

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA**

**LORENA MORALES SAINZ**

Identificación de las subunidades COX2A y COX2B de la  
citocromo *c* oxidasa en *Toxoplasma gondii*

MÉXICO, D.F. 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Salvador Uribe Carbajal

Vocal: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Secretario: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

1er. Suplente: Dra. Bertha González Pedrajo

2°. Suplente: Dra. Xóchitl Pérez Martínez

Instituto de Fisiología Celular  
Facultad de Química.

Asesor: Dr. Diego González Halphen

Sustentante: Lorena Morales Sainz

El presente trabajo se realizó en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con apoyo de un donativo del programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica, número IN218705-3.

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Diego González Halphen por muchas cosas, primero por la oportunidad de realizar mi trabajo de maestría en su laboratorio (324 N del IFC), después por su sabiduría compartida, por su paciencia y confianza en mi; finalmente por todo lo que obtuve en este tiempo de estudio, los conocimientos, la recuperación de la confianza en la investigación, la enseñanza que cada experimento me aporta y la planeación de ellos en condiciones extremas. Pero sobre todo por el gran valor humano con el que día a día trabajamos en este laboratorio, un equipo de amigos y aprendices de científicos con plena convicción en que la ciencia nos da más que desvelos y fines de semana frustrados, a todos ellos:

A mis amigos y compañeros del Instituto de fisiología Celular; Miriam, Paco, Valentín, Adelma, Hector, Alain, Maggy, Ernesto, Salvador, Alejandro Cabrera, Itzel, Miguel (Pollo), Yolanda y Araceli con los cuales he compartido innumerables tardes, carcajadas, desalientos, desesperación, angustia, apodos, burlas y juntos hemos hecho que los laboratorios sean nuestra casa. Por supuesto a Luis, Fernando y Sergio de los cuales aprendí mucho más de lo que les enseñé. ¡¡GRACIAS!!

A mis asesores el Dr. Salvador Uribe y a el Dr. Felipe Cruz los cuales me hicieron sufrir, pero de los cuales adquirí cada momento aprendizajes y enseñanzas.

A la QBP Miriam Vázquez por su gran apoyo técnico a lo largo de este trabajo.

## **DEDICATORIAS**

A lo largo de mi vida siempre he tenido gente que ha decidido aceptar el reto de compartir el espacio y el tiempo en que hemos coincidido, a todos ellos sin excepción quiero agradecerles por esta oportunidad de vida. Algunas veces solo hemos compartido algunas agradables y sinceras sonrisas o algunas frases, otras nos hemos hecho grandes amigos y algunos otros se han convertido en los grandes amores de mi vida... Pero sin duda alguna existen personas que han marcado mi vida y mi existir habitando día y noche en mi alma.

Todo lo que hoy soy es gracias a mis padres, mami... y papi... son lo mejor de mi vida hoy y siempre. Ustedes me han hecho una mujer fuerte, feliz, segura e inmensamente llena de amor y respeto a mi misma y a los demás, gracias por cada día y cada noche, por todos sus esfuerzos y todo su amor... ¡GRACIAS! .

A mi hermana Karla quiero agradecer el simple hecho de existir y compartir conmigo el regalo divino de la vida. Desde el momento que llegaste a nuestra vida aprendí a amar sin poseer, a compartir y a quererte como a nadie. Gracias gordis... y recuerda que siempre más allá de las parejas o vida que elijamos solo seremos hermanas tu y yo.

A mi abuelita Aura, porque ella siempre con su ejemplo de amor me ha llenado día a día. Porque de ti partimos todo un linaje de mujeres triunfadoras, felices y llenas de amor. Gracias por darnos no solo la vida sino enseñarnos a vivirla felices a cada momento transmitiendo humildad, respeto y amor a los que nos rodean.

A ti Peter, porque nuestros corazones laten fuerte, firmes y acompasados, gracias por la fuerza que me das día a día. Porque te amo y me amas.

A mis tios y tias... cada uno de ustedes son un ejemplo de amor, respeto y sabiduría que solo puedo amar. Porque somos la mejor familia en la que hemos podido vivir, disfrutémonos.

Dany... ésta es una oportunidad de agradecerte todo nuestro tiempo juntos, toda nuestra infancia compartida y nuestro amor recíproco. Sé que ahora somos una mujer y un hombre independientes, pero hoy somos lo que aprendimos a ser de pequeños "felices". Gracias por la confianza y tu ejemplo de vida. Jamás he siquiera dudado por un segundo de lo mucho que te quiero y respeto, nunca lo dudes tú tampoco.

A Manuel, Jay, Paola, Miguel, Arturo y Gaby... por nuestra amistad. Por cada exámen, por cada tarde en la biblioteca, por cada clase de siete y de nueve, por cada uno de los planes que nos platicamos, por cada risa, por cada llanto, por los viajes, los enojos y sueños compartidos porque los quiero mucho y ha sido un placer haberles conocido.

A Budbu y Bombón....jajajaja, chicas, son mis mejores amigas y lo saben. Entre nosotras existe todo lo que define la amistad cada día en mi alma están ustedes, a veces calladas y a veces a gritos. Porque me conocen como nadie y las conozco como la palma de mi mano; Gaby Dios te regaló a Danna, ámense inmensamente la una a la otra. Budbu, solo tenemos una vida, vívela intensa, feliz y segura de que eres una mujer hermosa, inteligente y fuerte, aunque a veces lo dudas...¡Las amo y quiero verlas felices! pero esto es decisión de cada quien, no duden e inténtenlo cada día y en cada momento.

*“Que La Tierra Se Vaya Haciendo  
Camino Ante Tus Pasos,  
Que El Viento Sople A Tus Espaldas,  
Que El Sol Brille Cálido Sobre Tu Rostro,  
Que La Lluvia Caiga Suavemente Sobre Tus Campos.  
Y Hasta Tanto Volvamos A Encontrarnos,  
Dios Te Guarde En La Palma De Su Mano”*

## INDICE

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
La mitocondria	1
La fosforilación oxidativa	3
Complejo I NADH o Ubiquinona oxidorreductasa	4
Complejo II o Succinato ubiquinona oxidorreductasa	4
Complejo III o Ubiquinona citocromo <i>c</i> oxidorreductasa	4
Complejo IV o Citocromo <i>c</i> oxidasa	5
Complejo V o F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> - ATP sintasa	7
Genoma mitocondrial	7
Migración de genes	7
Parásitos apicomplejos	10
<i>Toxoplasma gondii</i>	13
<b>ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL TRABAJO</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
Cultivo de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
Generación de anticuerpos	18
Extracción y purificación de mitocondrias	19

Caracterización de la fracción mitocondrial .....	20
Cuantificación de la proteína .....	20
Electroforesis en geles azules .....	21
Geles desnaturalizantes de segunda dimensión .....	24
Análisis de proteínas .....	24
Soluciones .....	25
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
Análisis de secuencias .....	27
Diseño y síntesis del péptido sintético .....	28
Sobreexpresión de COX2B y generación de anticuerpo .....	28
Cultivo y obtención de <i>T. gondii</i> .....	29
Identificación inmunoquímica de las subunidades COX2A y COX2B .....	30
Aislamiento y purificación de mitocondrias .....	30
Identificación inmunoquímica de las proteínas COX2A y COX2B en <i>Polytomella sp</i> .....	32
Geles en dos dimensiones para la separación e identificación de las subunidades que constituyen a los complejos mitocondriales de <i>T. gondii</i> .....	33
Secuenciación y LC MS/MS .....	36
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
pDNA	Ácido desoxirribonucleico del plástido
PVM	Vacuola membranosa parasitófora
DTT	Ditiotreitol
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
ATP	Adenosina trifosfato
COX 2	Proteína correspondiente a la subunidad 2 de la citocromo <i>c</i> oxidasa
COX 2A	Proteína correspondiente a la subunidad 2A de la citocromo <i>c</i> oxidasa
COX 2B	Proteína correspondiente a la subunidad 2B de la citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>Cox2</i>	Gene correspondiente a la subunidad 2 de la citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>Cox2a</i>	Gene correspondiente a la subunidad 2 A de la citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>Cox2b</i>	Gene correspondiente a la subunidad 2 B de la citocromo <i>c</i> oxidasa

## RESUMEN

La citocromo *c* oxidasa (COX) es una oxidasa terminal tipo  $aa_3$  de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Contiene cuatro grupos prostéticos, un grupo hemo A, un hemo  $A_3$ , un centro diatómico  $Cu_A$  y un sitio de unión a cobre  $Cu_B$ . El centro  $Cu_A$  es esencial para la actividad redox del complejo y se encuentra asociado a la subunidad II del complejo. En algunas especies como plantas leguminosas, el gen *cox2* está localizado en el núcleo y su proteína COX2 es sintetizada en el citosol e importada al interior de la mitocondria. En algas clorofíceas (como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp) y en parásitos apicomplejos (como *Toxoplasma gondii*), la subunidad correspondiente, además de expresarse en el citosol, esta fragmentada en dos polipéptidos, denominados COX2A y COX2B. Estos polipéptidos sintetizados en el citosol deben ser importados de forma independiente a la mitocondria, formando un heterodímero COX2A/COX2B altamente parecido, estructuralmente y funcionalmente a la subunidad COX2 encontrada en la mayoría de los eucariotes. Dos extensiones de aminoácidos cortas, una en el extremo carboxi-terminal de COX2A y otra en el extremo amino-terminal de COX2B, que no se encuentran en las subunidades COX2 convencionales, parecen ser específicas de las subunidades COX2 heterodiméricas, ya que no se encuentran en ninguna subunidad COX2 ortodoxa. Se piensa que dichas extensiones participan en la interacción entre las subunidades COX2A y COX2B estabilizando su unión. En este trabajo se presenta la evidencia de que estos dos polipéptidos se encuentran como unidades independientes en la mitocondria del parásito apicomplejo *T. Gondii*; se identificó una masa molecular aparente de 24.0 kDa para COX2A y una de 13.2 kDa para COX2B en geles azules nativos de dos dimensiones, con lo que se establece que su procesamiento puede ser distinto al de las algas clorofíceas; además poseen presecuencias mitocondriales para ambos fragmentos que son más largas que las comunes, para COX2B de 53 aminoácidos y para COX2A de 94 aminoácidos.

Hasta el momento son pocos los trabajos conocidos sobre proteínas y complejos mitocondriales de *T. Gondii*. Con este trabajo no sólo se muestra la presencia de COX2A y COX2B como subunidades independientes, sino que se aporta una aproximación bioquímica importante al estudio del proteoma mitocondrial del parásito apicomplejo *T. gondii*.

## INTRODUCCIÓN

### La mitocondria

La mitocondria es un organelo que está compuesto por dos membranas que delimitan al espacio intermembranal y a la matriz. El plegamiento en crestas provee una superficie muy amplia a la membrana interna, aumentando así la capacidad de síntesis de ATP: la presencia de más crestas indica mayores requerimientos de energía y el número de ellas en las mitocondrias varía de tejido a tejido (figura 1). La función principal de las mitocondrias en las células eucariotas es la producción de energía en forma de ATP a partir de piruvato y ácidos grasos. Sin mitocondrias, todo el ATP debería obtenerse de los procesos anaeróbicos, y no sería posible la vida en muchos de los organismos, incluyendo la humana. Además de la producción de ATP, otras funciones de las mitocondrias incluyen el mantenimiento del estado de reducción /oxidación (redox) en la célula, de la detoxificación y la producción de calor (Zorov y cols., 1997). Las mitocondrias también tienen un papel importante en la apoptosis; es decir, la muerte celular programada (Kromer y cols., 1995).

Se piensa que en algún momento de la evolución de los seres vivos las mitocondrias tuvieron vida extracelular independiente. Varias evidencias apoyan esta teoría llamada endosimbiótica (Gray, 1992), donde una Archaeta retuvo en su interior una  $\alpha$ -proteobacteria. Algunas de las evidencias son que las mitocondrias contienen un genoma propio cuyos genes tienen similitud con genes bacterianos, que presentan reproducción por fisión binaria, capacidad de desplazamiento y sensibilidad hacia algunos agentes antimicrobianos. Las mitocondrias probablemente se originaron a partir de un ancestro de las actuales  $\alpha$ -protobacterias del género *Rickettsia* (Gray y col., 2001).

Las tres principales vías metabólicas que confluyen en la mitocondria son: el metabolismo del piruvato, la oxidación de ácidos grasos y la formación de acetil coenzima A (Acetil CoA) que alimenta al ciclo de Krebs. Estas tres vías junto con la cadena respiratoria, contribuyen a generar buena parte de la energía necesaria para el funcionamiento celular.

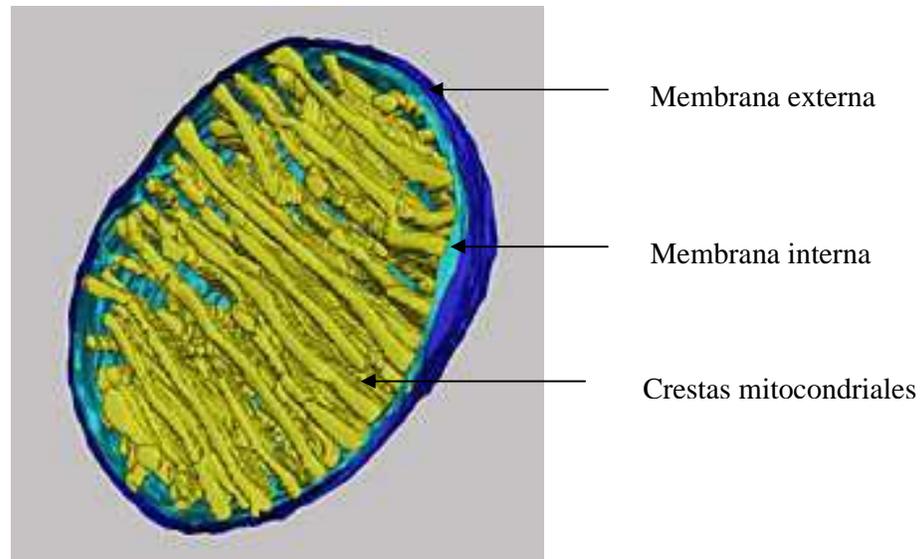


Figura 1. Imagen tridimensional de una mitocondria de cerebelo reconstruida termográficamente. El termograma fue segmentado contorneando regiones de membrana externa en azul, membrana interna en verde y crestas en amarillo respectivamente (Tomado de Perkins y cols., 1997).

Las mitocondrias poseen su propio DNA, con genes que codifican para diversas subunidades de las bombas de  $H^+$ . Asimismo, existen genes que codifican para los RNA ribosomales y para RNAs de transferencia. Las mitocondrias sintetizan algunas proteínas esenciales de la cadena respiratoria, por lo que es indispensable la información genética que poseen y la maquinaria para la replicación, transcripción y síntesis de proteínas. Los genes estructurales en la mitocondria codifican para proteínas muy hidrofóbicas, las cuales tienen dos o más regiones transmembranales, entre ellos encontramos a 7 genes que codifican las subunidades de la NADH deshidrogenasa (complejo I), un gene que codifica el citocromo b del complejo  $bc_1$  (complejo III), 3 genes de las tres subunidades más grandes de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) y 2 genes de las 2 subunidades del sector hidrofóbico de la ATP sintetasa (complejo V) (Anderson, 1981 y Lestienne, 1992).

En la cadena respiratoria, los polipéptidos de los complejos de la fosforilación oxidativa codificados en el genoma mitocondrial se sintetizan en ribosomas mitocondriales y se insertan en la membrana interna cotraduccionalmente. Sin embargo, la mitocondria también requiere de una gran cantidad de proteínas de importación que están codificadas en el genoma nuclear y que se sintetizan en los ribosomas citosólicos para después ser dirigidas hasta la

mitocondria, internalizadas en la matriz de este organelo y distribuidas hacia el compartimento o membrana donde ejercerán su función final (Haucke, 1997).

