

11281 39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Caracterización de la Cadena Respiratoria del
Alga Clorofita *Polytomella* sp.**

Inferencias sobre la Divergencia Evolutiva de los
Linajes Fotosintéticos e Incoloros en la
Familia Chlamydomonadaceae

TESIS
que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias
presenta:

Biól. Adrián Reyes Prieto

Dirección:

Dr. Diego González Halphen
Dr. Rafael Moreno Sánchez

Ciudad Universitaria, 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

Esta tesis se realizó bajo la dirección conjunta del Dr. Diego González Halphen (tutor responsable ante el posgrado) del Instituto de Fisiología Celular y el Dr. Rafael Moreno Sánchez del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

Durante el desarrollo del proyecto recibí el apoyo de una beca doctoral otorgada por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

El trabajo recibió apoyo de la Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) por medio de los proyectos 030359 y 201427.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.
Por sus tesoros compartidos con generosidad. A sus espacios e instituciones.
A sus páginas e imágenes. A su música y ciencia. A su gloria y dolor.
Sobre todo a su gente.

Al Dr. Diego González Halphen, por ser mi maestro por más de una década. Por impulsarme a crecer dentro de su idea. Porque el trabajo cotidiano nos convirtió en amigos y cómplices.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez, por permitirme ser parte de su grupo y enseñarme tantas cosas. Por apoyarme en todo momento y ayudarme a concretar cuando esto parecía tornarse más difícil.

A los doctores Georges Dreyfus y Federico Martínez, miembros del Comité Tutorial, que periodo tras periodo aportaron su conocimiento y experiencia a esta trabajo.

A los miembros del jurado: Los doctores Miguel Angel Cevallos Gaos, Miguel Lara Flores, Irma Bernal Lugo, Juan Pablo Pardo Vázquez y Salvador Uribe Carvajal, que con la revisión del manuscrito enriquecieron la conclusión del trabajo.

Un agradecimiento especial a la QFB Miriam Vázquez Acevedo por la ayuda técnica que siempre me brindó.

A los Doctores Miguel Gómez Lim, Edgar Davidson y Michael P. King. Gracias por permitirme aprovechar su experiencia y recursos en la consecución de objetivos importantes de este trabajo.

A los miembros de las unidades de Cómputo, Microscopía Electrónica y Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

A la Señora María Eugenia Araiza que con su trabajo transformó el papeleo del posgrado en algo extrañamente amigable.

Al señor Alfredo Octaviano por su cordial ayuda y compañía.

A los que siempre estuvieron cerca...

Soledad. Por tantas cosas que no cabrían aquí. Por llevar luz por dentro y compartirla cada instante. Gracias Sole. Gracias amiga.

Miriam, por tu buen humor . Por llenar de risas tantos años. Por tu apoyo incondicional.

Xóchitl, Ember y Anaíd. Amigas y maestras. Por tantos momentos felices. Hace tiempo que están lejos, pero las recuerdo con frecuencia.

Ricardo, Marcela, Norma, Óscar, Raúl, César, David, Álvaro, Karla, Sara, Raymundo, Fernando. Los buenos amigos del departamento de bioquímica del INC que me recibieron como uno más de ellos. Por las inolvidables comidas, risas y seminarios jugosos. Por su apoyo y ayuda, fundamentales para lo que se resume en la próximas páginas.

Los compañeros del 325norte, José Luis, Robert, Ariane, Paula, Óscar y recientemente Dinorah. Por lo mucho que aprendimos juntos. Por los buenos momentos, que también fueron muchos.

Los camaradas del IFC,
Alexander, por una compañía siempre agradable. Por compartir de cerca el último tramo de este sinuoso camino. Por iniciar el próximo... que se ve más escabroso. Ahí vamos. Victor, por compartir el inicio del proyecto más difícil . Por Edna y Mateo. Shaday y Artemio, hace casi 6 años iniciamos esto al mismo tiempo. Por los prerrequisitos (QEPD)

Mis grandes amigos,
Toño, aunque lejos hoy, siempre anduvimos juntos. Por la Marquesa, en penumbra y lluviosa. Por el templo destruido. Por Elementos.
Rodrigo, de más lejos todavía. Hermano, que bueno que has vuelto. Por la Canica Azul que nunca rodó. Por los goles con aroma a Rock'n Roll. Por el Cocuyo Banderas.
Pável, también lejos pero con súbitas y frecuentes apariciones. Porque nadie ejerce la irreverencia con tanta autoridad como tu. Por la Magia Negra.

Y por supuesto, a mi familia. Por su aliento constante, por su amor y cariño inagotables. Por la vida plena que compartimos día con día. Crecer en su seno ha sido el mejor regalo.

Y va para...

Maru, sabes que esto es de los dos, como todo. Sin ti no.

Anajose, no creía en angelitos hasta que dormiste en mis brazos.

Martha y Ricardo, poco dicen las palabras. Por cada cosa.

Fabián, lo mejor llegó carnal. Sin duda.



CONTENIDO

ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	
Introducción	1
NAD(P)H deshidrogenasas	2
La oxidasa alterna	4
Funciones de la AOX	6
Los genes <i>Aox</i>	11
CAPÍTULO 2	
Antecedentes directos	
Filogenia de las <i>algas verdes</i> y las <i>plantas terrestres</i>	19
Las clorofitas y el género <i>Polytomella</i>	21
OBJETIVOS	26
CAPÍTULO 3	
Resultados publicados	
Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte <i>Polytomella</i> sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase.	28
CAPÍTULO 4	
Resultados complementarios	
Actividad mitocondrial	
Potenciales de membrana	39
Oxidación de análogos de quinol	40
Efecto de la rotenona	40
Inhibidores de la oxidasa alterna	41
Actividad ascorbato-TMPD oxidasa	42
Inhibidores del complejo III	46
Exposición de cultivos celulares a cianuro	47

La búsqueda del posible gen <i>Aox</i>	
Hibridaciones	52
Reacción en cadena de la polimerasa	52
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	69
APÉNDICE I. MÉTODOS	
Cultivos celulares	72
Aislamiento de Mitochondrias	72
Consumo de oxígeno	73
Actividad de citocromo <i>c</i> oxidasa	73
Potencial de membrana	73
Síntesis de ATP	75
Contenido de citocromos	75
Cuantificación de ácidos grasos mitocondriales	76
Electroforesis en poliacrilamida e inmunodetección	77
Extracción de DNA total	77
Hibridación tipo <i>Southern</i>	77
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	79
Purificación de DNA de geles de agarosa	80
Clonación de productos de PCR	80
Purificación de Plásmidos	81
Minipreparaciones	81
Preparaciones grandes	81
Secuenciación de DNA	81
Material suplementario	
Alineamiento de PRC18	83
Alineamiento múltiple de AOX de diversas especies	84
APÉNDICE II. OTRAS PUBLICACIONES	
Artículo I	
Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: perspectives for the allotopic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies	86
Artículo II.	
Simbiosis y el Origen de los Eucariontes. <i>Revisión</i>	109

Artículo III

**Apicomplexan split *cox2* genes indicate a green
algal apicoplast ancestor**

137

TABLAS

I. Oxidación de análogos de ubiquinol	40
II. Constantes de afinidad y disociación	51
III. Consumo de oxígeno mitocondrial	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	NAD(P)H deshidrogenasas mitocondriales	3
Figura 2	Cadena respiratoria mitocondrial de plantas	5
Figura 3	Ciclo monómero-dímero de activación de la oxidasa alterna	8
Figura 4	Regulación de la expresión del gen <i>Aox</i>	10
Figura 5	Alineamiento de secuencias AOX. Hélices conservadas	12
Figura 6	Haz de hélices y sitio activo de la AOX	13
Figura 7	Diferentes propuestas de la estructura de la AOX en la membrana	14
Figura 8	Árbol filogenético (18S rRNA) de las plantas verdes	20
Figura 9	Micrografías de <i>Polytomella</i> sp	22
Figura 10	Filogenia consenso de las clorofitas	23
Figura 11	Micrografía de mitocondrias aisladas de <i>Polytomella</i> sp.	39
Figura 12	Efecto de la rotenona sobre la respiración mitocondrial	41
Figura 13	Trazos respiratorios con mitocondrias de <i>Polytomella</i> sp.	42
Figura 14	Efecto del KCN sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	43
Figura 15	Actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	44
Figura 16	Efecto de la azida sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	44
Figura 17	Efecto del oxígeno sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	45
Figura 18	Efecto de la antimicina y la mixotiazol sobre la respiración mitocondrial	46
Figura 19	Efecto del KCN sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	47
Figura 20	Efecto de la azida sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	48
Figura 21	Efecto de la antimicina y la mixotiazol sobre la respiración mitocondrial	49
Figura 22	Efecto del oxígeno sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa	50
Figura 23	Esquema del producto de PCR <i>PRC18</i>	53
Figura 24	Diseño de desoxiligonucleótidos sobre la secuencia de AOX	54
Figura 25	Productos de PCR	54
Figura 26	Productos de PCR anidado	55
Figura 27	La cadena respiratoria de <i>Polytomella</i> sp.	57
Figura 28	Algunas interacciones metabólicas mitocondria-cloroplasto	62
Figura 29	Esquema de regulación <i>redox</i> (fotosíntesis) de genes nucleares	63
Figura 30	Modelo para la pérdida del gen <i>Aox</i> en <i>Polytomella</i> sp.	64
Figura 31	Filogenia global por 16-18S rRNA	65
Figura A	Potencial transmembranal medido con safranina O	74
Figura B	Espectro reducido menos oxidado de mitocondrias de <i>Polytomella</i> sp.	76

ABREVIATURAS

AOX*	<i>Alternative oxidase</i> . Oxidasa alterna (ubiquinol: oxígeno oxidoreductasa)
BHT	Butil-hidroxitolueno
BSA*	<i>Bovine serum albumine</i> . Albúmina de suero bovino
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
DBH	Decilbenzo hidroquinol
DQ	Duroquinona
DTT	Ditio trietol
EDTA*	<i>Ethylendiamine tetraacetic acid</i>
EGTA*	<i>Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EPR*	<i>Electron paramagnetic resonance</i> . Resonancia paramagnética del electrón
HEPES*	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> .
MES*	<i>2-Morpholinoethanesulfonic acid</i> , Acido 3-morfolino etanosulfónico
MOPS*	<i>3-Morpholinopropanesulfonic acid</i> . Acido 4-morfolino propanosulfónico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida adenina-fosfato dinucleótido (forma reducida)
nPG	n-Propilgalato
PCR*	<i>Polymerase chain reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa
ROS*	<i>Reactive oxygen species</i> . Especies de oxígeno reactivas
SDS*	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> . Dodecil sulfato de sodio
SHAM*	<i>Salicylhydroxamic acid</i> . Ácido salicil hidroxámico
TMPD	<i>N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine</i>
TPP*	<i>Tetraphenylphosphonium</i> . Tetrafenil fosfonio
UQ	Ubiquinona
UQ*	Ubisemiquinona
UQH	Ubiquinol

*Siglas en ingles

RESUMEN

La oxidasa alterna (AOX) es una enzima mitocondrial que se ha encontrado en todas las *plantas terrestres* (estrepotofitas) analizadas hasta la fecha, así como en un gran número de *algas verdes* (clorofitas). Se ha propuesto que la AOX es parte de un sistema preventivo contra el estrés oxidativo, donde funcionaría como una válvula de escape de electrones cuando la cadena respiratoria clásica o citocrómica mantenga un estado de reducción elevado. La AOX también se ha relacionado con el metabolismo mitocondrial durante la fotosíntesis.

La respiración mitocondrial del alga incolora *Polytomella* sp. disminuye fuertemente (más del 92%) por acción de inhibidores de los complejos respiratorios III y IV. La inducción de estrés por KCN en los cultivos de *Polytomella* sp. no incrementa la respiración resistente a cianuro, a diferencia de lo que ocurre en otras algas clorofitas, como *Chlamydomonas reinhardtii*. Asimismo, ensayos de activación de la enzima por exposición a agentes reductores, como DTT, no incrementaron la actividad de la posible AOX. De la misma forma, los activadores típicos de la AOX en plantas, como piruvato o α -cetoglutarato, tampoco evidenciaron la actividad de la enzima. Por otro lado, experimentos de inmunodetección no detectaron alguna forma inactiva de la AOX en *Polytomella* sp. Adicionalmente, experimentos de hibridación de DNA total de *Polytomella* contra cDNA del gen *Aox* de *Chlamydomonas* sp. W80 sugieren que el gene no está presente. Estos datos se refuerzan por los resultados negativos después de intentar amplificaciones por PCR, donde en ninguna condición experimental se obtuvo evidencia de la existencia del gen *Aox*.

Los datos sugieren que el alga incolora *Polytomella* sp. carece de AOX y posiblemente del gen que la codifique. Es posible que la ausencia, o inactivación, del gen *Aox* esté relacionada con la pérdida de la capacidad fotosintética. Recientemente se ha presentado evidencia de que la expresión de la AOX responde, al menos parcialmente, a la exposición a luz y al metabolismo del cloroplasto. Considerando que *Polytomella* sp. perdió la

capacidad fotosintética y que esto puede llevar a la inactivación (incluso la pérdida) concomitante de genes nucleares relacionados con dicha función, es probable que la pérdida de la AOX este relacionada con la desaparición de la fotosíntesis, dado el papel aparente de la enzima durante el proceso.

Finalmente, aunque el estrés inducido por KCN no activa o lleva a la expresión de una AOX, si produce cambios en la proporción lípidos/proteína en las membranas mitocondriales, así como un incremento en el contenido de grupos hemo tipo *a*. En ese contexto, se observó un cambio en los parámetros cinéticos de la citocromo *c* oxidasa debido la presencia de KCN en los cultivos celulares. Los cambios más evidentes son las constantes de disociación de ligandos del centro bimetálico Cu_B-23 , como el cianuro, la azida y el oxígeno.

ABSTRACT

The alternative oxidase (AOX), a quinol oxidase, is a mitochondrial enzyme present in all *land plants (Streptophyta)* in several *green algae (Chlorophyta)* and, in some protists and fungi. It has been proposed that the AOX participates in a preventive system against oxidative stress during highly-reduced states of the classical respiratory chain. On the other hand, some data suggest that AOX is related with photosynthetic metabolism.

The inhibitors of respiratory complexes III (antymycin and myxothiazol) and IV (cyanide) inhibit the mitochondrial respiration of *Polytomella* sp. over 92%. The presence of cyanide in the culture media did not stimulate the cyanide-insensitive respiration; this differs from reports in other organisms, including the closely related green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Additionally, the activation assays with reducing agents, as DTT, or specific activators like pyruvate and α -ketoglutarate, failed to enhance an AOX activity. Immunodetection experiments did not detected some potential AOX in *Polytomella* sp. On the other hand, hybridization assays with the partial cDNA of the *Aox* gene from *Chlamydomonas* sp W80 did not shown a positive signal with total DNA from *Polytomella* sp. These data, and the negative results obtained when trying to amplify a putative *Aox* gene in *Poltomella* by PCR, strongly suggests the absence of the *Aox* gene in *Polytomella* sp.

The absence of AOX activity in *Polytomella* sp may be due to the lack of the corresponding gene, and not because of the presence of an inactive state of the enzyme. It is possible that the inactivation and later deletion of the *Aox* gene is related to loss of photosynthesis in the *Polytomella* genus. Recent reports about the *Aox* expression in response to the light in plant cells support the idea of the role of AOX in photosynthetic cells.

The data also suggested that the induced stress by cyanide modifies the mitochondrial lipid/protein ratio and heme *a* content, but did not stimulate the cyanide insensitive respiration by a plant-like AOX. In this context, the presence of cyanide changes the kinetic parameters of cytochrome *c* oxidase, i.e., increasing the apparent affinity towards ligands of a_3Cu_B bi-metallic center

of the complex, like cyanide, azide and oxygen. We do not completely understand how cyanide causes the modifications in the affinities of the ligands, however, those should be the result of global metabolic change by the stress, where the control flux points in the respiratory chain are modified from one state to other.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El surgimiento de la teoría quimiosmótica [Mitchell, 1961] proporcionó un principio teórico y mecanístico para explicar la fosforilación oxidativa y fotosintética. Hoy es un paradigma de la bioenergética que el acoplamiento de una serie de reacciones redox con la generación de un gradiente electroquímico de protones (cadena transportadora de electrones) se emplea para la síntesis de ATP (ATP sintasa). En la mayoría de las células eucariontes la fosforilación oxidativa es una fuente importante, en ocasiones la principal, para la obtención de energía [Saraste, 1999]. El proceso lo realizan cuatro complejos proteicos multiméricos embebidos en la membrana interna mitocondrial [Hatefi, 1985, Trumpower y Gennis, 1994]. De estos cuatro complejos, tres son integrantes de la cadena respiratoria, ya que participan en el transporte secuencial de electrones desde sustratos oxidables (provenientes del ciclo de Krebs, la β -oxidación, la oxidación de glicerol 3-P, etc.) hasta el oxígeno, acoplando la energía libre de las reacciones catalizadas a la translocación de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal. Históricamente, y por estudios efectuados en mitocondrias de mamíferos, los complejos respiratorios que funcionan como bombas de protones se denominaron secuencialmente: complejo I (NADH: ubiquinol oxido-reductasa o NADH deshidrogenasa), complejo III (ubiquinol: citocromo c oxido-reductasa o complejo *bc₁*) y complejo IV (citocromo c oxidasa). El complejo II (succinato: ubiquinol oxido-reductasa o succinato deshidrogenasa), es parte de ciclo de Krebs, pero no participa en la translocación de protones. Adicionalmente, la ATP sintasa F_1-F_0 es llamada complejo V, aunque no está involucrada en el transporte de electrones [Hatefi, 1985]. En años recientes, se resolvieron por cristalografía de rayos X las estructuras de los complejos III [Iwata et al., 1998] y IV [Tsukihara et al., 1996], así como de una porción importante del complejo ATP sintasa F_1-F_0 [Abrahams et al., 1994]. Estos trabajos corroboraron estudios previos que proponían modelos de la función y los mecanismos de acción, la translocación de protones y la rotación catalítica del

sector F₁, respectivamente [Saraste, 1999]. También se conoce la estructura cristalográfica de dos homólogos bacterianos del complejo II (ambos funcionan como fumarato reductasas) [Iverson, 1999, Lancaster et al., 1999]

Los trabajos realizados durante la década de los años 70 mostraron que las mitocondrias de las plantas tienen diferencias importantes respecto a los animales, pues se identificaron actividades enzimáticas *atípicas* y sensibilidad diferente a los inhibidores respiratorios clásicos [Solomos y Laties, 1976, Solomos, 1977].

NAD(P)H deshidrogenasas

Además del complejo I, en las mitocondrias de plantas se conocen cuatro diferentes NAD(P)H deshidrogenasas alternas (todas son flavoproteínas) al complejo I y que son insensibles a los inhibidores clásicos rotenona y piericidina [Moller, 1997, Moller y Rasmuson, 1998] (Figura 1). Dos de estas enzimas se ubican en la cara *citoplasmática* de la membrana interna mitocondrial, por lo que pueden oxidar el NAD(P)H generado en el citosol. Ambas difieren entre sí por la especificidad por NADH o NADPH, en el patrón de activación por Ca²⁺ (la primera tiene una K_m de 0.3 μ M, para la segunda es más alta pero no ha sido determinada) y en su sensibilidad al difeniliodonio, los agentes quelantes y al mersalil [Moller y Lin, 1986, Moller, 2001]. Con base en la especificidad por el sustrato se han clasificado como NADH deshidrogenasas externas (NADex(NADH)) o NADPH deshidrogenasas externas (NADex(NADPH)), respectivamente. Las dos enzimas restantes se localizan en la membrana interna, pero orientadas hacia el lado de la matriz. Una de ellas es aparentemente específica para el NADH, NADin(NADH), no es dependiente de Ca²⁺ y es diez veces menos afín por NADH que el complejo I (K_m de 80 μ M y 8 μ M, respectivamente) [Moller, 2001]. La otra enzima posiblemente es específica para NADPH (NADin(NADPH)), se activa por Ca²⁺ (K_m de 3 μ M) y es dos órdenes de magnitud más sensible al difeniliodonio que la NADin(NADH) [Moller, 2001].

La existencia de múltiples NAD(P)H deshidrogenasas alternas se ha relacionado con la importancia de la relación NADP/NADPH en varias vías metabólicas. Un ejemplo es el metabolismo del folato en las mitocondrias de

INTRODUCCIÓN

plantas, donde enzimas como la dihidrofolato reductasa y la metilén-tetrahidrofolato deshidrogenasa son dependientes de NADP^+ [Moller y Rasmusson, 1998]. Otro papel que se sugiere para el NADPH es la activación de la oxidasa alterna en un mecanismo mediado por una tioredoxina reductasa [Vanlerberghe, et al. 1995]. Asimismo, algunas enzimas que participan en la respuesta al estrés oxidativo, como una glutatión reductasa mitocondrial, dependen de NADPH [Jiménez et al., 1997]. En las plantas el NADPH puede ser generado en la matriz mitocondrial por la enzima málica, la malato deshidrogenasa o por una isocitrato deshidrogenasa específica para NADP^+ [Moller y Rasmusson, 1998]. La concentración total de $\text{NADP} + \text{NADPH}$ en la matriz mitocondrial de plantas entre 0.5 y 2 mM y la de NADPH en la matriz va de 40-100 μM . El $\text{NAD} + \text{NADH}$ se encuentra de 1 a 10 mM y el nivel de la forma reducida va desde 20 a 70% dependiendo del estado. [Moller, 2001] Una característica común de las NAD(P)H deshidrogenasas alternas es la de no contribuir a la generación del gradiente electroquímico de protones.

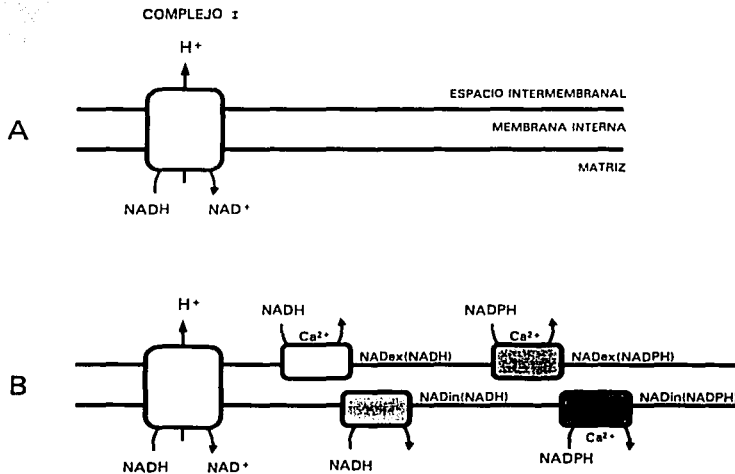


Figura 1. A, Complejo I o NADH deshidrogenasa en mitocondrias animales (mamíferos). B, Se indican las diferentes NAD(P)H deshidrogenasas externas (NADex) e internas (NADin), además del complejo I, presentes en mitocondrias de plantas. Modificado de Moller, 2001.

La oxidasa alterna

Otra enzima característica de las mitocondrias de plantas es la oxidasa alterna (AOX). La presencia de la AOX se evidenció por la respiración insensible a cianuro [Schmucker, 1925, Meeuse, 1975, Solomos, 1977]. El cianuro inhibe a la citocromo *c* oxidasa con valores de K_i de $1-10\mu\text{M}$, por lo que cabe suponer que con la presencia de KCN 1mM la enzima este completamente inhibida. Desde los años 30 van Herk había asociado la presencia de la respiración resistente a cianuro con una vía respiratoria alterna e insensible a dicho inhibidor [van Herk, 1937]. Varios trabajos trataron de establecer la naturaleza molecular de las enzimas participantes en esta vía alterna. Se determinó que la vía dependía de una sola enzima con actividad de quinol oxidasa [Huq and Palmer, 1978, Rich, 1978]. Sin embargo, no fue hasta 1986 que se obtuvieron fracciones semipuras de la AOX de las plantas aráceas *Sauromatum guttatum* [Elthon y McIntosh, 1986] y *Arum maculatum* [Bonner, et al., 1986]. En estos trabajos se estableció que la actividad de la enzima es inhibible específicamente por el ácido salicilhidroxámico (SHAM) [Schonbaum et al., 1971] e irreversiblemente por el ácido *p*-cloromercurobenzoico, agente derivatizante de grupos sulfhidrilo, indicando la presencia de residuos de cisteína esenciales para la actividad. Adicionalmente, se encontró que la AOX no era inhibible por cianuro o antimicina A (inhibidor del complejo III) [Elthon y McIntosh, 1986].

La preparación semipura de AOX de *S. guttatum* llevó a la identificación de una proteína con un masa molecular de ≈ 36 kDa y a la elaboración de anticuerpos policlonales contra la enzima, mismos que inmunorreaccionaron contra proteínas de otras cuatro especies de plantas [Elthon y McIntosh, 1987]. También se correlacionó la cantidad de proteína inmunodetectable con la actividad de AOX presente en cada caso, resaltando la variación simultánea de concentración y actividad de la AOX entre distintos tejidos de la misma planta [Elthon y McIntosh, 1987].

Diversos estudios muestran que la AOX es una ramificación de la cadena clásica o citocrómica que ocurre al nivel de la poza de quinonas, lo que explica la insensibilidad de la vía alterna a inhibidores de los complejos III y IV [Moore y Siedow, 1991] (Figura 2).

INTRODUCCIÓN

Otra característica importante de la AOX es que no está asociada a la generación del gradiente de protones [Moore y Bonner, 1982] ni a la síntesis de ATP [Bähr y Bonner, 1973] y sólo se puede observar fosforilación cuando se emplean sustratos oxidables ligados a la producción de NADH, ya que permiten la participación del complejo I en la vía [Moore et al, 1978]. Cuando el flujo de electrones ocurre preferentemente por la AOX hay una disminución en la síntesis de ATP y pérdida de energía en forma de calor. Por ello, en tejidos con actividad elevada de AOX (como en los espádicees durante el desarrollo de la flor), es posible observar termogénesis con una temperatura hasta 15°C por arriba de la ambiental, lo que se asocia a la volatilización de compuestos aromáticos útiles para atraer polinizadores [Meusee, 1975]. Esta posible función de la AOX se apoya en experimentos que muestran mayor actividad de la enzima en tejidos florales termogénicos [Elthon y McIntosh, 1987].

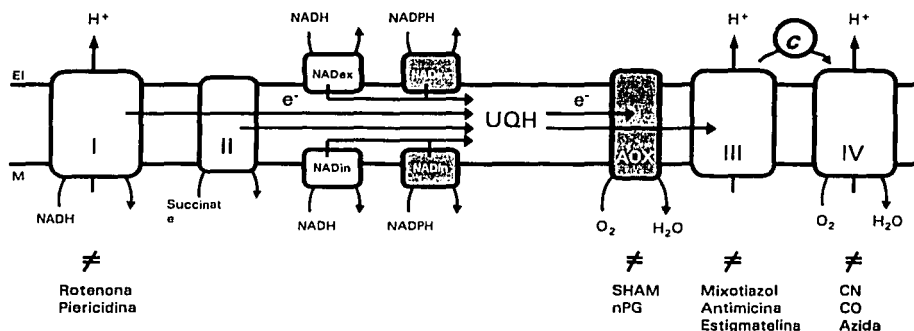


Figura 2. Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial típica de plantas. Se indican las múltiples NAD(P)H deshidrogenasas (NADex, NADin), así como las oxidasa alterna (AOX) que se bifurca de la vía clásica al nivel de la poza de quinonas (UQH). Aparecen los complejos I y II, así como los de la llamada vía citocrómica, III, IV y el citocromo c soluble (c). Por debajo de cada complejo se indican algunos de los inhibidores específicos conocidos.

Modificado de Moller y Rasmussen, 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Funciones de la AOX

La AOX es una enzima constitutiva en todas las *plantas terrestres* y recientemente se le han asignado funciones adicionales en el metabolismo de las células fotosintéticas. Debido a que la AOX también se ha identificado en *algas verdes* (clorofitas) [Eriksson et al 1995, Dinant et al., 2001], algunos protistas [Doussiere et al., 1984, Chaudhuri et al., 1996, Jarmuszkiewicz et al., 1997] y hongos [Li et al., 1996, Kirimura et al., 1999], es probable que la termogénesis sea una particularidad de ciertos grupos de plantas.

Cuando se restringe el transporte de electrones por la vía citocrómica (situaciones de estrés o presencia de inhibidores respiratorios), existe una inhibición sobre el ciclo de Krebs debida a la acumulación de intermediarios reductores (como NAD(P)H), lo que favorece la fermentación alcohólica (el etanol producido puede producir daño celular) e impide la biosíntesis a partir de intermediarios del ciclo de Krebs (como oxaloacetato y α -cetoglutarato). En esta situación se ha propuesto que la AOX permite el consumo de los intermediarios reducidos, direccionando los precursores hacia la biosíntesis y disminuyendo simultáneamente la fermentación [Palmer, 1976]. Posteriormente, esta propuesta se modificó para sugerir que la actividad de la vía alterna podría funcionar como una válvula de sobre-flujo cuando la vía citocrómica se satura [Lambers, 1982]. En este sentido, varios trabajos han demostrado que los mecanismos de modulación y activación de la AOX se ajustan a la propuesta de Lambers [1982] [Millar et al., 1993 y 1996, Wagner, 1995]

Los primeros datos sobre la regulación y estructura de la enzima mostraron que en las plantas la AOX existe en forma homodimérica; cada monómero con una masa molecular de ≈ 36 kDa. El dímero puede permanecer alternativamente en un estado de asociación no covalente, más activo o en uno oxidado de unión covalente, que es de 5 a 6 veces menos activo que el reducido [Umbach y Siedow, 1993]. La conversión de un estado a otro se induce experimentalmente por agentes reductores externos (como DTT), sugiriendo que el efecto es sobre residuos de cisteína que participan en una transición sulfhidrilo/disulfuro intermonomérica [Umbach y Siedow, 1996]. Adicionalmente, se encontró que la forma reducida del dímero puede activarse

INTRODUCCIÓN

por ceto-ácidos, principalmente por piruvato [Millar et al, 1993, Day et al., 1994], que disminuye la K_m aparente de la enzima por ubiquinol [Umbach et al., 1994]. También se sabe que el efecto del piruvato ocurre por interacción directa con residuos de cisteína, formando un tiohemiacetal [Umbach y Siedow, 1996]. A este respecto, existen datos contradictorios sobre los residuos de cisteína participantes en la unión del piruvato, ya que se ha propuesto que son los mismos que a forman el puente de disulfuro interdimérico [Rhoads et al., 1998] o bien que son diferentes [Umbach y Siedow, 1996].

Los datos mencionados permiten considerar la factibilidad de la hipótesis de Lambers. Así, una actividad restringida de la vía citocrómica conduciría a la inhibición del ciclo de Krebs, resultando en un incremento en la concentración de piruvato, activando la AOX y permitiendo de este modo el flujo hacia las rutas biosintéticas (Figura 3). Hasta la fecha no existen estudios detallados que permitan analizar la validez de la propuesta *in vivo*. Relacionado con esto se ha mencionado un posible mecanismo para modular el estado *redox* del dímero AOX, donde podrían participar tiorredoxina o glutatión, por medio de sistemas reductores dependientes de NADPH u otros intermediarios del ciclo de Krebs [Venlerbeghe, 1995].

En resumen, parece existir un sistema de regulación *redox* para la AOX que depende del balance de intermediarios del ciclo de Krebs y que permite el flujo hacia las rutas anabólicas aún cuando el flujo de electrones por la vía citocrómica se mantenga inhibido o restringido.

Otro tipo de experimentos que apoyan la función de la AOX como válvula de escape indica que la enzima alcanza su actividad máxima sólo cuando la relación UQH_2/UQ es mayor al 40%. Esto sugiere que el flujo a través de la AOX ocurre únicamente cuando la cadena citocrómica se acerca a la saturación [Dry et al., 1989]. Sin embargo, otros resultados muestran que en presencia de piruvato la AOX puede competir por los electrones con la vía citocrómica [Hoefnagel, et al., 1995], lo que demuestra que la AOX no es estrictamente una válvula de escape, pues puede ser activa en niveles en los que la vía citocrómica no esta saturada. Los datos muestran que la AOX sí

INTRODUCCIÓN

puede funcionar como una vía de escape para electrones *excedentes*, pero también puede competir por el ubiquinol contra la vía clásica.

Por otro lado, la actividad de la AOX puede relacionarse con los sistemas de defensa contra el estrés oxidativo, donde podría disminuir la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS), que son causa de daño y de muerte celular [Levine et al, 1996].

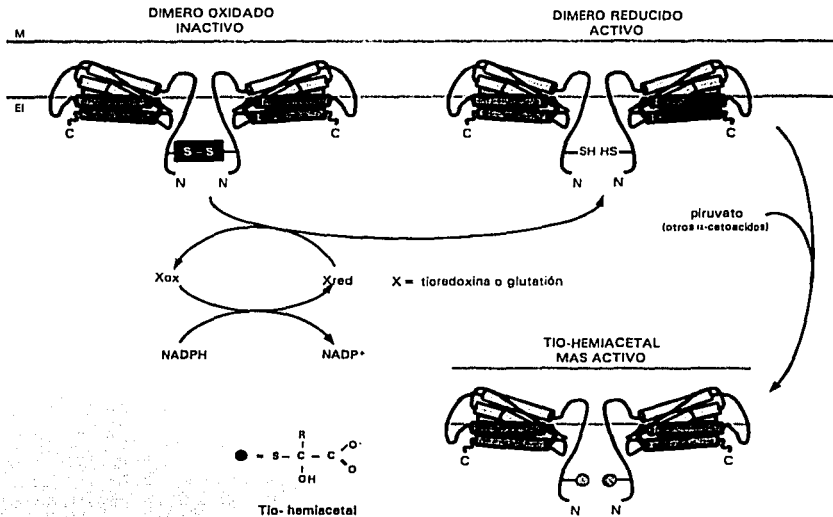


Figura 3. Esquema de la regulación (inactivación-activación) de la oxidasa alternativa mediante la oxidación-reducción del puente disulfuro intramonomérico. Se indica un intermediario reductor hipotético (X) que podría depender de un sistema que emplea NADPH (glutatión o tioredoxina reductasas). Se muestra también la activación adicional por piruvato (u otros α-ceto-ácidos) durante el estado reducido (activo). Se propone que la interacción del piruvato ocurre por la formación de un tio-hemiacetal con los residuos de cisteína.

Modificado de Siedow y Umbach, 2000

La cadena respiratoria es una fuente de ROS, ya que las semiquinonas ($UQ^{\cdot-}$) formadas durante el ciclo Q pueden reducir al oxígeno (O_2), generando el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Éste a su vez se dismuta a H_2O_2 , un intermediario que no es un radical libre, pero es más estable y móvil. El H_2O_2 puede

reaccionar con otro $O_2^{\cdot-}$ y producir el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), sumamente reactivo y relacionado con la peroxidación de proteínas, lípidos y DNA [Pryor, 1986]. En las plantas, la cadena fotosintética (CF) es otra fuente importante de ROS; donde la reducción de los intermediarios de la CF favorece la activación del oxígeno [Elstner y Osswald, 1994]. Para contender con el estrés inducido por la producción de ROS las células vegetales cuentan con un sistema general de detoxificación enzimático, que incluye superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas (dependientes de ascorbato o glutatión), mono o dihidroascorbato reductasas y glutatión reductasa [Elstner y Osswald, 1994, Wagner y Moore, 1997]. Adicionalmente existen compuestos fenólicos y flavonoides que pueden inactivar radicales OH^{\cdot} o 1O_2 [Elstner y Osswald, 1994].

Se ha demostrado que las situaciones de estrés metabólico (bajas temperaturas, envejecimiento, presencia de inhibidores respiratorios, etc.) incrementan la producción de ROS, así como la expresión y la actividad de la AOX [Vanlerberghe y McIntosh, 1992a, Hiser y McIntosh, 1990, Vanlerberghe y McIntosh, 1992b]. Simultáneamente, el estrés también produce una disminución en la actividad de la vía citocrómica [Purvis y Shewfelt, 1993, Elstner y Oswald, 1994]. Con esta evidencia, Purvis y Shewfelt [1993] propusieron que la AOX puede ser parte del sistema de respuesta contra el estrés oxidativo, al formar parte de una vía que permite desahogar la cadena respiratoria clásica. Así, se propone que el flujo de electrones por la AOX durante una situación de estrés mantiene un nivel relativamente oxidado de la poza de quinonas, minimizando el riesgo potencial de la formación de ROS. En apoyo de este posible papel de la AOX, se demostró que la activación de la enzima por DTT y piruvato disminuye significativamente la producción del radical superóxido en mitocondrias aisladas del pericarpo de *Capsicum annuum* [Purvis, 1997]. Además, la presencia de los inhibidores específicos de la AOX ácido salicilhidroxámico (SHAM) y n-propilgalato conduce a la producción de H_2O_2 en mitocondrias de cotiledones de *Glycine max* (frijol de soya) y *Pisum sativum* (chícharo) [Popov, et al., 1997].

