera a los organelos de un progenitor. En específico, este progenitor tendría cloroplastos que gradualmente perdieron alguno de los genes fotosintéticos, por los mecanismos señalados arriba. Los cloroplastos "incoloros" serían seleccionados por el organismo. Este organismo seguramente se desarrollaría en un ambiente nada favorable para la actividad fotosintética. Por ejemplo, la ausencia de luz de una longitud de onda adecuada o de nutrientes específicos para ello. El cambio o la pérdida de estos genes debe fijarse en el genoma y entonces generar el cambio. Cabe señalar, que el intercambio de nutrientes con el huésped, en el caso de los organismos parásitos, debe ser importante para que se realicen estos procesos.

Agradecimientos

A los doctores Carlos Gómez Lojero y Diego González Halphen por la revisión cuidadosa de este texto y las discusiones y sugerencias para mejorarlo. A la Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel por sus recomendaciones y su ayuda. A la Dra. Ariane Ateia por sus discusiones acerca del tema y a la M.en I.B.B. Rosalinda Tapia por su ayuda.

Lista de abreviaturas y de términos no explicados en el texto

- A+T: adenina + timina.
 ADN: cifras de Ácido desoxirribonucleico.
 ADNcl: ADN de cloroplasto.
 ADNpt: ADN de plástido (en general).
 ADNmt: ADN de mitocondria
 ADNn: ADN nuclear.
 ARNpol: ARN polimerasa.
 ARNr: ARN ribosomal
 ARNt^{aa}: ARN de transferencia, el superíndice indica el aminoácido que llevan.
 G+C: guanina + citocina,
 kbs: kilobases.
 Northern: técnica que se utiliza para transferir ARN a una membrana de nitrocelulosa o nylon para después unirle un fragmento de ADN marcado radiactivamente que sólo se acople a una secuencia específica del ARN inmovilizado.
 ORF: open reading frame, regiones del ADN que tienen un marco de lectura abierta, es decir, que pueden traducirse a proteína sin encontrar, a lo largo de ellas, codones de término. Regularmente se desconoce para qué codifican estas secuencias.
 P_b: pares de bases,
 PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
 Primeros: Fragmentos de ADN con una secuencia de nucleótidos específica que se unen a un templado de ADN. Estos fragmentos funcionan como "cebadores" de la reacción de síntesis de una nueva cadena de ADN complementaria al templado. Sirven de indicadores para que se una la ADN polimerasa.
 Transcrito: Corresponde al ARN mensajero que se transcribe. En general, esto es lo que se mide para saber la cantidad de ARN m que se obtiene en una célula.
 RubisC/O: Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa; formalmente ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa.
 Southern: técnica en la que se transfiere ADN a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Posteriormente se le puede unir un fragmento de ADN marcado radiactivamente que sólo se acople a una secuencia específica del ADN inmovilizado.

Literatura citada

Birky C.W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **92**: 11331-11338.

Blamire J., Flechtner V.R. y Sager R. 1974. Regulation of nuclear DNA replication by the chloroplast in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **71**:2867-2871.
 Boudreau E., Lemieux C., Otis C. y Turmel M. 1994. Conserved gene clusters in the highly rearranged chloroplast genomes of *Chlamydomonas moewusii* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*. **24**: 585-602.
 Bowsher C.G., Tetlow L.J., Lacey A.E., Hanke G.T. y Emes M.J. 1996. Integration of metabolism in non-Photosynthetic plastids of higher plants. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences*. **319**:853-860
 Brennicke A., Grohmann L., Hiessel R., Knoop V. y Schuster W. 1993. The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of the gene transfer in higher plants. *Federation of European Biochemical Societies*. **325**(1,2): 140-145.
 Clegg M.T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**:363-367.
 Clegg M.T., Gaut B.S., LeARN Jr., G.H. y Morton B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 6795-6801.
 Denovan-Wright E.M. y Lee R.W.1992. Comparative analysis of the mitochondrial genomes of *Chlamydomonas rugametos* and *Chlamydomonas moewusii*. *Current Genetics* **21**: 197-202.
 de Pamphilis C.W. y Palmer J.D. 1990. Loss of photosynthetic and chlororespiration genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* **348**:337-339.
 Douglas S. 1994. Chloroplast Origin and Evolution. En *The molecular biology of Cyanobacteria*. Bryant (Ed). Academic Pub. Holanda, p.p. 91-118.
 Douwe de Boer A. y Weisbeek P. J. 1991. Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* **1071**(3):221-253.
 Feagin J.E. 1992. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**:145-148.
 Gadeström P. 1996. Interactions between mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1275**:38-40.
 Gardner M.J., Bates P.A., Ling I.T., Moore D.J., McCready S., Gunasekera M.B.R., Wilson R.J.M., Williamson D.H. 1988. Mitochondrial DNA of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **31**:11-48.
 Gardner M.J., Williamson D.H. y Wilson R.J.M. 1991a. A circular DNA in malaria parasites encodes and RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Molecular and Biochemical Parasitology* **44**:115-124.
 Gardner M.J., Feagin J.E., Moore D.F., Spencer D.F., Gray M.W., Williamson D.H., Wilson R.J.M. 1991b. Organiza-