### La fosforilación oxidativa

El sistema de la fosforilación oxidativa está formado por 4 complejos enzimáticos multiméricos (figura 2), localizados en la membrana interna mitocondrial. Estas enzimas contienen flavinas, coenzima Q<sub>10</sub> (ubiquinona), centros de hierro-azufre, hemos y átomos de cobre. Los cinco complejos de la cadena respiratoria son: el complejo I (NADH-deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (ubiquinol citocromo *c* oxidorreductasa), el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) y el complejo V (ATP sintasa). Los complejos I, III, y IV transportan electrones de manera acoplada con la translocación de protones y el último (V) aprovecha el gradiente electroquímico para formar ATP.

Los electrones provenientes del NADH y FADH<sub>2</sub>, generados durante las reacciones de la

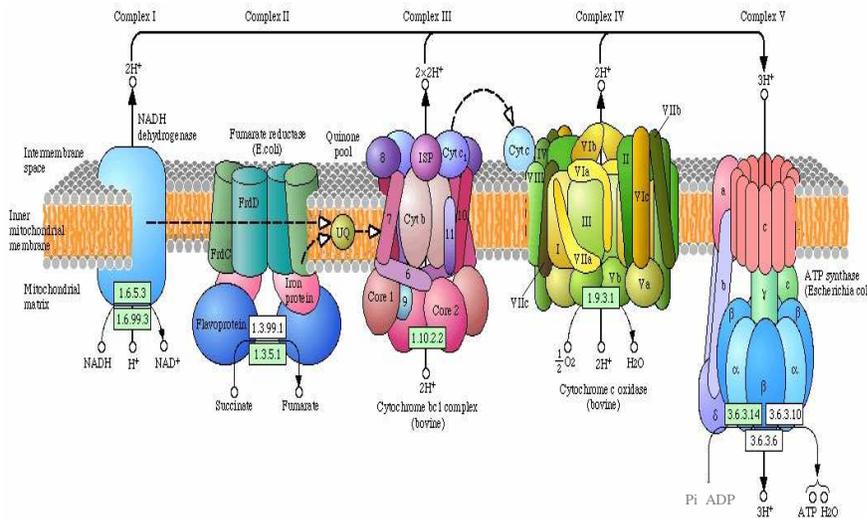


Figura 2. Representación de la cadena respiratoria con los complejos que la componen insertos en la membrana interna de la mitocondria. Tomado de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>

β oxidación y del ciclo de Krebs, alimentan el flujo de electrones en la cadena respiratoria, cuyo paso final oxidativo termina con la formación de agua. Para comprender mejor la estructura y función de la cadena respiratoria mitocondrial, se toman como ejemplo los componentes de la cadena respiratoria de los mamíferos, la cual es la que mejor se ha caracterizado.

### *Complejo I o NADH ubiquinona oxidoreductasa*

Este complejo es el componente proteico más grande de la cadena respiratoria y está compuesto por 45 subunidades (Carrol y cols., 2002). Estudios de microscopía sugieren que el complejo tiene la forma de una “L” expuesta a la matriz mitocondrial, constituida por una parte membranal y una parte periférica hidrofílica. El brazo de la “L” expuesto hacia la matriz mitocondrial que es el sitio de la oxidación del NADH. Los electrones del NADH son enviados hasta la ubiquinona por varias subunidades que contiene un mononucleótido de flavina (FNM) y varios centros hierro-azufre (FeS). En este complejo, por cada dos electrones, se traslocan cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial (Brandt, 1997).

### *Complejo II o succinato ubiquinona oxidoreductasa*

Este complejo enzimático perteneciente tanto al ciclo de Krebs como a la cadena respiratoria está asociado a la membrana interna mitocondrial; con sus cuatro subunidades el complejo II es el más pequeño de la cadena respiratoria. Su función es donar electrones del ciclo de Krebs a la ubiquinona (Hägerrhäll, 1997). Este complejo es el único que no bombea protones y por lo tanto no contribuye a la formación del gradiente electroquímico.

### *Ubiquinona*

Es una molécula muy hidrofóbica que está inmersa en la membrana interna y que recibe electrones del complejo I y II. La ubiquinona no sólo funciona como un transportador de electrones en la cadena respiratoria, sino también como un antioxidante en muchas membranas celulares (Pobezhimova y Voinikov, 2000).

### *Complejo III o ubiquinona citocromo c oxidoreductasa*

Esta enzima está compuesta por 11 subunidades y oxida la ubiquinona para reducir al citocromo *c*. Esta reacción está acoplada al movimiento de cuatro electrones, dos de ellos a través de la membrana interna mediante el llamado ciclo Q. El citocromo *b* del complejo III contiene dos grupos hemo que tienen distintos potenciales redox (hemos *b*<sub>560</sub> y *b*<sub>566</sub>). En cada ciclo, de los dos electrones del ubiquinol, un electrón es transportado por la proteína Rieske (FeS) al citocromo *c*<sub>1</sub>, para reducir el citocromo *c*, mientras que el otro electrón es transportado por los dos hemos *b* para formar ubisemiquinona (Q) a partir de ubiquinona en el otro lado de la membrana interna. La repetición de este ciclo Q produce otro ubiquinol y resulta en el transporte neto de protones a través de la membrana interna (Trumpower, 1990).

### *Citocromo c*

Es una proteína soluble de 12 kDa, que contiene un grupo hemo tipo C como grupo redox, ligado covalentemente a través de dos residuos de cisteína.

El citocromo *c* transporta los electrones del complejo III al complejo IV y está situado en el espacio intermembranal (Pettigrew y Moore, 1978).

#### *Complejo IV o citocromo c oxidasa*

Es el componente terminal de la respiración mitocondrial. Se encarga de reducir al oxígeno molecular y transformarlo en agua a partir de los electrones que recibe del citocromo *c* soluble presente en el espacio intermembranal. Acoplada a esta reacción hay una traslocación de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal (Calboun y col., 1994). La composición de subunidades de la oxidasa es variable, aunque en todos los organismos se ha visto que la composición mínima es de tres subunidades: subunidad I (COXI), la subunidad II (COXII) y subunidad III (COXIII). Se ha reportado que en mamíferos hay 13 subunidades (Kadenbach y col., 1995), en levadura hay 9 (Poyton y col., 1995) y en *Paracoccus denitrificans* hay 4 (Iwata y col., 1995) (figura 3A).

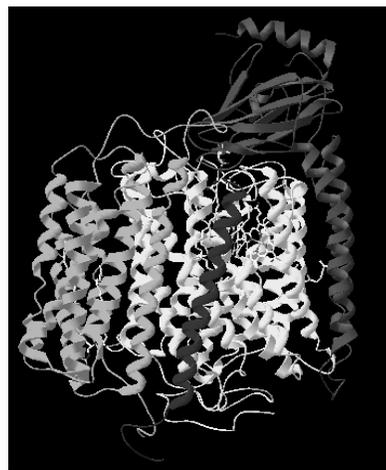
En la actualidad se conocen las estructuras cristalinas a 2.8 Å de resolución de la citocromo *c* oxidasa de *Paracoccus denitrificans* (Iwata y col., 1995) y de bovino (Tsukihara y col., 1996). En estas estructuras se observa que las 3 subunidades básicas de la enzima tienen un arreglo topológico muy similar entre ambos organismos. Podemos decir que tanto las secuencias como las estructuras de las subunidades COXI, COXII y COXIII están conservadas en la gran mayoría de las especies. En la figura 3 se muestran las estructuras cristalinas de estas subunidades en la citocromo *c* oxidasa de *P. denitrificans* (Iwata y col., 1995).

La subunidad I (COX I): es una subunidad muy hidrofóbica, con 12 cruces transmembranales y se encuentra muy conservada entre las especies. Aquí se encuentran los centros metálicos que se encargan de reducir al oxígeno molecular. Tiene grupos hemo tipo A y A<sub>3</sub> y un átomo de cobre (Cu<sub>A</sub>).

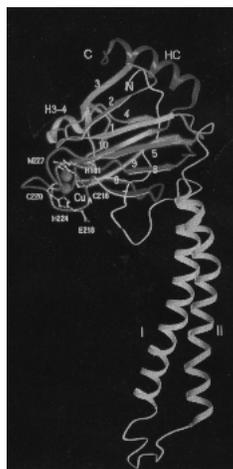
La subunidad II (COXII): es una proteína compuesta por tres segmentos, el primero es una región pequeña amino terminal que se localiza en el espacio intermembranal; el segundo corresponde a dos hélices transmembranales y finalmente hay una región en el extremo C-terminal que es hidrofílica y que se localiza en el espacio intermembranal. Esta última sección contiene los residuos que unen al centro bimetálico de cobre (Cu<sub>B</sub>), el cual recibe los electrones provenientes del citocromo *c* reducido. Los electrones son transportados al hemo A y luego al centro binuclear formado por un cobre Cu<sub>B</sub> y un hemo A<sub>3</sub>. Se ha reportado que existe una región aromática altamente conservada después del segundo cruce transmembranal, cuya función es importante para la actividad de la enzima (Overholtzer y cols., 1996). Esta región participa en la transferencia de electrones desde el citocromo *c* hasta los centros metálicos de la subunidad I. Witt y cols., (1998) demostraron que uno de los triptofanos

presentes en esta región es el aceptor inicial de los electrones provenientes del citocromo *c* reducido. Tanto la hélice II como ciertas regiones del extremo C-terminal tienen un alto grado de conservación (Holm y cols., 1987) (figura 3B).

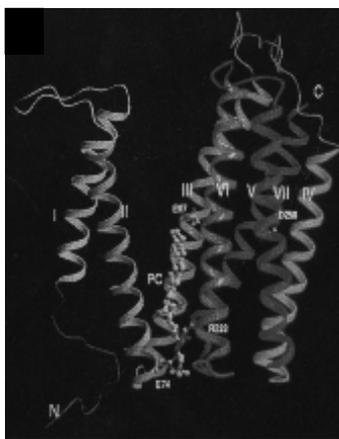
La subunidad III (COXIII): es una proteína altamente hidrofóbica, con 7 cruces transmembranales. De las tres subunidades, ésta es la menos conservada. No ha sido aclarada con certeza la función de esta subunidad ya que no posee grupos prostéticos que pudieran participar en las reacciones redox (figura 3C). El transporte de electrones causa la translocación de cuatro protones a través de la membrana interna, sin embargo todavía no se ha establecido el mecanismo preciso de esta translocación (Saraste, 1999). La citocromo *c* oxidasa es responsable de más del 90% del consumo de oxígeno de todos los organismos en la biosfera.



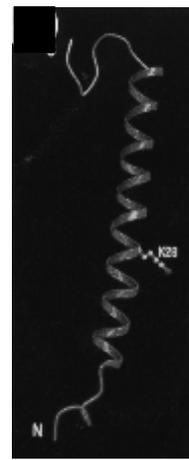
A



B



C



D

Figura 3.- A) Estructura cristalográfica de la citocromo *c* oxidasa de *Paracoccus denitrificans*, B) subunidad II, C) subunidad III y D) subunidad IV (Tomada de Iwata y cols., 1995 ).

### *Complejo V o $F_0F_1$ -ATP sintasa*

Este complejo tiene una masa molecular de más de 500 kDa y está constituido por 16 subunidades distintas. La fuerza protón-motriz generada por los complejos I, III y IV es utilizada por la ATP sintasa para producir ATP. Por cada ATP sintetizado se requiere la translocación de tres o cuatro protones (Boyer, 1997). La sección membranal ( $F_0$ ) contiene un canal para los protones y está conectada con la parte catalítica hidrofílica ( $F_1$ ) que está expuesta hacia la matriz mitocondrial. La sección  $F_0$  está compuesta por lo menos de 9 subunidades, de las cuales sólo las subunidades *a*, *b* y *c* tienen homólogos en *E. coli*.

### **El genoma mitocondrial**

De acuerdo a la teoría del endosimbionte, la mitocondria se originó de ancestros bacterianos cercanos a la familia de las Rickettsias (Andersson y col., 1998), que se incorporaron a una célula huésped. En la actualidad la mitocondria es un organelo semiautónomo, porque tiene su propio genoma que se replica y expresa, pero es incapaz de tener existencia independiente, ya que a lo largo de la evolución gran parte de su genoma ha sido exportado e integrado al DNA nuclear.

El DNA mitocondrial tiene una gran diversidad en cuanto a estructura, contenido y organización de genes, así como diferentes modos de expresión y replicación en los diferentes organismos. En mamíferos es un genoma compacto, entre 16 y 20 kb, y sin intrones, mientras que en plantas puede ser de 10 a 100 veces más grande, con muchas regiones intergénicas e intrones (Attardi, 1988; Schuster y Brennicke, 1994).

### **Migración de genes**

A partir del conjunto de 1000 genes o más que debieron encontrarse en el genoma del ancestro mitocondrial, hoy en día las mitocondrias exhiben entre 5 (*Plasmodium falciparum*) y 100 (*Reclinomonas americana*) genes. De esta manera, los genomas mitocondriales actuales representan sólo una fracción de aquellos genes que estaban presentes en el endosimbionte. La mayor parte de esta pérdida de material genético debe haber sucedido durante el establecimiento de la protomitocondria, y en principio puede ser el resultado de dos fenómenos distintos: la eliminación de genes no esenciales o redundantes, cuya función pudo ser sustituida por los genes nucleares del hospedero, y la exportación de material genético desde la protomitocondria hacia el núcleo celular (Lang, 1999; Kurland, 2000).

En los últimos años el estudio de genes que han cambiado su localización del genoma mitocondrial al nuclear ha permitido identificar pasos intermedios del fenómeno de migración de genes. Entre ellos, destacan los resultados obtenidos con los genes *cox2*, *rsp12* y *rpl2*:

a) En el grupo de plantas leguminosas es posible observar la coexistencia de dos copias diferentes del gen *cox2* (el gen que codifica para la subunidad II de la citocromo oxidasa). Se determinó que al menos en cinco géneros de leguminosas el gen *cox2* se encuentra presente tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear, y que ambas copias son transcritas y editadas (Adams, 1999). También en este grupo de plantas es posible observar pasos intermedios en la evolución de la migración del gen *cox2* al núcleo: en el chícharo, una copia del gen se encuentra en la mitocondria y la otra en el núcleo. Sin embargo la copia nuclear no es funcional (ya hubo migración, pero no una activación exitosa). En el caso de la soya la copia mitocondrial se encuentra intacta, sin embargo no es posible detectar ningún transcrito en la mitocondria, por lo que no se trata de un gen activo; en cambio, el gen nuclear sí se expresa (migración, integración y activación exitosa, seguidas del silenciamiento del gen mitocondrial original). En el género *Dumasia* se observan transcritos tanto del gen *cox2* mitocondrial como de su copia nuclear (coexistencia de dos genes activos provenientes de diferentes compartimentos celulares). Finalmente, en el caso del frijol mungo, la copia mitocondrial ha sido alterada por mutaciones y pérdida de algunos fragmentos, de manera que es inactivo y apenas reconocible, mientras que solo la copia nuclear es activa (migración exitosa hacia el núcleo con el gen mitocondrial original en vías de extinción).

b) En el grupo de las plantas angiospermas se ha identificado que el gen *rpl2* que codifica a la proteína ribosomal L12 ha sufrido diversas modificaciones, y actualmente se puede encontrar en cuatro diferentes versiones:

- 1.- El gen funcional está en el ADNmt
- 2.- El gen funcional está en el genoma nuclear
- 3.- El gen se encuentra fragmentado en dos, la región 5' se encuentra en la mitocondria y la región 3' se encuentra en el núcleo y
- 4.- El gen se encuentra fragmentado en dos y ambas regiones se encuentran en el núcleo.

Estas observaciones indican que la fragmentación de genes en dos genes funcionales es un factor que contribuye a la migración génica.