En células transgénicas de *Nicotiana tabacum* (tabaco), donde los niveles de AOX fueron disminuidos por supresión antisentido del gene *Aox1*, o

bien elevados por sobreexpresión, se demostró que la baja actividad de la enzima correlaciona con una mayor producción de ROS mitocondriales. Por el contrario, la sobreexpresión reduce significativamente la generación de las especies reactivas [Maxwell et al., 1999]. Cabe resaltar que el trabajo anterior también mostró que los niveles elevados de AOX se relacionan con un bajo nivel de expresión de enzimas *atrapadoras* de ROS, como son dos isoformas de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Lo anterior sugiere fuertemente que la AOX tiene participación en un sistema preventivo para la formación de ROS. Experimentos efectuados con cultivos celulares de *Glicine max* demostraron que un aumento en la actividad de la AOX protege de daño y muerte durante transiciones anoxia-reoxigenación y estrés oxidativo [Amor et al., 2000]. En tal situación la AOX formaría parte de un sistema preventivo para contender con de estrés oxidativo, que a su vez sería parte de la respuesta celular que incluye de manera fundamental la participación de varias peroxidasa [Amor et al., 2000].

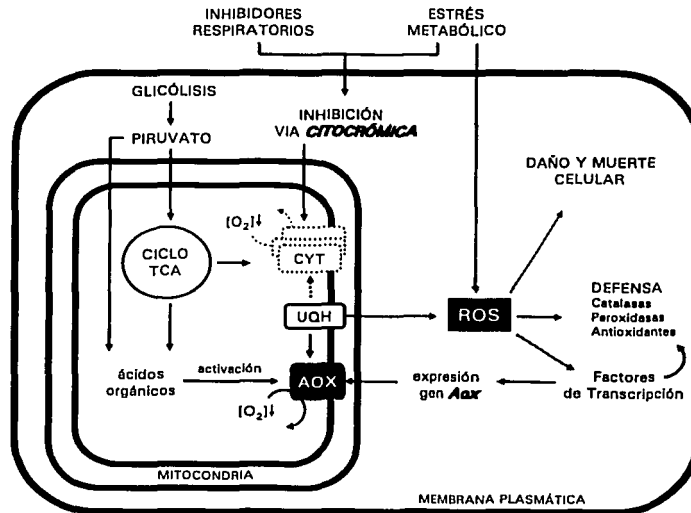


Figura 4. Esquema que muestra la regulación global de la oxidasa alterna (AOX). Se indica el sistema de control redox (figura 3 y en flechas negras), así como el efecto por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la síntesis de novo de la proteína (en flechas rojas). UQH, poza de quinonas; CYT, vía *citocrómica*. Modificado de Wagner y Krab, 1995

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, los genes *Aox* son inducidos a expresarse por exposición a H_2O_2 [Wagner y Wagner, 1997], lo que refuerza la idea sobre el papel activo de la AOX en el sistema global de protección contra ROS. En la figura 4 se presenta un esquema hipotético para la regulación de la AOX dependiente de la formación de ROS.

Los genes *Aox*

Al momento de la elaboración de este manuscrito se conocían las secuencias completas de más de 30 genes *Aox* de diferentes especies de plantas, hongos y de algunos protistas *tripanosomátidos* [www.ncbi.nlm.nih.gov]. En varios casos el gen se encuentra en multicopias funcionales. Debido a que no ha sido posible obtener una preparación purificada a homogeneidad de AOX, los modelos estructurales de la proteína que se han propuesto están basados solamente en el análisis de las secuencias existentes. Reconstrucciones iniciales suponían que cuatro regiones altamente conservadas hacia el extremo carboxilo (ubicado hacia la matriz mitocondrial), constituían conjuntamente una estructura de cuatro hélices (*haz*), involucrada en la coordinación del centro redox de la enzima (Figura 5).

Se ha propuesto que el grupo redox de la AOX es un centro Fe-Fe coordinado por residuos de glutamato e histidina, en un arreglo típico de las cadenas proteicas para este tipo de centros redox bimetálicos (Figura 6) [Siedow et al., 1995]. Lo anterior esta basado en la similitud en las señales negativas de EPR de la AOX y otras ferropoteínas no hémicas (di-fierro proteínas tipo R2, específicamente la subunidad hidroxilasa de la metano monooxigenasa), así como por la presencia de una secuencia consenso EXXH en dos de las posibles hélices. El grupo de Siedow también sugirió la existencia de dos regiones α -hélice transmembranales, ubicadas hacia la región central de la proteína y unidas entre sí por una α -hélice expuesta hacia el espacio intermembranal (Figura 7A). Finalmente, el extremo amino terminal, que también se ubica hacia la matriz mitocondrial, contiene dos residuos de cisteína conservados entre las plantas, que son los involucrados en la regulación redox y en la interacción tio-hemiacetal con ceto-ácidos, mencionada previamente.

INTRODUCCIÓN

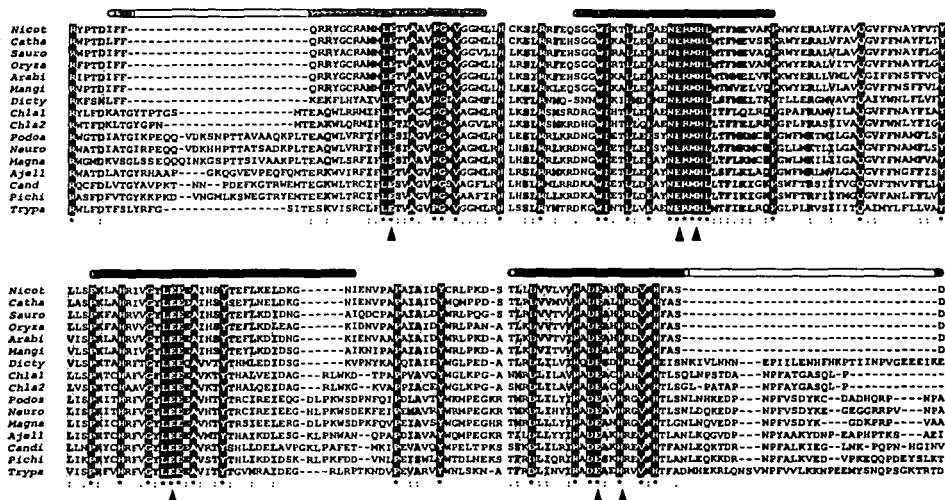


Figura 5. Alineación múltiple de las regiones carboxilo terminal de AOX procedentes de diferentes especies. Con cilindros negros se indican las regiones conservadas que formarían las hélices putativas para coordinar el centro Fe-Fe, las flechas negras indican los aminoácidos involucrados directamente. **Nicot:** *Nicotiana tabacum*; **Catha:** *Catharanthus roseus*; **Sauro:** *Sauromatum guttatum*; **Oryza:** *Oryza sativa*; **Arabi:** *Arabidopsis thaliana*; **Mangi:** *Mangifera indica*; **Dicty:** *Dictyostelium discoideum*; **Chia1** y **Chia2:** *Chlamydomonas reinhardtii*; **Podoa:** *Podospora anserina*; **Neuro:** *Neurospora crassa*; **Magna:** *Magnaporthe grisea*; **Ajell:** *Ajellomyces capsulatus*; **Cand:** *Candida albicans*; **Pichi:** *Pichia anomala*; **Trypa:** *Trypanosoma brucei brucei*;

Recientemente apareció una nueva evaluación del modelo topológico de la AOX, tomando como base las nuevas secuencias disponibles [Andersson y Nordlund, 1999]. Este nuevo análisis evidenció que una de las regiones que se consideró altamente conservada realmente no lo es, determinando que uno de los motivos EXXH que Siedow y Umbach propusieron en su modelo de cuatro hélices no se encuentra en todas las secuencias reportadas. Es así que el nuevo modelo descarta la existencia de regiones transmembranales y reubica a la hipotética hélice expuesta del modelo anterior (que posee otro motivo EXXH conservado, Figura 7B). En el nuevo modelo esta hélice forma parte de las cuatro hélices involucradas en la coordinación del centro redox, lo que de inicio modifica la disposición de los enlaces de coordinación (Figura 7C).

INTRODUCCIÓN

Empleando como base la estructura de la estearil-acil Δ^9 -desaturasa y de la ribonucleótido reductasa (ambas di-ferroproteínas tipo R2), Andersson y Nordlund propusieron también que las hélices hidrofóbicas solo permiten el anclaje de la proteína a la membrana interna, pero no son secciones transmembranales, de forma análoga a lo se conoce para la topología de la prostaglandina H₂ sintetasa (Figura 7B). Así, en esta disposición la AOX aparecería como una proteína integral de membrana que no cruzaría la bicapa lipídica, sino que solamente permanecería anclada a la mitad de la membrana. Alternativamente la AOX podría mantenerse asociada a la membrana por el efecto hidrofóbico con otras proteínas [Andersson y Nordlund, 1999].

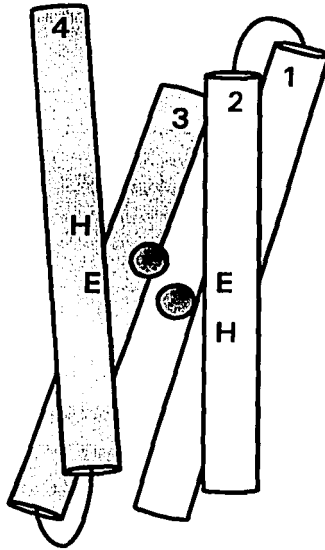


Figura 6. Construcción *in silico* del haz de hélices que coordinan un centro Fe-Fe en ferro-proteínas tipo R2 . Los motivos EXXH de coordinación están indicados. Las esferas negras representan los átomos de Fe.
Tomado de Andersson y Nordlund, 1999

INTRODUCCIÓN

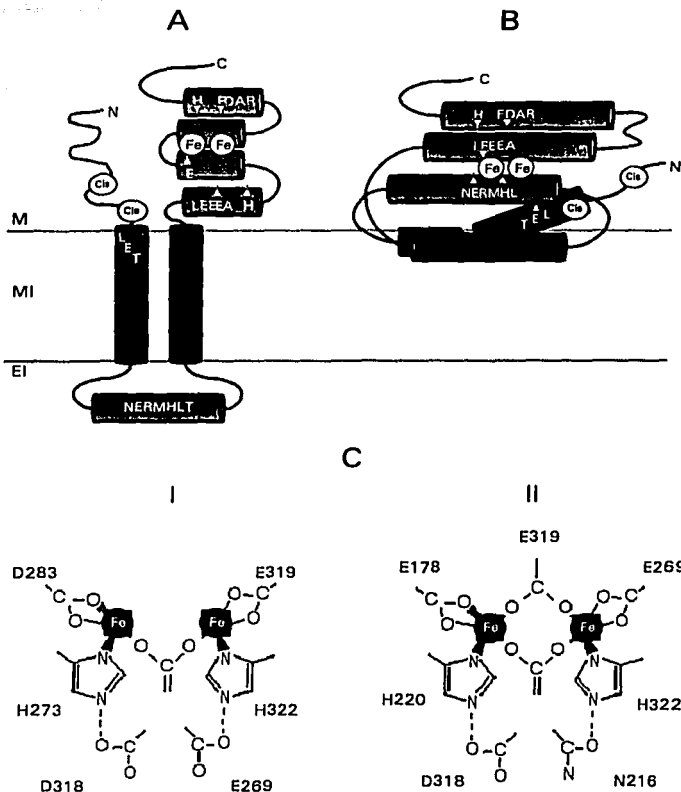


Figura 7. A, modelo topológico de la AOX propuesto por Siedow, et al., 1995, donde se distinguen dos α -hélices transmembranales y el haz de cuatro hélices con el centro Fe-Fe en el extremo carboxilo. B, modelo de Andersson y Nordlund, 1999, donde la hipotética α -hélice con el dominio NERMHL es reubicada para formar un nuevo haz coordinante, empleando segmentos mas largos de la proteína para formar las cuatro hélices el extremo carboxilo. En este caso se propone que las dos α -hélices hidrofóbicas se mantienen en la interfase de la membrana interna mitocondrial. En ambos modelos se muestran los residuos de cisteína (Cis) involucrados en la regulación redox. C, modelos de coordinación para el centro Fe-Fe, I corresponde al modelo de Siedow et al (A) y II al modelo de Andersson y Nordlund (B). Modificado de Berthold et al. 2000 y Andersson y Norlund, 1999.

REFERENCIAS

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. & Walker, J. E. (1994) *Nature* 370: 621-628.
- Amor, Y., Chevion, M. & Levinea, A. (2000) *FEBS Lett* 477: 175-180.
- Andersson, M. E. & Nordlund, P. (1999) *FEBS Lett* 449: 17-22.
- Bahr, J. T. & Bonner, W. D. (1973) *J Biol Chem* 248: 3441-3445.
- Berthold, D. A., Andersson, M. E. & Nordlund, P. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1460: 241-54.
- Bonner, W. D., Clarke, S. D. & Rich, P. R. (1986) *Plant Physiol* 80: 838-842.
- Chaudhuri, M. & Hill, G. C. (1996) *Mol Biochem Parasitol* 83: 125-129.
- Day, D. A., Millar, A. H., Wiskich, J. T. & Whelan, J. (1994) *Plant Physiol* 106: 1421-1427.
- Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B. & Matagne, R. F. (2001) *Curr Genet* 39: 101-108.
- Doussiere, J. & Vignais, P. V. (1984) *Biochem J* 220: 787-794.
- Dry, I. B., Moore, A. L., Day, D. A. & Wiskich, J. T. (1989) *Arch Biochem Biophys* 273: 148-157.
- Elstner, E. F. & Osswald, W. (1994) *Proc Royal Soc Edinburgh* 102B: 131-154.
- Elthon, T. E. & McIntosh, L. (1986) *Plant Physiol* 81: 1-6.
- Elthon, T. E. & McIntosh, L. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8399-8403.
- Eriksson, M., Gardestrom, P. & Samuelsson, G. (1995) *Plant Physiol* 107: 479-483.
- Hatefi, Y. (1985) *Annu Rev Biochem* 54: 1015-1069.
- Hiser, C. & McIntosh, L. (1990) *Plant Physiol* 93: 312-318.
- Hoefnagel, M. H., Millar, A. H., Wiskich, J. T. & Day, D. A. (1995) *Arch Biochem Biophys* 318: 394-400.
- Huq, S. & Palmer, J. M. (1978) *FEBS Lett* 95: 217-220.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. & Rees, D. C. (1999) *Science* 284: 1961-1966.

INTRODUCCIÓN

- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. & Jap, B. K. (1998) *Science* 281: 64-71.
- Jarmuszkiewicz, W., Wagner, A. M., Wagner, M. J. & Hryniewiecka, L. (1997) *FEBS Lett* 411: 110-114.
- Jimenez, A., Hernández, J.A., del Rio, L.A. & Sevilla, F. (1997) *Plant Physiol* 114: 275-284.
- Kirimura, K., Yoda, M. & Usami, S. (1999) *Curr Genet* 34: 472-477.
- Lancaster, C. R., Kroger, A., Auer, M. & Michel, H. (1999) *Nature* 402: 377-85.
- Lambers, H. (1982) *Plant Physiol* 55: 478-485.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R. & Lamb, C. (1996) *Curr Biol* 6: 427-437.
- Li, Q., Ritzel, R. G., McLean, L. L. T., McIntosh, L., Ko, T. & al, e. (1996) *Genetics* 142: 129-140.
- Maxwell, D. P., Wang, Y. & McIntosh, L. (1999) *Proc. Natl Acad Sci U S A* 96: 8271-8276.
- Meusee, B. J. D. (1975) *Annu Rev Plant Physiol* 26: 117-126.
- Millar, A. H., Wiskich, J. T., Whelan, J. & Day, D. A. (1993) *FEBS Lett* 329: 259-262.
- Millar, A.H., Hoefnagel, M., Day, A.D., & Wiskich, J.T. (1996) *Plant Physiol.* 11: 613-618
- Mitchell, P. (1961) *Nature* 191: 144-148.
- Møller, I. M. (1997) *Physiol Plant* 100: 85-90.
- Møller, I. M. (2001) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591.
- Møller, I. M. & Lin, W. (1986) *Annu Rev Plant Physiol* 18: 309-334.
- Møller, I. M. & Rasmusson, A. G. (1998) *Trends Plant Sci* 3: 21-27.
- Moore, A. L. & Bonner, W. D. (1982) *Plant Physiol* 70: 1271-1276.
- Moore, A. L., Bonner, W. D. & Rich, P. R. (1978) *Arch Biochem Biophys* 186: 298-306.
- Moore, A. L. & Siedow, J. N. (1991) *Biochim Biophys Acta* 1059: 121-140.

INTRODUCCIÓN

- Palmer, J. M. (1976) *Annu Rev Plant Physiol* 27: 133-157.
- Popov, V. N., Simonian, R. A., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. (1997) *FEBS Lett* 415: 87-90.
- Pryor, W. A. (1986) *Annu Rev Physiol* 48: 657-667.
- Purvis, A. C. (1997) *Physiol Plant* 100: 165-170.
- Purvis, A. C. & Shewfelt, R. L. (1993) *Physiol Plant* 88: 712-718.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Sweet, C. R., Lennon, A. M., Rauch, G. S. & Siedow, J. N. (1998) *J Biol Chem* 273: 30750-30756.
- Rich, P. R. (1978) *FEBS lett* 96: 252-256.
- Saraste, M. (1999) *Science* 283: 1488-1493.
- Schmucker, T. (1925) *Flora* 118: 460-475.
- Schonbaum, G. R., Bonner, W., Storey, B. T. & Bahr, J. T. (1971) *Plant Physiol* 47: 124-128.
- Siedow, J. N. & Umbach, A. L. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1459: 432-439.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L. & Moore, A. L. (1995) *FEBS Lett* 362: 10-14.
- Solomos, T. (1977) *Plant Physiol* 58: 521-525.
- Solomos, T. & Laties, G. G. (1976) *Biochem Biophys Res Commun* 70: 663-671.
- Trumpower, B. L. & Gennis, R. B. (1994) *Annu Rev Biochem* 63: 675-716.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) *Science* 272: 1136-1144.
- Umbach, A. L. & Siedow, J. N. (1993) *Plant Physiol* 103: 845-854.
- Umbach, A. L. & Siedow, J. N. (1996) *J Biol Chem* 271: 25019-25026.
- Umbach, A. L., Wiskich, J. T. & Siedow, J. N. (1994) *FEBS Lett* 348: 181-184.
- van Herk, A. W. H. (1937) *Rec Trav Bot Neer* 34: 79-156.
- Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E. & McIntosh, L. (1995) *Plant Physiol* 109: 353-361.

INTRODUCCIÓN

- Vanlerberghe, G. C. & McIntosh, L. (1992) *Plant Physiol* 100: 115-119.
- Vanlerberghe, G. C. & McIntosh, L. (1992) *Plant Physiol* 100: 1846-1851.
- Wagner, A.M. (1995) *FEBS Lett* 368: 339-342
- Wagner, A. M. & Moore, A. L. (1997) *Biosci Rep* 17: 319-333.
- Wagner, A. M. & Wagner, M. J. (1997) *Plant Physiol* 115: 617-622.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES DIRECTOS

Filogenia de las *algas verdes* y las *plantas terrestres*

El concepto actual de plantas verdes (*Chlorobionta* o *Viridiplantae*) incluye como grupos relacionados evolutivamente a las llamadas *algas verdes* (División *Chlorophyta*, clorofitas) y las *plantas terrestres* (División *Streptophyta*, estreptofitas). El grupo comparte la presencia de clorofilas tipos *a* y *b*, una disposición apilada de los tilacoides en un cloroplasto de dos membranas y el empleo de almidón como sustancia de reserva [Friedl, 1997]. Estudios recientes de filogenia mediante análisis de secuencia de rRNA 18s confirman el origen monofilético de las plantas verdes [Battacharya y Medlin, 1995] (Figura 8).

Los estudios con mitocondrias aisladas de clorofitas muestran similitudes importantes a lo observado en estreptofitas. Ejemplos fundamentales de dichas semejanzas son la presencia de NAD(P)H deshidrogenasas alternas [Webster y Hackett, 1965, Eriksson et al 1995, este trabajo], oxidasas alternas (AOX) [Sargent y Taylor, 1972, Webster y Hackett, 1965, Goyal y Tolbert, 1989, Eriksson et al, 1995] y similitudes particulares en espectros diferenciales de grupos hemo [Webster y Hackett, 1965]. Respecto a la AOX, recientemente se secuenciaron dos genes funcionales *Aox* de *Chlamydomonas reinhardtii*, que son los primeros reportados para una clorofita [Dinant et al, 2001]. Estos resultados reforzaron resultados previos donde se efectuó la inmunodetección de una proteína de ≈ 36 kDa en mitocondrias de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando un anticuerpo monoclonal generado contra la AOX de *Sauromatum gutattum* [Derzhap y Weger, 1996]. Asimismo, en *C. reinhardtii* se ha medido la actividad de la enzima sensible a SHAM. Durante la discusión de este trabajo se retomará este punto.

ANTECEDENTES DIRECTOS

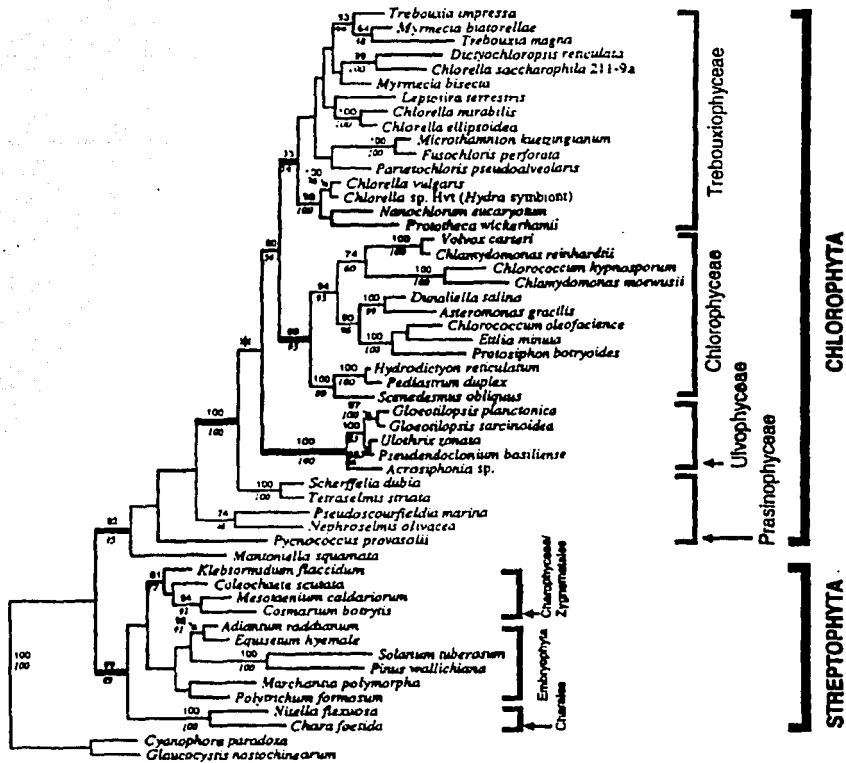


Figura 8. Análisis filogenético de 18S rDNA (rRNA) proveniente de los linajes más importantes de plantas verdes (*Chlorophyta* y *Streptophyta*). El árbol fue construido por el método de máxima parsimonia. Los números indican los valores de *Bootstrap* obtenidos por el método de *neighbor-joining* a partir de 500 remuestréos (cifras arriba de la ramas) y por el método de máxima parsimonia a partir de 100 remuestréos (cifras debajo de las ramas), respectivamente.
Tomado de Battacharya, 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las Clorofitas y el género Polytomella

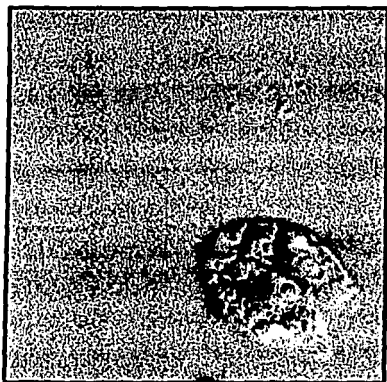
La división *Chlorophyta* está constituida en su mayor parte por géneros fotosintéticos; no obstante, debido a semejanzas estructurales y bioquímicas, algunos géneros heterótrofos también se han incluido en este grupo. Los géneros no fotosintéticos sólo poseen plástidos no funcionales carentes de clorofila (leucoplastos o amiloplastos). Este tipo de clorofitas se denominan genéricamente como *algas incoloras*, sin embargo, es importante resaltar que la *atrofia* o pérdida de la capacidad fotosintética ha ocurrido varias veces de manera independiente dentro del grupo [Rumpf, et al. 1996], por lo que el término *incolore* no necesariamente indica una relación evolutiva entre los géneros o especies con esa característica.

Entre las clorofitas, la especie fotosintética *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard [1988] (miembro de la familia *Chlamydomonadacea*, que incluye miembros unicelulares, bi o tetra-flagelados) es la más estudiada, debido al desarrollo de los métodos específicos de transformación nuclear [Kindle, 1990] y de cloroplastos [Boynton, 1988]. No obstante el gran número de reportes sobre *C. reinhardtii*, los análisis de la función mitocondrial presentan algunos problemas por la existencia de cloroplastos, ya que dificultan la obtención de preparaciones mitocondriales puras por métodos convencionales. Otra dificultad adicional es la presencia de un pared celular muy resistente, por lo que para obtener preparaciones mitocondriales intactas normalmente se deben emplear mutantes carentes de pared celular [Eriksson et al, 1995].

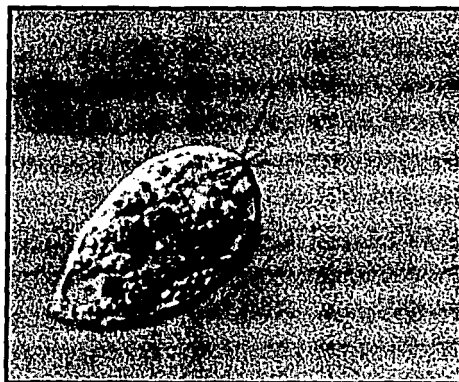
Dentro de la familia *Chlamydomonadacea* también se encuentra el género *Polytomella* Aragao [Aragao, 1910], de forma ovoide o piriforme, con cuatro flagelos idénticos insertados en la base de la papila (región apical), con una *mancha ocular* presente ocasionalmente y que puede formar quistes en monocapa. Tiene dos vacuolas contráctiles en posición anterior, presenta división celular por fisión longitudinal y reproducción sexual isogámica formando cigotos tetraflagelados (Figura 9). Adicionalmente, *Polytomella* sp. carece de cloroplastos y de pared celular. Aprovechando estas características ha sido posible aislar mitocondrias intactas [este trabajo] y obtener preparaciones puras y activas de los complejos III [Gutiérrez-Cirlos et al, 1994], IV [Pérez-Martínez et al, 2000] y V [Atteia et al., 1997]. Algunos

trabajos de nuestro grupo han revelado semejanzas importantes en las características génicas y estructurales del complejo IV de *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii* [Pérez-Martínez, et al. 2000, Pérez-Martínez, et al. 2001], lo que demuestra la estrecha relación evolutiva entre ambos organismos, hecho que ya se había sugerido anteriormente [Antaramian et al, 1996, Nakayama, 1996] (Figura 10).

A



B



Polytomella sp. Aragao, 1910

Figura 9. Fotografías por microscopía de luz de *Polytomella* sp. A, se pueden apreciar los cuatro flagelos de un cigoto durante un proceso de fisión longitudinal. B, se distingue el aparato tetra-flagelar ubicado en la región apical de la célula.

Imágenes tomadas de

mac2031.fujimi.hosei.ac.jp/PDB/Images/Mastigophora/Polytomella/

TESIS CON
COPIA DE ORIGEN

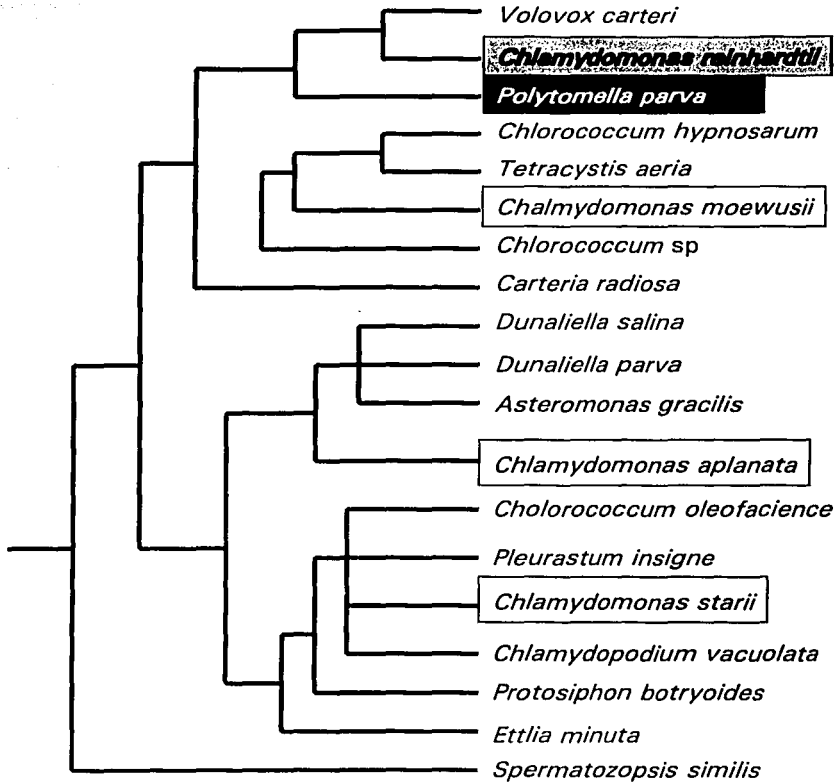


Figura 10. Árbol filogenético consenso obtenido a partir del análisis de secuencias de 18S rRNA por *neighbor-joining* y máxima parsimonia, respectivamente. Se observa la estrecha relación evolutiva entre *Polytomella parva*, en recuadro negro, y *Chlamydomonas reinhardtii*, recuadro gris. Es interesante resaltar que el género definido como *Chlamydomonas* constituye en realidad un grupo polifilético, ya que se ha encontrado que diversas especies del género, están distribuidas en diferentes clados (recuadros blancos).

Tomado de Nakayama et al, 1996.

Considerando las relaciones evolutivas y las evidencias experimentales mencionadas, se esperaba que la cadena respiratoria de *Polytomella sp.* tuviera semejanzas funcionales y estructurales con la de *Chlamydomonas reinhardtii* y con las de *plantas terrestres*.

REFERENCIAS

- Antaramian, A., Coria, R., Ramirez, J. & Gonzalez-Halphen, D. (1996) *Biochim Biophys Acta* 1273: 198-202.
- Aragao, H. B. (1910) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2: 42-57.
- Atteia, A., Dreyfus, G. & González-Halphen, D. (1997) *Biochim Biophys Acta* 1320: 275-84.
- Battacharya, D. & Medlin, L. (1995) *J Phycol* 31: 489-498.
- Battacharya, D. (1997). *Pl Syst Evol* 11: 87-101
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & et al. (1988) *Science* 240: 1534-8.
- Dangeard, P. A. (1888) *Ann Sci Nat Ser 7 Bot* 4: 105-175.
- Derzhap, T. L. M. & Weger, H. G. (1996) *J Phycol* 32: 621-623.
- Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B. & Matagne, R. F. (2001) *Curr Genet* 39: 101-8.
- Eriksson, M., Gardestrom, P. & Samuelsson, G. (1995) *Plant Physiol* 107: 479-483.
- Friedl, T. (1997) *Pl Syst Evol* 11: 87-101.
- Goyal, A. & Tolbert, N. E. (1989) *Plant Physiol* 89: 958-962.
- Gutiérrez-Cirlos, E. B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. & González-Halphen, D. (1994) *J Biol Chem* 269: 9147-54.
- Kindle, K. L. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1228-1232.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. & Inouye, I. (1996) *Phycol Res* 44: 47-55.
- Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P. & González-Halphen, D. (2001) *J Biol Chem* 276: 11302-9.
- Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P. & González-Halphen, D. (2000) *J Biol Chem* 275: 30144-52.
- Rumpf, R., Vernon, D., Schreiber, D. & Birky, C. W. (1996) *J Phycol* 32: 119-126.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Sargent, D. F. & Taylor, C. P. S. (1972) *Plant Physiol* 49: 775-778.

Webster, D. A. & Hackett, D. P. (1965) *Plant Physiol* 86: 688-692.

OBJETIVOS

Con base en los antecedentes se plantearon los siguientes objetivos:

Disecar las actividades enzimáticas que conforman la cadena respiratoria de *Polytomella* sp.

Determinar las velocidades de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas, empleando diferentes sustratos oxidables y cuantificar el efecto de inhibidores respiratorios

Determinar las constantes de afinidad por inhibidores clásicos de los complejos respiratorios III y IV.

Efectuar una caracterización general de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de *Polytomella* sp.

Cuantificar la generación de potenciales membranales en mitocondrias aisladas. Determinar el efecto de inhibidores y desacoplantes.

Cuantificar la velocidad de fosforilación oxidativa con diferentes sustratos mitocondriales, así como el efecto de inhibidores respiratorios y agentes desacoplantes.

Determinar si existe una oxidasa alterna (ubiquinol: oxígeno óxido-reductasa) en la cadena respiratoria de *Polytomella* sp.

Determinar si en las mitocondrias de *Polytomella* sp. existe una actividad respiratoria insensible a inhibidores de los complejos III y IV.

Realizar ensayos para sobreexpresar y/o activar una posible oxidasa alterna en *Polytomella* sp.

Efectuar experimentos de inmunodetección (réplicas tipo *Western*) empleando un anticuerpo policlonal generado contra una de las oxidasas alternas (AOX1) de *Chlamydomonas reinhardtii*.

OBJETIVOS

Clonar y secuenciar un posible gen ***Aox*** de ***Polytomella*** sp.

Realizar ensayos de hibridación tipo *Southern* utilizando como sonda un fragmento del cDNA del gen *Aox* de *Chlamydomonas* sp. Partiendo de los resultados anteriores se podrán construir minibancos de DNA genómico de *Polytomella* sp. para la búsqueda del gen *Aox*.

Efectuar experimentos de amplificación mediante PCR para obtener la secuencia de un posible gen *Aox* de *Polytomella* sp.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS PUBLICADOS

Reyes-Prieto, A., ElHafidi, M., Moreno-Sánchez, R. and González-Halphen, D.

Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte ***Polytomella*** sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase.

Biochimica et Biophysica Acta (2002) 1554: 170-179



Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte *Polytomella* sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase

Adrián Reyes-Prieto^a, Mohammed El-Hafidi^b, Rafael Moreno-Sánchez^b,
Diego González-Halphen^{a,*}

^aDepartamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510 México, D.F., Mexico

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, DF 01480, Mexico

Received 30 October 2001; received in revised form 7 May 2002; accepted 30 May 2002

Abstract

The presence of an alternative oxidase (AOX) in *Polytomella* sp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, was explored. Oxygen uptake in *Polytomella* sp. mitochondria was inhibited by KCN (94%) or antimycin (96%), and the remaining cyanide-resistant respiration was not blocked by the AOX inhibitors salicylhydroxamic acid (SHAM) or *n*-propylgallate. No stimulation of an AOX activity was found upon addition of either pyruvate, α -ketoglutarate, or AMP, or by treatment with DTT. An antibody raised against *C. reinhardtii* AOX did not recognize any polypeptide band of *Polytomella* sp. mitochondria in Western blots. Also, PCR experiments and Southern blot analysis failed to identify an *Aox* gene in this colorless alga. Finally, KCN exposure of cell cultures failed to stimulate an AOX activity. Nevertheless, KCN exposure of *Polytomella* sp. cells induced diminished mitochondrial respiration (20%) and apparent changes in cytochrome *c* oxidase affinity towards cyanide. KCN-adapted cells exhibited a significant increase of a -type cytochromes, suggesting accumulation of inactive forms of cytochrome *c* oxidase. Another effect of KCN exposure was the reduction of the protein/fatty acid ratio of mitochondrial membranes, which may affect the observed respiratory activity. We conclude that *Polytomella* lacks a plant-like AOX, and that its corresponding gene was probably lost during the divergence of this colorless genus from its close photosynthetic relatives.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Alternative oxidase; *Chlamydomonas*; Cyanide adaptation; Cytochrome *c* oxidase; *Polytomella*

1. Introduction

All plant mitochondria studied to date, along with those from some protists and fungi, have a respiratory chain with two terminal oxidases: a typical cytochrome *c* oxidase (COX) and an alternative oxidase (AOX). An important difference between these two enzymes is that the AOX is not coupled to oxidative phosphorylation [1]. AOX drains electrons directly from the ubiquinone pool and shows resistance to inhibitors of COX (cyanide and azide) and the *bc*₁ complex (antimycin and myxothiazol) [1]. Never-

theless, the presence of any of these inhibitors in cells or tissue cultures induces AOX mRNA synthesis, and increases AOX protein levels and activity [2–4]. Other stress conditions, such as chilling [5], increase of reactive oxygen species (ROS) [6] and aging [7], may also induce AOX synthesis. Therefore, it is thought that AOX could protect the cell from oxidative damage during metabolic states in which coupled respiration is inhibited [8–12].