- tion and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 48:77-88.
- Gardner M.J., Goldman N., Barnett P., Moore P.W., Rangachari K., Strath M., Whyte A., Williamson D.H., Wilson R.J.M. 1994. Phylogenetic analysis of the *rpoB* gene from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66:221-231.
- Gockel G., Hachtel W., Baier S., Fliss C. y Henke M. 1994. Genes for components of the chloroplast translational apparatus are conserved in the reduced 73-kb plastid DNA of the nonphotosynthetic euglenoid *Astasia longa*. *Current Genetics* 26:256-262.
- Haberhausen G., Valentin K. y Zetsche K. 1992. Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Molecular and General Genetics* 232:154-161.
- Hallicek R., Hong L., Drager R., Favreau M.R., Monfort A., Orsat B., Spielman A. y Scutz E. 1993. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research* 21(15):3537-3544.
- Harris E.H., Boynton J.E. y Gillham N.W. 1994. Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiological Reviews* 58(4):700-754.
- Hashimoto-T., Nakamura Y., Kamaishi T., Nakamura F., Adachi J., Okamoto K., Hasekawa M. 1995. Phylogenetic place of mitochondrion-lacking protozoan, *Giardia lamblia*, inferred from amino acid sequences of elongation factor 2. *Molecular Biology and Evolution* 12(5):782-93.
- Hirasaka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C-R., Meng B-Y., Li Y-Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M., 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet* 217:185-194.
- Joseph J.T., Aldritt S.M., Unnasch T., Puijalón O., Wirth D.F. 1989. Characterization of a conserved extracomposomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Molecular and Cellular Biology* 9(9):3621-3629.
- Kiebler M., Becker K., Pfanner N. y Neupert W. 1993. Mitochondrial protein import: specific recognition and membrane translocation of preproteins. *Membrane Biology* 135(3):191-207.
- Kurland C.G. 1992. Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code. *BioEssays* 14(10):709-714.
- Lee, J.C. 1991. Ribosomes. En: Rose, A.H. y Harrison, J.S. The Yeasts. Academic Press. E.U.A. 490-540.
- Leedale G.F. 1967. Euglenoid Flagellates. Prentice Hall, Inc. N.J. E.U.A. 242 p.p.
- Machado M.A., y Zetsche K. 1990. A structural, functional and molecular analysis of plastids of the holoparasites *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europaea*. *Planta* 181:91-96.
- Mayfield S.P., Yohn C.B., Cohen A. y Danon, A. 1995. Regulation of chloroplast gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:147-166.
- Margulis L., 1990. Introduction. En: Margulis, L., Corliss J.O., Melkonian M., y Chapman D.J. (Eds.). *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett Pub. Boston, xi-xxiii.
- McFadden G.I., Reith M.E., Munholland J., Lang-Unnasch N. 1996. Plastid in human parasites. *Nature* 381:482.
- Melkonian M. 1990. Phylum Chlorophyta. En: Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M., y Chapman, D.J. (Eds.) *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett Pub. Boston, 597-616.
- Nadakavukareni M.J. 1977. An ultrastructural survey of the genus *Prototheca* with special reference to plastids. *Mycopathologia* 61(2):117-119.
- Nes W.D., Norton R.A., Crumley F.G., Madigan S.J. y Katz E.R. 1990. Sterol phylogenesis and algal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87:7565-7569.
- Nungent J.M. y Palmer J.D. 1991. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66:473-481.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572-574.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H. 1986. Complete nucleotide sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 4:148-175.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H. 1988. Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome I. Cloning and gene identification. *Journal of Molecular Biology* 203:281-298.
- Pfanner N. y Neupert W. 1990. The mitochondrial protein import apparatus. *Annual Review of Biochemistry* 59:331-353.
- Patterson J.D. y Larsen J. 1991. *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The Systematics Association, Vol 45. Clarendon Press, Oxford Univ Press, Nueva York, 505 p.p.
- Round F.E. 1980. The evolution of pigmented and unpigmented unicells a reconsideration of the Protista. *BioSystems* 12:61-69.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Havaishida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Ohokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torozawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H. y Sugiura M. 1986. The complete deduced sequence of