La migración génica desde la mitocondria al núcleo es un proceso que puede dividirse en varios pasos: en primer lugar, el material genético debe atravesar las membranas mitocondriales e ingresar al núcleo, probablemente a través de los poros de la membrana nuclear. Posteriormente, debe integrarse en el genoma nuclear y adquirir elementos de regulación y expresión nucleares. Después de un cierto periodo durante el cual tanto el gen mitocondrial como la copia nuclear son funcionales, cualquiera de las dos copias puede ser silenciada y eventualmente eliminada.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se identificó que las algas clorofíceas tienen la peculiaridad de presentar genes fragmentados que codifican para la subunidad II de la citocromo oxidasa (COX2). En la mayoría de los eucariotes, la subunidad COX2 está codificada por el gen *cox2* mitocondrial. Sin embargo, en algunas algas clorofíceas, como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.*, la subunidad COX2 es heterodimérica, y está codificada por dos genes nucleares separados (*cox2a* y *cox2b*). El gen *cox2a* codifica a la subunidad COX2A, que comprende la región N-terminal e hidrofóbica (con dos cruces transmembranales) de una subunidad COX2 clásica. Por su parte, el gen *cox2b* codifica la región hidrofílica que une a los dos átomos de cobre que forman el centro Cu<sub>A</sub>, y que corresponde a la región C-terminal de una subunidad COX2 clásica (Pérez-Martínez y col., 2001). Ambas subunidades COX2A y COX2B se sintetizan en el citosol, se importan al interior de la mitocondria y se ensamblan con el resto de las subunidades de la citocromo *c* oxidasa para formar el complejo maduro en la membrana interna mitocondrial. Las subunidades COX2 fragmentadas presentan también otra particularidad: contienen extensiones C- y N-terminales que quizá participen en la interacción y estabilización del heterodímero, como se muestra en la figura 4 (Pérez-Martínez y col., 2001).

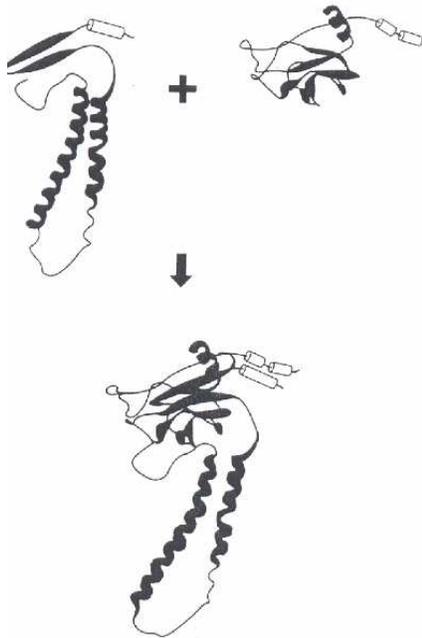


Figura 4. COX2 y sus dos subunidades llamados COX2A (correspondiente al fragmento hidrofóbico con dos cruces transmembranales) y COX2B (correspondiente al fragmento hidrofílico). Juntos forman una subunidad COX2 clásica del alga *Polytomella sp.* Tomado de (Pérez-Martínez y col., 2001).

### Parásitos apicomplejos

El parasitismo es la relación ecológica íntima entre dos organismos en la cual uno, el parásito, vive a expensas del otro, el hospedero, del que depende para sus requerimientos nutricionales y de otro tipo. Entre los parásitos se considera a los virus, bacterias, protistas, hongos, plantas y animales; entre sus hospederos se pueden incluir todas las especies de organismos, excepto los virus. Muchos parásitos utilizan dos o más vectores en sus ciclos de vida: un huésped final o definitivo y algunos intermedios en los que desarrollan una parte de su ciclo vital. Los vectores son organismos intermedios, que transmiten de forma activa a los parásitos de un huésped final a otro. Existen varias categorías de parásitos. Los microparásitos, como por ejemplo, las bacterias y los protozoos, son pequeños y se multiplican dentro de sus hospederos mientras que los macroparásitos, como los gusanos filamentosos y los gusanos planos, son grandes y no se multiplican dentro del hospedero.

Los endoparásitos, como las tenias, viven en el interior de sus hospederos, mientras que los ectoparásitos, por ejemplo, las pulgas, viven afuera. La relación puede ser temporal o permanente. La complejidad de la relación del parásito puede ser ejemplificada por el parásito apicomplejo que provoca la malaria *Plasmodium sp.* Se trata de un protista endoparásito permanente que parasita células sanguíneas humanas y que se transmite a través de unos mosquitos que actúan como vectores. Los propios mosquitos son también ectoparásitos temporales del hombre.

Muchos parásitos producen sólo pequeños daños en sus huéspedes pero otros son patógenos graves. Entre los patógenos de plantas superiores se incluyen a las propias plantas, como el muérdago y la cuscuta; hongos, como las royas y los tizones; y gusanos filamentosos, que atacan a árboles y a cultivos. Los parásitos de animales, entre ellos los de la especie humana, son aún más importantes ya, que se calcula que más de la mitad de los seres humanos hospedan a una o más especies de parásitos, sobre todo en los trópicos. Las pérdidas sociales y económicas, en cuanto a muertes y enfermedades, son incalculables. Los parásitos de la malaria afectan a 35 millones de personas y matan entre 2 y 3 millones cada año. Los tripanosomas causan la enfermedad del sueño en África y la enfermedad de Chagas en América del Sur, y ambas afectan a casi 20 millones de personas.

A causa de la estrecha relación hospedero-parásito, los parásitos son de gran interés. Sin embargo, su mayor importancia radica en las enfermedades que originan y en la enorme cantidad de esfuerzos que se emplean con el fin de controlarlos. Debido a que los parásitos están muy bien adaptados a sus modos de vida, son difíciles de destruir. Todos ellos desarrollan estrategias para evitar los mecanismos de defensa de sus hospederos y muchos han conseguido ser resistentes a los medicamentos e insecticidas que se aplican para su control. Existen vacunas que pueden ser usadas contra muchos virus y bacterias, pero no hay vacunas realmente eficaces contra protistas parásitos, gusanos helmínticos y hongos. Por lo tanto, los parásitos representan una amenaza constante, en particular muchos que apenas se conocían o se pensaba que eran inofensivos, como aquellos que provocan la toxoplasmosis, pneumocistosis y la criptosporidiosis y que en la actualidad se reconocen como causantes de muerte en pacientes inmunodeprimidos.

Los miembros del phylum Apicomplexa son protistas endoparásitos que se definen por tener un ciclo de vida que comienza con una forma infectiva móvil que contiene un complejo apical característico, que le da el nombre al phylum. Dentro de este grupo se encuentran

numerosos agentes causales de enfermedades importantes tanto para seres humanos como para animales domésticos.

Los parásitos apicomplejos pertenecen al superphylum Alveolata (Gajadhar y col., 1991), por lo que se consideran parientes de los dinoflagelados y de los ciliados (Moreira y López-García, 2002). Los apicomplejos son parásitos intracelulares obligados de animales y son de gran importancia médica y veterinaria. Sus complejos apicales son los responsables de la unión y penetración de los parásitos a sus hospederos. Las especies más representativas de los parásitos apicomplejos incluyen al parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* y a sus parientes cercanos, patógenos oportunistas como *Toxoplasma gondii* y miembros del género *Cryptosporidium* que atacan a individuos inmunosuprimidos y otros géneros como *Eimeria* (el causante de coccidiosis en aves de corral), *Babesia* (el causante de babesiosis) y *Theileria parva* (responsable de la fiebre de la Costa del Este en ganado). Todos estos protistas contienen un organelo único y característico llamado el apicoplasto (nombre proveniente de apicomplejo + plástido). Estos organelos tienen su propio genoma de 35 Kb.

Los parásitos apicomplejos tienen varios organelos: un complejo apical, uno o más anillos polares, un cono formado por una serie de espirales de microtúbulos que rodea a los anillos polares; de 2 a 8 roptrías, las cuales son estructuras en forma de sacos o de túbulos alargados que nacen desde la parte final del organismo en el conoide y se extienden hacia la parte delantera del mismo en el citoplasma, los micronemas o gránulos densos, así como un núcleo, un nucleolo, un aparato de Golgi y una mitocondria (figura 5).

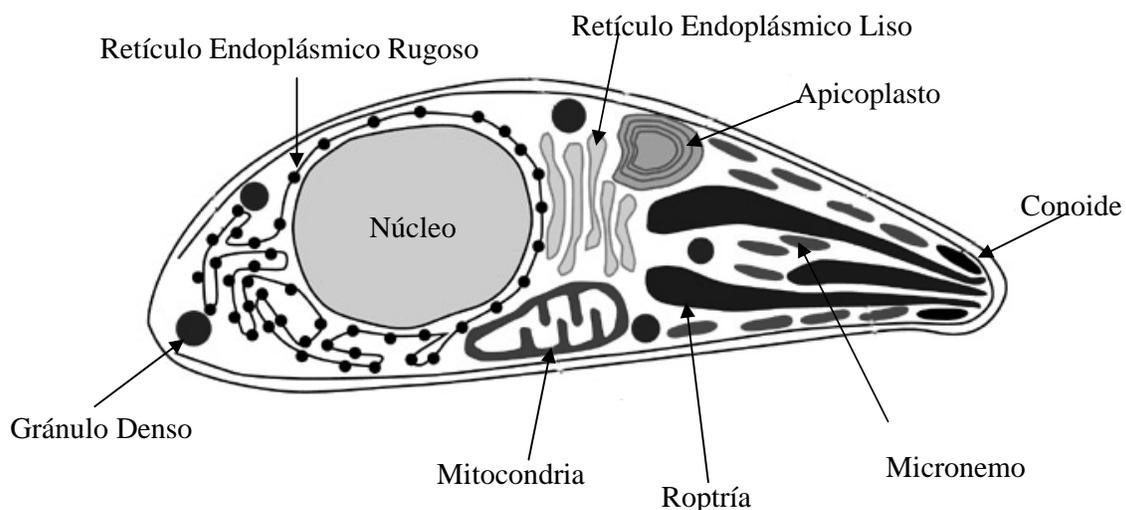


Figura 5. Imagen de un parásito apicomplejo (*T. gondii*) donde se muestran sus organelos. Tomado de [www.Cambridge University Press.com](http://www.Cambridge University Press.com)

En general, el ciclo de vida de los parásitos apicomplejos tiene tres estadios: i) una etapa de crecimiento durante la cual se lleva a cabo la infección de la célula huésped; ii) una etapa sexual durante la cual se lleva a cabo la producción de gametos y fertilización para formar cigotos localizados dentro de oocitos; y iii) una etapa de esporozitos, que son las nuevas formas infectivas (Vivier y Desportes, 1990; Ellis y col., 1998).

Las mitocondrias de los parásitos apicomplejos también contienen su propio genoma. Típicamente, los parásitos apicomplejos contienen un DNA mitocondrial lineal y extremadamente compacto, como el de *Plasmodium yoelli*, de únicamente 6 Kb (Vaidya y col., 1989).

### ***Toxoplasma gondii***

*T. gondii* es un parásito con un ciclo vital que se adapta a la vida intracelular en múltiples organismos, lo que ha hecho que su prevalencia sea elevada por todo el mundo. Han sido poco estudiados en humanos ya que los hospederos primarios son los animales, los cuales se enferman y mueren a causa de una infección provocada por el contacto con otros animales infectado, con heces de gatos o por consumir alimento contaminado. En los seres humanos es causante de serios daños en el sistema nervioso central de individuos inmunosuprimidos, así como de abortos en mujeres infectadas. Es importante recordar que la primera etapa de reproducción de estos parásitos ocurre exclusivamente en gatos, los cuales son animales domésticos y que en sus heces se encuentran los oocitos (esporas infectivas), los cuales se convierten en infectantes hasta dos o cuatro días después de su eliminación. Una higiene inadecuada de estos animales domésticos puede generar infecciones a familias completas.

La secuencia de eventos que marcan la invasión del parásito inicia con la unión entre el parásito y el hospedero, la cual provoca un reconocimiento entre proteínas en las células del hospedero y proteínas del parásito, que en el caso de *T. gondii* implica tres interacciones moleculares. La primera ocurre cuando el parásito une una laminilla de reconocimiento con el hospedero y envuelve con una superficie de lectina otra proteína conocida como SAG-1(P30), que une al receptor glicosilado de la célula del hospedero (Kasper y Mineo, 1994). Después de esta unión inicial, el parásito podría separarse de la célula hospedera por lo que moldea una unión más estable entre las dos células, el parásito se mueve sobre la unión y logra entrar a la célula hospedera. Todo este proceso se encuentra regulado por los micronemas y las roptrías.

El proceso de internalización se lleva a cabo en promedio en 10 segundos, lo cual es 10 veces más rápido que la fagocitosis. Una vez dentro del hospedero, se forma una vacuola membranosa parasitófora (PVM) (Sam-Yellow, 1996).

Usualmente se considera que dentro del grupo de los apicomplejos se encuentran cuatro grupos bien definidos (de acuerdo a sus características biológicas como las especificidades al hospedero y al tejido que infectan): los coccidios, los gregarinos, los haemosporidios y los piroplasmas. Sin embargo, el arreglo taxonómico apropiado de estos grupos está en discusión, y en los últimos años se han propuesto al menos siete arreglos diferentes (Ellis y col., 1998). *T. gondii* es un parásito perteneciente al grupo de los parásitos apicomplejos. Tiene un ciclo de vida complejo, que incluye tres estadios: el de esporozito, el de taquizoito y el de bradizoito. Los esporozitos son el último producto del ciclo de la reproducción sexual que ocurre exclusivamente en felinos. Los oocitos son las esporas que se encuentran en las heces de gatos infectados y por cada oocito se producen ocho esporozitos. Los oocitos son infecciosos y pueden ser ingeridos por otros gatos, iniciando un nuevo ciclo sexual. Alternativamente, si son ingeridos por otros animales vertebrados de sangre caliente como mamíferos y pájaros, puede iniciar un ciclo asexual. El parásito necesita de un hospedero para poder reproducirse y puede hacerlo en múltiples tipos de células y tejidos. La fase de taquizoito se presenta ya dentro del hospedero y se reconoce por una replicación rápida del parásito. La etapa de bradizoito es conocida como la etapa lenta de crecimiento. El bradizoito es antigénicamente diferente de la forma de taquizoito, lo cual se debe a que aunque el parásito dentro del tejido infectado tiene una larga vida de infección e ingesta, al encontrarse en su última etapa de vida ya no sigue desarrollándose rápidamente (Boothroyd y Komuniecki, 1995).

El curso de la toxoplasmosis suele ser leve y se caracteriza por síntomas que recuerdan a los de un catarro común. Sin embargo, la enfermedad en mujeres embarazadas puede ocasionar anomalías congénitas graves en el feto y en algunos casos abortos.

El toxoplasma suele estar presente en el ganado vacuno, las aves de corral y muchos animales domésticos sin producir en ellos ningún efecto dañino; sin embargo, el parásito se mantiene vivo en la carne cruda y no es hasta que ésta se cocina, deseca o congela durante un periodo prolongado cuando finalmente muere. Las dos causas principales de infección por toxoplasma son el consumo de carne cruda o poco cocinada y el contacto con las heces del gato doméstico.

Una sola infección suele proporcionar inmunidad. Las infecciones graves por toxoplasma se pueden prevenir evitando el consumo de carne cruda o asegurando que todas las carnes se han calentado al menos a 60 grados centígrados, y evitando el contacto con gatos infectados o desconocidos así como con sus heces.

El genoma de *T. gondii* es haploide y tiene de  $8 \times 10^7$  pb por núcleo y está compuesto por 11 cromosomas (Sibley y Boothroyd, 1992). Además se sabe de la existencia de otros dos genomas, uno mitocondrial y otro en el apicoplasto. Un aspecto importante es mencionar que el genoma nuclear se encuentra "contaminado" con secuencias de origen mitocondrial y de las cuales la función aún no es clara (figura 6) (Ossorio y cols., 1991) .