Chemical analysis of photosynthetic pigments, chloroplast microstructural studies, and recently, gene sequence analysis [13] strongly suggest that the land plants (*Streptophyta*) and green algae (*Chlorophyta*) constitute a monophyletic clade called *Chlorobionta*. Green algae share with land plants the presence of AOX and alternative NAD(P)H dehydrogenases in their mitochondrial respiratory chains [14]. The presence of a cyanide resistant respiration or of

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5622-5620; fax: +52-55-5622-5611.

E-mail address: dhalphen@fisiol.unam.mx (D. González-Halphen).

an AOX has been described in several chlorophytes, including *Chlamydomonas reinhardtii* [3,15,16], *Selenastrum minutum* [15], *Chlorella pyrenoidosa* [17] and *Nitella clavata* [18].

In this work, we describe the functional characterization of oxidative phosphorylation in mitochondria from the colorless chlorophyte *Polytomella* sp., a unicellular alga closely related to the green genus *Chlamydomonas* [19] that lacks both functional chloroplasts and a cell wall. Taking into account the physiological similarities and the evolutionary relationships between green algae and land plants, one supposes that the colorless alga *Polytomella* sp. could have a respiratory chain similar to that of other chlorobionts. Nevertheless, the presence of several activators known to enhance AOX activity in plants failed to induce an AOX activity in *Polytomella* sp. mitochondria. Exposure of cell cultures to KCN did not induce an AOX activity, but did change some of the kinetic parameters of cytochrome *c* oxidase. These observations support the absence of an AOX activity in the mitochondrial respiratory chain of *Polytomella* sp., and suggest the lack of an *Aox* gene and of the corresponding AOX polypeptide in this alga. We hypothesize that the AOX was lost during the divergence of the genus *Polytomella* from its close photosynthetic relatives.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

Polytomella sp. strain 198.80 (E.G. Pringsheim) was obtained from the algae culture collection of the University of Göttingen, Germany. The cells were grown in 1 mM sodium phosphate buffer (pH 5.3), 10 mM MES, 0.5% sodium acetate, 5% Beijerinck's solution, and trace elements [20]. The medium was supplemented with 10 µg/ml of vitamin B₁ and 0.5 µg/ml of vitamin B₁₂. Cultures of 2 l were started with an inoculum of 0.2×10^6 cells/ml in 3-l large-bottom flasks, without shaking, at 25 °C.

Cell-wall-less *C. reinhardtii* strain CW15 was grown in TAP media [21] with 1% sorbitol, with agitation at 100 rpm, and under continuous light. The cells were harvested at the late exponential phase of growth.

2.2. Preparation of mitochondria

Mitochondria from *C. reinhardtii* were isolated as previously described [16]. For preparation of *Polytomella* sp. mitochondria, cell cultures were harvested at the stationary phase ($1.8\text{--}2.0 \times 10^9$ cells), 24 h after inoculation, by centrifugation at $2500 \times g$ for 8 min at 4 °C. Cells were washed once with 250 mM sucrose, 20 mM MOPS (pH 7.4) and 1 mM EGTA (SME buffer). The pellet was resuspended in 2 ml of SME buffer supplemented with 0.3% fatty acid-free bovine serum albumin. Cells were broken by simple

homogenization with a Teflon pestle in a glass homogenizer. The homogenate was suspended in 35 ml of SME buffer and centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min; the supernatant was recovered and centrifuged at $9500 \times g$ for 10 min. The pellet, containing the crude mitochondrial fraction, was gently resuspended in 1 ml of SME buffer and incubated in the presence of 0.2 mM ADP and 0.2% fatty acid-free BSA for 10 min at 4 °C. Then, the mitochondrial fraction was diluted to 8 ml final volume with SME buffer and centrifuged at $10,500 \times g$ for 10 min. The usual yield was 20–25 mg of mitochondrial protein/l of culture. Protein concentration was determined as previously described [22].

2.3. Oxygen consumption

Oxygen uptake was measured with a Clark-type O₂ electrode. Mitochondria (1 mg protein) were incubated in 2 ml of air-saturated 20 mM MOPS (pH 7.2), 120 mM KCl, and 1 mM EGTA (KME buffer) at 30 °C. Rate values were determined using an oxygen solubility of 400 ng atoms/ml (200 µM) at 2240 m of altitude and 30 °C temperature.

2.4. Cytochrome *c* oxidase activity

The activity of cytochrome *c* oxidase was measured by oxygen consumption. Mitochondria (1 mg protein) were incubated with 5 mM ascorbate and 1 µM antimycin in 2 ml of KME buffer at 30 °C, and the reaction was started with the addition of 2 mM TMPD as artificial electron mediator [23]. COX activity was also measured spectroscopically in mitochondrial membranes that had been twice frozen at –72 °C and thawed, by following the oxidation of horse heart cytochrome *c* at 550–540 nm in a double beam spectrophotometer (SLM-AMINCO, DW-2000). For each measurement, 100 µg of mitochondrial protein were added to 1 ml of 250 mM sucrose, 20 mM HEPES (pH 7.2), 1 mM EGTA, 20 mM MgCl₂, and 1 µM antimycin at 30 °C.

2.5. Transmembrane electric potential

Changes in absorbance of the internalized lipophilic cation safranin O were used as an indicator of membrane potential [24]. Mitochondria (1 mg protein) were incubated in 3 ml of KME buffer containing 5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.2) and 8 µM safranin O at 30 °C. The changes in the absorbance difference at 554–520 nm were measured in the double wavelength spectrophotometer. In addition, the difference of electric potential across the inner membrane was estimated by following the distribution of [³H]TPP⁺ (tetraphenyl phosphonium) as previously described [25]. Mitochondria (2 mg protein) were incubated in 0.5 ml of KME buffer, containing 5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.2), and 0.8 µM [³H]TPP⁺ (0.05–0.07 µCi/nmol) at 30 °C. Substrates, inhibitors, or uncoupler agents, were added as indicated. After 2 min, the reaction was stopped by centrifugation at $14,000 \times g$ for 2 min at 4 °C. The radioactivity

of aliquots of the resulting pellets and supernatants was measured in a scintillation counter. The distribution of [^3H]TTPP $^+$ was calculated using the Nernst equation, and corrected for the nonspecific binding of the cation to mitochondrial membranes [26].

2.6. ATP synthesis

To determine the rate of oxidative phosphorylation, the incorporation of ^{32}P i into ATP was measured as previously described [27]. Aliquots of mitochondria (1 mg protein) were incubated in 1 ml of KME buffer containing ^{32}P i (1–1.3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 10 mM glucose, 5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2), 1 mg yeast hexokinase (20 units/mg), in the presence of different substrates or respiratory inhibitors, as indicated. After 3 min at 30 °C, the reaction was stopped with ice-cold 5% (w/v) trichloroacetic acid, and the reaction medium was centrifuged to remove denatured protein. An aliquot was withdrawn for extraction of ^{32}P i from the aqueous phase. Extraction was done by adding a mixture of ammonium molybdate/sulfuric acid, and using acetone plus *n*-butyl acetate as organic solvent. The extraction was repeated at least three times. The extracted aqueous phase was used for determination of ^{32}P i incorporated into ATP and glucose-6-phosphate by measuring Cerenkov radiation.

2.7. Cytochrome content

Difference spectra were obtained from mitochondrial samples reduced with dithionite versus samples reduced with ascorbate (cytochrome *b* quantification), and from samples reduced with dithionite (cytochromes *a*+*a*₃) or ascorbate (cytochromes *c*+*c*₁) versus samples oxidized with persulfate [28]. Measurements were made with 1 mg mitochondrial protein in 1 ml of SME buffer diluted with glycerol 1:1 (v/v) at 25 °C. Cytochrome contents were estimated using the following extinction coefficients: $\epsilon_{(561-540\text{ nm})} = 17.5\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for *c*-type cytochromes [29]; $\epsilon_{(563-578\text{ nm})} = 26\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for cytochrome *b* [30] and $\epsilon_{(609-630\text{ nm})} = 16\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for cytochromes *a*+*a*₃ [31].

2.8. Mitochondrial fatty acids quantification

Fatty acids extracted from *Polytomella* sp. mitochondria were quantified as described [32], with some modifications. Samples of 10 mg mitochondrial protein were stored at –70 °C in the presence of 50 μg butyl-hydroxytoluene (BHT)/mg protein until used. After thawing, 1 ml BHT in 0.02% (v/v) methanol, 50 μg phosphatidylcholine-diheptadecanoyl as internal standard, 1 ml 0.9% NaCl, and 2 ml chloroform were added and mixed for 20 s. The suspension was centrifuged at 1600 $\times g$ for 5 min. This procedure was repeated once. The organic phase was dehydrated by addition of 1.5 g Na_2SO_4 (anhydrous), then the mixture was filtered through a cotton layer. The solvent was evaporated

under a stream of N_2 . For trans-esterification of phospholipids and derivatization of free fatty acids to methyl-esters, dried samples were mixed with 0.1 ml toluene, 2 ml anhydrous methanol, and 0.04 ml of sulfuric acid [33]. This mixture was heated at 80 °C for 2 h. The treated samples were mixed with 1 ml 5% NaCl and 2 ml hexane and mixed vigorously. This procedure was repeated once. Then, the samples were evaporated under a stream of N_2 and stored at –72 °C until chromatographed. Gas chromatography conditions were as follows: a CPSIL 8CB column (film thickness 0.25 mm) using helium as carrier at a flow rate of 1 ml/min at 195 °C, in a Carlo Erba 2300 chromatograph.

2.9. Polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetection

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described [34], and the immunoblotting was carried out as previously reported [35] using conventional antibodies raised against *C. reinhardtii* recombinant fusion AOX1 protein [36], obtained from the cDNA of the *Aox1* gene [37]. Antibodies were kindly provided by Stacie Nakamoto of the Merchant group at the University of California, Los Angeles.

2.10. Southern blot hybridization

Total *Polytomella* sp. DNA was obtained by phenol–chloroform extraction as described [38]. Cells from 2 l of culture were collected and resuspended in 10 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% Triton X-100, and 1% SDS. Total DNA was extracted from broken cells by two phenol–chloroform extractions (1:1 v/v), followed by an additional chloroform extraction. The resulting aqueous phase was mixed in a 5:1 ratio (v/v) with 3 M sodium acetate to precipitate DNA. The pellet was resuspended in nuclease-free water and treated with RNase. Aliquots were frozen (–72 °C) until used. DNA (50 μg) was digested with different restriction enzymes as indicated, and subjected to electrophoresis in a 0.9% agarose gel in 45 mM Tris–borate (pH 8.0), 1 mM EGTA buffer (TBE). The DNA fragments were transferred to a nylon membrane and subsequently hybridized against a partial cDNA of the *Aox* gene of *Chlamydomonas* sp. W80 encoding for the putative active site of AOX [a kind gift of H. Miyasaka (The Kansai Electric Power Co., Japan), GeneBank accession number AB009087], labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP by random priming.

2.11. Aox sequence amplification by PCR

A pair of desoxyoligonucleotides were designed based on two highly conserved regions of plant and *Chlamydomonas* sp. W80 *Aox* genes. Total DNA (1 μg) from *Polytomella* sp., *C. reinhardtii*, or *Mangifera indica* (mango) were used as templates for amplification assays in the presence of 1 mM MgCl_2 and 200 pmol of each of the

following primers: 5'-GTC TTG ACA GCT TCC TCC TC-3' (forward) and 5'-GAG AAC GAG CGG CAT GCA CCT-3' (reverse). Samples were denatured for 5 min at 94 °C, and subjected to 30 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, 1.5 min annealing at 55 °C, and 2 min extension at 72 °C. All standard molecular biology techniques were as described [39]. Sequencing was carried out at the Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

3. Results

3.1. Oxygen uptake and the effect of respiratory inhibitors

An initial characterization of the respiratory chain of *Polytomella* sp. was carried out with oxymetric measurements in the presence of different substrates and inhibitors. Isolated mitochondria from *Polytomella* sp. were able to oxidize succinate and malate. The addition of glutamate did not increase the rate of malate oxidation (Table 1). In contrast, 10 mM L-lactate, 10 mM D-lactate, 10 mM α -ketoglutarate, or 5 mM pyruvate did not stimulate the rate of respiration. The classical respiratory inhibitors antimycin, myxothiazol and KCN strongly inhibited oxygen uptake (over 90% in all cases) with succinate or malate as substrates (Table 1). The remaining 5–10% of inhibitor-resistant oxygen uptake was not affected by the addition of the typical plant AOX inhibitors, 2 mM SHAM or 2 mM *n*-propylgallate. Nevertheless, 2 mM SHAM in the absence of any other inhibitor was able to partially inhibit respiration (15–20%) with malate or succinate, with estimated I_{max} values (minimal concentration of inhibitor required to achieve maximal inhibition) of 2.5 and 2.8 mM, respectively. The partial inhibition of total respiration by SHAM, but its lack of effect on the KCN-resistant respiration, suggested a nonspecific inhibitory action of SHAM on the respiratory chain of *Polytomella* sp. The oxidation of the quinol analogs duroquinol (29 \pm 7 nmol oxygen/min/mg protein, $n=3$) and decylbenzoquinol (44 \pm 16 nmol oxygen/min/mg protein, $n=5$), was completely blocked by antimycin (97% inhibition) or myxothiazol (98%), suggest-

ing that all the electron flux is directed through the *bc*₁ complex. Mitochondria were also able to oxidize NADH (43 \pm 18 nmol oxygen/min/mg protein, $n=4$). This oxidation was blocked by KCN (92% inhibition), antimycin (90%), myxothiazol (91%) and rotenone (67%). The oxidation of external NADH and its partial inhibition by rotenone suggested the presence of broken mitochondria in the preparation. A cytochrome *c* oxidase assay following oxygen uptake by added reduced cytochrome *c* in the presence and absence of detergents indicated that 60% of the mitochondrial preparation was intact.

3.2. Membrane potential generation and ATP synthesis

Polytomella sp. mitochondria were able to generate a significant membrane potential, as estimated by changes in the safranin O signal, in the presence of malate or succinate as oxidizable substrates (data supplied for review but not shown). The signal was abolished by the addition of CCCP. Full collapse of the membrane potential also occurred in the presence of KCN or antimycin.

Membrane potential was also quantitatively estimated by measuring the [³H]TPP⁺ distribution across the inner mitochondrial membrane. The membrane potential generated by succinate (101 \pm 3 mV) or malate (110 \pm 6.5 mV) was abolished by KCN (83 \pm 6 and 67 \pm 3 mV, respectively, $n=3$), antimycin (85 and 76 mV, respectively) and by CCCP (87 \pm 3 and 77 \pm 1.5 mV, respectively, $n=3$). The membrane potential values obtained were above the threshold value of 80 mV negative inside required to drive ATP synthesis determined for other mitochondrial preparations [40,41]. These results indicated an intact inner membrane, at least in a fraction of the mitochondrial preparation of *Polytomella* sp.

3.3. Attempts to measure alternative oxidase activity in *Polytomella* sp. mitochondria

To activate a possible oxidized state of the putative AOX, isolated mitochondria were treated with 20 mM DTT for 30 min at 4 °C as previously described for soybean mitochondria [42]. However, the rate of oxygen uptake was inhibited

Table 1
Oxygen uptake and ATP synthesis in *Polytomella* sp. mitochondria

Substrate	Oxygen uptake				ATP synthesis							P/O		
	nmol O ₂ min ⁻¹ mg protein ⁻¹	Percent inhibition				nmol ATP min ⁻¹ mg protein ⁻¹	Percent inhibition							
		KCN	Ant	Myx	Rot		KCN	Ant	Myx	Oli	Ven		Cat	CCCP
Malate	41 \pm 11 (7)	93	91	81	64	95 \pm 23 (7)	81	80	90	72	80	75	82	1.1
Succinate	92 \pm 17 (8)	94	95	96	20	54 \pm 19 (7)	90	88	91	75	nd	88	91	0.3
No substrate	3 \pm 2 (6)					14 \pm 6 (4)								19

Mitochondria from control cultures were incubated in the presence of the following substrates and inhibitors: 10 mM malate, 10 mM succinate, 1 mM KCN, 200 pmol antimycin/mg protein (Ant), 300 pmol myxothiazol/mg protein (Myx), 1 μ M rotenone (Rot), 500 pmol oligomycin/mg protein (Oli), 500 pmol venturicidin/mg protein (Ven), 1 μ M carboxyatractylolide (Cat), 500 nM CCCP.

The data shown are the mean \pm S.D. with the number of different preparations in parentheses. nd, not determined.

Table 2
Oxygen uptake in control and DTT-treated mitochondria from control or KCN-adapted cells

DTT	nmol O ₂ min ⁻¹ mg protein ⁻¹			
	mit _c		mit _K	
	+	-	+	-
Succinate	76 ± 11 (3)	85 ± 12 (3)	66 ± 12 (3)	71 ± 14 (3)
+ KCN	5 ± 3 (3)	5 ± 2 (3)	6 ± 2 (3)	5 ± 2 (3)
+ Pyruvate	6 ± 2 (3)	6 ± 2 (3)	6 ± 3 (3)	6 ± 2 (3)
+ AMP	7 ± 3 (3)	5 ± 3 (3)	6 ± 4 (3)	6 ± 3 (3)
+ α-KG	7 ± 4 (3)	6 ± 2 (3)	nd	nd

Isolated mitochondria were incubated in SME buffer in the presence of 20 nM DTT during 30 min at 4 °C. After treatment, mitochondria were washed and centrifuged. Additions were 10 mM succinate, 1 mM KCN, 2 mM pyruvate, 2 mM AMP or 5 mM α-ketoglutarate (α-KG). Pyruvate, AMP or α-ketoglutarate were added 1 min after KCN addition. The data indicate the mean ± S.D. with the number of different preparations in parentheses. nd, not determined.

over 90% by 1 mM KCN (Table 2, mit_c), indicating no activation of a putative plant-like AOX activity. Moreover, subsequent addition of either 5 mM pyruvate, 5 mM α-ketoglutarate, or 5 mM AMP, all of them AOX activators in plants or protists [43,44] did not stimulate oxygen uptake (Table 2).

An AOX activity [3,16] and the presence of two functional *Aox* genes have been identified in *C. reinhardtii* [37]. This *C. reinhardtii* AOX activity was stimulated by the addition of 0.2 mM KCN to the culture medium [3]. We attempted to express a possible AOX activity in *Polytomella* sp. mitochondria by exposing cell cultures to antimycin or KCN [3.5]. Concentrations of 100 pmol/ml antimycin and 0.6 mM KCN completely blocked cell proliferation, although the presence of 0.2 mM KCN maintained the culture population (Fig. 1). The addition of KCN was made 24 h after inoculation, because the addition of the inhibitor at the beginning of the culture abolished cell growth.

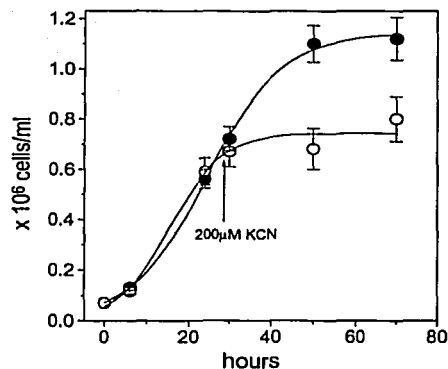


Fig. 1. Cell growth in presence of cyanide. Growth curves of *Polytomella* sp. in control acetate-MES medium (●) and in the presence of 200 μM KCN (○) added 24 h after inoculation (arrow).

Mitochondria isolated from cells adapted to 0.2 mM KCN exhibited a diminished respiratory activity using malate (21% diminished), succinate (18%), NADH (25%) or TMPD/ascorbate (12%) as electron donors. Additionally, DTT-treated mitochondria isolated from KCN-adapted cells also exhibited a high sensitivity to cyanide (Table 2, mit_K); the remaining, low cyanide-resistant respiration was, as in

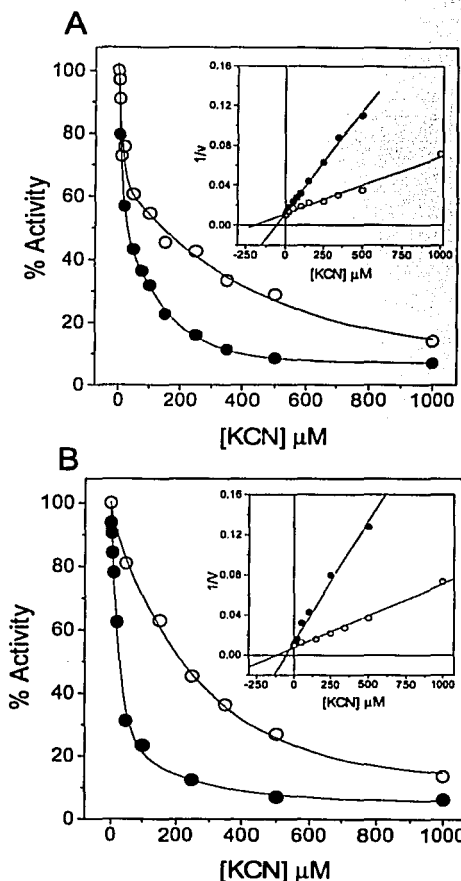


Fig. 2. Inhibition of respiration by cyanide in mitochondria from control and KCN-adapted cells. Isolated mitochondria from control (●) and KCN-adapted cultures (○), were incubated in KME medium at 30 °C, with 10 mM succinate (A), or 10 mM malate (B), and the indicated concentrations of KCN. Representative experiments for each substrate are shown. The Dixon plots for each experiment are shown in the insets. The maximal rates of respiration from mitochondria of KCN-adapted cells in the absence of KCN were 74 ± 22 (5) and 34 ± 12 (5) nmol oxygen min⁻¹ mg⁻¹ for succinate and malate, respectively.

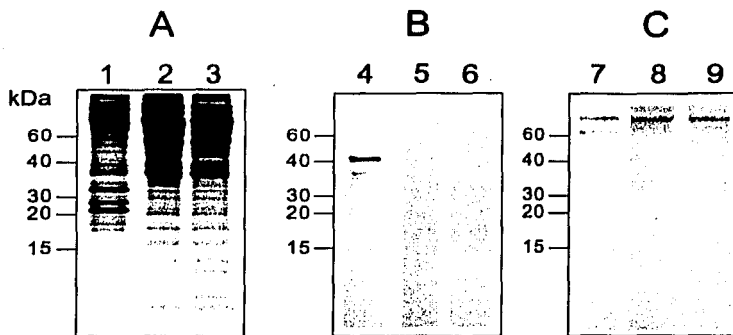


Fig. 3. Coomassie Blue stained polyacrylamide gels and Western blot analysis. Lanes 1, 4 and 7 contained mitochondria from *C. reinhardtii* (40 μ g protein). Lanes 2, 5 and 8 had mitochondria from *Polytomella* sp. (40 μ g protein). Lanes 3, 6 and 9 contained mitochondria from KCN-adapted *Polytomella* sp. cells (40 μ g protein). (A) Coomassie Blue stained 16% polyacrylamide gel. (B) Immunoblots decorated with an anti-AOX antibody raised against the *C. reinhardtii* protein. (C) Immunoblot decorated with an anti-ATPase β subunit antibody raised against the *Polytomella* sp. protein.

control mitochondria, not stimulated by α -ketoacids or AMP, nor was inhibited by 2 mM SHAM or 2 mM *n*-propylgallate.

KCN titration of the rate of respiration with succinate (Fig. 2A) or malate (Fig. 2B) revealed a strong but incomplete inhibition at a concentration of 1 mM in mitochondria

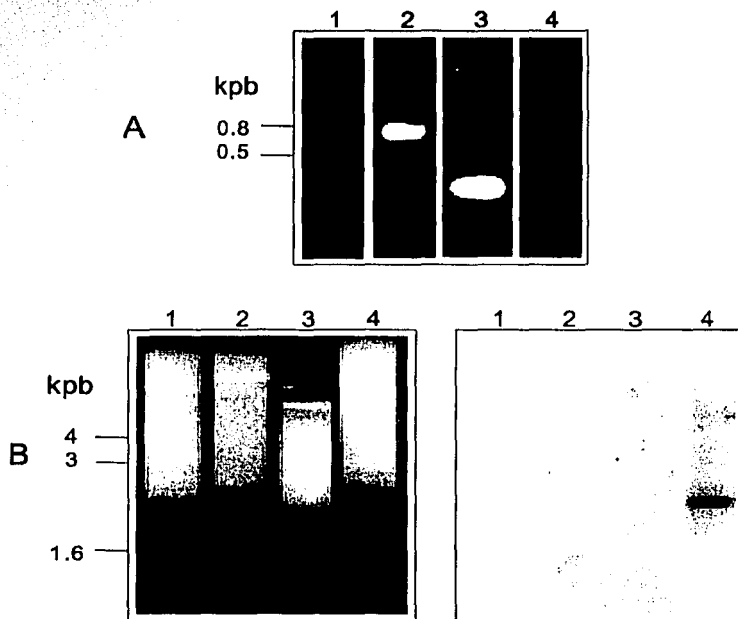


Fig. 4. (A) PCR reactions using as templates total DNA from *Polytomella* sp. (lane 1), *C. reinhardtii* (lane 2) and *M. indica* (lane 3), respectively. PCR conditions were those described in Material and methods. Lane 4 is a control without DNA. (B) Agarose gels and Southern blot analysis of total DNAs from *Polytomella* sp. (lanes 1, 2, and 3) and from *C. reinhardtii* (lane 4) using as probe a fragment of the cDNA of the *Aox* gene of *Chlamydomonas* sp. W08. Total DNAs (50 μ g per lane) were treated with the restriction enzymes *Eco*RI (lane 1), *Hind*III (lane 2) *Eco*RI–*Hind*III (lane 3) and *Pst*I (lane 4). The right panel shows the 0.9% agarose gel stained with ethidium bromide and the left panel the autoradiogram of the corresponding nylon membrane.

Table 3
Mitochondrial cytochrome content

Heme type	pmol mg protein ⁻¹	
	mit _c	mit _k
A	201 ± 48 (3)	405 ± 74 (4)
B	313 ± 13 (3)	398 ± 59 (3)
C	228 ± 14 (3)	294 ± 37 (3)

Spectra were obtained at room temperature with mitochondria from control (mit_c) and KCN-adapted cultures (mit_k).

Data shown represent mean ± S.E. of three different preparations.

from control and KCN-adapted cells. In both cases, the remaining KCN-resistant respiration was not activated by 5 mM pyruvate or 2 mM AMP, nor was it affected by the plant mitochondrial AOX inhibitors 2 mM SHAM or 2 mM *n*-propylgallate. The Dixon plots (Fig. 2, inserts) showed an apparent diminished affinity of mitochondria towards KCN by exposure to the inhibitor. Moreover, both the overall and KCN-resistant respiration were fully blocked by antimycin or myxothiazol in both types of mitochondria. Altogether, these results suggested the lack of an AOX activity in *Polytomella* sp. mitochondria isolated from cells grown with or without KCN.

3.4. Immunochemical analysis of AOX polypeptides

Using a conventional antibody raised against AOX1 of *C. reinhardtii*, it was possible to detect a polypeptide with apparent molecular mass of 40 kDa in a Western blot of isolated mitochondria from *C. reinhardtii*. In addition, a minor band around 36 kDa was also detected, and was thought to correspond to the AOX2 polypeptide (Fig. 3, panel B, lane 4). In contrast, the same anti-AOX1 antibody was unable to cross-react with mitochondrial proteins from *Polytomella* sp. control cells (Fig. 3, panel B, lane 5) or KCN-adapted cells (Fig. 3, panel B, lane 6). A polyclonal antibody raised against subunit β of the mitochondrial F₁F₀-ATPase of *Polytomella* sp. immunoreacted with a 70 kDa polypeptide of *C. reinhardtii* (Fig. 3, panel C, lane 7) and with mitochondrial proteins from *Polytomella* sp. control cells G or from KCN-adapted cells (Fig. 3, panel C, lane 9).

Numerous PCR experiments were done to amplify a putative *Aox* gene fragment from *Polytomella* sp. Fig. 4 shows one of such experiments, using the conditions described in Materials and methods. The designed primers were able to generate a PCR product of 662 bp from total DNA of *C. reinhardtii* (Fig. 4, Panel A, lane 2) and a product of 180 bp when using DNA from *M. indica* as template (Fig. 4, Panel A, lane 3). Nucleotide sequence analysis confirmed that the amplification products originated from the corresponding *Aox* genes of these organisms, and were identical to fragments from the sequences previously described (GenBank accession numbers AF314255 and X79329) [37,45]. In contrast, no amplification products were observed in the absence of DNA (Fig. 4, Panel A, lane 4) or when using total DNA from *Polytomella* sp. as template

(Fig. 4, Panel A, lane 1). In parallel with these experiments, Southern blot analysis was carried out. Total DNA from *Polytomella* sp. and *C. reinhardtii* were digested with restriction endonucleases, and probed with an *Aox* cDNA fragment of *Chlamydomonas* sp. W80. While this probe readily hybridized with *C. reinhardtii* DNA fragments (Fig. 4, Panel B, lane 4), negative results were obtained with *Polytomella* sp. DNA digested with different restriction enzymes (Fig. 4, Panel B, lane 4, Panel B, lanes 1, 2, and 3).

The lack of recognition of an AOX polypeptide and of the corresponding *Aox* gene in *Polytomella* sp. mitochondria in this colorless alga DNA also favored the notion of the absence of an alternative oxidase in the respiratory chain of this chlorophyte.

3.5. Cytochrome content and fatty acid composition

How did the presence of KCN in the culture medium modify the activity of the cytochrome *c* oxidase? In an initial attempt to address this question, cytochrome content and fatty acid composition were analyzed in mitochondria obtained from control and KCN-adapted cells.

Spectrophotometric analysis of *Polytomella* sp. mitochondrial membranes indicated an increase in the content of *a+a*₃ cytochromes after exposure to KCN and no significant variation in the content of *b* and *c* type cytochromes (Table 3). In contrast, the activity of COX was drastically decreased in mitochondria from cells adapted to KCN (*V*_m was four times lower than in control mitochondria). Nevertheless, the affinity (*S*_{0.5}) for cytochrome *c* did

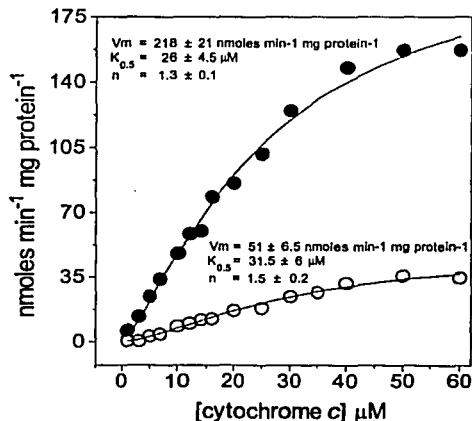


Fig. 5. Cytochrome *c* oxidase activity. Two times frozen–thawed mitochondrial membrane samples from control (●) and KCN-adapted cultures (○) were incubated with the indicated concentrations of reduced horse cytochrome *c*. The nonlinear regression, to determinate maximal velocity (*V*_m) and substrate affinity (*S*_{0.5}), using the Hill equation was made with Microcal-Origin 3.73 software.

Table 4
Mitochondrial fatty acid content

Fatty acid	$\mu\text{g mg protein}^{-1}$	
	mit _c	mit _k
C16:0	15 ± 2	25 ± 5.5 ^a
C16:1 _n -7	5 ± 0.7	6 ± 1
C16:2 _n -7	39 ± 8	60 ± 20
C18:0	5 ± 4.5	7 ± 6.5
C18:1 _n -9	12 ± 5.5	12 ± 3
C18:2 _n -6	13 ± 2	18 ± 4 ^a
C18:3 _n -3	38 ± 5	62 ± 20 ^a
Totals ^b	134 ± 17	201 ± 56 ^a

Fatty acids of mitochondria from control (mit_c) and KCN-adapted cultures (mit_k) were analyzed by gas spectrography. The values are the mean ± S.D. of five different preparations.

^a The values are significantly different with respect to controls (*t*-test, at $P < 0.05$).

^b The total content considers other fatty acids (together constituting less than 5%) not shown in this table.

not change, as judged by the titration of COX activity with different cytochrome *c* concentrations (Fig. 5).

The fatty acid content of mitochondrial membranes was determined, since stress conditions such as exposure to respiratory inhibitors, chilling or aging, may induce physical changes in the mitochondrial membrane lipid components. Such changes may lead to leaks in the electron transfer reactions catalysed by respiratory complexes, enhancing ROS production and restricting the overall respiratory activity [10,46].

The major fatty acids in both mitochondrial preparations were α -linolenic acid (18:3_n-3) and 7,10-hexadecadienoic acid (16:2_n-7). These two compounds constituted more than half of total fatty acid content (57% and 60%, respectively) (Table 4). A high content of α -linolenic acid has been previously described in mitochondria from other chlorobionts [47], but the 16:2_n-7 fatty acid has been reported in low (1–6%) or trace amount in algae cells [48]. The unsaturated/saturated fatty acid ratio in mitochondria from control (5.0) and KCN-adapted cells (5.2) indicated a similar mitochondrial inner membrane fluidity in both preparations. A similar temperature dependence of the COX activity in the range 15–50 °C also suggested a similar membrane fluidity in both mitochondrial preparations (data not shown). The high content of unsaturated fatty acids (84% and 83%, respectively) was in agreement with similar values described for plant mitochondria [48]. The most remarkable effect induced by KCN exposure was the 30% increase in the total content of fatty acids (Table 4). The significant modification in the lipid to protein ratio in the inner mitochondrial membrane may influence the activity of COX.

4. Discussion

The method reported in this work for the isolation of mitochondria from the colorless chlorophyte *Polytomella*

sp. yielded a preparation that was able to generate an electrochemical gradient that supported uncoupler-sensitive ATP synthesis. In a previous report, respiratory controls were obtained with the mitochondria from *Polytomella caeca* [49], although energy-dependent processes or membrane potential were not described. The partial inhibitory effect of rotenone on the oxidation of NADH suggested that a fraction of the *Polytomella* sp. mitochondrial preparation was broken; nevertheless, the remaining intact fraction was able to generate a transmembrane electric potential and to support ATP synthesis. The ATP synthesis was more than 70% inhibited by 200 pmol of oligomycin/mg protein, a concentration that is similar to the one found for maximal inhibition in plant mitochondria during state 3 respiration [50]. In contrast, in *C. reinhardtii*, the ADP-stimulated respiration was only partially inhibited (35%) by a much higher concentration of oligomycin (12.5 nmol/mg protein) [16].

The rate of respiration in mitochondria isolated from *C. reinhardtii* was partially inhibited (50%, 20% and 70% inhibition for malate, succinate and exogenous NADH, respectively) by 1 mM KCN and the subsequent addition of 2 mM SHAM totally blocked respiration, indicating the presence of a plant-like respiratory chain in this photosynthetic chlorophyte [16]. In contrast, the full inhibition of oxygen uptake by KCN, antimycin or myxothiazol with either oxidizable substrates or quinol analogs suggested the lack of an active alternate electron pathway in *Polytomella* sp. mitochondria. The AOX activity in plant and protist mitochondria is variable since it depends on cell culture conditions [2,3,11], type of tissue, the developmental stage of the organism [45,51] and the presence of activators such as pyruvate, AMP, IMP or GMP [1,44]. However, in all *Polytomella* sp. preparations, neither the KCN-resistant respiration nor the ubiquinol/oxygen oxidoreductase activity was stimulated by α -ketoacids or AMP.

The AOX in higher plants is present as a homodimer, which exists in a nonlinked (reduced) or covalently linked (oxidized) forms, the former being five times more active than the latter [42]. The ratio between these two forms is regulated by the redox state of the interdimeric disulfide bond. However, treatment with DTT to reduce the putative disulfide bridge and generate an active reduced homodimer [42] failed to enhance a cyanide-resistant respiration in *Polytomella* sp. mitochondria. It is relevant that the two Aox genes reported in *C. reinhardtii* lack the conserved cysteines present in plant sequences, which have been related to the regulatory disulfide bond formation and α -keto acid activation [37]. In consequence, this redox regulation of plant-like AOX may not be present in chlamydomonad algae at all.