- the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The European Molecular Biology Organization Journal* 5:2043-2049.
- Siemeister G. y Hachtel W. 1989. A circular 73 kb DNA from the colourless flagellate *Astasia longa* that resembles the chloroplast DNA of *Euglena*: restriction and gene map. *Current Genetics* 15:435-441.
- Siemeister G. y Hachtel W. 1990a. Structure and expression of a gene encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) in the colourless euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Plant Molecular Biology* 14:825-833.
- Siemeister G. y Hachtel W., 1990b. Organization and nucleotide sequence of ribosomal RNA genes on a circular 73 kbp DNA from the colourless flagellate *Astasia longa*. *Current Genetics* 17:433-438.
- Siemeister G., Buchhol C., Harchel W. 1990c. Genes for the plastid elongation factor Tu and ribosomal protein S7 and six tRNA genes on the 73 kbp DNA from *Astasia longa* that resembles the chloroplast DNA of *Euglena*. *Molecular and General Genetics* 220:425-432.
- Siu C-H, Chiang K-S., Swift H. 1975. Characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in the colorless alga *Polytoma*. *Journal of Molecular Biology* 98:369-391.
- Sleigh M.A. 1989. *Protozoa and other protists*. Cambridge Univ. Press. Nueva York. EUA. 342 p.p.
- Stryer L. 1988. *Biochemistry*. 3a ed. W.H.Freeman and Co. Nueva York. EUA. p.p. 397-426, 517-546.
- Tarassov I. y Entelis, N.S. 1992. Mitochondrially-imported cytoplasmic Lys-tRNA systems. *Nucleic Acids Research*. 20(6): 1277-1281.
- Taylor F.J.R. 1990. Phylum Dinoflagellata. En: Margulis, L. Corliss J.O., Melkonian M., y Chapman D.J. (Eds.) *Handbook of Protozoista*. Jones and Bartlett Pub. Boston, 270-287.
- Valentin K. 1993. *SecA* is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of plastid genomes and the thylakoid protein import apparatus. *Molecular and General Genetics* 236:245-250.
- Van den Hoek C., Mann D.G. y Jahns H.M. 1995. *Algae, an Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. EUA.
- von Heijne G. 1986. Why mitochondria need a genome. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 198(1): 1-4.
- Walne P.L. y Kivic P.A. 1990. Phylum Euglenida. En: *Handbook of Protozoista*. Margulis, L. Corliss, J.O., Melkonian, M., y Chapman, D.J. (Eds.) Jones and Bartlett Pub. Boston. EUA p.p. 270-287.
- Williamson S.E., Doolittle W.F. 1983. Gene for the tRNA^{Leu} and tRNA^{Met} in the spacer between the 16S and 23S rRNA genes of a blue-green alga: strong homology to chloroplast tRNA genes and tRNA genes of the *Escherichia coli rrrD* gene cluster. *Nucleic Acids Research* 11:225-235.
- Wilson R.J.M., Fry M., Gardner M.J., Feagin J-E., Williamson D.H. 1992. Subcellular fractionation of the two organelle DNAs of malaria parasites. *Current Genetics* 21: 405-408.
- Wimpee C.F., Wrobel R.L., Garvin D.K. 1991. An aberrant plastid ribosomal RNA gene cluster in the root parasite *Conopholis americana*. *Plant Molecular Biology* 18:273-285.
- Wimpee C.F., Morgan R. y Wrobel L. 1992. Loss of transfer RNA genes from the plastid 16S-23S ribosomal RNA gene spacer in a parasitic plant. *Current Genetics* 21:417-422.
- Wolff G. y Kück U. 1990. The structural analysis of the mitochondrial 5S rRNA implies a close phylogenetic relationship between mitochondria from plants and from the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii*. *Current Genetics* 177:347-351.
- Wolff G., Burger G., Lang B.F. y Kück U. 1993. Mitochondrial genes in the colourless alga *Prototheca wickerhamii* resemble plant genes in their exons but fungal genes in their introns. *Nucleic Acids Research* 21(3):719-726.
- Wolff G., Plante I., Lang B.F., Kück U, y Burger G. 1994. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. *Journal of Molecular Biology* 237:75-86.
- Wolfe K., Li W.H., y Sharp P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84:9054-9058.
- Wolfe K.H., Morden C.W. y Palmer J. 1992a. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:10648-10652.
- Wolfe K.H., Morden C., Ems S.C. y Palmer J.D. 1992b. Rapid evolution of the plastid translational apparatus in a nonphotosynthetic plant: loss or accelerated sequence evolution of tRNA and ribosomal protein genes. *Journal of Molecular Evolution* 35:304-317.
- Woolrich A., Koestkubliatt E. y Szaniawski W. 1994. Cutaneous protothecosis and AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31(5, parte 2):921-924.
- Young R.A., Mackalis R. y Steitz J.A. 1979. Sequences of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes encoding tRNA^{Ser} and ribosomal protein L20. *Journal of Biological Chemistry* 254:3264-3271.