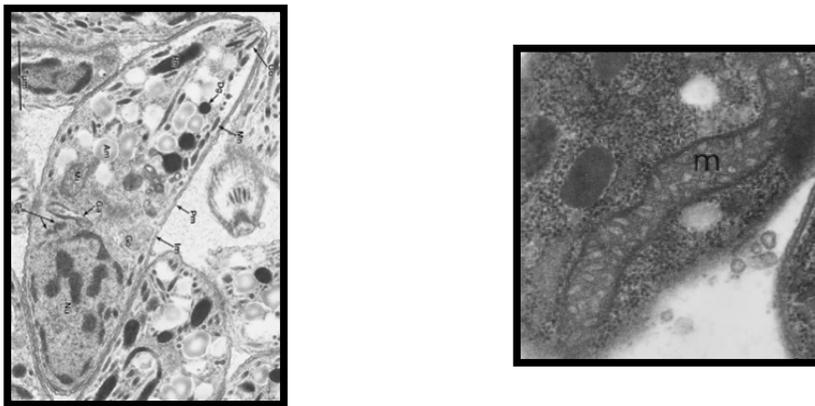


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de *T. gondii*. A la izquierda imagen de una célula de *T. gondii*. A la derecha imagen de la única mitocondria (m) que contiene éste parásito. Tomado de Melo y Attias, 2000.

Durante la investigación de la función mitocondrial en parásitos apicomplejos, específicamente con los implicados en la malaria, se aislaron dos moléculas de DNA extracromosomal, una de ellas era lineal de 6 kbp e inequívocamente se trataba del genoma mitocondrial mDNA. La otra era de 35 kbp y correspondía a una molécula circular de DNA que corresponde al DNA del apicoplasto pDNA.

El pDNA asemeja el genoma de un cloroplasto que perdió a todos los genes involucrados en la fotosíntesis.

La mayoría de las cuestiones filogenéticas sobre el pDNA y otros organelos llevan a considerar eventos de endosimbiosis secundaria, donde una célula eucariota retuvo en su interior a otra célula eucariota fotosintética (un alga unicelular).

El hecho de que los genes fragmentados *cox2a* y *cox2b* también han sido identificados en parásitos apicomplejos como *Plasmodium* (Funes y col., 2002; Gardner y col., 2002) y *Toxoplasma* (Funes y col., 2002), así como que las subunidades COX2B de estos organismos también presentan una extensión N-terminal semejante a la de las algas clorofíceas, llevó a proponer que los genes *cox2* fragmentados migraron del genoma del eucariote endosimbionte (alga verde) al genoma del hospedero (el ancestro apicomplejo). Los genes *cox2A* y *cox2B* de origen clorofita, eventualmente reemplazaron la función del gen *cox2* mitocondrial del apicomplejo, lo que llevó a la desaparición de este último (no existen genes *cox2* en los genomas mitocondriales de apicomplejos secuenciados a la fecha).

## **ANTECEDENTES**

En la gran mayoría de los organismos eucariotes la subunidad COX2 está constituida por un único polipéptido codificado por un solo gene mitocondrial, por lo tanto, la presencia de subunidades fragmentadas en la citocromo oxidasa codificadas en el núcleo es inusual, y hasta la fecha solamente se han descrito en las algas verdes y en los apicomplejos. Sin embargo, aún no se ha aportado evidencia bioquímica de la presencia de estas subunidades en la mitocondria del parásito, que confirmen que los genes fragmentados son activos o que sus productos proteicos están asociados al complejo IV. También es necesario obtener evidencia del posible sitio de procesamiento de las presecuencias mitocondriales propuestas.

## **HIPÓTESIS**

Si la citocromo oxidasa mitocondrial de *T. gondii* es codificada en el núcleo por dos genes independientes funcionales, entonces deben existir las subunidades correspondientes COX2A y COX2B asociadas en la citocromo *c* oxidasa mitocondrial del parásito. La presecuencia que dirige a la subunidad COX2A hasta la mitocondria y que guarda cierta semejanza con la de la subunidad COX2A de algas clorofíceas, podría ser procesada de manera semejante o diferente en el parásito apicomplejo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Obtener evidencia bioquímica de la presencia de las subunidades COX2A y COX2B en la mitocondria del parásito apicomplejo *Toxoplasma gondii* y establecer el sitio de procesamiento de la presecuencia mitocondrial de la subunidad COX2A.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener una preparación enriquecida en mitocondrias de *T. gondii*.
- Caracterizar el patrón electroforético de los complejos de la fosforilación oxidativa de *T. gondii* en un sistema de electroforesis azul-nativo y los correspondientes patrones electroforéticos de sus componentes en geles bidimensionales desnaturalizantes con SDS.
- Generar anticuerpos policlonales contra las subunidades COX2A y COX2B o contra péptidos sintéticos que contengan una secuencia parcial de las proteínas de interés de *T. gondii*.
- Establecer por técnicas inmunoquímicas (réplicas tipo Western) la presencia de las subunidades COX2A y COX2B en el patrón electroforético bidimensional de las proteínas mitocondriales de *T. gondii*.
- Obtener la secuencia amino-terminal de los péptidos correspondientes, para poder establecer el sitio de procesamiento de la (las) posible(s) presecuencia(s) mitocondrial(es).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de *T. gondii*

El cultivo del parásito se realizó por la infección directa, vía peritoneal a ratones (Balb C) hembras de 8 semanas. Se inocularon aproximadamente 200  $\mu$ l de toxoplasmas infectivos en los peritoneos de los ratones. Al cabo de tres o cuatro días los ratones presentaron los síntomas de la enfermedad y se sacrificaron después de extraer con 5 ml de PBS a los toxoplasmas vivos de los peritoneos. De aquí se tomó el volumen necesario para la siguiente inoculación y el resto del exudado se centrifugó a 2000 rpm para resuspender el botón en 500  $\mu$ l de PBS y guardarlo a  $-70$  °C. De cada ratón se obtuvieron alrededor de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml y en un volumen total de 5 ml, equivalentes a  $25 \times 10^6$  parásitos por ratón.

### Generación de anticuerpos

El anticuerpo anti COX2B se obtuvo mediante la proteína recombinante COX2B, la cual se inoculó a conejos hembras. La proteína COX2B fue generada como a continuación se describe. Mediante la técnica de PCR se amplificó el gene *cox2b* utilizando como templado cDNA de una genoteca de *T. gondii* y los oligonucleótidos:

5'-CGCGGATCCGATGTTTTCCGGTCCTTCTGGAAC-3'

5'-CGGGGTACCTCAGTCTTTGTACCACTTCTTTGC-3'

El fragmento amplificado y el plásmido pQE30 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I y posteriormente ligados con la enzima T4 ligasa. El plásmido pQE30-COX2B obtenido se usó para transformar una cepa *Escherichia coli* XL1-Blue generando la cepa *E. coli* XL1-Blue pQE30-COX2B. Esta cepa fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) adicionada con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y tetraciclina (50  $\mu$ g/mL), a una densidad óptica de 0.500 a 600 nm. Después le fue adicionado al cultivo IPTG en una concentración 1 mM y se dejó crecer durante 16 horas. Este cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en un rotor SS34, para obtener el botón bacteriano. La biomasa obtenida se resuspendió en amortiguador PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM a pH 7.8) adicionado con lisozima en una concentración de 10 mg/mL y PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas y se sonicó a una intensidad del 50% y una potencia de 3 a 5 Watts 4 veces por 1 minuto. La muestra obtenida fue centrifugada a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en un rotor SS34.

El sobrenadante se eliminó y el botón de lisis se resuspendió en una solución de guanidina 6 M, fosfato de sodio 500 mM y NaCl 5 mM a pH 7.8, y se incubó durante 16 horas a 4 °C. Finalmente se cargó la muestra en una columna de afinidad de Ni-ácido nitrilotriacético, se lavó con 5 a 6 volúmenes de columna con PBS sin guanidina y se eluyó consecutivamente con imidazol 10 mM e imidazol 100 mM en PBS. Con este último amortiguador se eluyó la proteína COX2B. Se corrió un gel de acrilamida tipo Laemmli al 12% y se extrajo la banda del gel con Tris 20 mM pH 6.8. Se guardaron alícuotas a -70 °C hasta el momento de la inoculación a los conejos. La inoculación inicial se llevó a cabo con 100 µg de proteína en adyuvante completo de Freund. Posteriormente se llevaron a cabo dos refuerzos, uno cada 22 días, donde se inocularon mezclas de 50 µg proteína con adyuvante incompleto de Freund. Finalmente se extrajo la mayor cantidad de sangre posible del conejo, se separó el suero del plasma, y se tituló para conocer el título óptimo de uso en inmunoréplicas tipo Western (en este caso, se usó una dilución 1:1000).

Por su parte, el anticuerpo contra la proteína COX2A, se indujo utilizando un péptido sintético. Inicialmente se analizó la secuencia de la proteína madura de interés para localizar la región antigénica, usando un programa computacional ubicado en la dirección de internet: <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>. El programa elabora una gráfica de hidrofobicidad e identifica los sitios de la proteína que potencialmente son más antigénicos. Se seleccionó una secuencia de 11 aminoácidos correspondiente al máximo de la gráfica y se sintetizó comercialmente un péptido con dicha secuencia. El péptido se entrecruzó como hapteno a una proteína altamente antigénica, la hemocianina. Una vez que se recibieron los péptidos acoplados, se procedió a la inoculación de los conejos para la generación del anticuerpo, para ello se elaboró un esquema de inmunización que constó de tres inoculaciones periódicas con lapsos de veintidos días entre uno y otro refuerzo. En la primera inoculación se utilizó adyuvante completo de Freund y en cada una de las inoculaciones subsecuentes se realizó una mezcla de péptido sintético con adyuvante incompleto de Freund.

Cada uno de los anticuerpos obtenidos fueron probados en inmunoréplicas tipo Western (Blake y cols., 1984) y se titularon comprobando que efectivamente se reconocía selectivamente la banda de interés. Se alicuotaron y se guardaron en congelamiento a -70 °C hasta su uso.

Extracción y purificación de mitocondrias.

El aislamiento de mitocondrias de *T. gondii* en gradientes de Percoll se llevó a cabo modificando la técnica reportada por Leriche (1991). Se obtuvieron mitocondrias en las

fracciones de un gradiente formado con Percoll (concentración inicial, 40%). Las mitocondrias aisladas se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

Los tubos obtenidos de las cosechas de los toxoplasmas, se centrifugaron a 2000 rpm/10 min en un rotor SS34. El botón que se obtiene se lavó dos veces con amortiguador TES (250 mM sacarosa, 1 mM EDTA y 5 mM trietanolamina pH 7.5) a 1250 rpm/10 min cada lavado. El botón se resuspendió en 10 ml de TES y las células se rompieron mecánicamente en un homogenizador de vidrio con vástago de teflón, evitando formar burbujas (5 golpes suaves). La solución se centrifugó a 2000 rpm/10 min y se desechó el botón. El sobrenadante se centrifugó a 15000 rpm/30 min y la pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador TES ajustando la solución a un 30% de Percoll. Se centrifugó a 50,000 rpm/ 25 min en un rotor 50Ti (Beckman). El gradiente se autoformó y las fracciones se colectaron en un volumen de 700  $\mu\text{l}$  cada una, se numeraron y analizaron. La fracción mitocondrial se encontró generalmente entre las fracciones 4 y 5.

#### Caracterización de la preparación mitocondrial.

Una vez obtenida una fracción mitocondrial se realizaron experimentos de oximetría a fin de explorar su respuesta a algunos sustratos e inhibidores clásicos como succinato y cianuro. Para estos experimentos se preparó un medio de reacción con MES 5 mM y Manitol 0.6 M a pH 6.8,  $\text{H}_2\text{PO}_4$  4 mM (titulado con Tris base a pH 6.8), KCl 20 mM y MgCl 0.5 mM todo a pH final de 6.8. La mezcla se homogeneizó y estabilizó a temperatura ambiente dentro de la cubeta del oxímetro (previamente calibrado). Después de 10 minutos se agregó la muestra a evaluar (100  $\mu\text{l}$ ), se dejó reaccionar 5 minutos con el medio y al cabo del tiempo se agregó succinato 15 mM como sustrato. A partir de este punto se detectó por 30 minutos el consumo de oxígeno de las muestras evaluadas. También se hicieron geles desnaturalizantes de las distintas fracciones del gradiente y se identificó la fracción mitocondrial por su reacción con anticuerpos específicos anti COX2A y anti COX2B.

#### Cuantificación de proteína

Se siguió el método de Lowry modificado por Markwell y cols. (1978) en el cual se utilizaron cuatro soluciones. La solución A (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.4% NaOH, 0.16% tartrato de sodio y 1% de SDS), la solución B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), la solución C (100 volúmenes de solución A más 1 volumen de solución B) y la solución D (1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua). Se elaboró un curva patrón con albúmina. A la muestra y a la curva patrón se les adicionó 3 ml de solución C y se mezcló, posteriormente se incubó por 10 min a temperatura

ambiente. Se adicionaron 0.3 ml de solución D, se mezcló inmediatamente y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm. Las lecturas de las muestras se realizaron por duplicado y se interpoló la lectura obtenida para las muestras a la curva patrón.

#### Electroforesis en geles azules (BN-PAGE)

Una herramienta para estudiar los complejos respiratorios mitocondriales es la electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE). Se ha usado mucho la electroforesis de isoelectroenfoque (IEF), que separa proteínas de acuerdo con su punto isoelectrico (pI), aplicando un gradiente de pH en el gel. Sin embargo, la aplicación del IEF a proteínas membranales es difícil, ya que se pierden algunas de las interacciones de las subunidades oligoméricas. Para superar estos problemas, se ha utilizado electroforesis en geles nativos azules de poliacrilamida (BN-PAGE). Pueden solubilizarse membranas u organelos enteros con detergentes no iónicos (como lauril-maltósido o Tritón X-100), que no destruyen las interacciones entre las subunidades que constituyen a los complejos. Posteriormente, la adición del azul de Coomassie a la muestra carga a las proteínas negativamente y les da movilidad en un campo electroforético (Schägger y von Jagow, 1991). De esta manera se conserva la integridad de las proteínas de los complejos proteicos, pero se promueve su separación por tamaño en un campo electroforético. Los complejos separados en BN-PAGE (primera dimensión) pueden ser desnaturalizados con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, para después ser analizados en geles desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio en segunda dimensión 2D-SDS-PAGE para conocer la composición polipeptídica de cada complejo. Para los geles nativos azules (BN-PAGE) la electroforesis se corrió a 4 °C con todos los amortiguadores previamente equilibrados a esa temperatura. Los geles se corren entre 1 a 1.5 horas para los sistemas cortos (10 cm x 7.5 cm) y hasta 5 horas para los sistemas largos (geles de 17 cm x 14.5 cm). Para mejorar la visibilidad de los complejos proteicos es recomendable cambiar el amortiguador del cátodo (cátodo I) después de 3/4 de la corrida por el mismo amortiguador pero conteniendo únicamente 1/10 del azul de Coomassie Serva G (amortiguador de cátodo II). El gel se corrió hasta que el frente azul llegó a salir del gel o hasta que se logró la separación deseada.

Tabla 1. Elaboración del gel de acrilamida (acrilamida al 48.5% / bis acrilamida al 1.5%) en cámaras de electroforesis Bio Rad mini protean II (1.5 mm de espesor).

<b>Reactivos</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>5%</b>	<b>8%</b>	<b>4%</b>
Acrilamida/bis acrilamida	1.08 ml	1.3 ml	1.62 ml	0.54 ml	0.87 ml	0.25 ml
Amortiguador 3X	1.75 ml	1.75 ml	1.75 ml	1.75 ml	1.75 ml	1.5 ml
Glicerol 80%	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	0.37 ml	0.37 ml	0
Agua	0.9 ml	0.66 ml	0.34 ml	2.55 ml	2.55 ml	1.75 ml
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
Persulfato de amonio	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl

Tabla 2. Elaboración del gel de acrilamida en cámaras grandes de 15 cm x 17 cm de 2 mm de espesor con la misma relación que arriba de acrilamida / bisacrilamida.