The stress condition that resulted from the addition of KCN did not induce an AOX activity in *Polytomella* sp., suggesting a nonfunctional state of the protein or the absence of a corresponding Aox gene, as discussed below. However, the exposure of cultures to KCN affected the

activity of COX. Our data suggest that the increase in the fatty acid content or in the lipid/protein ratio in mitochondria from KCN-adapted cells could affect the activity of COX from *Polytomella* sp. Changes in activities of membrane proteins may be induced by physical changes in the mitochondrial membranes during stress conditions [46]. In this case, the COX activity and the affinity of the binuclear center towards KCN was modified. The apparent lower affinity for cyanide in mitochondria from KCN-adapted cells may be related to a lower flux control exerted by COX on electron transport induced by the presence of KCN. The presence of a higher amount of a -type cytochromes did not correlate with the diminished activity of COX in mitochondria from KCN-adapted cells (Fig. 5). Thus, the cytochrome ($a + a_3$) accumulation is probably associated to nonfunctional proteins.

Altogether, the above data indicates that *Polytomella* sp. does not have a plant-like AOX, and most probably lacks a corresponding *Aox* gene. *Polytomella* therefore differs from other chlorophyte algae, such as *Chlamydomonas* [16] and *Chlorella* [17]. The absence of an AOX activity has also been observed in another colorless chlorophyte, *Polytoma uvella* [52]. Is it possible to relate the loss of photosynthesis with the loss of *Aox* genes? The change from photosynthetic to heterotrophic life style increases the mutation rate and induces some structural modifications in the plastid-located genes related to photosynthesis [53]. These modifications may also occur in nucleus-located genes related to chloroplast or other organelle activities. Accumulated mutations could eventually inactivate these genes, making the loss of photosynthetic capacity irreversible [54]. Light exposure of potato leaves increases dramatically the expression of the nucleus-localized *Aox* and *Nad1* (encoding the internal NAD(P)H dehydrogenase of mitochondria) genes [55]. This light-induction suggests that these genes are related to photosynthetic function and light metabolism, and that they may be regulated by chloroplast activity. It is therefore possible to visualize a role for AOX during light-metabolism. In dark–light transitions, the chloroplast NAD(P)H/NAD(P) ratio increases due to a highly active photosynthetic chain, eventually producing a photoinhibitory effect, diminishing the efficiency of the process, and leading to ROS production and concomitant damage [56]. In these conditions, the formation of NAD(P)H and ATP exceeds the cell demand. The existence of alternate, nonphosphorylating mitochondrial components (AOX and several NAD(P)H dehydrogenases) could diminish photoinhibition by removing the reduced intermediaries exported from the chloroplast, dissipating the light energy and avoiding ROS formation, even when ADP availability is limited. Although plant cells possess well-characterized systems that avoid overreduction, like activation of Calvin's cycle and increased nitrogen assimilation [56], the participation of AOX could be important.

With the loss of the whole autotrophic pathway, the mutation rate and inactivation of the light metabolism-

related genes could accelerate. In the case of *Polytomella* sp., the possible evolutionary loss of the *Aox* gene may be explained by random drift, assuming a nonessential activity of the encoded AOX enzyme after the loss of photosynthesis. Alternatively, but less likely, the *Aox* gene may still be present, and may be expressed in a different stage of development or in other physiological conditions in the life cycle of *Polytomella* sp. that were not explored in this work, like the processes of encystment and excystment.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. E. Davidson and M.P. King (Thomas Jefferson University, Philadelphia), M. Gómez-Lim (CINVESTAV, Irapuato, Mexico), and A. Gómez-Puyou (IFC, UNAM, Mexico) for their support in performing some experiments; Drs. L. Ongay y G. Codiz (Unidad de Biología Molecular, IFC, UNAM, Mexico), M. Vázquez-Acevedo (IFC, UNAM, Mexico) and M. West (Unidad de Microscopía, IFC, UNAM, Mexico) for their expert technical help; Drs. M. Gómez-Lim (CINVESTAV, Unidad Irapuato, Mexico), H. Miyasaka (The Kansai Electric Power Co., Japan), S. Merchant (University of California at Los Angeles), and S. Nakamoto (University of California at Los Angeles), for kindly providing us with antibodies or DNA probes that were used in the initial and final stages of this work; and to Drs. A. Atteia (IFC, UNAM), M. Gómez-Lim (CINVESTAV, Unidad Irapuato, Mexico) and D.W. Krogmann (Purdue University), for their critical comments on the manuscript. This work was supported by grants 27754N from CONACyT, Mexico; and IN202598 from DGAPA, UNAM, Mexico. ARP received a fellowship from DGAPA-DGEP (UNAM), and a graduate student grant from PAEP (UNAM).

References

- [1] G.C. Vanlerberghe, L. McIntosh, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1997) 702–706.
- [2] G.C. Vanlerberghe, L. McIntosh, *Plant Physiol.* 105 (1994) 867–874.
- [3] A. Goyal, N.E. Tolbert, *Plant Physiol.* 89 (1989) 958–962.
- [4] H. Yukioka, S. Inagaki, R. Tanaka, K. Katoh, N. Miki, A. Mizutani, M. Masuko, *Biochim. Biophys. Acta* 1442 (1998) 161–169.
- [5] G.C. Vanlerberghe, L. McIntosh, *Plant Physiol.* 100 (1992) 1846–1851.
- [6] A.M. Wagner, *FEBS Lett.* 368 (1995) 339–342.
- [7] C. Hiser, L. McIntosh, *Plant Physiol.* 93 (1990) 312–318.
- [8] E.F. Elstner, W. Oswald, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102B (1994) 131–154.
- [9] V.N. Popov, R.A. Simonian, V.P. Skulachev, A.A. Starkov, *FEBS Lett.* 415 (1997) 87–90.
- [10] A.C. Purvis, *Physiol. Plant.* 100 (1997) 165–170.
- [11] D.P. Maxwell, Y. Wang, L. McIntosh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 8271–8276.
- [12] Y. Amor, C. Mordechai, A. Levine, *FEBS Lett.* 477 (2000) 175–180.
- [13] D. Moreira, H. Le Guayader, H. Philippe, *Nature* 405 (2000) 69–72.
- [14] I.M. Moller, A.G. Rasmussen, *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 21–27.
- [15] H. Weger, R. Guy, D.H. Tupin, *Plant Physiol.* 93 (1990) 356–360.

- [16] M. Eriksson, P. Gardeström, G. Samuelsson, *Plant Physiol.* 107 (1995) 479–483.
- [17] D.F. Sargent, C.P.S. Taylor, *Plant Physiol.* 49 (1972) 775–778.
- [18] E. Ross, *Am. J. Bot.* 25 (1938) 458–463.
- [19] M. Melkonian, B. Surek, *Bull. Soc. Zool. Fr.* 120 (1995) 191–208.
- [20] A. Atceia, R. van Lis, J. Ramirez, D. González-Halphen, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 2850–2858.
- [21] D.S. Gorman, R.P. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54 (1965) 1665–1669.
- [22] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [23] R. Moreno-Sánchez, B.A. Hogue, C. Bravo, A.H. Newman, A.S. Basile, P.K. Chiang, *Int. J. Biochem.* 41 (1991) 1479–1484.
- [24] A. Zanotti, G.F. Azzone, *Arch. Biochem. Biophys.* 201 (1980) 255–265.
- [25] R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Cuéllar, N. Corona, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 432–444.
- [26] H. Rottenberg, *J. Membr. Biol.* 81 (1984) 127–138.
- [27] R. Moreno-Sánchez, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4028–4034.
- [28] C. Bravo, M. Vargas-Suárez, S. Rodríguez-Enríquez, H. Loza-Tavera, R. Moreno Sánchez, *J. Bioenerg. Biomembranes* 33 (2001) 289–301.
- [29] M. Degli Esposti, G. Lenaz, *Arch. Biochem. Biophys.* 289 (1991) 303–312.
- [30] J.W. Priest, J.W. Hadjuk, *J. Biol. Chem.* 257 (1992) 20188–20195.
- [31] K.A. Gray, M. Grooms, H. Myllykallio, C. Moomaw, C. Slaughter, F. Daldal, *Biochemistry* 33 (1994) 3120–3127.
- [32] L. Folch, M. Less, C.H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 265–275.
- [33] W.W. Christie, in: W.W. Christie (Ed.), *Gas Chromatography and Lipids*, The Oily Press, Scotland, 1989, pp. 64–84.
- [34] H. Shägger, T.A. Link, W.D. Engel, G. von Jagow, *Methods Enzymol.* 126 (1986) 224–237.
- [35] D. González-Halphen, M.A. Lindorfer, R.A. Capaldi, *Biochemistry* 27 (1988) 7021–7031.
- [36] S.S. Nakamoto, PhD thesis in Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Los Angeles, 2001, pp. 47–74.
- [37] M. Dinant, D. Baurain, N. Coosemans, B. Joris, R.F. Matagne, *Curr. Genet.* 39 (2001) 101–108.
- [38] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144–30152.
- [39] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [40] G.F. Azzone, T. Pozzan, S. Massari, M. Bragadin, *Biochim. Biophys. Acta* 501 (1978) 296–306.
- [41] H. Woelders, T. Van der Velden, K. Van Dam, *Biochim. Biophys. Acta* 934 (1988) 123–134.
- [42] A.L. Umbach, J.N. Siedow, *Plant Physiol.* 103 (1993) 845–854.
- [43] A. Millar, J.T. Wiskich, J. Whelan, D.A. Day, *FEBS Lett.* 329 (1993) 259–262.
- [44] W. Jarmuszkiewicz, A.M. Wagner, M.J. Wagner, L. Hryniewiczcka, *FEBS Lett.* 411 (1997) 110–114.
- [45] A. Cruz-Hernández, M.A. Gómez-Lim, *Planta* 197 (1995) 569–576.
- [46] A.C. Purvis, R.L. Shewfelt, *Physiol. Plant.* 88 (1993) 712–718.
- [47] K. Edman, I. Ericson, *Biochem. J.* 243 (1987) 575–578.
- [48] G.A. Thompson Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 1302 (1996) 17–45.
- [49] D. Lloyd, B. Chance, *Biochem. J.* 107 (1968) 829–837.
- [50] S. Krömer, M. Stitt, H.W. Heldt, *FEBS Lett.* 226 (1988) 352–356.
- [51] Y. Ito, D. Saisho, M. Nakazono, N. Tsutsumi, A. Hirai, *Gene* 203 (1997) 121–129.
- [52] D.A. Webster, D.P. Hackett, *Plant Physiol.* 41 (1965) 1091–1100.
- [53] A.M. Nedelcu, *J. Mol. Evol.* 53 (2001) 670–679.
- [54] R. Rumpf, D. Vernon, D. Schreiber, C.W. Birky, *J. Phycol.* 32 (1996) 119–126.
- [55] A.S. Svensson, A.G. Rasmusson, *Plant J.* 28 (2001) 73–82.
- [56] M.H.N. Hoefnagel, O.K. Atkin, J.T. Wiskich, *Biochem. Biophys. Acta* 1366 (1998) 235–255.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

I Actividad mitocondrial

Potenciales de membrana

El método desarrollado para el aislamiento y purificación de mitocondrias de *Polytomella* sp. (Figura 11) permitió la obtención de organelos intactos, capaces de sustentar un potencial membranar. La oxidación de succinato (10 mM), malato (10 mM) y NADH (1 mM) estimuló la formación de potenciales transmembranales suficientes para la síntesis de ATP [Rottenberg, 1984]



Figura 11. Fotografía por microscopía electrónica de transmisión de mitocondrias aisladas (M) de *Polytomella* sp. También se pueden observar amiloplastos (A).
Preparación de muestra y toma de fotografía por Jorge Sepúlveda, Unidad de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Oxidación de análogos de quinol

Las mitocondrias de *Polytomella* oxidan activamente los análogos de quinona reducidos, como el duroquinol (DQ) y el decil-benzoquinol (DBH); sin embargo, la incubación con antimicina (1 μM), mixotiazol (0.5 μM) o una mezcla de ambos inhibidores bloquea por completo el consumo de oxígeno, indicando que el flujo de electrones ocurre solo a través del complejo bc_1 (Tabla I)

TABLA I.

Sustrato	Velocidad Ng atom oxígeno /min/mg	Antimicina 1 μM	Mixotiazol 0.5 μM	Antimicina + Mixotiazol
		% inhibición		
Duroquinol	45 \pm 6 (3)	95	96	96
Decil-benzoquinol	87 \pm 5 (4)	94	96	95

Los valores representan la media aritmética \pm la desviación estándar del número de experimentos indicados entre paréntesis.

Como se indica en el artículo anexo (*Capítulo 3, Resultados Publicados*), ni el tratamiento con DTT ni la exposición a KCN incrementaron la resistencia a los inhibidores del complejo bc_1 durante la oxidación de los análogos de quinol. Indicando que el flujo de electrones no se ramificó hacia una vía alterna.

Efecto de la rotenona

La rotenona, inhibidor del complejo I, abate la respiración mitocondrial más de 65% cuando se oxidan NADH o malato (Figura 12). La inhibición parcial de la oxidación de NADH y de un sustrato ligado a la producción del mismo, sugiere la existencia de NADH deshidrogenasas alternas al complejo I. También existe una inhibición parcial por rotenona (\approx 15%) inespecífica sobre la oxidación de succinato.

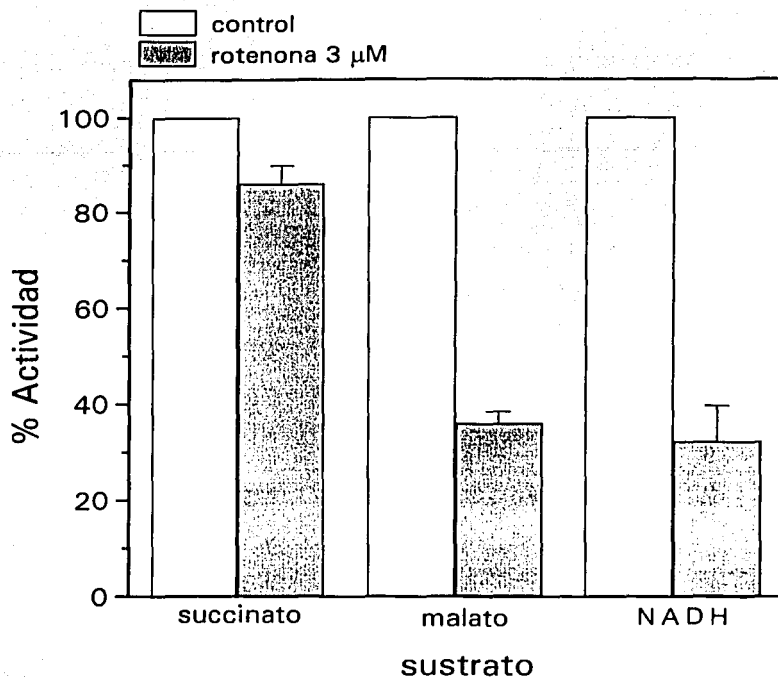


Figura 12. Efecto de la rotenona sobre la oxidación de sustratos en mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. Las barras representan el promedio de 4 experimentos independientes \pm la desviación estándar. La concentración de los sustratos es succinato 10 mM, malato 10 mM y NADH 1 mM.

Inhibidores de la oxidasa alterna

La respiración remanente después de inhibir con KCN 1-2 mM ($\approx 10\%$) no es abatible por los inhibidores típicos para AOX: SHAM y nPG. Como se mostró con anterioridad y se observa en la figura 13, la adición de KCN provoca una disminución del consumo de oxígeno mayor al 90 %, la subsecuente adición de SHAM 2 mM o nPG 2 mM no abate la respiración residual, lo que sugiere que ese pequeño porcentaje no corresponde a una posible AOX.

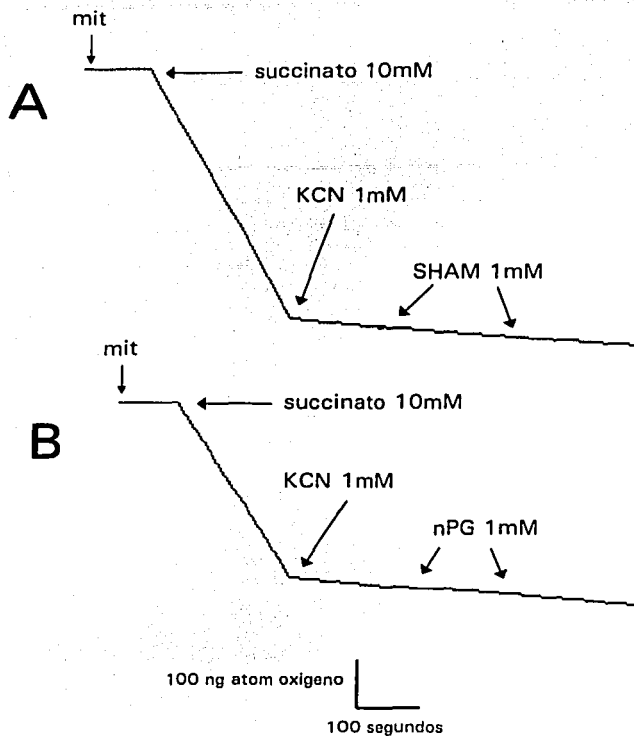


Figura 13. Registros de oximetría de mitocondrias aisladas de *Polytomella* sp. Se observa que la adición de KCN inhibe más de 90% el consumo de oxígeno. Asimismo, se aprecia el efecto nulo sobre por la adición subsecuente de inhibidores de oxidasa alterna: SHAM (A) o n-propil galato (B) Se muestran experimentos representativos usando succinato como sustrato. Resultados similares se obtienen con malato o NADH.

Actividad ascorbato-TMPD oxidasa

Se empleó el sistema ascorbato-TMPD para determinar la actividad del complejo IV en mitocondrias aisladas, así como la sensibilidad a inhibidores y la existencia de otra posible oxidasa que pudiera utilizar TMPD como donador de electrones. La actividad de TMPD analizada a diferentes concentraciones de KCN mostró una cinética bifásica (Figura 14), que se confirmó por el

análisis gráfico de Dixon (Figura 14, inserto), de donde pueden obtenerse por regresión lineal dos K_i aparentes (12 ± 4 y $630 \pm 250 \mu\text{M}$), que revelan dos afinidades distintas por el inhibidor. Lo anterior sugería la existencia de dos posibles oxidasas sensibles a KCN. Sin embargo, el análisis cinético de la actividad respiratoria dependiente de TMPD mostró un comportamiento hiperbólico típico (Figura 15), lo que indica la existencia de una sola entidad enzimática capaz de oxidar TMPD (K_m $168 \pm 16 \mu\text{M}$), por lo que el comportamiento bifásico respecto a la sensibilidad por KCN puede deberse a otros factores (ver *artículo anexo* y *discusión*). Adicionalmente, la inhibición de la oxidación de TMPD por azida (otro inhibidor clásico de la citocromo *c* oxidasa), muestra una cinética monofásica con una K_i aparente de 1 mM (Figura 16), lo que coincide con la existencia de una sola oxidasa en *Polytomella* sp: el complejo IV o citocromo *c* oxidasa.

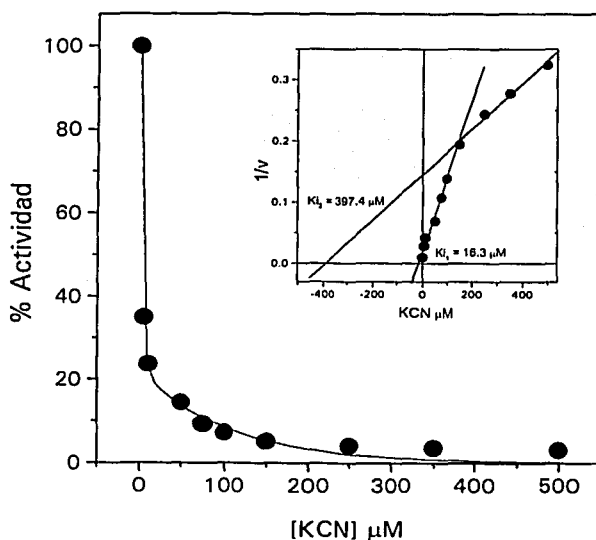


Figura 14. Efecto de KCN sobre la actividad de TMPD oxidasa en mitocondrias control aisladas de *Polytomella* sp. En el gráfico inserto aparece el análisis de Dixon de los datos del mismo ensayo, donde se pueden apreciar dos componentes cinéticos en la afinidad por el inhibidor.

Se muestra un experimento representativo.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

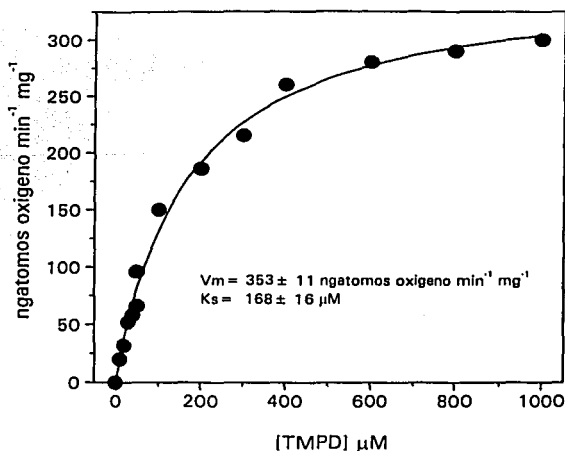


Figura 15. Consumo de oxígeno dependiente de TMPD en mitocondrias de *Polytomella* sp. El gráfico de velocidad contra sustrato muestra un comportamiento hiperbólico típico par una enzima Michaelis-Menten. El análisis de regresión no lineal se efectúo con el programa de computo Microcal Origin 3.71.

Se muestra un experimento representativo

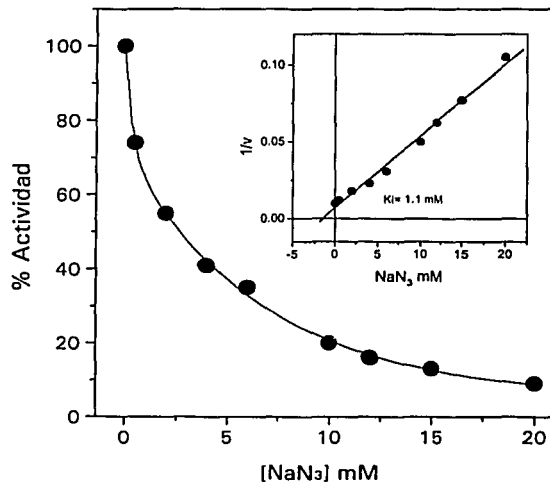


Figura 16. Efecto de NaN₃ en la actividad de TMPD oxidasa en mitocondrias control aisladas de *Polytomella* sp. El gráfico inserto es el análisis de Dixon correspondiente, en este caso la regresión lineal sugiere una sola K_i aparente para el inhibidor.

Se muestra un experimento representativo.

Por otro lado, mediante un método polarográfico se determinó la afinidad por oxígeno de la citocromo *c* oxidasa. Para ello se cuantificó la velocidad de respiración mitocondrial en concentraciones bajas de oxígeno (debajo de 200 μM) en la cámara del electrodo. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión no lineal y se determinó la $K_{0.5}$. En la figura 17 aparece la representación gráfica del ajuste al modelo de Hill para enzimas cooperativas, en este caso los valores de χ^2 demuestran que el modelo de una enzima cooperativa se ajusta mejor que el de una enzima de tipo Michaelis-Menten. El valor del número de Hill es alrededor de 2 ± 0.2 y el de la $K_{0.5}$ de $6 \pm 0.4 \mu\text{M}$.

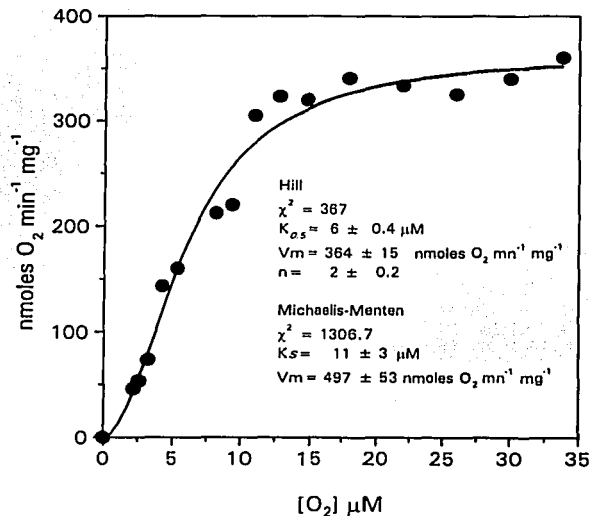


Figura 17. Velocidad de Acorbato-TMPD oxidasa dependiente de la concentración de oxígeno en mitocondrias control de *Polytomella* sp. Se indican los resultados de los análisis de regresión lineal para una enzima tipo Michaelis-Menten y una enzima cooperativa bajo las consideraciones del modelo de Hill.

Las regresiones no lineales se efectuaron con el programa de computo Microcal Origin 3.71.

Se muestra un experimento representativo

Inhibidores del complejo III

El análisis de la sensibilidad a antimicina y mixotiazol reforzó la posible ausencia de una AOX en las mitocondrias de *Polytomella* sp. La titulación con antimicina de la actividad respiratoria con succinato o malato, respectivamente, resultó en una inhibición severa (más del 90%) del consumo de oxígeno (Figura 18-A). En el caso del mixotiazol se observó una inhibición total cuando el succinato fue el sustrato oxidable; no obstante, durante la oxidación de malato no se obtiene una inhibición completa (Figura 18-B). Estos resultados indican, nuevamente, la ausencia de una quinol oxidasa (una posible AOX) diferente al complejo *bc₁*. Del análisis visual de las curvas de titulación se determinaron los valores de *I₅₀* para cada inhibidor con cada uno de los dos sustratos.

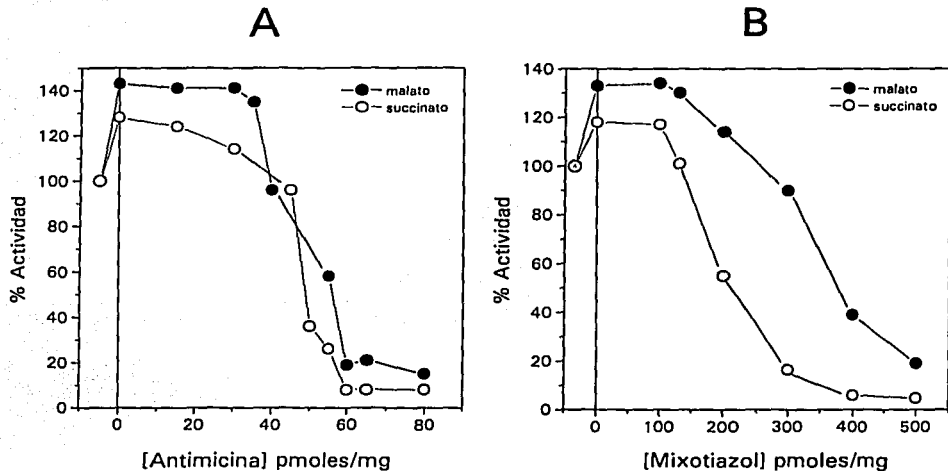


Figura 18. Efecto de inhibidores del complejo *bc₁* sobre la respiración en mitocondrias control de *Polytomella* sp. En el panel A se observa la inhibición por concentraciones crecientes de antimicina usando succinato (círculos abiertos) o malato (círculos llenos) como sustrato. En el panel B se representa un experimento análogo pero siguiendo el efecto del mixotiazol. El círculo gris representa la actividad basal antes de la adición de etanol (solvente empleado para preparar las soluciones de antimicina y mixotiazol), ya que la simple adición de etanol incrementa la velocidad de respiración de 20 a 40 %, dependiendo del sustrato ($x = 0$).

Se muestra un experimento representativo

Exposición de cultivos celulares a cianuro

Como se indicó en el artículo anexo, los cultivos celulares de *Polytomella* se expusieron a KCN 200 μM con la intención de estimular la producción y la actividad de una posible AOX. Los resultados obtenidos no permitieron observar una AOX; sin embargo, la actividad respiratoria mostró cambios importantes respecto a la afinidad aparente por ligandos del centro binuclear de la citocromo *c* oxidasa (COX): cianuro, azida y oxígeno. A continuación se muestran los análisis gráficos para determinar las constantes cinéticas de la COX en mitocondrias aisladas de células expuestas a KCN. Dichos gráficos son similares a los obtenidos de mitocondrias control y que ya se describieron en esta sección (Figuras 14, 16, 17 y 18).

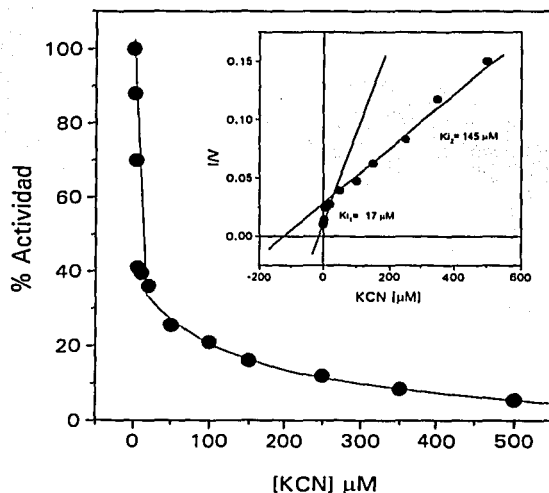


Figura 19. Efecto de KCN sobre la actividad de TMPD oxidasa en mitocondrias aisladas de cultivos expuestos a KCN 200 μM . En el gráfico inserto se muestra el análisis de Dixon, en este caso se observan nuevamente dos componentes cinéticos en la afinidad por KCN. (ver figura 14 para experimento análogo con mitocondrias control)

Se muestra un experimento representativo.

Las figuras 19 y 20 corresponden al efecto del KCN y de la azida sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa, respectivamente. La figura 21

representa la inhibición por antimicina y mixotiazol durante la oxidación de succinato (21-A) o malato (21-B). Finalmente, la figura 22 contiene la representación gráfica de la regresión no lineal de la TMPD-oxidasa dependiente de la concentración de oxígeno.

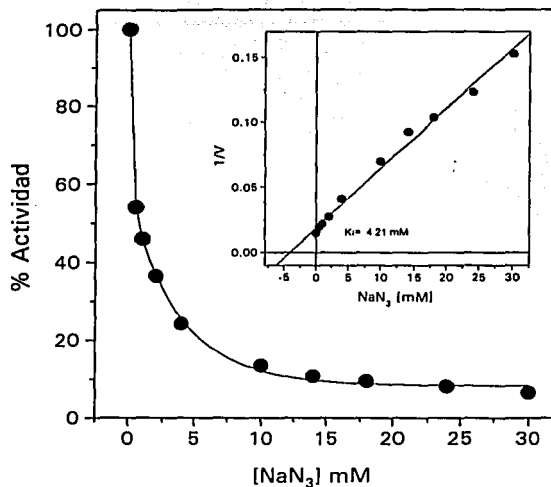


Figura 20. Efecto de NaN_3 sobre la actividad de TMPD oxidasa en mitocondrias aisladas de cultivos expuestos a KCN $200 \mu\text{M}$. El gráfico inserto contiene el análisis de Dixon, la regresión lineal sugiere también una sola K_i aparente para el inhibidor (ver figura 15 para experimento análogo con mitocondrias control)
Se muestra un experimento representativo.

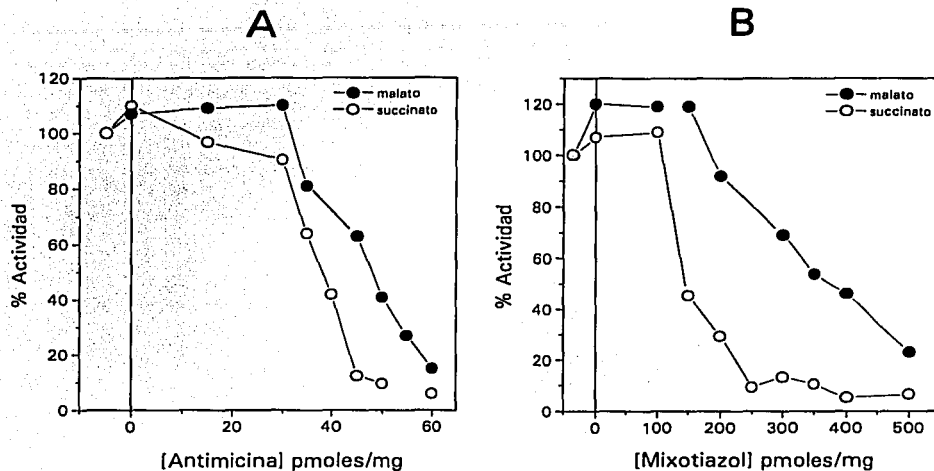


Figura 21. Efecto de inhibidores del complejo *bc₁* sobre la respiración en mitocondrias aisladas de cultivos expuestos a KCN 200 μ M. En el panel A se muestra la inhibición por antimicina con succinato (círculos abiertos) o malato (círculos llenos) como sustrato. En el panel B es un experimento análogo con mixotiazol. El círculo gris representa la actividad basal antes de la adición de etanol (solvente empleado para preparar la soluciones de antimicina y mixotiazol), ya que la simple adición de etanol incrementa la velocidad de respiración de 10 a 20 % ($x=0$). (ver figura 18 para experimentos análogos con mitocondrias control).
Se muestra un experimento representativo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

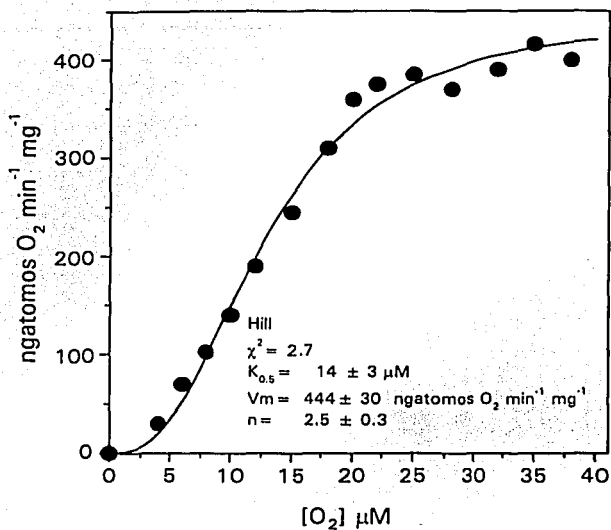


Figura 22. Velocidad de ascorbato-TMPD oxidasa dependiente de la concentración de oxígeno en mitocondrias aisladas de cultivos expuestos a KCN 200 μM. Se presenta el análisis de regresión lineal para una enzima cooperativa bajo las consideraciones del modelo de Hill.

La regresión no lineal se efectuó con el programa de computo Microcal Origin 3.71.
 Se muestra un experimento representativo

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Un resumen de la de los datos descritos en esta sección se presenta en la tabla II.

TABLA II.

Sustrato	KCN <i>K_i</i>		NaN ₃ <i>K_i</i>	Antimicina <i>I₅₀</i>		Mixotiazol <i>I₅₀</i>		Oxígeno <i>K_{0.5}</i>
	μM	μM	mM	$\text{pmol mg proteina}^{-1}$				μM
Succinato								
mitc	54 ± 6	6	—	42 ± 23	80 ± 12	180 ± 34	390 ± 33	—
mitx	248 ± 24	24	—	36 ± 13	67 ± 17	155 ± 49	415 ± 34	—
Malato								
mitc	74 ± 12	12	—	49 ± 21	74 ± 22	350 ± 30	580 ± 41	—
mitx	160 ± 17	17	—	43 ± 16	79 ± 19	310 ± 50	562 ± 56	—
Asc-TMPD								
mitc	12 ± 4	4	1.0 ± 0.1	—	—	—	—	6.5 ± 3
	631 ± 253							
mitx	20 ± 8	8	3.5 ± 0.3	—	—	—	—	17.0 ± 4
	659 ± 229							

mitc = mitocondrias control; mitx = mitocondrias de células expuestas a KCN 200 μM

De manera global parece evidente que la exposición de las células a KCN disminuye la afinidad de los ligandos de la citocromo *c* oxidasa, pero no exacerba la actividad de AOX. En general, la actividad respiratoria con cada sustrato oxidable aparece disminuida en diferentes proporciones por la exposición a cianuro (Tabla III).

TABLA III.