<b>Reactivos</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>5%</b>	<b>8%</b>	<b>4%</b>
Acrilamida/bis acrilamida	3.8 ml	4.6 ml	5.7 ml	1.9 ml	3.07 ml	0.5 ml
Amortiguador 3X	6.2 ml	6.2 ml	6.2 ml	6.2 ml	6.2 ml	2.0 ml
Glicerol 80%	4.73 ml	4.73 ml	4.79 ml	1.2 ml	1.2 ml	0
Agua	3.8 ml	3.04 ml	1.9 ml	9.2 ml	8.1 ml	3.44 ml
TEMED	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	9 µl
Persulfato de amonio	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	32 µl

Para proteínas membranales de mitocondria de *T. gondii* se elaboró un gradiente del 15% al 5% de acrilamida para el gel separador y al 4% para el gel concentrador. Los geles en gradiente permiten una separación óptima de los complejos mitocondriales.

La solución de acrilamida al 48.5% puede cristalizar a 4 °C, por lo tanto es necesario mantenerla a temperatura ambiente.

Para prevenir la agregación del azul de Coomassie Serva G que a su vez conduciría a la agregación de las proteínas, se evitó la presencia de iones divalentes en los amortiguadores. La solubilidad del azul de Coomassie es crítica y deben de evitarse los precipitados.

Para BN-PAGE, las mitocondrias de los toxoplasmas se solubilizaron con n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido durante 30 minutos en hielo (1 mg de proteína mitocondrial se solubiliza con 2 mg de detergente). Para eliminar el material insoluble se ultracentrifugaron las muestras a 30,000 rpm durante 30 min en un rotor 50Ti.

El azul de Coomassie se agregó posteriormente para proporcionarle una carga negativa a las proteínas y aumentar su movilidad electroforética.

Pasos seguidos en la preparación de las muestras:

1. Centrifugar las mitocondrias a 4 °C (5 min a la máxima velocidad de una microcentrífuga de mesa).
2. Resuspender la pastilla en amortiguador de lavado.
3. Volver a centrifugar 5 min y remover el sobrenadante.
4. Resuspender las mitocondrias en el amortiguador de muestra. Por cada miligramo de proteínas mitocondriales el volumen final será de 200  $\mu$ l. Para calcular el volumen del amortiguador de muestra que debe agregarse en la resuspensión hay que tomar en cuenta el volumen de la pastilla, el volumen de dodecil maltósido y el volumen de azul de Coomassie que se agregarán posteriormente. Por ejemplo 1mg de proteínas mitocondriales es aproximadamente 25  $\mu$ l, como el lauril maltósido se agrega a una concentración final de 1% a partir de una solución al 10% (20  $\mu$ l); la cantidad de colorante que hay que agregar representa  $\frac{1}{4}$  de la cantidad de detergente, por lo que se agregarán 10  $\mu$ l de una solución de azul de Coomassie al 5%. Finalmente se agregaron 145  $\mu$ l de amortiguador de muestra (200 $\mu$ l –(25 $\mu$ l +20 $\mu$ l +10 $\mu$ l)). Así el volumen total de la muestra fue de 200  $\mu$ l.
5. Agregar el lauril maltosido a la muestra y solubilizar incubando por 30 minutos en hielo, invirtiendo el tubo ocasionalmente, al final de la incubación agitarlo en el vortex. A menos que haya material insoluble, la muestra debería volverse completamente transparente. En general 2 g de lauril maltósido/g de proteína son suficientes para lograr una buena solubilización, pero en ocasiones se requiere de mayor cantidad de detergente.
6. Centrifugar a 100,000 xg (33.000 rpm) a 4°C, 30 min en el rotor 50Ti.
7. Agregar el azul de Coomassie Serva G al sobrenadante y mezclar por inversión. Mantener siempre las muestras mitocondriales en hielo.

### Geles desnaturalizantes Tricina-SDS de segunda dimensión (2D-SDS-PAGE)

La electroforesis en segunda dimensión desnaturalizó los complejos de la primera dimensión y separó a las subunidades de los complejos de acuerdo con su tamaño. Un carril completo de la primera dimensión se incubó por 30 min a temperatura ambiente en solución de SDS al 1% y mercaptoetanol al 1% en agitación constante.

Para colocar el gel de la primera dimensión sobre el segundo gel se polimeriza el segundo gel y se separan las placas. El gel de la primera dimensión se colocó arriba del vidrio más pequeño en contacto directo con el segundo gel; posteriormente se ensamblaron las placas y se colocaron en la cámara de electroforesis. El gel se corrió a 50 Volts hasta que el frente azul penetró en el gel concentrador y después se aumentó a 100 Volts el resto de la corrida.

Tabla 3. Para los sistemas largos la preparación del gel al 14% tiene la composición que se muestra a continuación:

<b>Reactivos</b>	<b>Separador</b>	<b>Concentrador</b>
Acrilamida / bis acrilamida	14 ml	1.6 ml
Amortiguador Tris-HCl	12 ml	3.0 ml
Glicerol 79.5%	4 ml	0
Agua	0	7.4 ml
Persulfato de amonio	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl

Tabla 4. Para los sistemas cortos la preparación del gel es como a continuación se muestra:

<b>Reactivos</b>	<b>Separador</b>	<b>Concentrador</b>
Acrilamida / bis acrilamida	3.5 ml	350 µl
Amortiguador Tris-HCl	3 ml	750 µl
Glicerol 79.5%	1 ml	0
Agua	0	1.9 ml
Persulfato de amonio	50 µl	50 µl
Temed	5 µl	5 µl

### Secuenciación por degradación de Edman

Para la secuenciación por degradación de Edman se corrió un gel azul nativo en gradiente de primera dimensión y posteriormente uno de Tricina-SDS para la segunda dimensión. El segundo gel se transfirió a una membrana de PVDF utilizando CAPS como amortiguador (CAPS 10 mM en metanol al 10% a pH 11. Ajustado en frío) durante 16 horas.

A la membrana se le dió una lavada con agua destilada y se tiñó (Azul de Coomassie brillante R250 0.1% en metanol absoluto al 50%), se fijó (Metanol absoluto 50% y ácido acético 10%),

se lavó con agua destilada y se secó. Finalmente se cortaron las bandas de interés y se enviaron al Institute Pasteur (Paris, Francia) para ser sometidos a microsecuenciación automática de los extremos aminos terminales.

Análisis por espectroscopía de masas (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC MS/MS))

Para el análisis por LC MS/MS se corrió un gel de primera dimensión BNE-PAGE y posteriormente uno 2D-SDS-PAGE. El segundo gel se fijó (50% metanol y ácido acético 10%), tiñó (azul de Coomassie 1% en ácido acético 10%) y destiñó (ácido acético 10%) hasta que las manchas fueron visibles. Las bandas o manchas de interés se cortaron y se enviaron al KECK Laboratory en Yale E.U.A. para ser analizadas por LC-MS/MS.

Soluciones utilizadas para la corrida de los geles

1.- Amortiguador de geles 3X (100 ml)

Ácido amino caproico	1.5 M
Bis-Tris	150 mM
Ajustar el pH a 7.0 con HCl	

2.- Amortiguador de cátodo 1 (1 L)

Tricina	50 mM
Bis-Tris	15 mM
Azul de Coomassie Serva G	0.02%

3.- Amortiguador de cátodo 2 (1 L)

Tricina	50 mM
Bis-Tris	15 mM
Azul de Coomassie Serva G	0.002%

4.- Amortiguador del ánodo (1 L)

Bis tris	50 mM
Ajustar el pH a 7.0 con HCl	

5.- Solución de Dodecil maltósido 10% (1 ml)

Dodecil-maltósido	10%
Disolver en 1 ml de H <sub>2</sub> O	

6.- Solución de Coomassie Serva Blue G (1 ml)

Azul de Coomassie Serva Blue G 5%

Disolver en 1 ml de amortiguador de muestra

7.- Amortiguador de lavado (100 ml)

Sorbitol 250 mM

Bis-Tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

8.-Amortiguador de muestra (100 ml)

Ácido amino caproico 750 mM

Bis-Tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Soluciones para los sistemas en segunda dimensión

1.- Solución de acrilamida.

Acrilamida 30%

Bis acrilamida 0.98%

Filtrar la acrilamida antes de utilizarla

2.-Amortiguador Tris-HCl

Tris 3 M

HCl 1 M

SDS 0.3%

3.- Amortiguador de cátodo

Tris 1 M

Tricina 0.1 M

SDS 0.1%

4.- Amortiguador del ánodo

Tris-HCl 0.1 M

Ajustar el pH a 8.9 con HCl

## RESULTADOS

### Análisis de Secuencias

Toxoplasma, al igual que las algas clorofíceas, contiene genes fragmentados para la subunidad II de la citocromo oxidasa, cuyas secuencias fueron reportadas originalmente por nuestro laboratorio: *cox2a* (AAO27883) y *cox2b* (AAO27882) (Funes y cols., 2001). Existe otra secuencia en el banco de datos, anotada como *cox2* de *T.gondii* (AAF07939) (Mc Fadden y cols., 1999), cuya secuencia inicial es idéntica a la de *cox2b* y cuya secuencia final corresponde a la traducción del extremo 3'UTR de dicho gene. Al inicio de este trabajo se realizó un análisis exhaustivo del banco de datos, explorando también los EST (Expressed Sequence Tags) y se encontraron varios fragmentos de EST's que codifican para las subunidades COX2A y COX2B. Todas las secuencias relacionadas con COX2A correspondieron con la reportada por Funes y cols., (2001), sin embargo se encontró una diferencia con la secuencia de COX2B previamente reportada. Varias secuencias EST (CN617613, CB411434, CB187686, BM189028) presentaron un fragmento adicional de 19 aminoácidos que se muestra en negritas y subrayado en la figura 7A.

#### A) Secuencia COX2B de *T.gondii*

MDVFRSFWNRRGAAPGGAATSSGRPAGCREENSSVLLQSLKANSQ  
**OKKGETPLQNVAAADYVTP**QKYLD DDPDKIPTY YVFQSNMVTDEDL  
LPGMLRNLEVDKRLTLPTRTHIRFLITATDVIHSWAVPALGIKADA  
IPGRLQRINTFIQREGVFYGGQCSELCGALHGFMPIVIEAVSPETYAA  
HAKKWKD

#### B) Secuencia COX2A de *T.gondii*

**MLAYFAASRELA VVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASSPCSLFFG**  
**SRLYPIRSCGRPAGFP**AKIVYPFLSAHTFPKMMPLSSSLFRPYGH  
**LFHQFPRRFFSSAQRGDYSLMLPRHFSSTASSVTKPPQKTDAPAK**  
**HDEHDSHHGTNNFYHMP SHHSPSRHHLNPDGTMRD**LTTAETFHW  
EHAEAE TPAQQIVS VNGRKMVKG VETRDLVELFLVHQKNIPFWPR  
MRMN VWGNHLLMKA EFLFFW TPTFITW SLAIPMFTLLYMLDEA  
VYAAMTVKVIGRQWYWIYEEVES **PVDDEE**

Figura 7. Secuencias de *cox2a* (AAO27883) y *cox2b* (AAO27882) de *T. gondii*. Las extensiones de ambas subunidades se encuentran en un recuadro. A) Para COX2B en negritas, cursivas y

subrayado el fragmento adicional de 19 aminoácidos encontrado en las bases de datos. B) La presecuencia mitocondrial reportada para COX2A se muestra con caracteres cursivos sobre fondo gris, subrayado también se localizan los dos fragmentos antigénicos identificados para la construcción del péptido sintético.

### **Diseño y síntesis del péptido sintético**

Al construir el perfil de antigenicidad de la secuencia madura de COX2A se obtuvieron dos máximos, los cuales representan dos posibles sitios antigénicos de la proteína. El primero corresponde a un péptido de 9 aminoácidos, P A Q Q I V S V N, y el segundo a una secuencia de 11 aminoácidos, D L V E L F L V H Q K. Esta última se eligió para la construcción del péptido sintético (figura 7B). El péptido, sintetizado comercialmente, se entrecruzó con hemocianina con el fin de hacerlo más antigénico (figura 8).

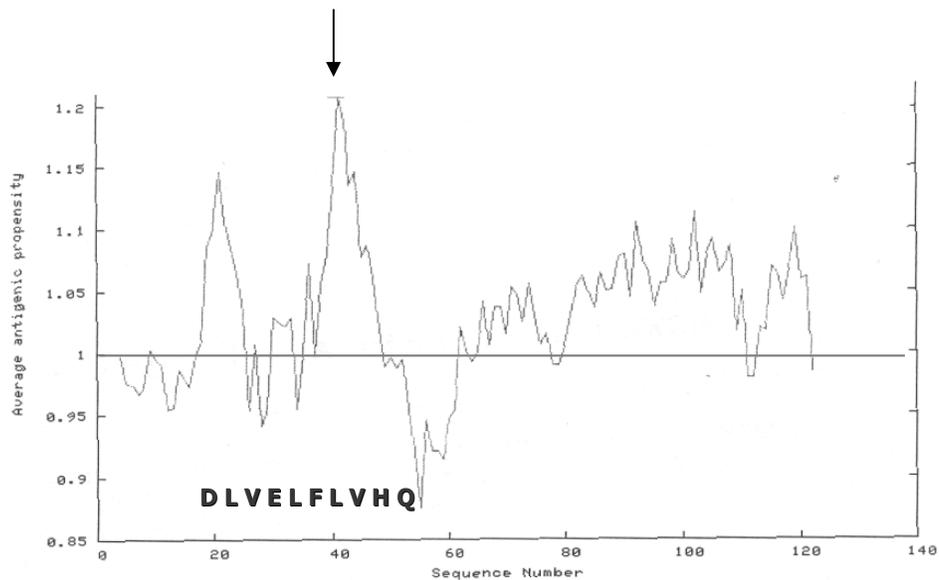


Figura 8. Gráfica de antigenicidad obtenida del análisis de la secuencia de COX2A de *T.gondii*. En la curva se observan dos máximos sobre el valor basal de 1. Se seleccionó el péptido de mayor antigenicidad DLVELFLVHQK.

### **Sobreproducción de COX2B y generación de anticuerpos**

El Veterinario Valentín de la Cruz Torres trabajó en el laboratorio en la inducción y generación del anticuerpo correspondiente a la proteína COX2B. Después de la amplificación del fragmento correspondiente por medio de PCR y su ligación en el plásmido pQE30, se

transformó a las bacterias de la cepa *E.coli* XL1-Blue y se indujo la sobreexpresión de la proteína con IPTG (figura 9A). Se purificó y con ella se generó el anticuerpo gracias a un esquema de inmunización con una inoculación inicial seguida de dos refuerzos. Con el anticuerpo obtenido se realizó una inmunodetección tipo Western del perfil electroforético de la expresión de *cox2b* y se reveló por quimioluminiscencia (figura 9B). De esta manera se comprobó la especificidad del anticuerpo obtenido.

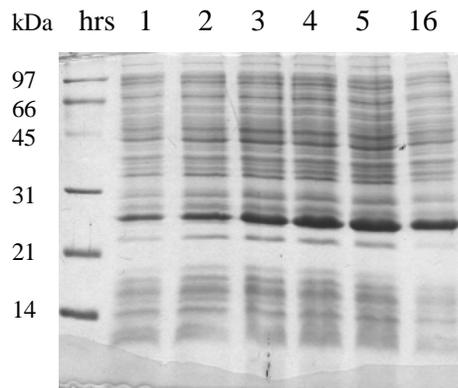


Figura 9A. Perfil de inducción de *cox2b* con IPTG 1 mM a distintos tiempos, el tiempo seleccionado fue el de 16 horas para la generación del anticuerpo policlonal anti COX2B de conejo.

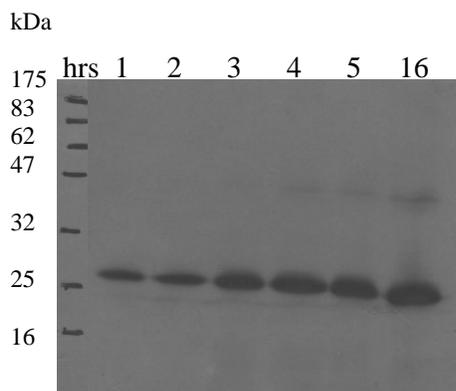


Figura 9B. Inmunodetección por quimioluminiscencia de la proteína COX2B con el anticuerpo obtenido contra la proteína recombinante. Las muestras corresponden a diferentes tiempos de inducción de la proteína recombinante en *E. coli*.