Sustrato	Mitocondrias Control	Mitocondrias expuestas a KCN
	ngatomos oxígeno/ min/ mg	
Succinato	184 ± 34 (8)	151 ± 25 (4)
Malato	82 ± 22 (7)	65 ± 19 (3)
NADH	86 ± 35 (4)	64 ± 12 (4)
Ascorbato-TMPD	289 ± 56 (4)	254 ± 31 (4)
Decil benzoquinol	87 ± 5 (3)	70 ± 12 (3)

Los valores representan la media aritmética ± la desviación estándar del número de experimentos indicados entre paréntesis

II La búsqueda del posible gen *Aox*

Hibridaciones

Los ensayos de hibridación con la sonda de cDNA para AOX de *Chlamydomonas* sp W80 contra DNA total de *Polytomella* sp. digerido con diferentes endonucleasas no muestran señales positivas. Por otro lado, en ensayos iguales empleando DNA total digerido de *C. reinhardtii*, especie donde ya se han reportado dos genes *Aox*, es posible detectar una señal positiva muy clara y sin hibridación inespecífica con otros fragmentos. Si bien estos resultados no descartan la presencia del gen *Aox* en *Polytomella*, muestran que es posible reconocer por hibridación con una sonda *heteróloga* (*Chlamydomonas* sp. W80) el gen o genes en *C. reinhardtii* y no así en *Polytomella*.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para intentar por PCR una amplificación de un posible gen *Aox* se diseñaron diferentes desoxioligonucleótidos para ser usados como cebadores. En la sección de métodos se describen las secuencias de los oligonucleótidos empleados.

El par de oligonucleótidos CSP1F y CSP1R se diseñó a partir de regiones muy conservadas en genes *Aox* conocidos y tomando como base la secuencia del cDNA reportado para el gen *Aox* de *Chlamydomonas* sp W80 (único conocido para clorofitas en ese momento). Con esta combinación de cebadores fue posible amplificar un fragmento de 607 pb (denominado PRC18), correspondiente un gen homólogo *Aox* de *C. reinhardtii* (en ese momento no se había reportado aun los genes *Aox* en *C. reinhardtii*), sin embargo, en las condiciones empleadas no fue posible obtener algún producto de PCR con DNA de *Polytomella* sp. como templado.

El análisis de secuencia del producto PRC18 indicó que se había amplificado un fragmento interno del gen *Aox2* de *C. reinhardtii* (las secuencias completas fueron liberadas por el grupo de R. Matagne en agosto del 2001). Ver alineamiento de secuencias (*material suplementario en la sección de métodos*) y figura 23.

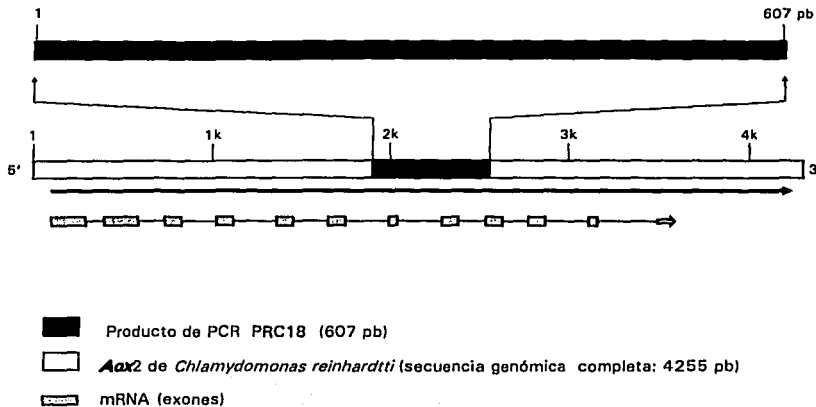
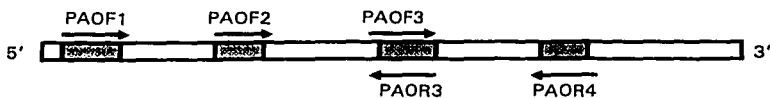


Figura 23. Esquema de la secuencia obtenida de la clona PRC18 (607 pb) donde se indica le región a la que corresponde en el gen *Aox2* de *Chlamydomonas reinhardtii*

Posteriormente, se diseñaron los oligonucleótidos de la serie PAO (ver sección de métodos), basándose en la secuencia de los dos genes completos *Aox* de *C. reinhardtii* (Dinant et al, 2001) (ver material suplementario sección de métodos, alineamiento II). En la figura 24 se muestra un esquema de las regiones conservadas tomadas como referencia para construir los cebadores anteriores. Las secuencias se construyeron *degeneradas* considerando el uso de codones de los genes nucleares de *Polytomella* sp. conocidos. (Pérez-Martínez et al., 2001). En la figura 26 se pueden observar los productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores, en reacciones efectuadas a 4 temperaturas diferentes de alineamiento, según se indica en el pie de la figura. Con DNA total de *Polytomella* sp. como templado se obtuvieron productos de amplificación con las combinaciones de cebadores PAO2F-PAO3R (producto PRP1), PAO1F-PAO4R (producto PRP2) y PAO3F-PAO4R (producto PRP3). Sin embargo, las secuencias de los amplicones no mostraron similitud con genes *Aox*. La modificación de las condiciones de PCR, respecto a las temperaturas de alineamiento y la concentración de MgCl₂ en el medio no permitieron amplificar en ningún caso, algún producto

homólogo a genes *Aox* cuando se utilizó DNA de *Polytomella* sp. como templado.



Regiones conservadas entre secuencias de AOX de diversas especies

Figura 24. En rectángulos grises se indican las regiones conservadas entre secuencias de genes *Aox* de diversas especies (ver anexo, alineamiento II). Las flechas indican la posición, dirección y nomenclatura de los cebadores, que se diseñaron a partir del uso de codones de genes nucleares en *Polytomella* sp. (ver apéndice para detalles de las secuencias individuales).

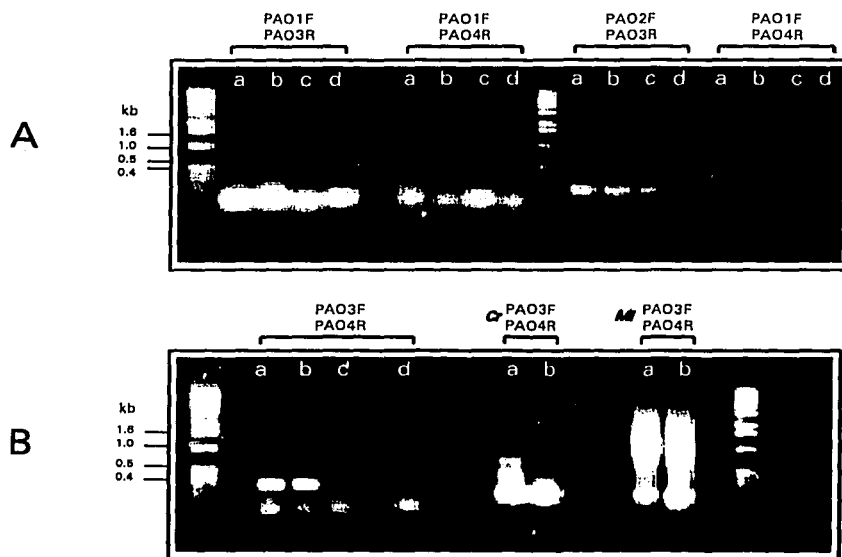


Figura 25. Análisis electroforético de productos de PCR. Los corchetes indican la combinación de cebadores empleada en cada grupo de reacciones. En las cuatro combinaciones del panel A y la de la extrema izquierda del panel B se utilizó DNA total de *Polytomella* sp. como templado. Las últimas dos combinaciones del panel B corresponden a DNA de *C. reinhardtii* (Ch) y *Mangifera indica* (M). Las letras a, b, c y d indican diferentes temperaturas de alineamiento: 47.3, 50.4, 54.3 y 58.6 °C, respectivamente.

Finalmente, también se realizaron ensayos de *PCR anidado* usando como templados los posibles productos obtenidos con los cebadores PAO1F y PAO4R. Las combinaciones de cebadores para la amplificación *anidada* fueron 1) PAO2F-PAO3R, 2) PAO1F-PAO3R y 3) PAO2F-PAO4R. Los resultados ilustrados en la figura 26 muestran la obtención de productos de amplificación con las segunda y tercera combinaciones de cebadores. Sin embargo, la secuencia de dichos productos no indicó similitud con genes *Aox* conocidos.

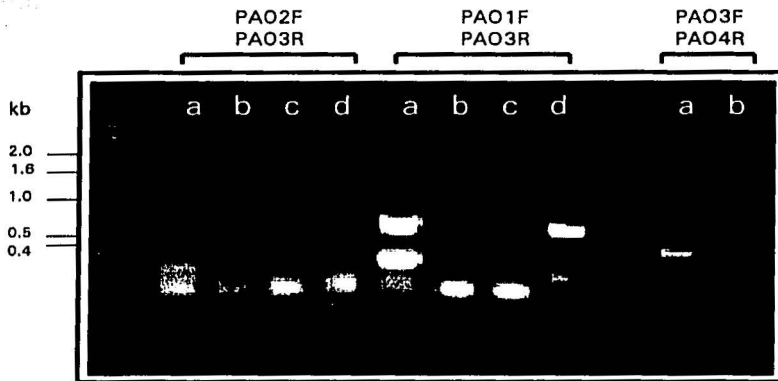


Figura 26. Análisis electroforético de PCR anidado. Sobre los corchetes se señalan las combinaciones de cebadores empleadas en cada caso. En todas las reacciones el templado inicial fue 1 μ l de la ración obtenida en el PCR descrito en la figura 26, panel A, PAO1F-PAO4R, carril a. Las letras a, b, c y d indican diferentes temperaturas de alineamiento: 47.3, 50.4, 54.3 y 58.6 °C, respectivamente.

En resumen, los experimentos de hibridación y amplificación efectuados no proporcionan evidencia para suponer la presencia de un gen, o familia de genes *Aox* en *Polytomella* sp.

Los datos bioquímicos descritos a lo largo del trabajo son consistentes con los presentados en este último apartado. Si bien la mayoría de los resultados son negativos, en conjunto son congruentes entre sí, al sugerir la ausencia de una AOX en *Polytomella* sp. Hemos descartado la actividad de la enzima, la presencia de la proteína y la evidencia apunta hacia la ausencia del gen que la codifica.

DISCUSIÓN GENERAL y CONCLUSIONES

LA CADENA RESPIRATORIA DE *Polytomella* sp.

Los resultados de la oxidación de sustratos y el efecto de inhibidores indican que *Polytomella* sp. posee una cadena respiratoria atípica dentro del grupo de las plantas: se tiene evidencia de la presencia de los complejos respiratorios I, II, III y IV, pero resalta la ausencia de la oxidasa alterna.

Por otro lado, también se mostraron datos que sugieren la existencia de al menos dos NADH deshidrogenasas alternas (NADdH). La oxidación de NADH por las mitocondrias de *Polytomella* sp. es un aspecto que debe explorarse en mayor detalle, ya que el NADH exógeno se oxida por una vía insensible a rotenona. Se sabe que en plantas hay dos NADdH externas, por lo que se espera que en *Polytomella* sp. puedan estar presentes también. Los datos muestran que en nuestra preparación el 40% de la oxidación total de NADH se debe a esta potencial vía alterna (Figura 12). El resto debe ser resultado de la actividad del complejo I en mitocondrias rotas. Otros experimentos indican que la oxidación de NADH exógeno en las mitocondrias de *Polytomella* puede sustentar la síntesis de ATP y la formación de un gradiente electroquímico, evidencia clara que existe una vía alterna para la oxidación de NADH citosólico. Por otro lado, la oxidación de malato, como un sustrato ligado a la producción de NADH en la matriz, también es parcialmente sensible a rotenona (60%), por lo que es probable que *Polytomella* sp. también posea NADdH internas diferentes al complejo I. En este sentido, se requiere analizar la actividad resistente a rotenona así como el efecto de cationes (Ca^{2+}) y de algunos inhibidores, como el difeniliodonio, para poder diseccionar las actividades que mostramos de manera gruesa en este trabajo.

Nuestros datos permiten esbozar que la cadena respiratoria de *Polytomella* sp. muestra semejanzas con las de plantas (Figura 27), sin embargo, la falta de una AOX permite discutir algunos puntos sobre el metabolismo no fotosintético secundario de esta alga.

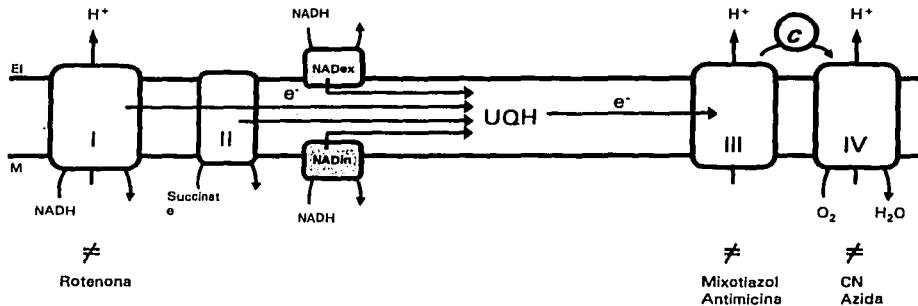


Figura 27. La cadena respiratoria de *Polytomella sp.* Se esquematizan los complejos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato deshidrogenasa), III (ubiquinol: citocromo c oxido-reductasa), IV (citocromo c oxidasas) y las posibles vías alternas para la oxidación de NADH (NAD^{ex} y NADⁱⁿ), probablemente conformadas por más de una enzima cada una.

LA AUSENCIA DE LA OXIDASA ALTERNA

Es importante resaltar nuevamente que la evidencia obtenida en este trabajo muestra que la cadena respiratoria de *Polytomella sp.* carece de una de las enzimas mitocondriales características del grupo *Chlorobionta*: La *oxidasa alterna* (AOX). Este hecho resulta de gran interés ya que *Polytomella sp.* y *C. reinhardtii* comparten una historia evolutiva muy cercana, reflejada de manera contundente y particular por la estructura similar de algunos genes nucleares que eran originalmente parte del genoma mitocondrial [Pérez-Martínez et al., 2000, Pérez-Martínez et al., 2001]. De tal manera, sugerimos, como se expondrá más adelante, que la ausencia de la AOX y posiblemente también del gen nuclear que la codificaría (*Aox*), pueden ayudar a inferir y/o ubicar temporalmente la separación evolutiva entre *Polytomella sp.* y *C. reinhardtii*, organismos que comparten una misma rama junto con el género *Volvox* dentro del grupo de clorofitas unicelulares-coloniales [Nakayama et al., 1996]. La supuesta función de la AOX como parte de un sistema preventivo para evitar la formación de especies de oxígeno reactivas durante situaciones de estrés [Purvis, 1997], es base importante para nuestra propuesta. Antes de argumentar, resulta fundamental destacar nuevamente que la diferencia más

evidente entre *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii* es la ausencia de fotosíntesis en la primera, debido a un evento evolutivo secundario. La pérdida de la capacidad fotosintética en las clorofitas no es un fenómeno extraño, por el contrario, parece que ha ocurrido más de una vez en la historia del grupo. Así, se supone que las clorofitas unicelulares no-fotosintéticas actuales (como *Polytoma*, *Polytomella* y *Prototheca*) descienden de ramas ancestrales fotosintéticas [Rumpf, et al., 1996], ya que se han encontrado evidencias sobre la presencia de plástidos degenerados (leucoplastos o amiloplastos) y/o DNA cloroplástico en dichos géneros *incolores* [Nedelcu, 2001].

Pero, ¿qué tan frecuentemente podría darse la pérdida secundaria de la fotosíntesis? La respuesta puede venir de la relativa facilidad para obtener mutantes no fotosintéticos viables de *C. reinhardtii*, algunas de las cuales pueden proliferar en medios simples con acetato como fuente de carbono, incluso en la obscuridad [Harris, 1989]. Algunas de estas mutantes son significativamente reducida la síntesis de proteínas en el cloroplasto, lo que las convierte en *algas incolores funcionales*. En este contexto se ha considerado que en ambientes ricos en compuestos orgánicos y con incidencia baja o nula de luz, es factible la proliferación de mutantes no fotosintéticos selectivamente neutras. Si bien no es de esperar que esto ocurra con alta frecuencia en medios naturales, es evidente que puede suceder [Rumpf, et al., 1996].

En el marco ecológico se requirieron ciertas condiciones para *originar* una especie con fenotipo no fotosintético: la fijación de una mutación en la población ancestral por deriva génica (principalmente), un aislamiento reproductivo respecto a la población troncal fotosintética y finalmente la acumulación de nuevas mutaciones, o incluso eliminaciones, en los genes involucrados en el proceso fotosintético, en los cuales, por tener una presión selectiva nula, aumentaría la velocidad de mutación-inactivación [Rumpf et al., 1996]. De hecho, se ha demostrado que la tasa de sustitución, la variación estructural y el porcentaje del contenido AT en los genes rRNA 16s (plastídicos) son mayores en las algas incolores (*Polytoma uvella*, *P. oviforme* y *Prototheca wickerhamii*) respecto a sus parientes fotosintéticos más cercanos (*Chlamydomonas applanata*, *C. moewusii* y *Chorella protothecoides*, respectivamente) [Nedelcu, 2001].

Otra posibilidad es que el ancestro fotosintético haya perdido parte importante, o incluso la totalidad, del genoma de cloroplasto (cpDNA) durante el proceso reproducción sexual. Se sabe que en *C. reinhardtii* (sólo tiene un cloroplasto con ≈ 80 copias del genoma) la herencia del cpDNA es uniparental, debido a que el cpDNA de uno de los gametos (mt^-) se pierde (del 95 a 99.9%) y se mantiene el del gameto complementario (mt^+) [Umen y Goodenough, 2001]. Recientemente se reportó que en el proceso participa una nucleasa (MDN) que degrada específicamente el cpDNA del gameto mt^- , asegurando la transmisión uniparental del genoma plastídico [Nishimura et al, 2002]. En este contexto, es posible que la aparición de mutaciones en algunos genes involucrados (por ejemplo, los que codifican para las DNA-metiltransferasas o las nucleasas de cloroplasto), o en sus mecanismos de regulación, permitan la degradación exhaustiva del cpDNA, generando un fenotipo que en un ambiente de escasa o nula iluminación podría no ser letal. Para que la pérdida del cpDNA resulte selectivamente neutra debe suponerse que el ancestro fotosintético presentara un metabolismo mixotrófico eficiente. En ese sentido, se sabe que *C. reinhardtii* es un organismo mixotrófico que puede proliferar en la obscuridad.

Retomando la ausencia de la AOX en *Polytomella* sp. y su posible papel en la protección contra la formación ROS, hemos tratado de establecer una correlación entre la pérdida de la fotosíntesis y la de la enzima.

La aparición de la fotosíntesis oxigénica (hace ≈ 3.5 millones de años) dio lugar a una atmósfera que propició las condiciones para la aparición del metabolismo oxidativo aerobio, que como consecuencia inevitable trajo consigo la producción de ROS. En las células fotosintéticas la producción de ROS puede ocurrir durante reacciones *luminosas* y *obscuras*, ya que tanto la cadena fotosintética en los cloroplastos (principalmente el fotosistema I), como la cadena respiratoria mitocondrial (a través los Complejos I y III) son fuentes importantes de ROS. Cuando la producción de ROS excede la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (dismutasas, catalasas y peroxidasas) tiene lugar una situación de *estrés oxidativo* [Moller, 2001].

Ya se mencionó que varios reportes consideran que la AOX participa en los sistemas preventivos contra el estrés oxidativo: el incremento en la

actividad de la AOX reduce la producción de ROS mitocondriales, mientras que una disminución en la actividad de la AOX lleva a situaciones de estrés oxidativo [Maxwell et al., 1999]. Hay evidencia de que la exposición a H_2O_2 o la presencia de inhibidores respiratorios que generan estrés oxidativo, inducen la síntesis *de novo* y la actividad de la AOX [Wagner, 1995, Wagner y Moore, 1997]. Algunos reportes muestran también que la actividad de AOX en plantas es mas elevada en tejidos verdes (hojas) respecto a tejidos no fotosintéticos (raíces y tallos) [Wagner y Moore, 1997]. Un efecto análogo ocurre en hojas maduras de chícharo con relación a hojas jóvenes [Lennon et al., 1995]. Adicionalmente, los trabajos anteriores sugieren un papel de la AOX durante la fotosíntesis, posiblemente evitando una sobre-reducción de sustratos que ocasiona la fotoinhibición [Hoefnagel et al., 1998]. No obstante, considero que la función de la AOX durante la fotosíntesis podría tener relación directa con su papel como *válvula* para disminuir la formación de ROS, ya que durante un periodo de fotosíntesis activa aumenta la producción de intermediarios reducidos (NADH, NADPH) y oxígeno, situación metabólica que favorece la formación de ROS. Recientemente se reportó que al exponer a la luz hojas de *Solanum tuberosum* (papa), mantenidas previamente en la obscuridad por 4 días, se incrementa de manera dramática la *síntesis de novo* de la AOX, partiendo incluso de niveles no detectables de la proteína en hojas control [Svensson y Rasmusson, 2001]. Es importante mencionar que en dicho trabajo se reporta por primera vez que la expresión de una proteína mitocondrial depende completamente de la luz; la proteína es una NADH deshidrogenasa membranal orientada hacia la matriz, es conocida como NDA1 y está codificada en el genoma nuclear. Si bien en ese trabajo se aborda principalmente la expresión de la NDA1, se muestra claramente que la AOX también sigue un patrón de expresión dependiente de la exposición a la luz.

Los datos anteriores ponen de manifiesto que la actividad mitocondrial puede estar relacionada con el metabolismo fotosintético. Si bien se ha sugerido que parte del metabolismo fotosintético depende, al menos parcialmente, del ATP suministrado por la fosforilación oxidativa [Kromer, 1995], en este caso la NDA1 y la AOX son enzimas no acopladas al proceso, por lo que su papel debe ser otro. La NDA1 podría estar participando en la

oxidación del NADH generado por la descarboxilación de la glicina en la matriz mitocondrial durante la fotorespiración, por ello su incremento durante periodos de iluminación intensa [Svensson y Rasmusson, 2001].

Tomando como base las evidencias y propuestas mencionadas, considero que la función de la AOX, al disminuir la producción de ROS, debe ser importante durante la fotosíntesis activa. Ampliando la propuesta de Hoefnagel [1998] de que la enzima participa en la regulación del nivel redox celular, es posible que la AOX también puede jugar un papel en el control global del estrés oxidativo, especialmente cuando la tasa fotosintética es elevada y la activación del oxígeno por intermediarios reducidos es más probable. El incremento en la síntesis de AOX por exposición a la luz podría dar indicios de que ello este ocurriendo.

La interacción metabólica entre mitocondrias y cloroplastos no se conoce a fondo. No obstante, ya se han determinado algunos intercambios de metabolitos entre los dos organelos en determinadas situaciones: durante la fotorespiración, la síntesis de sacarosa, la síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto, así como el recambio de esqueletos carbonados para la biosíntesis (FIGURA 28). Sin embargo, no es claro cuando y en que condiciones se incrementan o restringen dichos flujos.

Si bien el conocimiento de la expresión génica dependiente del nivel redox celular no es profundo, se tiene evidencia de que algunos genes nucleares, que codifican para proteínas citosólicas o mitocondriales, dependen de señales plastídicas, y en algunos casos exclusivamente del transporte de electrones fotosintético o del nivel redox de intermediarios como la plastoquinona, la tiorredoxina, el glutatión o incluso el nivel de ROS [Rodermel, 2001].

Los modelos redox del control de la expresión génica implican la participación de moléculas *inciadoras* o intermediarias que poseen grupos tiol, centros hierro-azufre, grupos hemo o flavinas [Bauer, et al., 1999]. La polémica más importante es si existe una red de regulación redox global o existen rutas que operen de manera semi-independiente o independiente [Pfannschmidt, et al. 2001]. En el primer caso, considerando la participación del cloroplasto, la expresión de un gen nuclear dependiente del estado redox debe ser el reflejo de la situación promedio imperante en toda la célula. Es en este contexto que podemos insertar los genes nucleares *Aox*, ya que su expresión parece depender de la exposición a luz, posiblemente a través de sistemas de regulación que emplean intermediarios redox [Pfannschmidt, et al. 2001]. En la figura 29 se muestra un modelo de regulación redox de genes nucleares por la actividad fotosintética.

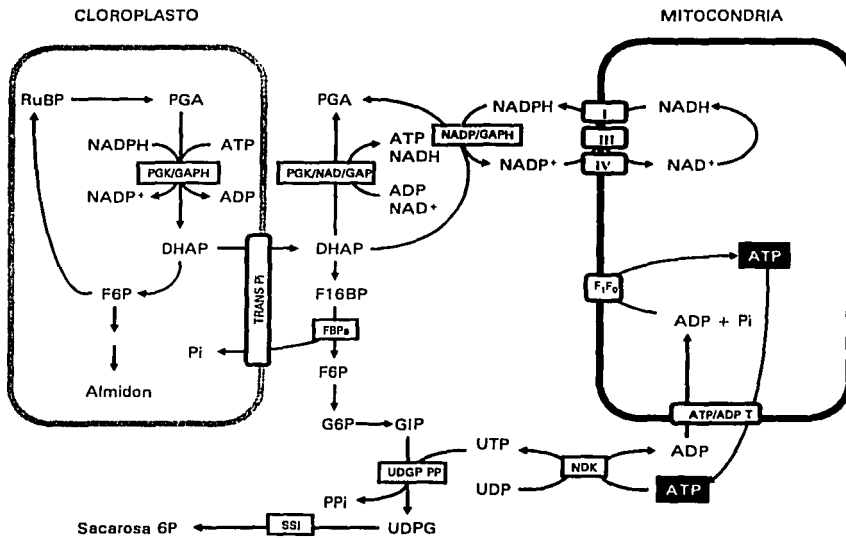


Figura 28. Se muestran algunas rutas metabólicas que permitirían el intercambio de intermediarios reducidos o fosforilados entre la mitocondria y el cloroplasto durante la exposición a la luz. PGK, fosfoglicerato cinasa; NDK, nucleosido 5' difosfato cinasa, UDGP PP, UDP glucosa pirofosforilasa; FBPa, fructosa 1, 6 bifosfatasa; RuBP, ribulosa 1, 5 bifosfatasa; GAPH, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

Modificado de Kromer, 1995.

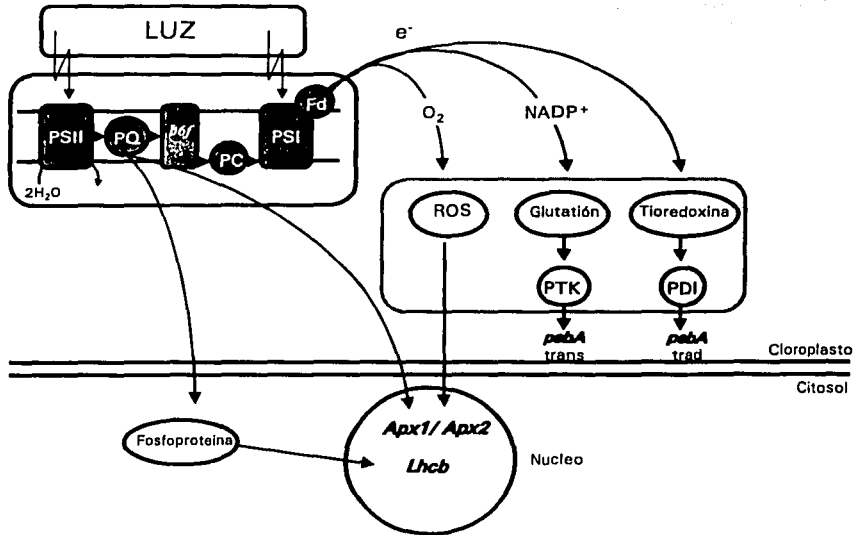


Figura 29. Propuesta de control redox de la expresión de genes relacionados con la actividad fotosintética. En verde se muestran los posibles sistemas *sensores* que generan los intermediarios hacia los elementos *transductores* (recuadro rojo). Finalmente se indican los ejemplos conocidos de genes que responden a este tipo de regulación redox. PSI, fotosistema I. PSII, fotosistema II, PQ, plastoquinona, PC, platocianina, Fd, ferredoxina, *Lhcb*, subunidad 2 complejo cosechador de luz, *Apx*, ascorbato peroxidasa.

Modificado de Pfannschmidt et al, 2001.

Es evidente la relación estrecha entre el estado redox de la célula y el estrés oxidativo (producción de ROS). En ese sentido, la pérdida secundaria de la fotosíntesis en *Polytomella* sp., posiblemente llevó a una reducción en la producción global de ROS y de intermediarios citosólicos reducidos como el NAD(P)H. La pérdida de un sistema de regulación tan importante como la actividad plastídica, liberó de su control a los genes nucleares dependientes o relacionados con la fotosíntesis.

Si se considera que la expresión del gen *Aox* depende de la exposición a la luz (nivel redox-estrés oxidativo), o que incluso podría participar evitando el efecto fotoinhibitorio desde la mitocondria [Hoefenagel et al., 1998], es factible que su actividad se haya afectado fuertemente por la pérdida de la

fotosíntesis. En tal caso, si la expresión de los genes *Aox* está relacionada estrechamente con la función fotosintética, la ausencia de la actividad enzimática de la AOX en un organismo no fotosintético secundario podría ser, en términos selectivos, un fenotipo neutro o cercano a la neutralidad. En un contexto ecológico como el que supone la aparición de poblaciones incoloras a partir de ancestros fotosintéticos, es probable que ocurra la pérdida o inactivación de genes que no afecten la adecuación promedio de la población, que tengan una actividad fútil o se mantengan sin expresión. Los datos de este trabajo sugieren que el gen o los genes *Aox* de *Polytomella* sp. pudieron seguir una historia de este tipo. En la figura 30 se muestra un resumen de la propuesta.

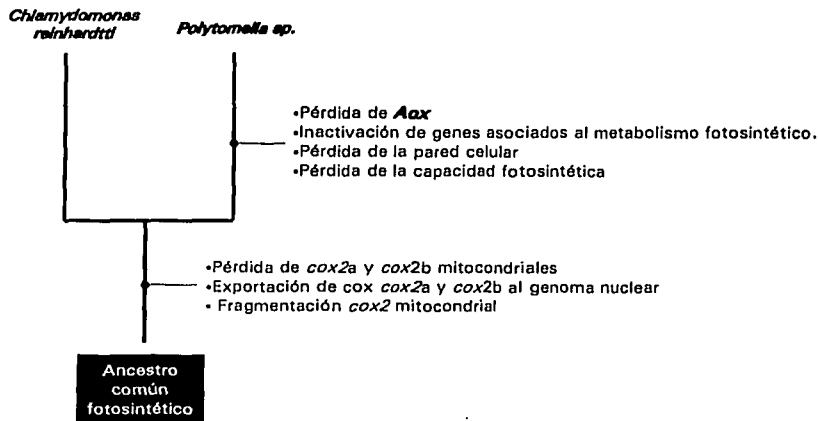


Figura 30. Se ilustra un escenario evolutivo para ubicar la posible pérdida del gen (o genes) *Aox* en *Polytomella* sp. En esta propuesta se considera que *Aox* formaría parte de un conjunto de genes relacionados con el metabolismo celular durante la exposición a la luz, de este modo, una vez perdida la capacidad fotosintética la velocidad de mutación-inactivación de dichos genes se aceleró.

Las clorofitas son un modelo adecuado para explorar esta propuesta, ya que existen al menos cuatro casos independientes de pérdida secundaria de la fotosíntesis, en los cuales es factible analizar el *status* de los genes *Aox* durante la evolución de las ramas incoloras.

Es importante resaltar que se conocen varios ejemplos de AOX activas en organismos no fotosintéticos; sin embargo, en ningún caso se trata de organismos relacionados con las plantas, sino de hongos ascomicetos, basidiomicetos, tripanosomátidos parásitos y amibas de vida libre. Lo anterior pone de manifiesto que la actividad de la AOX no está relacionada exclusivamente con el metabolismo fotosintético, al menos en estos grupos. Un punto que debe contribuir a comprender mejor el papel de la AOX es determinar el posible origen del gen, ya que hasta la fecha no se conocen ejemplos de genes *Aox* en animales o procariontes, lo que restringe su distribución a ciertos grupos relativamente distantes entre sí (Figura 31).

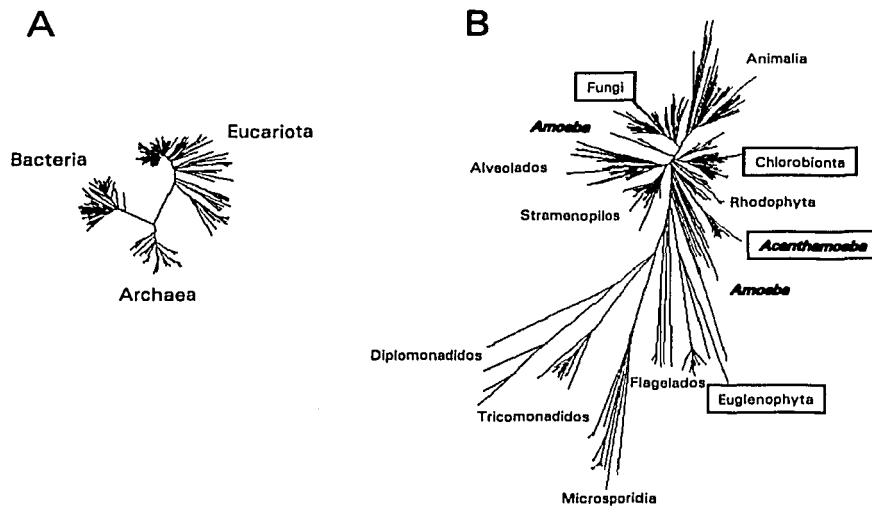


Figura 31. A, Árbol universal sin raíz construido por análisis de rRNA 18S. B, Acercamiento al clado eucarionte, en recuadros verdes se indican los linajes en los que se ha identificado actividad de oxidasa alterna.

EL ESTRÉS POR CIANURO

La adición de cianuro a los medios de cultivo tuvo como finalidad sobreexpresar una potencial AOX; no obstante, no fue posible estimular ninguna actividad enzimática, ni inmunodetectar una proteína. Sin embargo,

los ensayos mostraron que la presencia del inhibidor en los medios de cultivo ocasionó cambios aparentes en la afinidad por cianuro (Figura 2 en *Resultados publicados* y Tabla II en *Resultados complementarios*). De tal manera que las mitocondrias provenientes de cultivos con KCN (mit_k) aparentan una afinidad menor por el cianuro que las mitocondrias control al oxidar el succinato o el malato (mit_c). Los resultados anteriores no eran contundentes para sugerir un cambio en la afinidad por cianuro en el complejo IV, ya que no se puede descartar que dichos cambios se deban a alteraciones en el control del flujo en las vías analizadas (succinato-oxígeno y malato-oxígeno), donde al menos están involucradas tres enzimas, un transportador y la fuga de protones.

Para analizar solamente el complejo IV se determinó la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa en presencia de antimicina. En este caso, los experimentos para determinar las *K_i* aparentes por KCN mostraron resultados que no permitieron esclarecer los cambios vistos con succinato y malato, ya que en la titulación con KCN aparecen dos componentes en ambos tipos de mitocondrias (Figuras 14 y 19), uno de alta y otro de baja afinidad. Este comportamiento puede deberse a la existencia intrínseca de dos estados del complejo IV, que a su vez pueden tener diferente afinidad por el cianuro dependiendo de su estado redox [Wilson et al., 1994]. Alternativamente, análisis similares con otros ligandos del centro binuclear del complejo IV, como azida de sodio y oxígeno, indicaron que la exposición a KCN disminuye la afinidad aparente por dichos ligandos (Tabla II *Resultados complementarios*). No es claro por qué se producen modificaciones en algunos de los parámetros cinéticos de la citocromo *c* oxidasa, si bien no era un objetivo inicial perseguir la actividad de ésta enzima, resultó interesante tratar de abundar un poco más en las causas.

El contenido de citocromos indicó que la exposición a cianuro induce un aumento importante (100%) de los hemos tipo A en las mit_k, sin embargo, los datos de actividad de citocromo *c* oxidasa (Figura 5, *Resultados publicados*) muestran una disminución de 4 veces de la velocidad máxima en las mismas mitocondrias. Estos datos parecen contradictorios, sin embargo, es posible que el estrés por cianuro ocasione, entre otras cosas, una acumulación de formas inactivas de la enzima, o de algunas de sus subunidades.