### Cultivo y obtención de *T. gondii*

Para obtener el material biológico necesario, se infectaron 5 ratones cada tres o cuatro días y se sacrificaron 10 ratones por semana con el fin de obtener un promedio de  $250 \times 10^6$  parásitos. Las alícuotas obtenidas se congelaron a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. La colecta de toxoplasmas se realizó hasta tener cantidades suficientes para romper las células del parásito,

purificar mitocondrias y cargar solubilizados de proteína mitocondrial a geles azules, ya que para poder visualizar los componentes de interés es necesario cargar un mínimo de 1 mg de proteína mitocondrial.

### Identificación inmunoquímica de las subunidades COX2A y COX2B

El anticuerpo de la proteína COX2B proviene de una proteína recombinante y el de COX2A de un péptido sintético de 11 residuos de aminoácidos. En la figura 10 se observa la reacción de inmunodetección tipo Western de un lisado de células completas de *T. gondii* en un gel de tricina-SDS al 14%

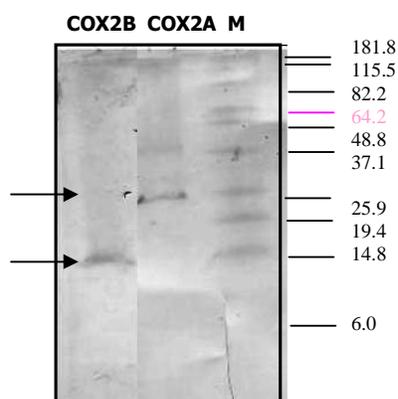


Figura 10. Inmunodetección de COX2A (23.8 kDa) y COX2B (13.2 kDa) en un lisado de células completas de *T.gondii* 40 µg. En el carril de extrema derecha se observan los marcadores de masa molecular (M).

### Aislamiento y purificación de mitocondrias

El proceso de aislamiento y purificación de mitocondrias se llevó a cabo después de colocar células rotas del parásito en gradientes de Percoll y su separación mediante centrifugación. Se obtuvieron una serie de fracciones que fueron analizadas por oximetría para identificar las que contenían mitocondrias enriquecidas. En la figura 11 se observa que el consumo de oxígeno en presencia de succinato sólo ocurre significativamente en dos de las fracciones del gradiente (fracciones 4 y 5). En la misma figura se observa la identificación de proteína de cada una de las fracciones obtenidas mediante inmunorréplica tipo Western.

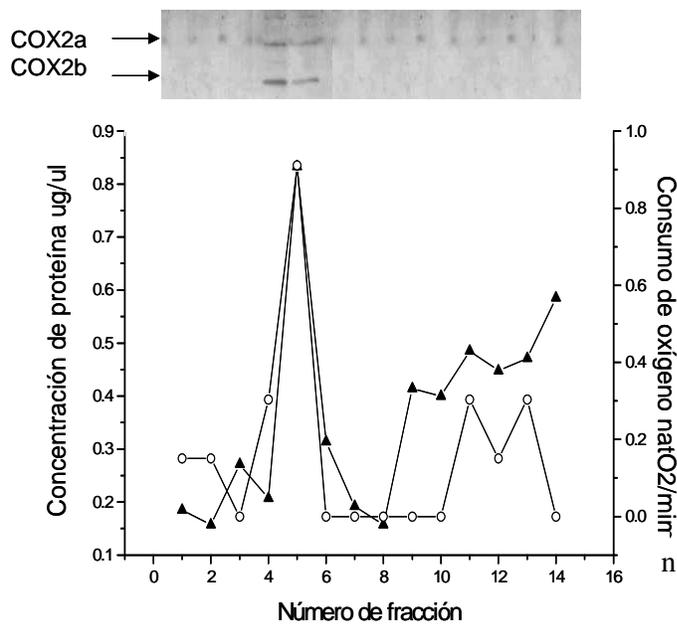


Figura 11. Distribución de consumo de oxígeno en el gradiente de Percoll al 40 %. ▲ Concentración de proteína en  $\mu\text{g/ml}$  de cada una de las fracciones obtenidas. ○ Velocidades de consumo de oxígeno en  $\text{natO}_2/\text{min}$  en presencia de succinato como sustrato. En la parte superior se muestra la inmunodetección tipo Western con el perfil de las fracciones del gradiente donde se observa que las fracciones que contienen a las proteínas COX2A y COX2B son las que muestran mayor consumo de oxígeno en presencia de succinato.

Al identificar en mitocondrias aisladas a COX2A y COX2B de *T.gondii* en gels de tricina-SDS, observamos que existe una diferencia significativa entre las masas moleculares aparentes de estas dos proteínas con respecto a las reportadas para las algas clorofíceas por Pérez-Martínez y cols., (2001). Por lo anterior, decidimos evaluar con mayor cuidado las masas moleculares aparentes de las proteínas COX2A y COX2B tanto, del alga incolora *Polytomella sp* como del parásito apicomplejo *T.gondii*.

### Identificación inmunoquímica de las proteínas COX2A y COX2B en *Polytomella sp*

Se purificaron mitocondrias del alga incolora *Polytomella sp*, se solubilizaron, se cargaron en un gel de Tricina-SDS al 14 %, y se determinó la masa molecular aparente de cada una de las proteínas en una inmunodetección tipo Western, utilizando anticuerpos específicos anti-COX2A y anti-COX2B de *Polytomella sp* obtenidos previamente en el laboratorio.

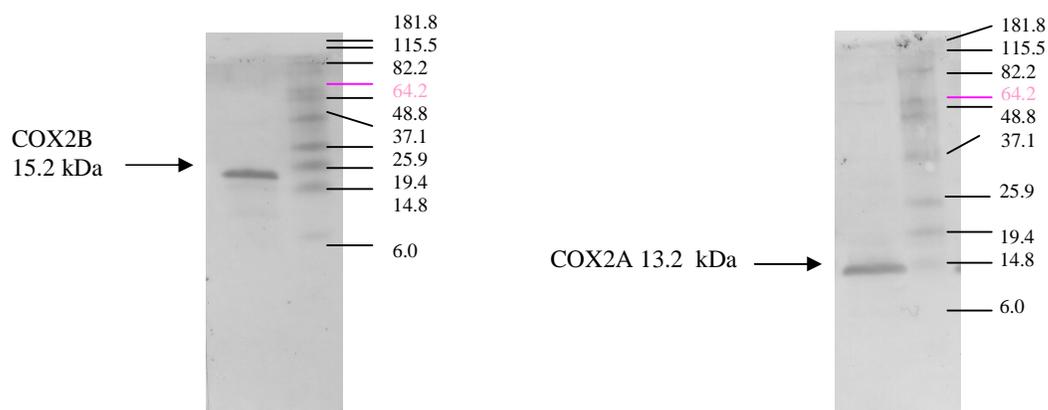


Figura 12. Detección inmunoquímica de COX2A y COX2B de *Polytomella sp* en gels Tricina-SDS al 14%.

La comparación de las masas moleculares de las subunidades COX2A y COX2B del alga clorofícea y del parásito apicomplejo se llevó a cabo en el mismo sistema electroforético y utilizando los mismos marcadores de masa molecular. Se determinaron las masas moleculares aparentes de forma gráfica. Se relacionó el desplazamiento relativo de cada proteína (RF) en el gel con el logaritmo de la masa molecular de los marcadores utilizados y se interpolaron los valores de movilidad electroforética obtenidos para las subunidades de interés. Como ejemplo se muestra uno de estos gráficos en la figura 13. Para las subunidades del alga clorofícea *Polytomella sp* se obtuvieron masas moleculares aparentes de 13.2 kDa para COX2A y de 15.2 kDa para COX2B. Para *T. gondii* los valores obtenidos fueron de 23.8 kDa para COX2A y de 13.2 kDa para COX2B.

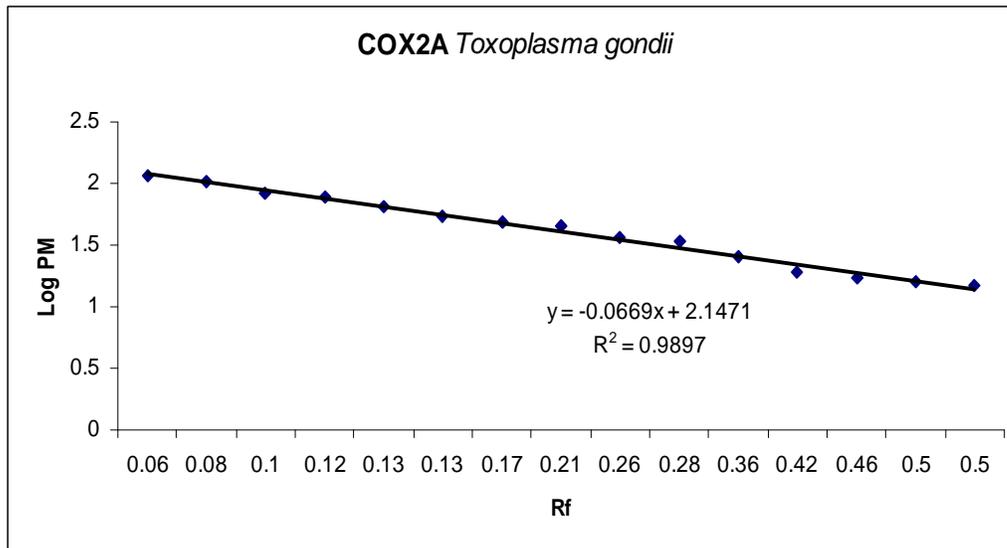


Figura 13. Gráfica de los logaritmos de las masas moleculares aparentes contra movilidad electroforética de marcadores de masa molecular e interpolación de los valores de las subunidades de interés para estimar la masa molecular aparente. PM (Peso molecular) y RF (Desplazamiento relativo).

### **Geles en dos dimensiones para la separación e identificación de las subunidades que constituyen a los complejos mitocondriales de *T. gondii***

Para el análisis de las subunidades de complejos mitocondriales se recurrió a las técnicas de geles azules nativos en una primera dimensión seguidos de geles desnaturalizantes de Tricina-SDS en segunda dimensión (Schägger y von Jagow, 1991). Cabe mencionar que la preparación mitocondrial presentó una alta contaminación de antígenos de superficie y actina, los cuales fueron identificados por sus secuencias N-terminales y por espectrometría de masas. Sin embargo, también fue posible la identificación de algunas proteínas mitocondriales del parásito. En la figura 14 se muestra el perfil electroforético de segunda dimensión obtenido para las mitocondrias de *T. gondii*. Se observaron complejos de alta masa molecular que en segunda dimensión se separarán en varios polipéptidos, y que pueden corresponder a los complejos III, IV y V de *T. gondii*.

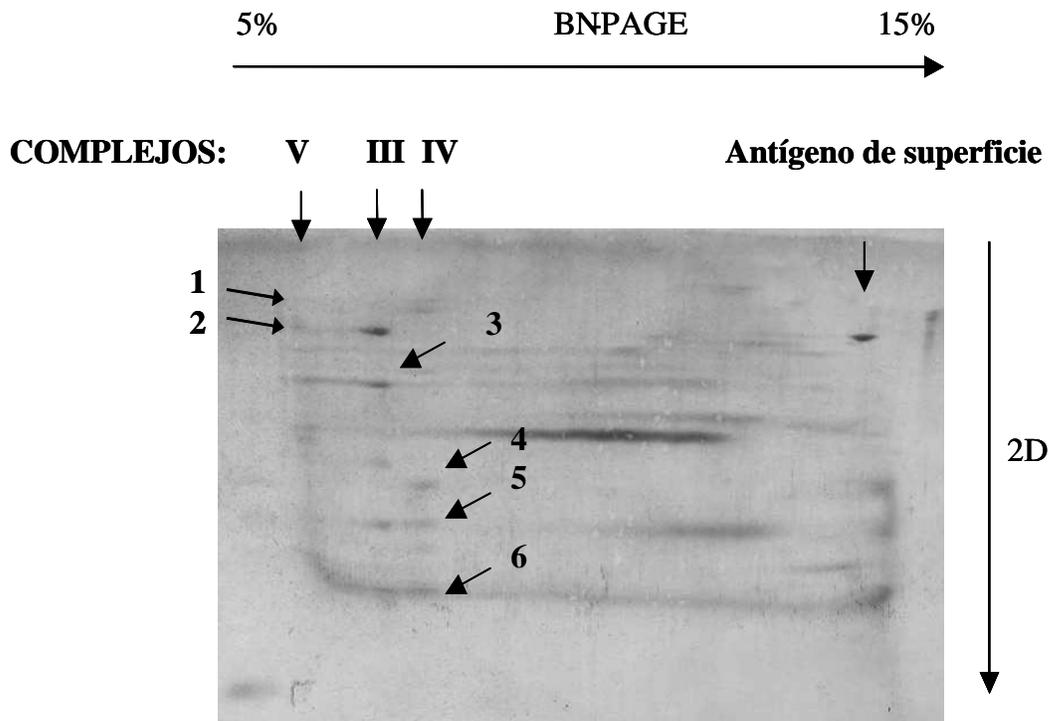


Figura 14. Patrón electroforético en dos dimensiones (2D) de las proteínas mitocondriales de *T.gondii*. Algunas de las manchas que se identificaron corresponden a: 1.- subunidad alfa de la ATPasa, 2.- subunidad beta de la ATPasa, 3.- subunidad de la citocromo *c* reductasa, 4.- COX2A, 5.- COXVb, 6.- COX2B

Uno de los geles de segunda dimensión fue transferido a membranas de nylon e inmunodecorado con anticuerpos anti-subunidades COX2A y COX2B. Se muestra la sección del gel donde se resuelven los complejos de mayor masa molecular como el III, el IV y el V. Con el fin de poder comparar las inmunodecoraciones tipo Western con los geles teñidos con azul de Coomassie, se transfirieron y se tiñeron las proteínas de carriles que fueron separados en el mismo gel azul nativo y bajo las mismas condiciones (figura 15). Los resultados obtenidos indican con claridad que ambos polipéptidos, COX2A y COX2B están asociados a un solo complejo mitocondrial, el cual debe ser el complejo IV o citocromo *c* oxidasa.