Resultados paralelos del contenido de ácidos grasos en mit_k y mit_c, permiten observar un incremento del 30% en la relación ácidos grasos/proteína por la presencia de cianuro. No existe alguna relación establecida claramente (*in vivo*) respecto al contenido de ácidos grasos y la actividad de la citocromo *c* oxidasa, pero es posible que estos cambios estén influenciando la actividad, la eficiencia catalítica y la afinidad por algunos ligandos de la enzima. En este contexto no es posible ofrecer algún comentario concluyente, pero definitivamente resulta claro que el estrés por cianuro afecta el metabolismo celular de manera global. En esta parte trabajo sólo se abordaron algunos aspectos puntuales de la función mitocondrial, de los cuales resultaba más importante para los objetivos iniciales la sobreexpresión de una posible oxidasa alterna.

REFERENCIAS

- Bauer, C. E., Elsen, S. & Bird, T. H. (1999) *Annu Rev Microbiol* 53: 495-523.
- Harris, E. H. (1989). *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use*, Academic Press, San Diego, California.
- Hoefnagel, M. H. N., Atkin, O. K. & Wiskich, J. T. (1998) *Bichim Biophys Acta* 1366: 235-255.
- Kromer, S. (1995) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 45-70.
- Lennon, A. M., Pratt, J., Leach, G. & Moore, A. L. (1995) *Plant Physiol* 107: 925-932.
- Maxwell, D. P., Wang, Y. & McIntosh, L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8271-8276.
- Moller, I. M. (2001) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. & Inouye, I. (1996) *Phycological Research* 44: 47-55.
- Nedelcu, A. M. (2001) *J Mol Evol* 53: 670-9.
- Nishimura, Y., Misumi, O., Kato, K., Inada, N., Higashiyama, T., Momoyama, Y. & Kuroiwa, T. (2002) *Genes Dev* 16: 1116-28.

Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P. & González-Halphen, D. (2001) *J Biol Chem* 276: 11302-9.

Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Claros, M. G., Davidson, E., King, M. P. & González-Halphen, D. (2000) *J Biol Chem* 275: 30144-52.

Pfannschmidt, T., Allen, J. F. & Oelmüller, R. (2001) *Physiol Plant* 112: 1-9.

Purvis, A. C. (1997) *Physiol Plant* 100: 165-170.

Rodermel, S. (2001) *Trends Plant Sci* 6: 471-8.

Rumpf, R., Vernon, D., Schreiber, D. & Birky, C. W. (1996) *J Phycol* 32: 119-126.

Svensson, A. S. & Rasmusson, A. G. (2001) *Plant Journal* 28: 73-82.

Umen, J. G. & Goodenough, U. W. (2001) *Genes Dev* 15: 2585-97.

Wagner, A. M. (1995) *FEBS Letters* 368: 339-342.

Wagner, A. M. & Moore, A. L. (1997) *Biosci Rep* 17: 319-33.

Wilson, W.T., Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P., Brunori, M., (1994) *J Biol Chem* 269: 24114-24119

PERSPECTIVAS

LA FUNCIÓN DE LA OXIDASA ALTERNA

La actividad de la oxidasa alterna durante la fotosintética durante periodos de iluminación y la influencia directa de la luz sobre la expresión del gen *Aox*, son puntos fundamentales para esclarecer la función de la enzima. En trabajos aún no publicados de otros grupos (serán presentados en un congreso próximo), se ha observado que también la actividad del cloroplasto influencia, al menos parcialmente, la expresión de la AOX. En este sentido se vuelve muy interesante conocer como se regula la expresión y la actividad de la AOX en células no fotosintéticas, y para ello las algas y plantas incoloras se convierten en modelos interesante, ya que en aquellos que posean el gen (o genes) *Aox* activo, podría disecarse el papel preciso de la enzima.

Debido a que el gen *Aox* no está presente en *Polytomella* sp. resulta relevante explorar la presencia y/o actividad del gen en otros géneros no fotosintéticos del grupo, como *Polytoma* y *Prototheca*, ya que es probable que también en estos géneros el gen esté ausente o inactivo. Asimismo, la facilidad para obtener mutantes no fotosintéticos de *Chlamydomonas reinhardtii* permitiría analizar la regulación y el papel de la AOX en células que han perdido la vía fotosintética y explorar si en este grupo existe también un relación entre la actividad de la enzima y el metabolismo fotosintético. Por otro lado, es importante abundar sobre la función de la AOX en organismos que carecen de cloroplasto y no tienen un pasado fotosintético, como el caso de los hongos, ya que este tipo de organismos ofrecerá información sobre la relevancia de la enzima en organismos con un metabolismo heterótrofo ancestral.

Otro punto a esclarecer es el origen del gen *Aox*. Los datos actuales muestran que no existen ningún gen homólogo en los genomas procariontes conocidos, lo que indica que el gen es de origen eucarionte. Hasta el momento el único gene homólogo conocido es uno que codifica para una quinol oxidasa de cloroplasto (*ptaox*) y que se ha encontrado en algunas plantas. Sin embargo, la existencia del *ptaox* no resuelve la situación del origen, ya que en ambos casos se trata de genes nucleares que no parecen provenir de los

genomas ancestrales del cloroplasto o la mitocondria. La visión anterior debe cambiar cuando conozcamos mejor la distribución de ambos genes en los distintos grupos biológicos.

LA CADENA RESPIRATORIA

En este trabajo se presentó evidencia marginal de la presencia de NADH deshidrogenasas alternas al complejo I en *Polytomella* sp., no obstante, no se persiguió a fondo la caracterización de estas posibles vías alternas. Actualmente se han identificado varios genes que codifican algunas de las NADH deshidrogenasas alternas en plantas, por lo que resulta de interés conocer si en las clorofitas existen proteínas homólogas a las de plantas. No existen reportes explícitos de este tipo de enzimas en algas verdes.

LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN *Polytomella* sp.

Los cambios ocasionados por la presencia de KCN en la actividad respiratoria, el contenido de ácidos grasos y de grupos hemo, indican que a pesar de no potenciar la presencia de una oxidasa alterna, el estrés induce una respuesta celular que afecta de manera general la función mitocondrial. Los datos obtenidos sólo permiten observar el efecto del estrés sobre las mitocondrias; sin embargo, es probable que se afecte globalmente el metabolismo celular, ya que el cianuro es también un inhibidor de catalasas. Respecto a este trabajo, resta por explorar cómo afecta la relación lípidos/proteínas la actividad de los complejos respiratorios, específicamente de la citocromo *c* oxidasa, donde el estrés por disminuye la afinidad por los ligandos del centro bimetálico y simultáneamente aumenta el contenido de ácidos grasos mitocondriales.

Respecto al análisis de ácidos grasos, este trabajo resulta innovador al presentar el contenido de ácidos grasos mitocondriales de una alga verde. La naturaleza incolora de *Polytomella* sp. permitió obtener resultados claros sobre la composición de las membranas mitocondriales. Resalta el alto contenido (40-60 µg/mg) del ácido 2,7 hexadecadienoico (C16: 2*n*-7), que sólo ha sido reportado como traza en otras algas (ácidos grasos totales, no mitocondriales). Se sabe que los ácidos grasos constituyen el 30-40% del peso seco total en algunas clorofitas, por lo que resultaría importante conocer cuanto corresponde

PERSPECTIVAS

a los ácidos grasos mitocondriales y así poder evaluar una potencial fuente de ácido 2,7 hexadecadienoico. Ya otras algas verdes, como *Parietochloris incisa*, son empleadas como fuente importante de ácidos grasos polinsaturados poco comunes, como el ácido araquidónico.

APÉNDICE I. MÉTODOS

I Cultivos celulares

La cepa original *Polytomella* sp. 198.80 (E.G. Pringsheim) se obtuvo de la colección ficológica de la Universidad de Göttingen, Alemania. Actualmente se mantiene en la Colección Microbiológica del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV-IPN, México, con el número de registro CDBB-951. Los cultivos celulares proliferaron en un medio compuesto por fosfato de potasio 1 mM (pH 7.0) , MES 10 mM, acetato de sodio 0.5%, solución de Beinjerink 0.5% y elementos traza [Atteia et al., 2000], complementado con tiamina (vitamina B₁) 10 µg/ml, y cianocobalamina (vitamina B₁₂) 0.5 µg/ml. Cultivos de 2.l se iniciaron con un inóculo de 0.2 x10⁶ células /ml y se mantuvieron por 48 horas sin agitación a 25 °C.

Los cultivos de *C. reinhardtii* se mantuvieron de acuerdo a lo reportado previamente [Gorman y Levine, 1965]

II Aislamiento de mitocondrias

Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 2, 500 x g por 8 minutos al final de la fase estacionaria (1.8-2.0 x10⁹ células totales por cada 2 l), que ocurre alrededor de 24-28 horas después de la inoculación,. Las células se lavaron con sacarosa 250 mM, MOPS 20 mM (pH 7.4) y EGTA 1 mM (medio SME) y centrifugaron en las condiciones ya mencionadas. La pastilla celular se resuspendió en 2 ml de medio SME complementado con 0.3 de BSA libre de ácidos grasos. Posteriormente se efectuó la ruptura celular por homogeneización manual con un vástago de teflón a 4°C. El homogenizado se diluyó hasta 35 ml con medio SME y centrifugó a 2,500 x g por 10 minutos. El sobrenadante resultante se recuperó y se centrifugó a 9, 500 x g por 10 minutos. La pastilla resultante con la fracción mitocondrial enriquecida se incubó con ADP 0.2 mM y BSA libre de ácidos grasos 0.2 % (p/v) por 10 minutos en hielo. Finalmente, la fracción mitocondrial se diluyó a 12 ml con medio SME y se centrifugó a 10, 500 x g por 10 minutos. El rendimiento típico de la técnica proporcionó de 20 a 25 mg de proteína mitocondrial por litro de

cultivo. La concentración de proteína se determinó acorde a métodos descritos con anterioridad [Markwell, 1979].

III Consumo de oxígeno

Se midió empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark. En cada determinación 1 mg de proteína mitocondrial se incubó en 2 ml de KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1 mM (medio KME) saturado con aire a 30°C. Para la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno se consideró una solubilidad del oxígeno en agua de 400 nano-gramo-átomos/ ml, a una altitud de 2,240 m snm.

Actividad de citocromo c oxidasa

Empleando el método polarográfico ya descrito, 1 mg de proteína mitocondrial se incubó con antimicina 1 μ M y ascorbato 5 mM en 2 ml de medio KME durante 3 minutos. Con la adición de TMPD 2 mM como mediador del transporte de electrones se inició la reacción. Todos los ensayos se efectuaron a 30°C. Alternativamente la actividad también se determinó por espectroscopía, siguiendo la oxidación de citocromo *c* de caballo a 550-540 nm en un espectrofotómetro de doble haz (SLM-AMINCO, DW-2000). En este caso, 100 μ g de membranas mitocondriales rotas por congelamiento-descongelamiento se incubaron en 1 ml sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7.2), EGTA 1 mM, Mg₂Cl 20 mM, y antimicina 1 μ M a 30°C. La reacción se inició con la adición de citocromo *c* de caballo reducido previamente con ditionita y purificado posteriormente en una columna de Sephadex G-25 (10 cm x 12 mm).

IV Potencial de membrana

Como indicador de la generación de potenciales transmembranales se empleó el catión lipofílico safranina O de acuerdo a los métodos reportados [Zanotti y Azzone, 1980]. Los cambios de absorbancia a 554-520 se midieron en una mezcla de 1 mg de proteína mitocondrial con 3 ml de medio KME, K₂PO₄ 5 mM y safranina O.8 μ M a 30°C. La reacción se inició adicionado sustratos mitocondriales oxidables. Asimismo, se determinó el efecto de

diversos inhibidores respiratorios. En la figura A se muestra un trazo representativo del cambio en la absorbancia de la safranina durante la oxidación de sustratos.

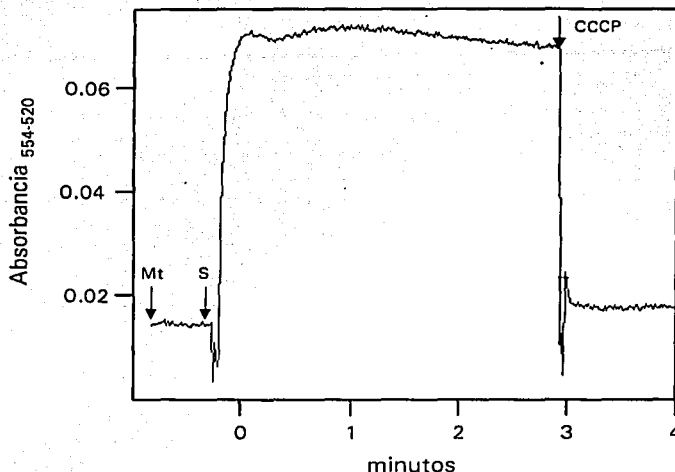


Figura A. Potencial de membrana detectado por el cambio de absorbancia (554-520 nm) de la safranina. 0.1 mg de proteína mitocondrial (Mt) se incubo en medio KME adicionado con safranina 8 μ M. Posteriormente se agrego succinato 10 mM (S), después de 3 minutos el potencial se abatió con CCCP 0.5 μ M

El potencial eléctrico transmembranal se cuantificó mediante la distribución del catión $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$, acorde con el método reportado anteriormente [Moreno-Sánchez et al., 1995]. Se incubaron por 1 minuto 2 mg de mitocondrias, en 0.5 ml de medio KME, K_2PO_4 5mM y 8 μ M de $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ (0.05-0.07 μ Ci/nmol), a 30°C en viales con capacidad de 20 ml. La reacción se inició adicionando sustratos oxidables, inhibidores o agentes desacoplantes, según se indica en la sección de *Resultados publicados*. Después de 3 minutos en agitación constante a 30°C la reacción se detuvo por centrifugación a 14,000 x g por 2 minutos a 4°C, empleando tubos de plástico con capacidad de 1.5 ml (*Eppendorf*). La radioactividad remanente se cuantificó en el sobrenadante y la pastilla. Finalmente, la distribución del $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ se calculó empleando la ecuación de Nernst y considerando la unión inespecífica del catión a las membranas mitocondriales [Rottenberg, 1984].

V síntesis de ATP

La velocidad de la fosforilación oxidativa se determinó mediante la técnica radioactiva previamente descrita [Moreno-Sánchez, 1985]. Alícuotas de 1 mg de proteína mitocondrial se adicionaron a 1 ml de medio KME, $^{32}\text{P}_i$ (1-1.3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), glucosa 10 mM, P_i 5 mM y 1 mg hexocinasa de levadura (20 unidades/mg) y en presencia de distintos sustratos, inhibidores o agentes desacoplantes, según se indicó en cada caso. Se emplearon tubos de ensaye con capacidad de 8 ml. Cada muestra se incubó por 3 minutos a 30°C en agitación constante y la reacción se detuvo por adición de ácido tricloroacético 5% frío (en hielo). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 3, 500xg por 10 minutos. Se recuperó 1 ml del sobrenadante obtenido para extraer el $^{32}\text{P}_i$ no incorporado. Las extracciones se hicieron con una mezcla de molibdato de amonio/ácido sulfúrico, empleando acetona y n-butil acetato como solventes orgánicos. La extracción de la fase orgánica por agitación vigorosa y centrifugación se repitió al menos 3 veces. La fase acuosa resultante se empleó para determinar por radiación Cerenkov la cantidad de $^{32}\text{P}_i$ incorporado al ATP y glucosa 6-P.

VI Contenido de citocromos

Para la determinación del contenido de grupos hemos totales mitocondriales se efectuaron espectros diferenciales de acuerdo con el método descrito previamente [Bravo et al., 2001]. Para citocromos tipo *b* se uso el par reducido con ditionita contra reducido con ascorbato, para citocromos tipo *a* reducido con ditionita contra oxidado con persulfato, y para citocromos tipo *c* reducido con ascorbato contra oxidado con persulfato. Las determinaciones se efectuaron a partir de 1 mg de proteína mitocondrial en 1 ml de medio SME: glicerol (1:1) a temperatura ambiente. Para la cuantificación se emplearon los siguientes coeficientes de extinción molar: $\epsilon_{(563-578\text{nm})} = 26 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para citocromos tipo *b* [Priest et al., 1992], $\epsilon_{(609-630\text{nm})} = 16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para citocromos *a* + *a*₃ [Gray et al., 1994] y $\epsilon_{(550-540\text{nm})} = 17.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para citocromos tipo *c* [Degli-Esposti et al., 1991]. En la figura B se muestra un espectro representativo reducido (ditionita) menos oxidado (persulfato) de mitocondrias de *Polytomella* sp.

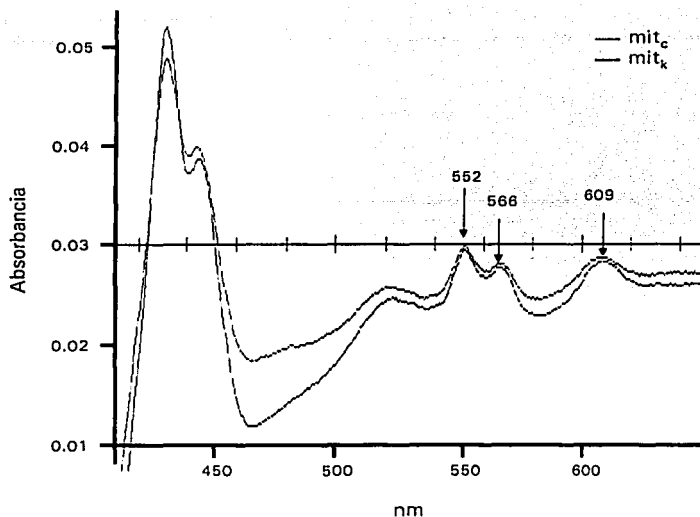


Figura B. Espectro diferencial reducido (ditionita) menos oxidado (persulfato) de mitocondrias de *Polytomella* sp. Se emplearon 2 mg/ml de proteína mitocondrial en cada celda. Se muestra un barrido de 414 a 645 nm y se indican los picos α de absorción para los hemos tipo *a* (609nm), tipo *b* (566) y tipo *c* (552nm), respectivamente.

VII Cuantificación de ácidos grasos mitocondriales

Se empleó la técnica reportada previamente con ciertas modificaciones [Folch et al., 1957]. A muestras de 10 mg de proteína mitocondrial se adicionaron de 500 μ g butil-hidroxitolueno (BHT) y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Después de descongelar se agregó 1 ml de BHT 0.02% en metanol, 50 μ g fosfatidilcolina-diheptadecanol como control, 1 ml de NaCl 0.9% y 2 ml de cloroformo. La muestra se agitó por 20 segundos y posteriormente se centrifugó a 1, 600 x g por 5 minutos. A la fase orgánica obtenida se le agregó 1.5 g de Na_2SO_4 (anhidro). Después de agitar se filtró por una columna de algodón en una pipeta Pasteur. El solvente se evaporó por flujo de N_2 . Las muestras secas se mezclaron con 0.1 ml de tolueno, 2 ml de metanol anhidro y 0.04 ml de ácido sulfúrico [Christie, 1989], con la intención de formar derivados metil-éster de los ácidos grasos. Las muestras se hornearon a 80°C por 2 horas. Posteriormente se agregó a cada muestra 1 ml

de NaCl 5%, 2 ml de hexano y se mezclaron vigorosamente. Finalmente se evaporó el solvente por flujo de N₂, sin burbujear.

Las muestras así obtenidas se analizaron por cromatografía de gases en una columna CPSIL 8CB en un cromatógrafo Carlo Erba 2300. Se utilizó helio como acarreador a un flujo de 1ml/min a 195 °C

VIII Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección

La electroforesis en poliacrilamida y la inmunodetección se efectuaron acordes con los métodos ya reportados anteriormente [Shägger et al, 1986 y González-Halphen et al., 1988], respectivamente.

Para la inmunodetección se empleó un anticuerpo convencional generado contra la proteína recombinante AOXI de *Chlamydomonas reinhardtii*, regalo de Stacie Nakamoto del grupo de Sabeeha Merchant en la Universidad de California en Los Angeles [Nakamoto, 2001].

IX Extracción de DNA total de *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii*

Los métodos empleados para la extracción de DNA por solubilidad diferencial con fenol-cloroformo fueron los mismos ya reportados en trabajos anteriores de nuestro grupo [Antaramián, 1998; Pérez-Martinez, 2000].

X Hibridación tipo Southern

Para cada análisis, 30-40 µg de DNA total digerido con endonucleasas de distinto tipo en cada caso, se corrieron en geles de agarosa 0.9% en Tris-borato-EDTA (medio TBE) por 6 horas a 25 V. Después de desnaturalizar 1 hora con NaOH 1M/ NaCl 1.5M y posteriormente neutralizar por 1 hora con Tris 1M (pH 8.0)/ NaCl 1.5M, el DNA se transfirió por capilaridad con amortiguador SSC a una membrana de nylon (*Hybond*, Amersham) 10X. Se efectuó un entrecruzamiento del DNA transferido con la matriz de nylon mediante exposición a radiación UV (*Stratalinker*, Stratagene).

La membrana se mantuvo por 3 horas en el amortiguador de *prehibridación* (SSC 6X, reactivo de Denhardt 5X, Tris-HCl pH 8.0, EDTA-Na 2 mM pH 8.0, SDS 0.2 % y DNA de esperma de salmón 0.1 mg/ml) a 50°C. La sonda de DNA de doble cadena (30-50 ng) se marcó con dCTP-γ³²P por el

método de cebadores al azar (*Random Primer*, Gibco-BRL) y se purificó por un sistema de centrifugación (*Micro Bio-Spin 30*, Bio-Rad). Una vez marcada la sonda se colocó en agua en ebullición por 10 minutos y se transfirió inmediatamente a hielo por 10 minutos más. Finalmente, la sonda se adicionó al medio de prehibridación. La hibridación se efectuó a la temperatura adecuada (50 a 60 °C) durante 12 horas como mínimo.

Secuencias de cDNA empleadas como sondas en los ensayos de hibridación tipo Southern

A) cDNA Aox de *Mangifera indica* (Mango)

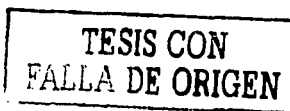
Definición: *Mangifera indica* (cv Manila) AOMI 1 mRNA.

Numero de acceso GeneBank: X79329

Cruz-Hernández, A. and Gómez-Lim, M.A. (1995). Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* 197: 569-576

```

1  cacgaggac  tttgtaagga  tgacggtgat  gcgaggtcct  ttaaaccggtg  ggaggtacgg
61  caaccggtag  atttggacgg  cgatctccct  acggcatccg  gaggttatgg  agggaaacgg
121  cttggagtcg  gcagttatgc  aatggcggag  gatgttgagc  aacgcccgtg  gagctgaagc
181  ccaagtgaag  gaggcagaag  aggagaagaa  agatgcatg  gtgtccaatt  attggggaat
241  tccagggcca  aagatcaact  gggaaagacc  ctcagagtgg  ccttggaaat  gcttcatgcc
301  atgggaaact  tatcggtcag  acttatcaat  tgatttgaag  aagcatcatg  taccaaggac
361  atttatggat  aaatttgcac  acaggactgt  gaaaaacact  cgagtcccaa  ctgatatctt
421  ttttcagaga  cgttatgggt  gtcgggcaat  gatgtggaa  acagtggctg  ctgtgcccg
481  aatggttgg  ggcattgttc  tgcattctga  gtctctccgc  aagttggagc  aaagtgggtg
541  ctggatcaaa  gccttgcttg  aagaagcaga  gaatgagagg  atgcatctca  tgaccatggt
601  ggagcttg  cagcctaaat  ggtatgagag  gctgtggtt  cttgtctgtc  agggagtctt
661  ctttaactga  ttctttgtgc  ttatgtact  ttctcccaa  ttggcacata  taactgtcgg
721  gtatttggag  gaggaaagct  tccactccta  tacagaatat  ctcaaggata  ttgacagtgg
781  tgcaataaaa  aatatccag  ccccagctat  tgcaattgac  tattggagac  ttcctaagga
841  tgctaccctc  aaggatgta  tcactgtggt  ccgtgctgat  gaggctcacc  atcgagatgt
901  caaccatttc  gcatctgatg  tacaagtcca  ggggaaggaa  ttgagagatg  caccggcccc
961  cgttgggtat  cactagccgc  ctatttcaat  attcagggta  taattttact  ttttgtatct
1021  gctgagaata  ctataatagt  actactatag  gaataagaa  tatgtacgca  agtactaaat
1081  agtatgtggt  atttgtatct  gctgtaaaag  aaaacaaatt  attgtatggt  gtggattaac
1141  ttgatgtaat  ttaacaagca  acttcgggaa  aaggattggc  tctgagggat  tctgagggat
1201  gggcacgggg  gtcccacgtc  ccgaagtctg  ctgtcgggtg  actgtctcag  ctgctccscg
1261  ggcgagacgg  gtcgcgggtg  gccgcgggg  gacggactgg  gaacggctcc  tccgggggcc
1321  tccccgggc  gtcgaacagt  cgactcagaa  ctggtacgga  caagggaaat  ccgactggtt
1381  aattaaaca  aagcattgag  atggtccctg  cggatgctca  cgaaatgtga  tttctgcccc
1441  gtgctctgaa  tgtcaagtg  aagaaattca  accaacgcgc  ggtaaacggc  ggagtaacct
1501  atgactctct  taaggtagcc  aaatgcctcg  tcatctaatt  agtgacgcgc  atgaatggat
1561  taacagagatt  cccactgtcc  ctgtctacta  tccagcgaaa  ccacagccaa  gggaacgggc
1621  ttggcagaat  cagcggggaa  agaagacct  gttgagcttg  actctagtcc  gactttgtga
1681  aatgacttga  gagggtgagt  ataagtggga  gccgaaagcg  gaaagtgaaa  taccactact
1741  tttaacgtta  tttacttat  tccgtgaatc  ggaggcgga  ctgcccctct  ttttggacc
1801  aacgccccg  cgggcccagc  cgggcggaag  acattgtcag  gtggggagtt  tggcctcgtg
1861  cc
    
```



B) cDNA parcial de *Aox* de *Chlamydomonas sp* W80

Definición: *Chlamydomonas sp.* W80 cDNA parcial de *Aox*

Numero de acceso GeneBank: AB009087

```

1  ggatccccgg ggetgcagge gctgctcgag gaggcggaga acgagcgcac gcacctgctg
61 accttctctg agatgcgcca gccaaagtgg atgttccgcy cggcgggtgt gctggcgcag
121 ggagcgtact tcaacatggt ttctatttcc tatctcatct cgccaagt ctgccaccgc
181 gtcgtgggct acctcgagga ggaagctgtc aagacgtaca cgcacctgct tcacgacatt
241 gacgcccggc acgtgtggaa ggacaagccc gcgccgaaga ccggcatatg gtactggaag
301 ctgtcccgcg acgcaacgat gcgcgacctg atccttgccc tcgcgcggga cgagcgcagc
361 cactcgttgg tcaatcacac cctgagcgag atccccctgg acgcgccaaa cccgttcate
421 gagccagcaa aggctgacgc ttccagcaag gcagagaaca agctgtgagc aacaactacc
481 ttctgatcac agacttccag ctgcatgtgt gcgcatgtga gctgcagctg ccggcgtgct
541 gctgggtgccc tttgagcgaa tgggctgctc agcataaagg aatgatgtct tacaacagtc
601 gccgttgaga tgaagcttct ttgcgcggcg ggcgtgtgct tgcaatcaag caatgcaagc
661 gatgtttgag tattgggcag agaagaagac ctgggcaat acatcgtgtg gccgctggaa
721 accgccatac cagcagcggg ggtgtgcctt ggtcttgagg ctgtctttgt ggattggagg
781 gaagcattaa gagtgttctt gcctctcctg ccactgctgc tactgattac actgatggtt
841 ttttctctgt cttcctgtgg ggaataacgc tcccaccgga gagggtcaca gcgaggattt
901 gctgcacaaa tccgcgcgaa gtcgaagatt gcatgggtaa aactgataaa actgcacccc
961 gggacgaaac tccgcgcgca atgcactaaa actgcccctg gacagtagtc agttgatcaa
1021 accttgtggt gectctagtt tggcgcgctc tcaagtgtaa acacatgtat gaag
    
```

En letras oscuras se muestra la región codificante en la clona completa.

XI Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se prepararon las mezclas descritas por los fabricantes de la DNA polimerasa empleada (*Taq PCR core kit*, Qiagen). En cada reacción se empleó de 0.5 a 1 µg de DNA templado, 200 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200 pmoles de cada oligodesoxinucleótido cebador (*primers*), MgCl₂ 1 mM (en ocasiones se incrementó la concentración hasta 2 mM) con 0.5 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 unidades/µl, Qiagen) en un volumen final de 50 µl con agua esterilizada.

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes:

	Temperatura °C	Tiempo minutos	
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	1	} 30 ciclos
Alineamiento	variable	1.5	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	8	

Desoxioligonucleótidos empleados como cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa.

	1	10	20	30	3'
	5' ---	---	---	---	---
CSP1F	GTC	TTG ACA GCT	TCC TCC TC		
CSP1R	GAG	AAC GAG CGG CAT	GCA CCT		
PAO1F	GAG	ACY GTY GCY GGY	GTY CCY GGY ATG G		
PAO2F	GAG	GCY GAG AAC GAG	CGY ATG C		
PAO3F	GTY	GGY TWC CTY GAG	GAG GAG GCY G		
PAO3R	ACR	GCC TCC TCC TCR	AGG WAR CC		
PAO4R	TGG	CAR GCC TCR TCR	GCR CG		
CRAOXF	CTC	CAT GAC CGA GGC	CCA GTG G		
CRAOXR	GGC	ATC AGT GCT GGG	GTT GAG C		

Y= C ó T, R= A ó G, W= A ó T

XII Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Una vez separados por electroforesis los fragmentos a purificar se escindieron del gel y se extrajeron de la matriz de agarosa mediante el sistema de solubilización, centrifugación y precipitación *Quiaex II agarose gel extraction* (Quiagene).

XIII Clonación de productos de PCR

Una vez purificados los productos de PCR obtenidos se ligaron al plásmido pGEM empleando el sistema *pGEM-T Easy Vector* (Promega). Las transformaciones por choque térmico de células competentes de *Escherichia coli* se efectuaron siguiendo los protocolos previamente reportados por nuestro grupo [Pérez-Martínez, 2000]. La selección de clonas de interés se llevo acabo por resistencia a ampicilina y ausencia de actividad de β -galactosidasa. El *plaqueo* se hizo en medio LB-agar 1% con ampicilina 100 μ g/ml en presencia de 10 μ l de IPTG 800 mM y 40 μ l de X Gal 2%.

XIV Purificación de plásmidos

Minipreparaciones

Purificaciones preparativas de plásmido se efectuaron a partir de las clonas seleccionadas y crecidas en medio LB-agarosa, ampicilina 100 µg/ml por 12 horas. Se empleó el método ya reportados en trabajos anteriores [Pérez-Martínez, 2000]. Alternativamente, se emplearon cultivos líquidos de 10 ml de las clonas seleccionadas y se procesaron con el protocolo *Wizard Plus SV* (Promega).

Preparaciones grandes

A partir de cultivos de 40 ml y de 12 horas de crecimiento se aislaron los plásmidos mediante el sistema *Plasmid Midi Kit* (Quiagen)

XV Secuenciación de DNA

Se emplearon los secuenciadores automáticos *ABI prism 310 Genetic Analyser* (Perkin-Elmer).

REFERENCIAS

- Antaramian, A. Tesis Doctoral en Ciencias Biomedicas. 1998. UACPyP, Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Atteia, A., R. van Lis, J. Ramírez, D. González-Halphen, (2000) *Eur. J. Biochem.* 267: 2850-8.
- Bravo, C., M. Vargas-Suárez, S. Rodríguez-Enríquez, H. Loza-Tavera, R. Moreno-Sánchez, (2001) *J. Bioenerg. Biomem* 33: 289-301.
- Christie, W.W., In: Gas Chromatography and lipids (Christie, W.W., ed.) The Oily Press, Scotland (1989) pp 64-84.
- Degli Esposti, M., G. Lenaz, (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 303-312.
- Eriksson, M., P. Gadeström, G. Samuelsson, G. (1995) *Plant. Physiol.* 107: 479-483.
- Folch, L., M. Less, C.H. Sloane-Stanley (1957) *J. Biol. Chem.* 226: 265-275.
- González-Halphen, D., M. A. Lindorfer, R. A. Capaldi, (1988) *Biochemistry* 27: 7021-7031

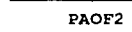
- Gorman, D.S., R.P. Levine, (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54: 1665-1669.
- Gray, K.A., M Grooms, H. Myllykallio, C. Moomaw, C. Slaugther, F. Daldal, (1994) *Biochemistry* 33: 3120-3127.
- Markwell M.A.K, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, (1978) *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Moreno-Sánchez, R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 4028-4034.
- Moreno-Sánchez, R., B.A. Hogue, C. Bravo, A.H. Newman, A.S. Basile, P.K. Chiang, (1991) *Int. J. Biochem.* 41: 1479-1484.
- Moreno-Sánchez, R., S. Rodríguez-Enríquez, A. Cuéllar, N. Corona, (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 432-444.
- Nakamoto, S.S. Tesis Doctoral en Bioquímica y Biología Molecular, 2001, University of California, Los Angeles. pp. 47-74
- Perez-Martinez, X. Tesis Doctoral en Ciencias (Bioquímica). 2000. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Priest, J.W., J.W. Hadjuk, (1992) *J. Biol. Chem.* 257: 20188-20195.
- Rottenberg, H. (1984) *J. Memb. Biol.* 81: 127-138.
- Shägger, H., T. A. Link, W. D. Engel, G. von Jagow, (1986) *Methods Enzymol.* 126: 224-237
- Zanotti, A., G. F. Azzone, (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201: 255-265.

II Alineamiento múltiple de AOX de especies diversas

<i>Nicotiana</i>	RYPTDIFF-----	QRRYGCRA	M	V	A	V	M	GGMLL
<i>Catharanthus</i>	RWPTDLFF-----	QRRYGCRA	M	V	A	V	M	GGMLL
<i>Sauromatum</i>	RWPTDLFF-----	QRRYACRA	M	V	A	V	M	GGVLL
<i>Oryza</i>	RFPTDIF-----	QRRYGCRA	M	V	A	V	M	GGMLL
<i>Arabidopsis</i>	RIPTDIFF-----	QRRYGCRA	M	V	A	V	M	GGMLL
<i>Mangifera</i>	RVPTDIF-----	QRRYGCRA	M	V	A	V	M	GGMLL
<i>Dictyostelium</i>	RKFSNLF-----	KEKFLHYA	I	V	A	V	L	AGMFL
<i>Chlamydomonas1</i>	RYLFDKATGYPTGS-----	MTEAQWLR	R	M	I	F	V	GGM
<i>Chlamydomonas2</i>	RWTFDKLTGYGPN-----	MTEAKWLQ	R	M	I	F	V	GGM
<i>Podospora</i>	RWGTDIATGKPEQQ-VDKSNPTTAVAAQKPLTEAQWLVRFIF-----							
<i>Neurospora</i>	RWATDIATGIRPEQQ-VDKHHPPTATSADKPLTEAQWLVRFIF-----							
<i>Magnaporthe</i>	RWGMKVSGLSSEQQINKGSPTTSIVAAKPLTEAQWLSRFIF-----							
<i>Ajellomyces</i>	RWATDLATGYRHAAP---GKQGVVEVPEQFMTERKVVIRFIF-----							
<i>Candida</i>	RQCFDLVTGYAVPKT--NN--PDEFKGTRWEMTEGKWLTRCIF-----							
<i>Pichia</i>	RASFDFVTGYKPKD---VNGMLKSWEGTRYEMTEEKWLTRCIF-----							
<i>Trypanosoma</i>	RWLFDLTSLYRFG-----	SITESKVIS	R	C	L	F	V	GGMLR



<i>Nicotiana</i>	KSLRREFEQSGG	K	L	D	A	E	F	F	M	M	T	F	M	V	A	K	P	N	W	Y	E	R	A	L	V	F	V	G	V	E	F	N	A	Y	E	V
<i>Catharanthus</i>	KSLRREFEHSGG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	T	F	M	V	S	K	P	R	W	Y	E	R	A	L	V	F	V	G	V	E	F	N	A	Y	F
<i>Sauromatum</i>	KSLRREFEHSGG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	T	F	M	V	A	K	P	R	W	Y	E	R	A	L	V	F	V	G	V	E	F	N	A	Y	E
<i>Oryza</i>	RSLRREFEQSGG	R	L	L	E	A	E	F	F	M	M	T	F	M	V	A	K	P	W	Y	E	R	A	L	V	I	V	G	V	E	F	N	A	Y	E	L
<i>Arabidopsis</i>	KSIRKFEHSGG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	T	M	M	L	V	K	P	K	W	Y	E	R	L	L	V	L	V	G	I	F	E	N	S	F	F
<i>Mangifera</i>	KSLRLEQSGG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	T	M	V	E	L	V	Q	P	K	W	Y	E	R	L	L	V	L	V	G	V	E	F	N	S	F
<i>Dictyostelium</i>	KLTRNMQ-SNNKIKIMDM	K	L	S	F	M	L	T	K	P	T	L	L	E	R	G	M	V	A	T	A	I	Y	N	L	F	L	V	E							
<i>Chlamydomonas1</i>	KSLRSMRDRG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	L	T	F	L	Q	L	R	Q	P	P	A	R	A	M	V	L	A	G	V	E	F	N	A	Y	E
<i>Chlamydomonas2</i>	KSLRSMKRDRG	K	L	L	E	A	E	F	F	M	M	L	T	F	E	L	R	K	P	G	L	F	R	A	S	I	V	A	G	V	E	F	N	A	Y	E
<i>Podospora</i>	ESLRLLRKDRNG	E	S	L	R	L	S	F	M	L	T	F	K	M	C	P	G	W	F	M	K	T	M	L	L	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E	
<i>Neurospora</i>	HSLRRLKDRNG	H	S	L	R	L	S	F	M	L	T	F	K	M	C	P	G	L	M	K	T	L	L	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E			
<i>Magnaporthe</i>	HSLRRLKDRNG	H	S	L	R	L	S	F	M	L	T	F	L	K	M	C	P	G	W	L	M	K	L	L	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E		
<i>Ajellomyces</i>	RSLRRMKDRNG	R	S	L	R	M	L	S	F	L	K	L	Q	P	G	W	F	M	R	L	M	V	L	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E			
<i>Candida</i>	HSLRMLRRDKAM	H	S	L	R	M	L	T	F	I	K	I	G	K	P	S	W	F	T	R	S	I	I	V	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E		
<i>Pichia</i>	HSLRLLKRDKA	H	S	L	R	L	L	T	F	I	K	I	G	N	P	S	W	F	T	R	F	I	Y	M	G	A	G	V	E	F	N	A	Y	E		
<i>Trypanosoma</i>	SSLRYMTRDKG	S	S	L	R	Y	M	T	F	I	E	L	R	Q	P	L	P	L	R	V	S	I	I	T	A	A	M	Y	L	F	L	V	A			



<i>Nicotiana</i>	LLS	K	L	A	R	I	V	Y	E	E	I	H	S	T	E	F	L	K	E	L	D	K	G	-----	N	I	E	N	V	P	A	P	A	I	A	I	D	Y	C	R	L	P	K	D	-S				
<i>Catharanthus</i>	LAS	K	L	A	R	I	V	Y	E	E	I	H	S	S	E	F	L	N	E	L	D	K	G	-----	N	I	E	N	V	P	A	P	A	I	A	I	D	Y	Q	M	P	P	D	-S					
<i>Sauromatum</i>	LLS	K	F	A	R	V	Y	E	E	I	H	S	T	E	F	L	K	D	I	D	N	G	-----	A	I	Q	D	C	P	A	P	A	I	A	I	D	Y	W	R	L	P	Q	-S						
<i>Oryza</i>	LLS	K	F	A	R	V	Y	E	E	I	H	S	T	E	F	L	K	D	L	E	A	G	-----	K	I	D	N	V	P	A	P	A	I	A	I	D	Y	W	R	L	P	A	-A						
<i>Arabidopsis</i>	VLS	R	L	A	R	V	Y	E	E	K	H	S	T	E	F	L	K	D	I	D	N	G	-----	K	I	E	N	V	A	A	P	A	I	A	I	D	Y	W	R	L	P	K	D	-A					
<i>Mangifera</i>	VLS	K	L	A	R	I	V	Y	E	E	H	S	T	E	Y	L	K	D	I	D	S	G	-----	A	I	K	N	P	A	P	A	I	A	I	D	Y	W	R	L	P	K	D	-A						
<i>Dictyostelium</i>	VLS	K	T	A	R	F	T	Y	E	E	V	T	T	H	M	L	E	D	I	D	S	G	-----	K	V	P	N	Y	K	A	P	Q	I	A	E	Y	W	G	L	P	E	D	-A						
<i>Chlamydomonas1</i>	V	L	S	R	L	A	R	V	Y	E	E	V	K	T	H	A	L	V	E	I	D	A	G	---	R	L	W	K	D	-	T	P	A	P	P	V	A	Y	Q	W	G	L	K	P	G	-A			
<i>Chlamydomonas2</i>	V	L	S	R	L	A	R	V	Y	E	E	V	K	T	H	A	L	Q	E	I	D	A	G	---	R	L	W	K	G	-	K	V	A	P	P	I	A	C	E	Y	W	G	L	K	P	G	-A		
<i>Podospora</i>	VLS	R	I	T	R	F	V	Y	E	E	V	H	T	T	R	C	I	R	E	I	E	Q	---	D	L	P	K	W	S	D	P	N	F	Q	I	P	L	A	V	Y	W	K	M	P	E	G	K		
<i>Neurospora</i>	VLS	R	I	T	R	F	V	Y	E	E	V	H	T	T	R	C	I	R	E	I	E	G	---	H	L	P	K	W	S	D	E	K	F	E	I	P	E	M	A	V	Y	W	R	M	P	E	G		
<i>Magnaporthe</i>	VLS	R	I	C	R	F	V	Y	E	E	V	H	T	T	R	S	I	E	E	L	E	R	G	---	D	L	P	K	W	S	D	P	K	F	Q	V	P	E	I	A	V	S	Y	W	G	M	P	E	G
<i>Ajellomyces</i>	VLS	R	T	C	R	F	V	Y	E	E	V	M	T	T	H	A	I	K	D	L	E	S	G	---	K	L	P	N	W	A	---	Q	P	A	D	I	A	V	A	Y	W	M	P	E	G				
<i>Candida</i>	LLS	R	Y	C	R	F	V	Y	E	E	V	R	T	S	H	L	L	D	E	L	A	V	P	K	L	P	A	F	E	T	---	M	K	I	P	E	V	A	Q	Y	W	L	P	T	P	K	S		
<i>Pichia</i>	LLS	R	Y	C	R	F	V	Y	E	E	V	S	T	T	H	L	I	K	D	I	D	S	K	---	R	L	P	K	F	D	---	V	N	L	P	E	I	S	W	L	Y	W	T	D	L	N	E	K	
<i>Trypanosoma</i>	VLS	R	F	V	R	F	V	Y	E	E	V	I	T	T	G	V	M	R	A	I	D	E	G	---	R	L	R	P	T	K	N	D	V	P	E	A	V	Y	W	N	L	S	K	N	-A				



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE I. MÉTODOS

<i>Nicotiana</i>	TLRDVVLVVFAPFAHHRDNTYFAS-----D
<i>Catharanthus</i>	TLRDVVMVVFAPFALHRDNTYFAS-----D
<i>Sauromatum</i>	TLRDVVTVVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Oryza</i>	TLKDVTVVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Arabidopsis</i>	TLKDVTVVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Mangifera</i>	TLKDVTVVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Dictyostelium</i>	TLRDLLIYVFAPFAHHRDNTYFAS-----D
<i>Chlamydomonas1</i>	NMRDLILAVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Chlamydomonas2</i>	SMRDILAVFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Podospora</i>	TMRDLILYFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Neurospora</i>	TMRDLIHYFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Magnaporthe</i>	TMRDLLLYFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Ajellomyces</i>	TILDLLYFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Candida</i>	SFKDLILRFAFPAHHRDNTYFAS-----D
<i>Pichia</i>	TFRDLIQRFAPFAHHRDNTYFAS-----D
<i>Trypanosoma</i>	TFRDLINVFAPFAHHRDNTYFAS-----D

..*:: :* ** : * ** *

← PAOR4

<i>Nicotiana</i>	IHYGQQLKDSAPIGYH-----
<i>Catharanthus</i>	IHYGLELKEAAAPLDYH-----
<i>Sauromatum</i>	VHYQDLELKTTPALGYH-----
<i>Oryza</i>	IHYGMELKQTPAPIGYH-----
<i>Arabidopsis</i>	IRNQGKELREAAAPIGYH-----
<i>Mangifera</i>	VQVQGKELRDAPAPVGYH-----
<i>Dictyostelium</i>	HSQEGIRIEKKINPTSEL-----
<i>Chlamydomonas1</i>	-----
<i>Chlamydomonas2</i>	-----
<i>Podospora</i>	LKPTGFERSEVIG-----
<i>Neurospora</i>	LKPTGFERAEVIG-----
<i>Magnaporthe</i>	SRPEGFEREVIGKEVIGKEVIEKDVGKQVSV
<i>Ajellomyces</i>	VKPTGWERDEVI-----
<i>Candida</i>	MRPTGWEKQDLQL-----
<i>Pichia</i>	PHPEGWNREQMRL-----
<i>Trypanosoma</i>	FGSEGAKTASNVNKHV-----

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

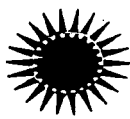
APENDICE II. OTRAS PUBLICACIONES

ARTICULO I

Funes, S., Pérez-Martínez, X., Ataramián, A., Vázquez-Acevedo, M., van Lis, R., Reyes-Prieto, A., Santillán-Torres, J.L., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P. and González-Halphen, D.

Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: perspectives for the allotopic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies

En Recent Research Developments in Bioenergetics. En prensa.



RESEARCH SIGNPOST

May 30, 2002

Ref No: RS/BN/6

Dr. Diego González-Halphen
Departamento de Genética Molecular
Instituto de Fisiología Celular, Universidad
Nacional Autónoma de México, Apartado
Postgal 70-243, 04510 México D.F.
MEXICO

Dear Sir,

Your article entitled "Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: Perspectives for the allotopic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies" is found suitable for publication and we look forward to including it in the forthcoming issue of our book 'Recent Research Developments in Bioenergetics'. A bill amounting to U.S.\$ 561/- which covers the cost of 150 reprints and mailing charges is being enclosed herewith. Hope you will kindly expedite the payment.

Thanking you

Sincerely yours,

S.G. Pandalai
Managing Editor

NB:- Also kindly suggest a suitable short title (running title) for your article.

Cheques/draft are to be drawn in favour of "**Research Signpost.**"

Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae: perspectives for the allotypic expression of OX-PHOS proteins and future human therapies.

Soledad Funes¹, Xochitl Pérez-Martínez¹, Anaíd Antaramian¹, Miriam Vázquez-Acevedo¹, Robert van Lis¹, A. Reyes-Prieto¹, J.L. Santillán-Torres¹, M.Gonzalo Claros², Edgar Davidson³, Michael P. King³ and Diego González-Halphen^{1*}

1. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (Mexico)
2. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, E-29071 (Spain).
3. Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA. (USA).

(*) To whom correspondence should be addressed: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510 México D.F. Tel. (52-55) 5622-5620; Fax (52-55) 5622-5611. E-mail dhalphen@ifisiol.unam.mx

Abbreviations

<H>	local hydrophobicity
<i>mesoH</i>	mesohydrophobicity
mtDNA	mitochondrial DNA
MTS	mitochondrial targeting sequence
nt	nucleotides
TIM-TOM	translocases of the mitochondrial inner and outer
<i>atp6</i>	gene encoding subunit <i>a</i> (ATP6) of the F ₁ F ₀ -ATP synthase.
<i>cox2</i>	gene encoding subunit II (COXII) of cytochrome <i>c</i> oxidase.
<i>cox3</i>	gene encoding subunit III (COXIII) of cytochrome <i>c</i> oxidase.

ABSTRACT

Mitochondrial genomes encode a limited set of polypeptides that are components of the membrane-embedded oligomeric complexes that participate in oxidative phosphorylation (OX-PHOS). It has been proposed that the genes that remained localized in the mitochondrial genome are those that encode highly-hydrophobic polytopic proteins, containing two or more helices that span the membrane. The 15.8 kb linear mitochondrial genome (mtDNA) of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* lacks several of the genes, encoding essential components of OX-PHOS, that are typically found on mtDNA, including *cox2*, *cox3* and *atp6*. These genes were transferred to the nucleus of this alga where they were modified to permit their successful expression in the nucleus of *C. reinhardtii*. In an extreme example, the *cox2* gene, encoding the COXII subunit, has been split into two genes whose products, COX IIA and COX IIB are predicted to form a heterodimeric subunit. The predicted COX IIA, COX III, and ATP6 polypeptides have long putative mitochondrial targeting sequences (MTS) and exhibit diminished physicochemical constraints for import into mitochondria. The mean hydrophobicity of the nucleus-encoded proteins is diminished, particularly in those transmembrane stretches that are thought not to participate directly in proton translocation or in inter-subunit contacts, as shown for the ATP6 and COXIII subunits. Based on these results, we suggest some conclusions on the allotopic expression of human mitochondrial genes and on the design of mitochondrial gene therapy strategies.

1. INTRODUCTION

In some members of the chlorophyte algae from the family Chlamydomonadaceae, several genes that are normally found in the mitochondrial genomes, like *cox2*, *cox3*, and *atp6*, naturally reside in the nucleus. The study of these genes, and the structural changes that allowed their successful relocation to the nucleus, are the subject of this review. To illustrate this transfer process, we first briefly address the large diversity of mitochondrial genomes in nature, and in particular, those of Chlorophycean algae. We then summarize the evidence for the prevalent and on-going transfer of mitochondrial genes to the nucleus, review this process in chlamydomonad algae, and address why some genes have remained in mitochondrial genomes. We suggest that nuclear genes encode mitochondrial membrane proteins whose overall hydrophobicity has decreased as compared to its mitochondria-encoded counterparts. We also show that the hydrophobicity has decreased preferentially in those transmembrane regions of the protein that seem not to be critical for function or for inter-subunit interactions. Finally, we suggest some conclusions for consideration when designing mitochondrial gene therapy strategies involving allotopic expression of mitochondrial genes.

2. THE LARGE DIVERSITY OF MITOCHONDRIAL GENOMES IN NATURE.

Mitochondria are believed to have evolved from endosymbionts [1,2] that derived originally from free-living α -proteobacteria [3,4,5,6], related to the contemporary members of the genus *Rickettsia* [7]. The nature of the host with whom the endosymbiosis was

established remains a matter of debate, and it is thought to be either an archeon or an amitochondrial eukaryote [8]. It is believed that the endosymbiotic event that gave rise to mitochondria occurred only once in evolution [9], and that it was followed by a massive transfer of genes to the nucleus, followed by a more gradual transfer [10] that seems to be an ongoing process [11]. This long-term migration process gave rise to the present highly reduced mtDNAs.

Mitochondrial genomes from different species vary in size as well as in organization. In general, they encode ribosomal RNAs, tRNAs, and a limited set of polypeptide subunits of OX-PHOS proton translocating complexes, plus a variable set of proteins involved in mitochondrial protein synthesis [5]. The majority of mitochondrial proteins are nucleus-encoded, translated in the cytoplasm, and translocated through a specialized import-machinery known as the TOM-TIM complex [12]. In yeast, more than 400 mitochondrial proteins (97% of all proteins required for mitochondrial function) are encoded in the nucleus [13]. Many proteins imported into mitochondria contain a mitochondrial targeting sequence (MTS), generally a small, cleavable presequence of 20 to 40 amino acids, capable of forming an amphiphilic α -helix, that is recognized by the mitochondrial TOM-TIM machinery.

A wide spectrum of gene content of mitochondrial genomes is found in nature. The 60 kb mtDNA of the flagellate *Reclinomonas americana* [14], "the mitochondrion that time forgot" [15], resembles a highly reduced bacterial genome. This mtDNA encodes 24 proteins that participate in OX-PHOS, plus a set of 38 additional proteins involved in translation, transcription, protein import, and maturation. The *R. americana* mitochondrial genome is thought to be the extant mtDNA that most closely resembles the proto-mitochondrial genome. At the other end of the mtDNA complexity-spectrum, there is the highly reduced 6 kb mtDNA of the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum*, that contains only 3 genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain - *cob*, *cox1*, and *cox3* [16,17]. *cob* and *cox1* are present in all mitochondrial genomes known to date. Their gene products are highly hydrophobic polytopic proteins that function as central components of proton translocating complexes: cytochrome *b* of the bc_1 complex, and subunit I of cytochrome *c* oxidase. In the small circular mitochondrial genomes of metazoans, including humans, 13 protein-coding genes, all encoding components of oxidative phosphorylation are present: *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8* [18].

3. THE MITOCHONDRIAL GENOMES OF CHLOROPHYCEAN ALGAE.

The class Chlorophyceae, members of the phylum Chlorophyta (green algae), contains more than 355 genera and 2650 species. Most live in freshwater but there are also marine and terrestrial species [19]. The mitochondrial genomes of 7 species of chlorophycean algae have been sequenced, *Chlamydomonas eugametos* [20], *Scenedesmus obliquus* [21,22], *Chlorogonium elongatum* [23], *Chlamydomonas reinhardtii* [24,25], *Nephroselmis olivacea* [26], *Pedinomonas minor* [26], and *Prototheca wickerhamii* [27]. Table 1 summarizes the gene content of the mitochondrial genomes of these green algae. The 15.8 kb linear mtDNA from *C. reinhardtii* lacks several genes encoding essential components of OX-PHOS: *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, and *atp8*, that until recently had only been characterized as mtDNA-encoded genes. These six genes are also absent from the circular genomes of the related green algae *C. eugametos* and *C. elongatum*. It was

hypothesized that these genes had been transferred to the nucleus in these species. The products of two of these genes, subunit III of cytochrome *c* oxidase (COX III) and subunit 6 of F₁F₀-ATP synthase (ATP6, equivalent to subunit *a* in *Escherichia coli*), are usually highly-hydrophobic polypeptides, with 7 [28] and 5 [29,30] transmembrane stretches respectively. As outlined below, we have demonstrated that functional *atp6*, *cox2*, and *cox3* genes are nuclear localized in *C. reinhardtii* [31,32,33]. The modifications that enabled these once mitochondrial genes to become nuclear localized and fully functional offers insights into the evolutionary processes involved, and suggest possible strategies for the allotopic expression of proteins as potential genetic therapies for human mitochondrial disorders.

Table 1. Gene content in the mitochondrial genomes of Chlorophycean algae.

Genes	TR	P. WI	N. OL	P. MI	S. OB	C. RE	C. EU	C. EL
COMPLEX I								
<i>nad1</i>	8-9	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad2</i>	13-14	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad3</i>	3	+	+	+	+	-	-	-
<i>nad4</i>	13-14	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad4L</i>	3	+	+	+	+	-	-	-
<i>nad5</i>	15-16	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad6</i>	5	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad7</i>	1-2	+	+	-	-	-	-	-
<i>nad8</i>	1	-	+	-	-	-	-	-
<i>nad9</i>	1	+	+	-	-	-	-	-
COMPLEX III								
<i>cob</i>	9	+	+	+	+	+	+	+
COMPLEX IV								
<i>cox1</i>	12	+	+	+	+	+	+	+
<i>cox2</i>	2	+	+	-	+	-	-	-
<i>cox3</i>	7	+	+	-	+	-	-	-
COMPLEX V								
<i>atp1</i>	0	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp6</i>	5	+	+	+	+	-	-	-
<i>atp8</i>	2	+	+	+	-	-	-	-
<i>atp9</i>	2	+	+	-	+	-	-	-
rib RNAs								
<i>rnl</i>		+	+	+(2)	+(4)	+(8)	+(6)	+(6)
<i>rns</i>		+	+	+	+(2)	+(4)	+(3)	+(3)
5S		+	+	-	-	-	-	-
tRNAs		26	26	8	27	3	3	3

TR= TRANSMEMBRANE REGIONS OF THE PROTEIN ENCODED, P. WI= PROTOTHECA WICKERHAMII, N. OL=NEPHROSELMIS OLIVACEA, P. MI= PEDINOMONAS MINOR, S. OB= SCENEDESMUS OBLIQUUS, C. RE= CHLAMYDOMONAS REINHARDTII, C. EU= CHLAMYDOMONAS EUGAMETOS, C. EL= CHLOROGONIUM ELONGATUM. NUMBERS IN PARENTHESIS INDICATE THE NUMBER OF FRAGMENTS THAT CONSTITUTE THE RIBOSOMAL RNAS

4. TRANSFER OF MITOCHONDRIAL GENES TO THE NUCLEUS.

The theory of mitochondrial origin proposes that there was a gradual transfer of genes from the endosymbiont to the nucleus [10]. This transfer of genetic material may have happened in the form of DNA or of cDNA [34]. In *S. cerevisiae*, the current rate of transfer of DNA from the mitochondria to the nucleus is 10^5 times more frequent than the rate of transfer in the opposite direction [35]. This suggests a favored unidirectional flux of genetic material from organelles to nuclear control. Transfers of mtDNA to the nucleus can involve fragments ranging from 31 nt [36] up to 620 kb, as in the case of *Arabidopsis thaliana*, where a complete mtDNA copy was found in the nucleus [37]. The human genome project has also revealed transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus, ranging from 106 to 14,654 bp [38].

The continuous transfer of organellar DNA to the nucleus predicts that all coding sequences should eventually be displaced from the mitochondrion [39]. However, this transfer is not always successful, since on many occasions genes do not establish themselves functionally in the nucleus. Numerous copies of mitochondrial genes reside in the nucleus as pseudogenes in over 64 animal species [40,41]. These pseudogenes are considered relics of anciently transferred mtDNA that remain as molecular fossils in the nucleus [42]. Mitochondrial DNA has been transferred to the nucleus on numerous independent occasions, and the same gene can be sent to the nucleus at different times in closely related organisms [9]. These multiple transfers sometimes resulted in a successful integration of the genes and their establishment as functional genes. In other occasions, after integration, the genes were not activated, and remained as pseudogenes.

Transfer of mitochondrial genes to the nucleus seems to be an ongoing process [43], exemplified by the presence of similar genes for the same protein encoded in both the mitochondrial and the nuclear genomes of an organism, i.e. F_1F_0 -ATP synthase subunit 9 (ATP9) of *Neurospora crassa* [44,45] and cytochrome *c* oxidase subunit II (COX II) of some higher plants [11,46]. The functional relocation of mitochondrial genes to the nucleus required several steps [39,47]: *i*) The transfer of a gene to the nucleus, while an active copy is still retained in the mitochondria. *ii*) The activation of the nuclear copy of the gene by acquisition of sequences encoding nuclear promoters, ribosome binding sites, mitochondrial targeting sequences (MTS), and polyadenylation signals. These structural transformations may also be accompanied by changes in codon usage and the acquisition of introns. The relocalization of mitochondrial genes to the nucleus implies the coexistence of

active nuclear and mitochondrial genes during a variable period of time, as described for the *cox2* gene in some legumes [48]. *iii*) Inactivation of the mitochondrial gene. Such is the case of the mitochondrial ribosomal protein S14 in rice, that has been transferred to the nucleus, while the original mitochondrial copy has been interrupted by stop codons [49]. Ultimately, the original mitochondrial gene will be eliminated. Alternatively, the nuclear copy may be the one to inactivate, resulting in the original gene being retained in the mitochondrion and the appearance of mtDNA pseudogenes in the nucleus [50].

The transfer of mitochondrial genes to the nucleus may confer a selective advantage, since nuclear genes in some organisms exhibit a lower mutation rate [51]. This is not necessarily true of fungi, where mutation rates of the nuclear and mitochondrial genes are almost equivalent, or in plants, where nuclear genes mutate at a higher rate than mitochondrial genes [52,53,54]. Gene transfer from organelles to the nucleus is also thought to reduce the accumulation of deleterious mutations, since the genes migrate from a predominantly asexual to a predominantly sexual genome [55,56].

5. Transfer of mitochondrial genes to the nucleus in chlamydomonad algae.

Since the genes *cox2*, *cox3*, and *atp6* were absent in the mtDNA of *C. reinhardtii*, we investigated whether these genes were expressed in the nucleus. We used the standard techniques of molecular biology to address the presence of these genes in *C. reinhardtii* combined with a biochemical approach to show the presence of the corresponding proteins in the mitochondrion. For this second approach, we also used the colorless alga *Polytomella* sp. as it lacked a cell wall and functional chloroplasts [57,58]. These characteristics allowed the isolation of algal mitochondria free of thylakoid contaminants which facilitated the purification of several OX-PHOS complexes [31,59,60,61]. The colorless algae of the genus *Polytomella* are closely related to *C. reinhardtii*, as demonstrated by the similarities between their nucleus-encoded beta-tubulin [62] and 18S rRNA [58,63], and mtDNA-encoded *cox1* genes [64].

The combined studies with *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. demonstrated that the gene *cox3*, encoding subunit III of cytochrome *c* oxidase (COX III), had been transferred to the nucleus in both organisms [31]. We also found that in both *Polytomella* sp. and *C. reinhardtii* subunit II of cytochrome *c* oxidase (COX II) is encoded by two separate nuclear genes that were named *cox2a* and *cox2b*. The *cox2a* gene encodes a protein, COX IIA, corresponding to the amino terminal half of a typical single-polypeptide COX II, that includes the two transmembrane stretches. The *cox2b* gene encodes a protein, COX IIB, equivalent to the soluble C-terminal domain of an orthodox COX II subunit. We proposed that the separate *cox2a* and *cox2b* genes gave rise to a heterodimeric COX II that resulted from the non-covalent assembly of the COX IIA and COX IIB polypeptides in the mature cytochrome *c* oxidase complex [32]. This contrasts with the COX II proteins of other eukaryotes, that are single polypeptides encoded by single genes normally localized in the mitochondrial genome, with the exception of full-length nuclear *cox2* genes in the nuclei of some legumes. In addition, the gene *atp6* encoding subunit ATP6, an essential component of the proton translocating F_0 sector of the F_1F_0 -ATP synthase, has also been transferred to the nucleus in *C. reinhardtii* [33]. Therefore, the four genes *cox2a*, *cox2b*, *cox3*, and *atp6* where shown to reside in the nucleus in at least some members of the family

Chlamydomonadaceae, in contrast to the mitochondrial location of the genes *cox2*, *cox3* and *atp6* in the vast majority of eukaryotes. The transfer of these genes probably occurred late in evolution, after the massive transfer of genes from the protomitochondrion to the nucleus [5], since nowadays many green algae still retain the *cox2*, *cox3*, and *atp6* genes in their mitochondrial genomes.

The discovery of these genes in *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. allows a consideration of the specific features that accompanied their transfer from the mitochondrion to the nucleus:

- a) *The export of the nucleic acid molecule from the mitochondria in the form of DNA or RNA.* Some genetic material has been transferred to the nucleus via RNA intermediates, shown by the presence of edited versions of plant mitochondrial genes in the nucleus, where the mRNA has a change of C→U when compared to the genomic sequence. [46,48,65,66]. This transfer as RNA must have been followed by a reverse transcription step, before its integration into the nuclear genome. It remains to be ascertained if the genes *atp6*, *cox2a*, *cox2b*, and *cox3* of chlamydomonads were transferred as DNA or RNA intermediates. Mitochondrial editing has not been found in algae, and no evidence for reverse transcription activity has been found, despite the presence of a gene encoding a putative reverse transcriptase-like protein in the mitochondrial genome of *C. reinhardtii* [24]. The absence of editing suggests that the integration of an RNA-derived DNA fragment was not obligatory, as would be the case in an organism that required RNA editing for functional gene expression.
- b) *Integration into the nucleus.* Integration into the nuclear genome most probably occurred in a non-coding region through nonhomologous recombination [67], or by an end-joining mechanism [36].
- c) *Acquisition of an MTS.* Random genomic DNA sequences preceding mitochondrial genes that have been relocated in the nucleus could provide an MTS. Two to five % of randomly sheared DNA sequences attached upstream of protein genes *in vitro* functioned as effective MTS [68], showing the potential ease of gaining of an MTS. In some cases, mitochondrial genes have inserted into nuclear genes, acquiring the pre-existing MTS [48,69]. MTS acquisition may also occur by duplication of existing targeting signals [70] or by nuclear exon shuffling [71]. The deduced amino acid sequence located before the N-terminal sequence of the mature COX IIA, COX III and ATP6 proteins of *C. reinhardtii* predicts the existence of unusually large MTSs, of 143, 119 and 107 amino acids respectively, rich in alanines, prolines, and charged amino acids. In yeast, it has been observed that the duplication of MTSs improves the *in vitro* and *in vivo* import of hydrophobic proteins into mitochondria [72]. It has also been suggested that long MTSs can improve the interaction of the precursor with the mitochondrial import machinery [73]. Alternatively, a long MTS could affect the folding of the protein to increase its importability [74]. It is possible that, during import into mitochondria, the targeting sequences are cleaved and maintained as components of the cytochrome *c* oxidase complex, as was observed with the MTSs of the Rieske subunit of yeast and beef heart mitochondrial cytochrome *bc₁* complexes [75,76]. The function of the targeting sequence retained in the *bc₁* complex is not known, we speculate that it may act as a chaperone for components of the enzyme complex during assembly. A conventional N-terminal

MTS is not absolutely required for a nucleus-encoded protein to be imported into the mitochondrion. Several mitochondrial genes that were transferred to the nucleus have become activated, and their protein products may be imported into mitochondria in the absence of an MTS [50]. This is also the case for the *cox2b* genes of *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. which do not exhibit a region encoding a putative MTS.

- d) *Acquisition of introns, promoters, and ribosome binding sites.* Most nuclear genes in *C. reinhardtii* have introns, with an average number of 3.9 introns per kb of coding sequence. These introns are often small, ranging from 57 bp to 1318 bp, with an average size of 219 bp [77]. We found introns in the genomic sequences of the chlamydomonad mitochondrial genes that were transferred to the nucleus: 6 in *cox2a* of *Polytomella* sp., 7 in *cox2a* of *C. reinhardtii*, 1 in *cox2b* of *C. reinhardtii*, 4 in *cox3* of *Polytomella* sp., 9 in *cox3* of *C. reinhardtii*, and 7 in *atp6* of *C. reinhardtii*. These introns show orthodox splicing sites exhibiting the typical GT sequence at the 5' end and an AG sequence at the 3' end. An exception was *Polytomella* sp. *cox2b* that did not contain introns. The sequences flanking the proposed open reading frame initiating methionine codons corresponded to the consensus translation initiation site (A/C) A (A/C) (A/C) ATG (G/C) reported for *C. reinhardtii* [77]. We have yet to identify promoter regions in the genomic regions upstream from these genes.
- e) *Acquisition of polyadenylation signals.* In *C. reinhardtii* the most common polyadenylation signal in the nuclear genes is TGTA located 10-20 bp upstream of the actual polyadenylation site [77]. This signal was present in the *cox3*, *cox2a*, *cox2b*, and *atp6* genes that were transferred to the nucleus in chlamydomonad algae. These signals are distinctive features of nuclear genes, since they are not present in mitochondrial genes.
- f) *Change in codon usage.* The *C. reinhardtii* mitochondrial genetic code is the same as the standard genetic code utilized in the nucleus, which may facilitate a continued transfer of mitochondrial genes to the nucleus. However, the chlamydomonad algae exhibit a highly biased codon usage in their nuclear genes. The nuclear genome of *C. reinhardtii* has a high GC content, and this feature is reflected in the pronounced codon bias, which favors triplets with C or G in the third position. In contrast, there is a different bias in the codon usage in the mitochondrial genome. Relocalization of mitochondrial genes to the nucleus in *C. reinhardtii* was followed by changes in codon usage to frequencies typically found for nuclear genes.
- g) *Inactivation of the mitochondrial gene copy, and loss of the original mitochondrial gene.* Successful transfer of genes from organelles to the nucleus is usually followed by inactivation of the mitochondrial copy, its conversion into a pseudogene, and its eventual loss from the mitochondrial genome [78]. There is no evidence for the presence of *cox2a*, *cox2b*, *cox3* or *atp6* genes, gene fragments, or pseudogenes in the mitochondrial genomes of several chlamydomonads, including *Polytomella* sp., *C. reinhardtii*, *C. eugametos*, *C. elongatum* and *C. moewusii*.
- h) *The splitting of the *cox2* gene into *cox2a* and *cox2b*.* The gene encoding the mitochondrial COX II protein is absent from the mtDNA of a number of chlamydomonad algae. We found that the gene had been split into two parts, *cox2a* and *cox2b*, both expressed from the nucleus, in *Polytomella* sp. and *C. reinhardtii* [32]. We also observed that a *cox2* gene in the mtDNA of *Scenedesmus obliquus*

shows strong similarities to the chlamydomonad *cox2a* gene, suggesting that the splitting of *cox2* occurred prior to the transfer of the gene to the nucleus, and that the chlamydomonad transfer of *cox2b* to the nucleus is likely to have preceded that of *cox2a*. It is not known if the *S. obliquus* mtDNA-encoded *cox2a* is functional, or if there is also a nuclear copy of the same gene. It is possible that the *S. obliquus* *cox2a* was prevented from relocating to the nucleus by the divergence of the mitochondrial genetic code from the standard code in this organism [21,22]. In *Polytomella* sp. and *C. reinhardtii* the COX IIA protein contains a C-terminal 20-amino acid region, lacking similarity to conventional COX II proteins, that had a high density of charged amino acids. The predicted COX IIB polypeptide contains 42-amino acids at the N-terminus with a high density of charged amino acids that are not homologous to known COX II proteins and are not a cleavable MTS. We propose that the C-terminal extension of COX IIA interacts with the N-terminal extension of the COX IIB protein and that these acquired amino acid sequences stabilize the two COX II subunits in the cytochrome *c* oxidase complexes.

6. WHY HAVE SOME GENES REMAINED IN THE mtDNA?

Several ideas have been put forward to explain why mitochondrial genomes still contain a limited set of genes that has not been transferred to the nucleus. One explanation has been the evolution of a different mitochondrial genetic code in some organisms that would inhibit the functional expression of mitochondrial genes transferred to the nucleus. Similarly, some mitochondrial genes have accumulated complex processing patterns like mRNA-editing, which would render the transferred gene inviable when relocated to the nucleus [79]. Another explanation may be that the presence of some organellar proteins in the cytoplasm could have detrimental effects [80], including misrouting of certain highly hydrophobic mitochondrial proteins synthesized in the cytosol to other cell structures, such as the endoplasmic reticulum [81]. An additional explanation suggests that some genes have remained in the mitochondrial genome to be rapidly regulated by the organelle redox state [82]. Finally, it has been proposed that highly hydrophobic proteins, containing four or more helices that span the membrane, can not be readily imported into mitochondria. Therefore, these polytopic membrane proteins must be synthesized *in situ* to be properly inserted and assembled into the inner mitochondrial membrane [74,83]. The synthesis of these hydrophobic polypeptides inside the mitochondria, may ensure their proper insertion in the inner membrane, giving rise to the correct topological arrangement required for vectorial proton translocation.

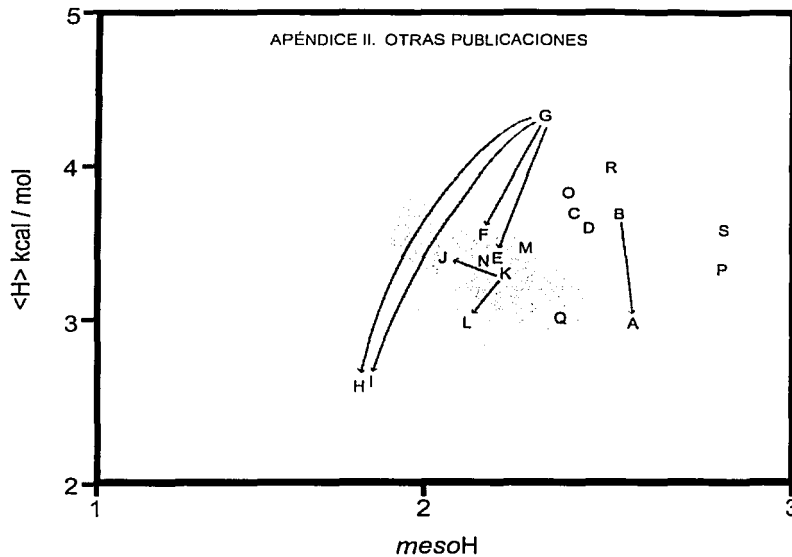
There are two universal examples of genes retained in the mitochondrial genomes: the cytochrome *b* gene (*cob*), encoding a protein with 8 transmembrane regions [84], and the cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox1*), which encodes a protein with 12 transmembrane helices [28,76]. These subunits also bind prosthetic groups, including heme groups and metal ions. Both genes are present in all mitochondrial genomes so far characterized. Other genes that encode highly hydrophobic polypeptides (*cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8*, *atp9*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* and *nad6*) are also present in the majority of mtDNAs [85]. In some yeasts, the absence of *nad* genes in the mitochondrial genome is related to the lack of respiratory complex I. Those organisms that do contain complex I retain a set of six to seven *nad* genes. The corresponding proteins of the genes retained in mtDNAs exhibit at least two transmembrane helices, and some of them up to 17 putative transmembrane

stretches. Therefore, it may be that physicochemical properties (mainly hydrophobicity) are the ultimate limiting step for the transfer of mitochondrial genes, encoding polytopic membrane proteins, to the nucleus.