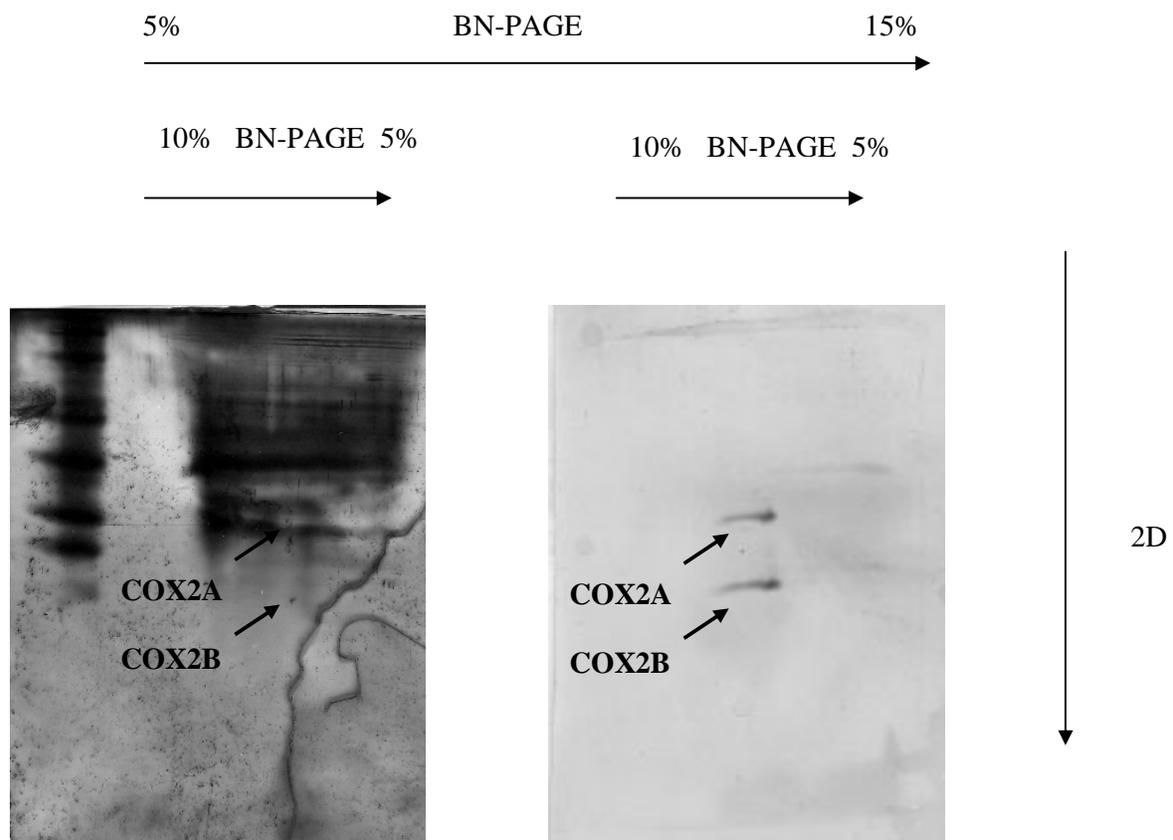


Figura 15. Localización e identificación de COX2A y COX2B en mitocondrias de *T. gondii*. En la primera dimensión, las mitocondrias aisladas (equivalentes a 1 mg de proteína) se corrieron en un gel azul nativo. Se cortó la mitad superior de cada gel y se corrieron lado a lado en un mismo gel de segunda dimensión en condiciones desnaturizantes. Para la mitad (izquierda) se utilizó tinción con plata y la otra mitad (derecha) se transfirió a membrana de nitrocelulosa para la detección inmunológica de COX2A y COX2B.

### **Secuenciación y LC MS/MS**

Adicionalmente al corrimiento de los geles y las inmunodetecciones, se realizaron transferencias a membrana de PVDF (Problot) para secuenciación de extremos N-terminales de los polipéptidos. No fue posible obtener secuencia del extremo N-terminal para ninguna de las proteínas de los complejos de la fosforilación oxidativa del parásito. En todos los casos, se encontró que los péptidos se encontraban bloqueados (es decir, que sus extremos N-terminales estaban acetilados o formilados). Otros geles fueron teñidos con azul de Coomassie para cortar algunas de las bandas y someterlas a análisis de LC MS/MS (Cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tandem). Esto con el fin de intentar obtener información de las secuencias detectadas con los anticuerpos y conocer más del proteoma mitocondrial de *T. gondii*. En la figura 16 se muestra un perfil de separación de proteínas de la mitocondria de *T. gondii* y algunas de las proteínas que se seleccionaron para ser analizadas por espectroscopía de masas. Además de las proteínas de superficie del parásito que contaminan fuertemente a la preparación mitocondrial, fue posible identificar sin ambigüedades a las subunidades alfa y beta de la ATPasa, una subunidad del complejo III y a la subunidad COXVb de la citocromo oxidasa, la cual se encuentra asociada al mismo complejo donde fue posible identificar inmunoquímicamente a las subunidades COX2A y COX2B. Por lo tanto, corroboramos la presencia de subunidades fragmentadas COX2A y COX2B en el complejo de la citocromo *c* oxidasa de *T. gondii*. Con lo anterior, también damos por primera vez referencia bioquímica de algunas proteínas del proteoma mitocondrial del parásito apicomplejo *T. gondii*.



## DISCUSIÓN

A pesar de la gran importancia médica del parásito apicomplejo *T. gondii* existen muy pocos estudios sobre la mitocondria. Si bien se ha planteado que la aportación de ATP mitocondrial a la poza celular es mínima (Uyemura y cols., 2004), en trabajos anteriores se ha demostrado la existencia de potencial membranal en el organelo en algunos miembros del phylum Apicomplexa como en *Plasmodium yoelli* (tanto en forma de bradizoíto como de taquizoíto) (Uyemura y cols., 2004) y en *T. gondii* que únicamente presenta potencial de membrana mitocondrial en la forma de taquizoíto (Versecy y cols., 1998). Un ejemplo de la importancia de la mitocondria de este parásito lo ejemplifica la droga anti-apicomplejos hidroxinaftoquinona “atovaquona”, la cual actúa interfiriendo con la cadena de transporte de electrones del parásito inhibiendo al citocromo *b* del complejo  $bc_1$  y que también es capaz de bloquear la replicación del taquizoíto (Mc. Fadden y cols., 2000). Se han caracterizado con oximetría algunos de los componentes de la fosforilación oxidativa del parásito *T. gondii* en parásitos completos permeabilizados con digitonina (Vercesi y col., 1998) y se han analizado estructuralmente las membranas mitocondriales por microscopía electrónica (Köhler, 2006). Finalmente, otros estudios enfocados a la purificación de otros organelos, como roptrias o granulos densos reportaron la separación de mitocondrias como productos secundarios (Dubremetz y cols., 1997) y fueron la base para la purificación de las mitocondrias en nuestro trabajo.

Actualmente consideramos que el problema de obtención de mitocondrias en cantidad suficiente es el factor principal que ha impedido la caracterización bioquímica de estos organelos del parásito. Ya se había señalado la dificultad y el alto costo de obtención de grandes cantidades de células de *T. gondii* (Crausaz y col., 2004). Una alternativa es la obtención de toxoplasmas en células Vero en cultivo. El crecimiento del parásito en estas condiciones permite rendimientos bastante altos, sin embargo los requerimientos de infraestructura, así como los costos aumentan considerablemente.

Para el presente estudio se montó la técnica del inóculo de *T. gondii* directo al peritoneo de los ratones, la cual nos permitió contar con material a lo largo de todo el tiempo de estudio y a un costo accesible. Sin embargo la cantidad de material obtenido para el estudio siempre fue una limitante, pues para lograr aislar 1 mg de proteína mitocondrial para correr

un gel azul-nativo, fue necesario recolectar un mínimo de  $392 \times 10^6$  parásitos, a partir de 15 ratones infectados.

A pesar de que las cantidades de proteína obtenida fue reducida, podemos asegurar que nuestra preparación mitocondrial es genuina, pues consume oxígeno en presencia de succinato y es sensible a cianuro (figura 11). Sin embargo la fracción mitocondrial aún se encuentra fuertemente contaminada con proteínas excretadas en altas concentraciones por el parásito, como son la actina, la proteína de deslizamiento (4S; gi/30840677), proteínas de la cadena ligera de miosina (TgMLC1; gi/16580144), proteínas de gránulos densos (GRA2; gi/2506908 y GRA3; gi/2498422), el antígeno P22 (gi/8777955) y el antígeno de superficie P30 (gi/13447088). Estas proteínas comigran con la fracción mitocondrial en los gradientes de Percoll y aparecen como contaminantes importantes en los geles bidimensionales. Estos contaminantes de la fracción mitocondrial pueden funcionar como marcadores del estadio celular del parásito, pues algunos de ellos son exclusivos de los taquizoítos y no de bradizoítos, como la proteína P30 (SAG1) encontrada en nuestro trabajo (Toursel y cols., 2000). Sin embargo, es necesario purificar ulteriormente la fracción mitocondrial de *Toxoplasma*. Una posibilidad es la inclusión de un paso adicional de purificación de los organelos en gradientes de Nicodenz.

La obtención limitada de células y mitocondrias obligó a Vercesi y col. (1998) a caracterizar funcionalmente a las mitocondrias de *T. gondii* utilizando células permeabilizadas con digitonina. Sus resultados indicaron la presencia de mitocondrias que respiran, llevan a cabo fosforilación oxidativa y generan un gradiente electroquímico. La respiración resultó sensible a los inhibidores mitocondriales clásicos antimicina y cianuro. No hay duda entonces, que *Toxoplasma* requiere de un sistema completo de fosforilación oxidativa, por lo menos en algún estadio de su ciclo vital.

De trabajos anteriores se sabía que COX2A y COX2B estaban codificadas en el DNA nuclear de los parásitos apicomplejos por dos genes independientes, por lo tanto se deberían traducir como dos péptidos que deben ensamblarse dentro de la mitocondria para formar una subunidad heterodimérica parecida estructuralmente a la subunidad 2 ortodoxa de la citocromo *c* oxidasa (Funes y cols., 2001).

Para poder identificar a las subunidades COX2A y COX2B de *T. gondii* se produjeron dos anticuerpos, uno contra la proteína recombinante COX2B y otro contra un péptido sintético de 11 residuos de aminoácidos correspondiente a un epítipo antigénico del

polipéptido COX2A. Ambos anticuerpos reconocen bandas con masas moleculares aproximadas a lo esperado tanto en lisado de células completas de *T. gondii* (figura 10), en fracciones enriquecidas de mitocondrias aisladas (figura 11), como en polipéptidos asociados con la citocromo oxidasa en geles bidimensionales (figura 15). Las dos bandas migran asociadas al complejo IV, donde además se identificó por espectrometría de masas a un polipéptido adicional que corresponden a la subunidad Vb de la citocromo c oxidasa (figura 14).

Con las mitocondrias aisladas se realizaron los experimentos de separación e identificación de dichas subunidades. En la figura 11 podemos identificar la presencia de una subunidad COX2A con una masa molecular de 24 kDa y otra independiente COX2B con una masa molecular de 13.2 kDa en células completas de *T. gondii*. También se utilizó un anticuerpo anti subunidad beta de la ATPasa de *Polytomella sp* en mitocondrias aisladas de *T. gondii* en geles 2D con el cual se identificó una banda de la subunidad beta de la ATP sintasa del parásito en la esquina superior izquierda de la membrana (datos no mostrados). Adicionalmente se identificaron las subunidades alfa (gi/728921) y beta (gi/78057343) de la ATP sintasa de *T. gondii* por espectrometría de masas. Con estos resultados podemos hablar de la presencia de los complejos III, IV y V mitocondriales en *T. gondii*, lo cual concuerda con lo reportado previamente (Vercesi y col., 1998). Los datos también son consistentes con la ausencia del complejo I en estos parásitos. Hasta la fecha, no se han identificado genes que codifiquen para subunidades del complejo I en ninguno de los genomas de parásitos apicomplejos secuenciados en su totalidad.

En el transcurso de los estudios con inmunorrélicas tipo Western se observaron diferencias importantes en las masas moleculares aparentes de las proteínas COX2A y COX2B del alga *Polytomella sp* y del parásito *T. gondii*. Normalmente las proteínas mitocondriales que son codificadas en el núcleo presentan una presecuencia o péptido señal necesario para que las proteínas puedan ser importadas al organelo (Brydges y Carruthers, 2003). En el 2001 Pérez-Martínez y cols. describieron que la subunidad COX2A de *Polytomella sp*, con base en su secuencia, debería tener una masa molecular aparente de 29.2 kDa la cual después de ser procesada (y eliminada la presecuencia mitocondrial) daría lugar a una proteína madura con una masa molecular aparente de 16.2 kDa. Para la subunidad COX2B no se identificó ningún tipo de procesamiento, ya que el extremo amino terminal de la proteína madura corresponde al predicho por la secuencia genómica. Por lo tanto, su masa molecular aparente debería ser de 17.2 kDa. En este trabajo se estudió el comportamiento electroforético de las dos subunidades del alga clorofícea y se estimaron sus masas moleculares aparentes (figura 12)

que corresponden a 13.0 kDa para COX2A y a 15.2 kDa para COX2B. Los valores experimentales revelan masas moleculares 18% y 12% inferiores con respecto a las teóricas para COX2A y COX2B respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a una simple anomalía electroforética, ya que las proteínas membranales, con regiones hidrofóbicas importantes, suelen unir mayor cantidad de SDS y migrar mayores distancias en los geles.

En cuanto a proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo del parásito apicomplejo, hasta el momento se han reportado una HSP70, una HSP60 (Toursel y cols., 2000) y una superóxido dismutasa SODB2 (Brydges y Carruthers, 2003). También varios tRNAs mitocondriales son importados al interior de las mitocondrias del parásito (Crausaz y cols., 2004). Las pre-proteínas presentan características propias; para la HSP70 se identificó una presecuencia típica, por lo que se sabe que *T. gondii* cuenta al menos con la maquinaria mínima necesaria de importación, para la HSP60 se identificó una presecuencia de 22 aminoácidos y una proteína madura de 32 aminoácidos y se mostró que tanto la presecuencia como la parte N-terminal de la proteína madura son necesarias para la importación correcta de la proteína. Para que SODB2 se importe se identificaron varias características diferentes a las reportadas anteriormente, para comenzar es indispensable que exista potencial de membrana en la mitocondria, el cuál existe sólo en la forma de taquizoíto. Esta información inicial nos lleva a pensar que muchas proteínas de la mitocondria y su actividad son específicamente importadas e integradas al organelo en este estadio del ciclo de vida del parásito. Adicionalmente, SODB2 tiene una presecuencia distinta que contiene un segmento hidrofóbico de 25 aminoácidos parecido a un péptido señal seguido por una presecuencia de 58 aminoácidos y solamente si cuenta con estas dos señales llega a su destino correcto en la mitocondria. Si se remueve una u otra señal, la proteína se dirige al apicoplasto o se queda en el citosol.

Si se considera un procesamiento para las subunidades COX2A y COX2B de *T. gondii* idéntico a lo que ocurre en el alga clorofícea, se esperan masas moleculares aparentes de 13.0 kDa para COX2A y de 15.0 kDa para COX2B. Sin embargo, analizando la subunidad COX2A del parásito apicomplejo se encontró consistentemente una masa molecular de 24.0 kDa. En un posible escenario que explique una masa de 11.0 kDa más a la esperada, se puede pensar que la presecuencia mitocondrial de COX2A de *T. gondii* se podría procesar antes que la de *Polytomella sp* (entre los residuos 94 y 95 en lugar de entre los residuos 174 y 175). Si suponemos que al igual que en *Polytomella*, la subunidad COX2B de *T. gondii* no tiene presecuencia, predecimos una masa molecular para la subunidad de 21.2 kDa. Sin embargo, las estimaciones de la masa molecular aparente a partir de nuestros experimentos nos indican

un valor de 13.0 kDa, señalando la presencia de una proteína 8 kDa más pequeña que lo esperado. Esta diferencia del 38% es muy superior a la atribuible a una simple anomalía de corrimiento electroforético. Una posible explicación es que la subunidad COX2B se procese en *T. gondii*, de tal manera que parte de la extensión sea reconocida como una presecuencia mitocondrial. Un corte proteolítico entre los residuos 76 y 77 de la secuencia de COX2B podría explicar esta diferencia en masas moleculares. Existe la posibilidad de que *T. gondii* esté reconociendo una parte de la extensión a la proteína COX2B como péptido señal mitocondrial y la esté procesando. Esto sería, en principio, distinto a lo que ocurre en *Polytomella sp*, donde COX2B no se procesa, lo cual es parecido a lo que ocurre con la proteína mitocondrial SODB2 en *T. gondii*.

En la figura 17 se muestra una propuesta de los aminoácidos componentes de las presecuencias con sus posibles sitios de procesamiento que explicarían la formación de la proteína madura COX2B y de sus extensiones.

Por lo tanto, proponemos que quizá *Toxoplasma* tenga una COX2A más grande y una COX2B más pequeña que sus contrapartes en las algas, y que por tanto, las extensiones resultantes sean distintas en tamaño y secuencia que las de las algas clorofíceas. Esto implica también, una interacción distinta entre las extensiones de las subunidades COX2A y COX2B en las algas y en los apicomplejos. Cada una estas proteínas representa subunidades esenciales del complejo IV de las cadena respiratoria. Alteraciones en las secuencias de estas proteínas podrían resultar en fenotipos deficientes en la respiración; el correcto ensamble de estas subunidades en el complejo de la citocromo *c* oxidasa es un prerequisite indispensable para su buen funcionamiento.

La hipótesis aquí planteada propone diferencias importantes en el procesamiento de las subunidades COX2A y COX2B entre las algas clorofíceas y los parásitos apicomplejos. Esto da pie a una reinterpretación de las secuencias conocidas, como se muestran en la siguiente figura:

Secuencia COX2B *T. gondii*

**MDVFRSFWNRRGAAPGGAATSSGRPAGCREENSSVLLQSLKANSQ**  
**QKKGETPL** QNVAAADYVTPQKYLDDPKIPTYYV FQSNMVTDEDLL  
 PGMLRNLEVDKRLTLPTRTHIRFLITATDVIHSWAVPALGIKADAI  
 PGRLQRINTFIQREGVFYGCSELGALHGFMPIVIEAVSPETYAAH  
 AKKWKD

Secuencia COX2A *T. gondii*

**MLAYFAASRELA VVFCVGTTLPENIFLFLSRRLAIIPASSPCSLFFG**  
**SRLYPIRS CCGRPAGFPAKIVYPFLSAHTFPKMMPLSSSLFRPYGH**  
**L**FHQFPRRFFSSAQRGDYSLMLPRHFSSTASSVTKPPQKTDAPAKH  
DEHDSHHGTNNFYHMPSSHSPSRHHLNPDGTMRDLTTAETFHWE  
HAEAETPAQQIVSVNGRKMVKGVETRDLEVELFLVHQKNIPFWPRM  
RMNVWGNHDLMLKAEFLFFWTPTFITWSLAIPMFTLLYMLDEAVY  
AAMTVKVIGRQWYWIYEEVESP **VDDEE**

Figura 17.- Nuevos sitios de procesamiento propuestos para las subunidades COX2A y COX2B de *T. gondii*. Las extensiones de ambas subunidades se encuentran en un recuadro. La presecuencia mitocondrial se muestra con caracteres cursivos sobre fondo gris. Comparar las secuencias con las mostradas en la figura 7.

Al inicio nos sorprendió el hecho de observar estas diferencias de masas moleculares entre estos dos organismos; sin embargo, es perfectamente posible pues, aunque se trate de los dos únicos ejemplos en la naturaleza con el gene *cox2* fragmentado en el núcleo, cada uno de ellos corresponde a dos organismos completamente diferentes (alga fotosintética y parásito apicomplejo), cada uno con organelos, formas y ciclos de vida completamente distintos e independientes. Y recordando lo que ocurre con las otras proteínas mitocondriales reportadas hasta el momento en *T. gondii* como SODB2, es muy probable que éste sea lo que ocurre. Por lo tanto, pensamos que la maquinaria de importación de las proteínas mitocondriales de los parásitos apicomplejos son más complejas de lo que se conoce. Estos parásitos poseen un organelo adicional que es el apicoplasto, el cual puede utilizar péptidos de tránsito similares a presecuencias mitocondriales (Brydges y Carruthers, 2003) pero con un péptido señal adicional con una longitud de 20 a 100 aminoácidos (Ralph y cols., 2004). También es importante recordar que el parásito cuenta con muchas otras estructuras membranosas más que el alga, además de la mitocondria y del apicoplasto (Köhler, 2006). Así que al adquirir los genes fragmentados del alga cloroficea requirió modificarlos y procesarlos de manera distinta a los originales para direccionarlos específicamente a la membrana interna de la mitocondria y no hacia cualquier otra membrana de sus múltiples organelos.

Debido a la alta contaminación de la muestra mitocondrial por parte de otros componentes celulares y antígenos de superficie propios del parásito, fue imposible la determinación exacta de los sitios de procesamiento por secuenciación de Edman de las dos proteínas de interés.

A pesar de que se realizaron acumulaciones de material con el fin de tener mayor cantidad de muestra, los contaminantes siempre enmascararon la muestra. Además, como ya se indicó, resultó imposible obtener secuencias N-terminales de las proteínas mitocondriales del parásito, probablemente porque muchas se encuentran bloqueadas (¿acetiladas? y/o ¿formiladas?). Las proteínas de deslizamiento y antígenos de superficie como la P30 se secretan en altas cantidades y favorecen que el parásito se mantenga unido a la célula del hospedero. Además como mostró David Sibley y col. (2003), estas proteínas son altamente adhesivas y van dejando una estela a lo largo de todo el trayecto que recorre el parásito antes de internalizarse en la célula que parasita. En nuestras manos, resultó sumamente difícil eliminar esta proteína, la cual parece adherirse a las mitocondrias durante el proceso de purificación.

Los genomas de los parásitos apicomplejos constituyen el grupo de los DNA mitocondriales más compactos que se han caracterizado. En los del género *Plasmodium* los genes mitocondriales se encuentran en una unidad lineal de un poco menos de 6 kb que se encuentran repetidos múltiples veces. En otro apicomplejo del género *Theileiria*, las unidades lineales se encuentran de manera independiente y presentan secuencias repetidas en los extremos. Independientemente de estas diferencias, en ambos genomas mitocondriales se han identificado regiones que codifican para dos RNAs ribosomales y tres componentes de la cadena respiratoria: las subunidades I y III (COX I y COX III) de la citocromo c oxidasa (complejo IV) y el citocromo *b*, un componente esencial de la ubiquinol: citocromo *c* oxido reductasa (complejo III o complejo *bc*<sub>1</sub>) (Feagin, 2000). En *T. gondii* hasta el momento sólo se han descrito las secuencias del DNA nuclear (parcial) y del apicoplasto, pero el DNA mitocondrial aún no se ha secuenciado. Sin embargo podemos predecir, con confianza, que no habrá gene alguno codificando para la subunidad COX2 de la citocromo oxidasa en dicho genoma mitocondrial.

La identificación de 19 aminoácidos adicionales a la secuencia reportada para COX2B resulta muy importante en el conocimiento de estas dos proteínas, que si bien resultan ser junto con las algas verdes los únicos dos ejemplos en la naturaleza que presentan estas dos proteínas fragmentadas en el núcleo, muestran también diferencias específicas entre cada organismo. La posibilidad de que la diferencia entre las masas moleculares de COX2A y COX2B sea debido a un procesamiento distinto en las presecuencias mitocondriales del parásito con respecto al alga verde nos recuerda que son organismos distintos con ciclos de vida totalmente distintos.

Así pues resulta de interés el conocimiento acerca de las interacciones que mantienen estable la estructura heterodimérica de las subunidades COX2A y COX2B. El conocimiento detallado de la estructura del heterodímero COX2A/COX2B podrá llevar eventualmente al diseño de sustancias químicas que desestabilicen la interacción entre las dos subunidades y que puedan servir potencialmente como fármacos en contra de la toxoplasmosis e incluso la malaria.

## CONCLUSIONES

1. Aportamos evidencia bioquímica de que *COX2A* y *COX2B* codificadas en el genoma nuclear en genes independientes se traducen a proteína y se integran a al mitocondria del parásito apicomplejo como dos péptidos también independientes.
2. Se identificaron las proteínas COX2A con una masa molecular aparente de 23.8 kDa y COX2B con una masa molecular aparente de 13.2 kDa.
3. Los sitios de procesamiento pudieran ser diferentes en los apicomplejos comparados con las algas clorofíceas y aunque no fue posible su determinación exacta por análisis de grupos aminos terminales, la evidencia bioquímica en geles de Tricina-SDS muestra que el procesamiento de estas dos proteínas es diferente para cada especie.
4. Se identificaron algunas proteínas componentes del proteoma mitocondrial del parásito apicomplejo. Con inmunodetección componentes de la citocromo *c* oxidasa, como las subunidades COX2A y COX2B; por LC MS/MS las subunidades alfa y beta de la ATPasa, una subunidad VB de la citocromo *c* oxidasa y una subunidad de la citocromo *c* reductasa.
5. Con este trabajo se presenta la primera evidencia bioquímica del análisis de proteínas mitocondriales en el parásito, la cual abre las puertas para un estudio proteómico más extenso.

## **PERSPECTIVAS**

Con este trabajo se abre la puerta para una serie de trabajos posteriores necesarios para el entendimiento de la evolución de los organismos apicomplejos y sus estructuras. Entre las estrategias a seguir podemos indicar:

- 1.- Llevar a cabo una purificación adicional de la fracción mitocondrial obtenida, para tratar de eliminar los contaminantes que imposibilitan estudios posteriores.
- 2.- Determinar los sitios exactos de procesamiento de las proteínas COX2A y COX2B del parásito apicomplejo *T. gondii* por secuenciación de los extremos N-terminales de las proteínas correspondientes.
- 3.- Análisis de otras subunidades de la citocromo *c* oxidasa presentes en el parásito.
- 4.- Análisis del resto de los complejos mitocondriales y sus proteínas integrales.

## REFERENCIAS

Adams K.I., Song K., Roessler P.G., Nugent J.M., Doley J.L. and Palmer (1999) Intracellular gen transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc. Natl. Acad Sci.* 96: 13863-13868.

Anderson S., Bankler A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.J., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R. and Young I.G. (1981) Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290: 457-465.

Anderson S., Zomorodipour A., Anderson J.O., Sichert-Ponten T., Alsmark C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 396: 133-140.

Anibal E. Vercesi, Claudia O. Rodríguez, Sergio A. Uyemura, Li Zhong and Silvia N.J. Moreno (1998) Respiration and Oxidative Phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry.* (273), 43: 3104-31047

Attardi, G., and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annual Review Cellular Biology.* 4: 289-333

Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.J., Gotschlich E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry.* 136:175-179.

Boyer P.D. (1997) The ATP synthase a splendid molecular machine. *Annual Review Biochemistry.* 66: 717-749

Brandt U. (1997) Proton translocation by membrane-bound NADH: Ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochimical and Biophysical Acta.* 1318 (1-2): 79-9

Brydges S. and Carruthers V. (2003) Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*. 116: 4675-4685

Calboun M.W., Thomas J.W. and Gennis R.B. (1994) The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochemistry*. 19: 325-330

Carroll J., Shannon R.J., Fearley I.M., Walker J.E. and Hirst (2002) Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification two new subunits. *J Biol Chem*. 277 (52): 50311-50317

Crausaz Esseiva A., Naguleswaran A., Hemplill A. and Schneider A. (2004) Mitochondrial tRNA import in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (41): 42363-42368

Ellis, J.T., Morrison, D.A. y Jeffries, A.C. (1998) The phylum apicomplexa: an update on the molecular phylogeny. In *Evolutionary relationships among protozoa* (eds. GH Coombs, K Vickerman, M.A. Sleign y A. Warren) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands p.p. 255-274

Feagin J.E. (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol*. 30: 371-390

Funes S., Davidson E., Reyes-Prieto A., Magallon S., Herion P., King M.P. and González-Halphen D. (2002) A green algal apicoplast ancestor. *Science*. 298: 2155

Funes S., Reyes-Prieto A., Perez-Martinez X., Gonzalez-Halphen D. (2004) On the evolutionary origins of apicoplasts: revisiting the rhodophyte vs. chlorophyte controversy. *Microbes Infection*. 6: 305-311.

Gajadhar A.A., Marquardt W.C., Hall R., Gunderson J., Ariztia-Carmona E. and Sogin M.L. (1991) Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 45: 147-154

Gardner M.J., Williamson D.H. and Wilson R.J. (1991) A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 44: 115-123

Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Perteua M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.I., Cummings L.M., Subramanian G.M., Mungall C., Venter J.C., Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davis R.W., Fraser C.M. and Barrell B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419: 498-511

Gray M.W. (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 9: 678-687

Gray M.W., Burger G. and Lang B.F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology*. 2: 1018.1-1018.5

Hackett J.D., Yoon H.S., Bento Soares M., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Scheetz T.E., Kelly M., Lappalainen P., Talbo G., Haltia T., van der Oost J., Saraste M. (1993) Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center. *Journal Biology Chemistry*. 268: 16781-16787.

Holm L., Saraste M. and Wikstom M. (1987) Structural models of the redox centres in cytochrome oxidase. *EMBO Journal*. 6: 2819-2823

Iwata S., Ostermeier C., Ludwin B. and Michel H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. 331: 717-719

Köhler S. (2006) Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. The ovoid mitochondrial cytoplasmic complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitology Research*. 98: 355-369

Köhler S., Delwiche C.F., Denny P.W., Tilney L.G., Webster P., Wilson R.J., Palmer J.D. and Roos D.S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 275: 1485-1489

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-685.

Leriche M.A. and Dubremetz J.F. (1991) Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 45: 249-260

Markwell M.A.K., Hass S.M., Biber L.L. and Tolbert N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210

McFadden G.I. and Waller R.F. (1997) Plastids in parasites of humans. *Bioassays*. 19: 1033-1040

Melo E.J.L., Attias M. and De Souza W. (2000) The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology*. 130: 27-33

Moreira D. and López-García P. (2002) The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiology*. 10: 31-38

Ossorio P.N., Schwartzman J.D., Boothroyd J.C. (1993) A toxoplasma rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 50:1-16.

Pettigrew G. and Moore G.R. (1978) *Cytochromes a biological aspects*. Springer Verlag, Berlin- Heidelberg- New York.

Perkins G., Renken C., Martone M.E., Young S.J., Ellisman M., and Frey T. (1997) Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts" *Journal of Structural Biology*. 119: 260-272

Pérez-Martínez X., Antaramian A., Vazquez-Acevedo M., Funes S., Tolkunova E., d'Alayer J., Claros M.G., Davidson E., King M.P. and González-Halphen D. (2001) Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *Journal of Biology Chemistry*. 276: 11302-11309

Pobezhimova T.P. and Voinikov V.K. (2000) Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membrane Cell Biology*. 13 (5): 595-602

Poyton R.O., Goehring B., Droste M., Sercarino K.A., Allen L.A., and Zhao X.J. (1995) Cytochrome c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. 260: 97-116

Ralph S., Foth B., McFadden G. (2004) Evolutionary Pressures on apicoplast transit peptides. *Molecular Biology and Evolution* 21 (12):2183-2194

Schägger H., and von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem*. 199: 223-231.

Schägger H. (1994) Denaturing electrophoretic techniques. In *A practical guide to membrane protein purification* (von Jagow G., and Schägger H., eds.) Academic Press, pg 59-166.

Seeber F. (2003) Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 3: 99-109

Shuster W. and Brennicke A. (1994) Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioen. Biomem*. 45:61-78.

Sibley L.D., (2003) *Toxoplasma gondii*: Perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4: 581-586

Sibley L.D. and Boothroyd J.C. (1992) Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma*. *Mol Biochem Parasitol*. 51 (2): 291-300

Stoebe B. and Kowallik K.V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. Trends Genet. 15: 344-347

Toursel C., Dzierszynski F., Bernigaud A., Mortuaire and Tomavo S. (2000) Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*. Molecular and Biochemical Parasitology. 111: 319-332

Trumpower B.L. (1990) The proton motive Qcycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. J Biol Chem. 265 (20): 11409-11412

Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Iton K., Nakashima R., Yacho R., and Yoshikawa S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8Å. Science. 272: 1132-1144

Vaidya A.B., Akella R. and Suplick K. (1989) Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in a tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. Mol Biochem Parasitol. 35: 97-108

Vivier and Desportes. Phylum apicomplexa in Handbook of protista. USA Press 1990; p.p 549-573

Waller R.F., Keeling P.J., van Dooren G.G. and McFadden G.I. (2003) Comment on A green algal apicoplast ancestor. Science. 301: 49

Williamson D.H., Gardner M.J., Preiser P., Moore D.J., Rangachari K. and Wilson R.J. (1994) The evolutionary origin of the 35 kb circular DNA of *Plasmodium falciparum*: new evidence supports a possible rhodophyte ancestry. Mol Gen Genet. 243: 249-252

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

Witt H., Malatesta F., Nicoletti F., Brunori M. and Ludwin B.C. (1998) Cytochrome c binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Eur.J.Biochem.* 251: 367-373

Zorov D.B., Kasnikov B.F., Kozminova A.E., Vysokikn M.Y. and Zorova L.D.  
(1997) mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci Rep.* 17 (6): 507-520