7. NUCLEAR GENES ENCODING MITOCHONDRIAL MEMBRANE PROTEINS DECREASE THEIR HYDROPHOBICITY WHEN COMPARED TO THEIR MITOCHONDRIAL COUNTERPARTS.

In yeast, *in vivo* studies with cytoplasmic synthesized constructs of variable lengths of apocytochrome *b*, showed that the importability of polypeptides into mitochondria is not strictly related to the number of transmembrane domains [74]. These studies suggested that the highest average hydrophobicity over 60 to 80 amino acids of a polypeptide chain (*mesoH*), along with the maximum hydrophobicity of the putative transmembrane segments, are useful indicators of the likelihood that a protein could be imported into mitochondria. Accordingly, mitochondrial *cox2*, *cox3* and *atp6* genes from many eucaryotes encode proteins that exhibit physicochemical characteristics that would block the import of such proteins if they were nucleus-encoded. However, the corresponding nucleus-encoded proteins of chlamydomonad algae COX IIA, COX IIB, COX III and ATP6, all exhibit reduced overall hydrophobicity that allow them to be imported into mitochondria, most probably through the TOM-TIM machinery. Figure 1 shows a mesohydrophobicity (*mesoH*) versus maximal local hydrophobicity (<H>) plot for the *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. COX IIA, COX IIB, COX III and ATP6 sequences as compared to the protein products predicted from the human mitochondrial genes *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, and *atp6*. The *atp8* gene was not included since its very small size, 68 amino acids, distorts the *mesoH* and <H> values. In comparison with their human mtDNA-encoded counterparts, the nucleus-encoded chlamydomonad sequences display both decreased *mesoH* and <H> (Figure 1). We propose that one of the important modifications required for nuclear genes to encode functional mitochondrial OX-PHOS proteins is a diminished overall mesohydrophobicity of its protein product. The changes in hydrophobicity may have occurred either prior or subsequently to the transfer process and may allow for the successful import and assembly of these proteins into the mitochondrial inner membrane.

Mitochondria readily import hydrophobic carrier proteins with multiple transmembrane stretches, like the adenine nucleotide translocator. Nevertheless, carrier proteins also seem to follow the low <H> and low *mesoH* rule [74]. However, the import pathway of the translocators differs greatly from the "conservative intramitochondrial sorting pathway", in which polypeptides are transferred to the mitochondrial matrix space and then sorted to its final membrane destination. The insertion of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane is mediated through different TIM complexes, mainly the so-called tiny-TIMS and the TIM22 complex [12]. This import pathway is distinct from the one followed by orthodox MTS-containing polypeptides.



Scale: PRIFT

Scanning Window: 13

Increasing windows from 60 to 80

Figure 1. Plot of mesohydrophobicity (*mesoH*) versus maximal local hydrophobicity ($\langle H \rangle$) of the OX-PHOS mitochondrial proteins encoded in the human mtDNA compared to the nucleus-encoded homologs COX II, COX III and ATP6 of *Chlamydomonas* and *Polytomella*. Arrows indicate the mitochondrial and nuclear counterparts. Letters indicate the following sequences: A. *C.reinhardtii* ATP6, B. human ATP6, C. human COB (cytochrome *b*), D. human COX I, E. *C. reinhardtii* COX IIA, F. *Polytomella* sp. COX IIA, G. human COX II, H. *C. reinhardtii* COX IIB, I. *Polytomella* sp. COX IIB, J. *C. reinhardtii* COX III, K. human COX III, L. *Polytomella* sp COX III., M. human NAD1, N. human NAD2, O. human NAD3, P. human NAD4L, Q. human NAD4, R. human NAD5, S. human NAD6.

8. MEAN HYDROPHOBICITY HAS DECREASED IN THOSE TRANSMEMBRANE REGIONS THAT ARE NOT CRITICAL FOR FUNCTION.

Hydropathy analysis of the COX III polypeptides of *Polytomella* sp. and *C. reinhardtii* showed the presence of seven putative transmembrane stretches, numbered I to VII. The hydrophobicity of these seven helices seems to be lower in the chlamydomonad algae when compared with the *Paracoccus denitrificans* or the bovine subunits. This was more evident when the three dimensional structure of COX III from *Polytomella* sp. was modelled using the crystallographic coordinates of the bovine subunit [28]. In this model (Figure 2), shorter transmembrane stretches are observed as well as interruptions in the middle-sections of the membrane helices. The helices that are in contact with COX I (helices I and III), do not exhibit significant modifications in hydrophobicity. However, transmembrane domains II, V and VI have diminished their hydrophobicity by 16%, 10%

and 12%, respectively. It should be noted that domains IV and VII, that are the least hydrophobic in the mtDNA-encoded COX III proteins ($\Delta G \sim 1.1$ kcal/mol) offer distinct behaviour: IV remains the same and VII has increased its hydrophobicity by 22%, although the final hydrophobicity is not predicted to be a problem for import. This suggests that the diminished hydrophobicity of COX III is stronger in those regions of the protein which seem not to be involved in subunit-subunit interactions (Figure 3).

The *in silico* analysis of the predicted ATP6 sequence of *C. reinhardtii* revealed similar characteristics [33]. Based on multiple sequence comparisons, secondary structure predictions, and available biochemical data [29,30, and see also 118], five hydrophobic regions could be predicted as transmembrane stretches and were named A, B, C, D and E. Hydrophobicity analysis showed that transmembrane helices A, B and C exhibit a highly reduced mean hydrophobicity. In fact, helix A could even be considered not to be membrane-imbedded. A similar situation was observed for the transfer to the nucleus of the mitochondrial *sdh3* gene – encoding subunit 3 of succinate dehydrogenase - in angiosperms: its protein product is predicted to lack one of three transmembrane domains [86]. In contrast ATP6 transmembrane helices D and E, which are believed to interact with the multimeric ring of *c*-subunits (ATP9), and which contain most of the conserved amino acids in the protein, exhibit similar $\langle H \rangle$ values when compared with the helices of other mitochondria-encoded ATP6 subunits.

Transmembrane domains II in COX III and helix A in ATP6 are the most hydrophobic, and have decreased their $\langle H \rangle$ to the greatest extent. Therefore, we conclude that the overall decrease in hydrophobicity in the chlamydomonad subunits COX IIA, COX III, and ATP6 accompanied the functional transfer of their respective genes to the nucleus, and facilitates the import and assembly of these proteins into active cytochrome *c* oxidase and F_1F_0 -ATP synthase complexes, respectively. In addition, we propose that the selective decrease in the hydrophobicity of proteins encoded by nuclear genomes is stronger in those transmembrane regions that seem not to be critical for function, assembly, or participation in inter-subunit interactions with other constituents of the complexes. This conclusion has important implications for the allotopic expression of mitochondrial genes and for future application of allotopic expression to human mitochondrial gene therapy.

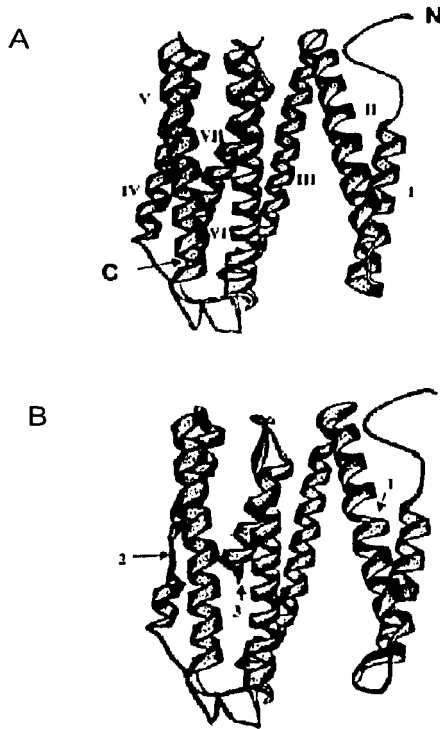


Figure 2. Model for the structural arrangement of COX III from *Polytomella* sp. **Panel A**, three dimensional structure of bovine COX III [28]. The seven transmembrane helices are indicated by roman numerals. The amino and carboxy termini are indicated by the letters N and C, respectively. **Panel B**, three dimensional model for Ps-COX III based on the bovine structure. Arrows indicate distinct features of this polypeptide: 1) the presence of a kink in transmembrane helix II, 2) a distortion in the middle-section of transmembrane helix IV, and 3) a shorter transmembrane helix VII.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

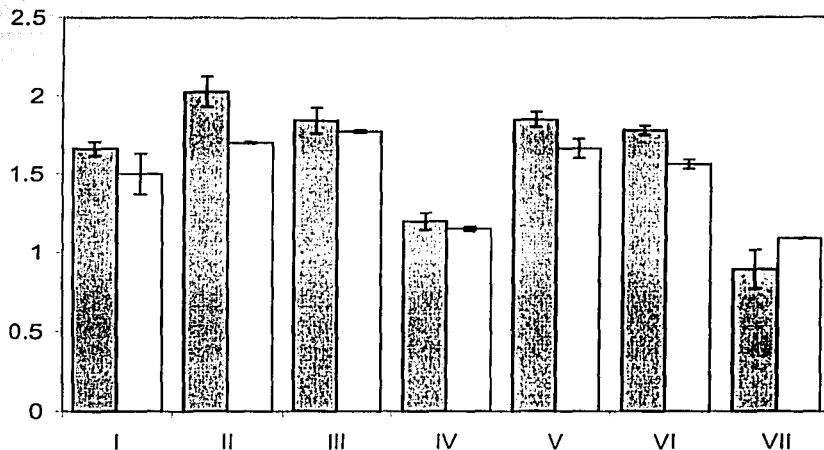


Figure 3. Analysis of the mean hydrophobicity values of the seven transmembrane regions of COX III. Hydrophobicity values for the seven transmembrane helices of COX III from *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. (white bars) were compared with the mean value of hydrophobicity of COX III from different organisms (grey bars). In Cr-COX III and Ps-COX III, mean hydrophobicity is reduced in transmembrane helix I (diminished by 10%, although not statistically significant), helix II (diminished by 16%), helix V (diminished by 10%) and helix VI (diminished by 12%) as compared to the mean values of $\langle H \rangle$ of plant and human transmembrane regions. Domains III and IV, although exhibiting diminished hydrophobicity by 4%, has no significant variation. The same is applicable to domain VII, whose hydrophobicity is increased by 22%, but the $\Delta G = 1.09$ kcal/mol for this transmembrane segment do not impede the import of the protein.

9. THE ALLOTOPIC EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL GENES AND THE QUEST FOR HUMAN MITOCHONDRIAL GENE THERAPY.

The first pathogenic mutations of the human mtDNA were described in the pioneering works of Holt *et al.*, [87] and Wallace *et al.*, [88]. Since then, more than 100 unique, pathogenic mutations of mtDNA have been reported [89]. Genetically, the mtDNA mutations fall into three categories 1) mutations in protein encoding genes; 2) mutations in structural RNA genes such as tRNAs and rRNAs; and 3) large-scale rearrangements (deletions or duplications) of the mtDNA. These alterations in human mtDNA result in a broad range of clinical outcomes.

Pathogenic mutations have been described for nearly all protein encoding mitochondrial genes [90]. Perhaps the most common are those associated with Leber's

hereditary optic neuropathy (LHON). LHON presents as acute or subacute bilateral visual loss caused by severe bilateral optic nerve atrophy and is associated primarily with mutations in genes for subunits of NADH dehydrogenase [91]. Mutations in the ATP6 gene of the mtDNA are often associated with two syndromes: NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa) [92] and maternally-inherited Leigh's syndrome (MILS; subacute necrotizing encephalomyelopathy) [93,94]. Other protein coding mutations, in the mtDNA-encoded COX subunits, or cytochrome *b* of the *bc*₁ complex, present with a wide variety of clinical features, including progressive exercise intolerance, myopathy, encephalopathies, and multi-system disorders [95-102].

Several strategies to develop gene-based mitochondrial therapies for mitochondrial diseases have been reviewed [103-106]. Direct manipulation of the mtDNA is presently not possible. However DNA-protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway, and chimeras of DNA attached to polypeptide presequences may be imported independently of its DNA length [107-109]. These techniques may eventually lead to the ability to correct mtDNA gene mutations. Another interesting approach for overcoming mutations in mtDNA-encoded proteins is to place a wild-type copy of the affected gene in the nucleus, and target the expressed protein to the mitochondrion to replace the defective mitochondrial protein. This approach requires the nuclear expression of genes that are normally localized in the mtDNA, their synthesis in the cytoplasm, and their successful import into the mitochondrial inner membrane.

Allotopic expression is defined as the functional activation of a gene in a cellular compartment different from its original location. Such "allotopic" expression of mitochondrial genes has been successfully performed in *S. cerevisiae* to overcome defects in mitochondrial *b14*, the RNA maturase of the yeast mitochondrial matrix [110,111]; to study the functions of VARI1, a subunit of the mitochondrial ribosome [112]; and with ATP8 (subunit A6L), a small (48 aa) hydrophobic polypeptide of the F₀ component of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase [113]. The sequence of the *atp8* gene was genetically engineered for nuclear expression, and a sequence encoding a yeast MTS was artificially attached. This *atp8* gene was expressed, and its corresponding protein product was synthesized in the cytoplasm, imported into the inner mitochondrial membrane, and assembled into a functional F₀ sector of F₁F₀-ATP synthase.

The fact that several typically mtDNA-encoded genes are nuclear-localized in some organisms, such as chlamydomonad algae, may facilitate the eventual allotopic expression of genes in human cells exhibiting mitochondrial diseases, especially those associated with defects in mitochondrial *atp6* genes [114], MILS and NARP [115], or those related with alterations in *cox* genes [95,99,100].

The allotopic expression of mitochondrial genes in the nucleus for gene therapy purposes, must be accompanied by the appropriate changes in codon usage of the transferred gene, and by the addition of an appropriate MTS. These two requirements may be necessary but not sufficient for successful allotopic expression. Human mitochondrial genes may also require additional alterations for allotopic expression. A decrease in the mean hydrophobicity of the protein product, particularly in those transmembrane stretches that are not highly conserved, and that are known to be non-critical for function may facilitate import of these highly hydrophobic proteins. Where appropriate the hydrophobicity of a protein could be diminished in the same regions where hydrophobicity has been reduced naturally in chlamydomonad algae. These approaches require a more detailed knowledge of the topology and function of the proteins of interest, more extensive

site-directed mutagenesis of the allotopically expressed mitochondrial gene than previously considered, and a deep knowledge of the mechanisms of action of the coexpressed proteins.

For genes whose simple allotopic expression cannot produce an active mitochondria-localized protein, it may be plausible to co-express a gene that increases the import of such a protein. In yeast, some non-importable polypeptides can be expressed in the nucleus and imported efficiently into mitochondria when another gene is co-expressed [73]. The nature of these genes is being elucidated [116,117]. Overexpression of yeast karyopherin Pse1p/Kap121p stimulated the mitochondrial import of hydrophobic proteins [117]. In addition, hydrophobic mitochondrial proteins seem to be imported into mitochondria by means of ribosomes attached to the mitochondrial outer membrane. This scenario is analogous to the export of proteins to the endoplasmic reticulum [M. Corral-Debrinski, personal communication].

A number of genes encoding highly hydrophobic polypeptides have been retained with remarkable consistency in the mitochondrial genomes of a large number of eukaryotes. However, certain members of the chlamydomonad algae have relocated some of those genes to the nucleus. As we have described above, several structural transformations have accompanied chlamydomonad *cox2*, *cox3* and *atp6* genes on their way to the nucleus. Two important changes are the use of relatively long MTS and the reduction of hydrophobicity of their encoded protein products. This reduction of hydrophobicity is more notable in those transmembrane regions that do not participate in proton translocation or in subunit-subunit interactions. Human therapies using allotopic expression of mtDNA-encoded genes, would typically require modifications to the genetic code, and the addition of the necessary transcriptional control signals and a region encoding an appropriate MTS. Further, one should consider reductions in the hydrophobicity of membrane-embedded helices that are not critical for function and assembly to facilitate the functional import of these proteins into mitochondria.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Dr. Aubrey de Grey (University of Cambridge) for the criticism and comments about this manuscript, and Dr. M. Corral-Debrinski (Ecole Normale Supérieure, Paris) for her personal communication. Work in our group is supported by grants TW01176 from Fogarty International Center, National Institutes of Health, USA; 27754N from CONACyT, Mexico; and IN202598 from DGAPA, UNAM, Mexico. SF, XPM, AA, RvL, ARP and JLST received fellowships from CONACyT and/or DGEP (UNAM) and graduate student grants from PAEP (UNAM).

REFERENCES

- [1] Margulis, L. 1970, Origin of Eukaryotic Cells, Yale University Press, New Haven, CT.
- [2] Gray, M.W. 1992, Int. Rev. Cytol. 141, 233.
- [3] Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4443.
- [4] Martin, W., and Müller, M. 1998, Nature, 392, 37.
- [5] Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. 1999, Science, 283, 1476.

- [6] Lang, B.F., Gray, M.W., and Burger, G. 1999, *Annu Rev Genet.*, 33, 351.
- [7] Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Nslund, A.K., Eriksson, A.-S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. 1998, *Nature*, 396, 133.
- [8] Kurland, C.G., and Andersson, S.G.E. 2000, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 786.
- [9] Gray, M.W. 1999, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9, 678.
- [10] Gray, M.W. 1989, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5, 25.
- [11] Covello, P.S. and Gray, M.W. 1992, *EMBO J.*, 11, 3815.
- [12] Pfanner N., Geissler A. 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 339.
- [13] Hodges, P.E., McKee, A.H.Z., Davis, B.P., Pasyne, W.E.B., and Garrels, J.I. 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27, 69.
- [14] Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. and Gray, MW. 1997, *Nature*, 387, 493.
- [15] Palmer, J.D. 1997, *Nature*, 387, 454.
- [16] Feagin, J.E., Werner, E., Gardner, M.J., Williamson, D.H. and Wilson, R.J. 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 879.
- [17] Conway, D.J., Fanello, C., Lloyd, J.M., Al-Joubori, B.M., Baloch, A.H., Somanath, S.D., Roper, C., Oduola, A.M., Mulder, B., Pova, M.M., Singh, B. and Thomas, A.W. 2000, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 111, 163.
- [18] Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. 1981, *Nature*, 290, 457.
- [19] van den Hoek, C., Mann, D.G., and Jahns, H.M. 1995, *Algae. An introduction to phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 627.
- [20] Denovan-Wright, E.M., Nedelcu, A.M. and Lee, R.W. 1998, *Plant Mol. Biol.*, 36, 285.
- [21] Nedelcu, A.M., Lee, R.W., Lemieux, C., Gray, M.W. and Burger G. 2000, *Genome Res.*, 10, 819.
- [22] Kück U., Jekosch K. and Holzamer P. 2000, *Gene.*, 253, 13.
- [23] Kroymann, J. and Zetsche, K. 1998, *J. Mol. Evol.*, 47, 431.
- [24] Gray, M.W. and Boer, P.H. 1988, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 319, 135.
- [25] Michaelis, G., Vahrenholz, C. and Pratje, E. 1990, *Mol. Gen. Genet.*, 223, 211.
- [26] Turmel, M., Lemieux, C., Burger, G., Lang, B.F., Otis, C., Plante, I., and Gray, M.W. 1999, *The Plant Cell*, 11, 1717.
- [27] Wolff, G., Plante, I., Lang, B.F., Kück, U., and Burger, G. 1994, Gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.*, 237, 75.
- [28] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. 1996, *Science*, 272, 1136.
- [29] Valiyaveetil, F.L. and Fillingame, R.H. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 16241.
- [30] Wada, T., Long, J.C., Zhang, D. and Vik, S.B. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 17353.
- [31] Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P. and González-Halphen D. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 30144.

- [32] Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P. and González-Halphen, D. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 11302.
- [33] Funes, S., Davidson, E., Claros, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P. and González-Halphen, D. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 6051.
- [34] Henze, K., and Martin, W. 2001, *Trends in Genet.*, 17, 383.
- [35] Thorsness, P.E., and Fox, T.D. 1990, *Nature*, 346, 376.
- [36] Blanchard, J. L., and Schmidt, W. G. 1996, *Mol. Biol. Evol.*, 13, 537.
- [37] Stupar, R.M., Lilly, J.W., Town, C.D., Cheng, Z., Kaul, S., Buell, C.R., and Jiang, J. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98, 5099.
- [38] Mourier, T., Hansen, A.J., Willerslev, E., and Arctander, P. 2001, *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1833.
- [39] Berg, O.G., and Kurland, C.G. 2000, *Mol. Biol. Evol.*, 17, 951.
- [40] Wallace, D.C., Stugard, C., Murdock, D., Schurr, T., Brown, M.D. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 14900.
- [41] Bensasson, D., Zhang, D., Hartl, D.L., and Hewitt, G.M. 2001, *Trends Ecol. Evol.*, 16, 314.
- [42] Perna, N.T., and Kocher, T.D. 1996, *Curr Biol.*, 6, 128.
- [43] Palmer, J.D. 1991, *The Molecular Biology of Plastids*, L. Bogorad and I.K. Vasil (Eds.), Academic Press, San Diego, 5.
- [44] van den Boogaart, P., Samallo, J. and Agsteribbe, E. 1982, *Nature*, 298, 187.
- [45] Sebald, W. and Hoppe, J. 1981, *Curr. Top. Bioenerg.*, 12, 1.
- [46] Nugent, J.M. and Palmer, J.D. 1991, *Cell*, 66, 473.
- [47] Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V. and Schuster, W. 1993, *FEBS Lett.* 325, 140.
- [48] Adams, K.L., Song, K., Roessier, P.G., Nugent, J.M., Doyle, J.L., and Palmer, J.D. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13863.
- [49] Kubo, N., Harada, K., Hirai, A., and Kadowaki, H.-I. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9207.
- [50] Adams, K.L., Daley, D.O., Qiu, Y.-L., Whelan, J., and Palmer, J.D. 2000, *Nature*, 408, 354.
- [51] Neckelmann, N., Li, K., Wade, R.P., Shuster, R. and Wallace, D.C. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7580.
- [52] Wolfe, K.H., Li, W.-H., and Sharp, P.M. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9054.
- [53] Palmer, J.D., and Herbon, L.A. 1988, *J. Mol. Evol.*, 28, 87.
- [54] Lynch, M. 1997, *Mol. Biol. Evol.*, 14, 914.
- [55] Martin, W., and Herrmann, R.G. 1998, *Plant Physiol.*, 118, 9.
- [56] Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K.V. 1998, *Nature*, 393, 162.
- [57] Round, F.E. 1980, *Biosystems*, 12, 61.
- [58] Melkonian, M. and Surek, B. 1995, *Bull. Soc. zool. Fr.*, 120, 191.
- [59] Gutiérrez-Cirlos, E.B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R., and González-Halphen, D. 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 9147.
- [60] Atteia, A., Dreyfus, G. and González-Halphen, D. 1997, *Biochim. Biophys. Acta.* 1320, 275.

- [61] Atteia, A., van Lis, Robert, Ramírez, J., and González-Halphen, D. 2000. *Eur. J. Biochem.*, 267, 2850.
- [62] Conner, T.W., Thompson, M.D., and Silflow, C.D. 1989, *Gene*, 84, 345.
- [63] Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., and Inouye, I. 1996, *Phycol. Res.*, 44, 47.
- [64] Antaramian, A., Coria, R., Ramírez, J., and González-Halphen, D. 1996, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1273, 198.
- [65] Blanchard, J.L., and Schmidt, G.W. 1995, *J. Mol. Evol.*, 41, 397.
- [66] Steinhäuser, S., Beckert, S., Capesius, I., Malek, O., and Knoop, V. 1999, *J. Mol. Evol.*, 48, 303.
- [67] Sun, C. -W., and Callis, J. 1993, *Plant Cell*, 5, 97.
- [68] Baker, A., and Schatz, G. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 84, 3117.
- [69] Figueroa, P., Gómez, I., Holuigue, L., Araya, A., Jordana, X. 1999, *Plant J.*, 18, 601.
- [70] Kadowaki, K., Kubo, N., Ozawa, K., and Hirai, A. 1996, *EMBO J.*, 15, 6652.
- [71] Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C., and Gilbert W. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 7727.
- [72] Galanis, M., Devenish, R.J., and Nagley, P. 1991, *FEBS Lett.*, 282, 425.
- [73] Claros, M.G., Perea, J., and Jacq, C. 1996, *Methods Enzymol.*, 264, 389.
- [74] Claros, M.G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F.A., Popot, J.L. and Jacq, C. 1995, *Eur. J. Biochem.*, 228, 762.
- [75] Brandt, U., Yu, L., Yu, C.A., and Trumpower, B.L. 1993, *J. Biol Chem.*, 268, 8387.
- [76] Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. 1995, *Nature*, 376, 660.
- [77] Silflow, C. D. 1998, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.D.Rocheaix, M. Goldschmit-Clermont, and S. Merchant (Eds.) Kluwer Academic, The Netherlands, 25.
- [78] Grohmann, L., Brennicke, A., and Schuster, W. 1992, *Nucleic Acids. Res.*, 20, 5641.
- [79] Doolittle, F.W. 1998, *Trends in Genet.*, 14, 307.
- [80] Martin, W., and Schnarrenberger, C. 1997, *Curr. Genet.*, 32, 1.
- [81] von Heijne, G. 1987, *FEBS Lett.*, 198, 1.
- [82] Allen, J. F. 1993, *J. Theor. Biol.*, 165, 609.
- [83] Popot, J.-L., and de Vitry, C. 1990, *Annu. Res. Biophys. Chem.*, 19: 369.
- [84] Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. 1997, *Science*, 277, 60.
- [85] Burger, G., Plante, I., Lonergan, K.M., and Gray, M.W. 1995, *J. Mol. Biol.*, 245, 522.
- [86] Adams, K.L., Rosenblueth, M., Qiu, Y.-L., and Palmer J.D. 2001, *Genetics*, 158, 1289.
- [87] Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan Hughes, J.A. 1988, *Nature*, 331, 717.
- [88] Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A., Elsas, L.J., and Nikoskelainen, E.K. 1988, *Science*, 242, 1427.
- [89] DiMauro, S., Andreu, A.L. 2000, *Brain Pathol.*, 10, 431.
- [90] Kogelnik, A.M., Lott, M.T., Brown, M.D., Navathe, S.B., and Wallace, D.C. 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 112.
- [91] Newman, N.J. 1993, *Arch Neurol.*, 50, 540.

- [92] Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K., and Morgan-Hughes, J.A. 1990, *Am. J. Hum. Genet.*, 46, 428.
- [93] Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., Clarke, J.T., Wherret, J., Smith, C., Rudd, N., Petrova-Benedict, R., and Robinson, B.H. 1992, *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 852.
- [94] Carrozzo, R., Tessa, A., Vázquez-Memije, M. E., Piemonte, F., Patrono, C., Malandrini, A., Dionisi-Vici, C., Vilarinho, L., Villanova, M., Schägger, H., Federico, A., Bertini, E. and Santorelli, F. M. 2001, *Neurology*, 56, 687.
- [95] Keightley, J.A., Hoffbuhr, K.C., Burton, M.D., Salas, V.M., Johnston, W.S.W., Penn, A.M.W., Buist, N.R.M., and Kennaway, N.G. 1996, *Nature Genet.*, 12, 410.
- [96] Keightley, J. A., Anitori, R., Burton, M. D., Quan, F., Buist, N. R. and Kennaway, N. G. 2000, *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 1400.
- [97] Andreu, A. L., Hanna, M. G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A. S., Tanji, K., Pallotti, F., Iwata, S., Bonilla, E., Lach, B., Morgan-Hughes, J. and DiMauro, S. 1999, *N. Engl. J. Med.*, 341, 1037.
- [98] Bruno, C., Martinuzzi, A., Tang, Y., Andreu, A. L., Pallotti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C. M., Angelini, C., DiMauro, S. and Manfredi, G. 1999, *Am. J. Hum. Genet.*, 65, 611.
- [99] Rahman, S., Taanman, J. W., Cooper, J. M., Nelson, I., Hargreaves, I., Meunier, B., Hanna, M. G., García, J. J., Capaldi, R. A., Lake, B. D., Leonard, J. V. and Schapira, A. H. 1999, *Am. J. Hum. Genet.*, 65, 1030.
- [100] Tiranti, V., Corona, P., Greco, M., Taanman J.-W., Carrara, F., Lamantea, E., Nijtmans, L., Uziel, G., Zeviani, M. 2000, *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2733.
- [101] Karadimas, C. L., Greenstein, P., Sue, C. M., Joseph, J. T., Tanji, K., Haller, R. G., Taivassalo, T., Davidson, M. M., Shanske, S., Bonilla, E. and DiMauro, S. 2000, *Neurology*, 55, 644.
- [102] Campos, Y., García-Redondo, A., Fernández-Moreno, M. A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J. C., Martín, M. A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R. and Arenas, J. 2001, *Ann. Neurol.*, 50, 409.
- [103] Collombet, J.-M. and Coutelle, C. 1998, *Mol. Med. Today*, 4, 31.
- [104] de Grey, A.D.N.J. 2000, *Trends Biotechnol.*, 18, 394.
- [105] DiMauro S, Hirano M, Schon EA. 2000, *Neurol Sci.*, 2000, S901.
- [106] Taylor RW, Wardell TM, Lightowlers RN, Turnbull DM. 2000, *Neurol Sci.*, 21, S909.
- [107] Rings, E.H., Büller, H., Neele, A.M. and Dekker, J. 1994, *Eur. J. Cell. Biol.*, 63, 161.
- [108] Seibel, P., Trappe, J., Villani, G., Klopstock, T., Papa, S. and Reichmann, H. 1995, *Nucl. Acids Res.*, 23, 10.
- [109] Vestweber, D. and Schatz, G. 1989, *Nature*, 338, 170.
- [110] Banroques, J., Delahodde, A., and Jacq, C. 1986, *Cell*, 46, 837.
- [111] Banroques, J., Perea, J., and Jacq, C. 1987, *EMBO J.*, 6, 1085.
- [112] Sanchirico, M., Tzellas, A., Fox, T.D., Conrad-Webb, H., Periman, P.S., Mason, T.L. 1995, *Biochem Cell Biol.*, 73, 987.
- [113] Gray, R.E., Law, R.H.P., Devenish, R.J. and Nagley, P. 1996, *Methods Enzymol.*, 264, 269.
- [114] Kempken, F., Howard, W. and Pring, D.R. 1998, *FEBS Lett.*, 441, 159.
- [115] Schon, E.A. 2000, *Trends Biochem. Sci.*, 25, 555.

APÉNDICE II. OTRAS PUBLICACIONES

- [116] Torchet, C., Jacq, C., and Hermann-Le Denmat, S. 1998, RNA, 4, 1636.
- [117] Corral-Debrinski, M., Belgareh, N., Blugeon, C., Claros, M.G., Doye, V., and Jacq, C. 1999, Mol. Microbiol., 31, 1499.
- [118] Vázquez-Memije, M.E. and García, J.J. 2002, This Book.

ARTICULO II

Adrián Reyes Prieto

Simbiosis y el Origen de los Eucariontes. Revisión

En preparación

Simbiosis y el Origen de los Eucariontes

Revisión

Adrián Reyes Prieto

*Departamento de Genética Molecular
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D.F.*

e-mail: areyes@ifisiol.unam.mx

Introducción

Durante la evolución de la vida sobre la tierra se ha hecho evidente el incremento de la complejidad biológica, entendida esta como un fenómeno que ha conducido al aumento continuo, no necesariamente gradual, en el número de genes codificantes, así como en la riqueza morfológica y conductual de los organismos. Este proceso, que si bien es comprobable, no permite esgrimir fácilmente argumentos claros para su explicación y causalidad. Algunos autores han abordado el aumento de la complejidad biológica mediante el análisis de fenómenos importantes en la historia evolutiva, las llamadas *grandes transiciones evolutivas*, profundizando en las características globales que comparten estas transiciones (Szathmáry & Maynard-Smith, 1995). Se han propuesto situaciones comunes a estos procesos mayores de evolución: a) existen entidades individuales primarias que poseen una replicación independiente, capacidad que pierden después de ocurrida la *transición*, b) se genera una división del trabajo, que puede llevar a la especialización y posiblemente a una mayor eficiencia, y c)

se presentan modificaciones en el almacenamiento y manejo de la información genética.

Dentro de este grupo de grandes procesos evolutivos se ha incluido la transición procarionte-eucarionte, es decir, el origen de la naturaleza eucarionte, tema principal de este trabajo. Si bien dentro del contexto global de la biología se da como un hecho que la aparición de los eucariontes es producto de eventos simbióticos, existen múltiples evidencias que hacen el tema complicado y en cierto modo controvertido. Parece claro que la transición procarionte-eucarionte a través de fenómenos de simbiosis cumple con las características generales de los acontecimientos que han llevado al incremento de la complejidad biológica: hoy encontramos cloroplastos y mitocondrias que se replican como parte de una sola entidad, pero tenemos evidencia de que sus ancestros fueron procariontes de vida libre. La división de las funciones metabólicas ha llevado a una marcada especialización de estos plástidos, hasta el grado de convertirlos en

organelos muy eficientes, mientras que el núcleo se ha convertido en un sistema de almacenamiento y regulación del flujo de genes y sus productos. Estrechamente relacionado con lo anterior está el manejo de la información genética, que se ha modificado por el gran intercambio de genes ocurrido entre los simbioses, provocando una tendencia al aumento en el tamaño genómico y la aparición de nuevos sistemas para la transmisión y expresión de la información genética, tal como es el tráfico e internalización de proteínas codificadas en el citoplasma hacia los organelos y otros compartimentos celulares.

En el desarrollo de este trabajo se pretende abordar algunos detalles sobre las hipótesis clásicas de endosimbiosis, los hallazgos recientes en la biología celular, la genómica, la biología molecular y el metabolismo en un contexto ecológico; mencionar ciertas propuestas novedosas basadas en estos datos, cómo se insertan éstas en las ideas anteriores (sí es que lo hacen) y sus aportaciones fundamentales. Lo anterior con el fin de mostrar un panorama general del conocimiento e ideas actuales sobre el origen de los eucariontes.

Endosimbiosis

La idea sobre el origen de los eucariontes por simbiosis fue propuesta inicialmente en los primeros años del siglo

XX (Mereschkowsky, 1905), sin embargo, el gran desarrollo de la hipótesis ocurrió al ser retomada después de 60 años (Margulis, 1970), cuando se propuso en un trabajo mucho más detallado un origen *endosimbiótico* para los cloroplastos, mitocondrias y aparatos de movilidad (undulipodia) de los eucariontes, mencionando el fenotipo probable de los procariontes involucrados en la asociación simbiótica. No obstante, algunos puntos resultaban (aun lo son) poco claros, como la dificultad de explicar la aparición de la cubierta nuclear, el sistema de endomembranas o retículo endoplásmico (RE) y el citoesqueleto. Hoy, casi 100 años después de Mereschkowsky, el origen estructural y ancestral del núcleo, retículo endoplásmico y citoesqueleto son de las cuestiones más oscuras en la historia de los eucariontes. Con la generación de nueva información experimental se han podido argumentar o modificar algunas de las posiciones respecto al origen de los eucariontes. Es interesante, por ejemplo, encontrar que hoy se argumente que el origen de la mitocondria puede estar relacionado directamente con la aparición del grupo eucarionte, es decir, podríamos ya no verlo como un proceso independiente y posterior de simbiosis, sino como una parte fundamental de la aparición del propio linaje eucarionte.

Es de resaltar la importancia de la simbiosis en la evolución, y un buen ejemplo es la aparición de un nuevo tipo celular que derivó en la multicelularidad

constitutiva y nuevos niveles de organización biológica no alcanzados previamente por los procariontes. La simbiosis ha favorecido intercambios génicos entre especies, lo que constituye una manera exitosa de aumentar en tiempos cortos el contenido genómico, que si se dan las condiciones adecuadas para la expresión de la información adquirida, puede incrementar la plasticidad fenotípica y aumentar la adecuación de los individuos, en otras palabras, la simbiosis es fuente de evolución. Por lo anterior resulta importante recurrir a los datos sobre la ecología microbiana y analizar las evidencias que permitan encontrar conexiones o analogías entre las asociaciones simbióticas (endosimbióticas) actuales, las características de los eucariontes y tratar de entender más sobre su origen.

Las filogenias universales

La idea de esclarecer las relaciones evolutivas (filogenéticas) entre diferentes organismos mediante la comparación de las secuencias de moléculas informacionales (ácidos nucleicos y proteínas) generó una nueva manera de interpretar la biología, revolucionando las posibilidades de la sistemática al permitir análisis comparados y simultáneos de múltiples formas de vida, que de otra forma presentaban grandes limitaciones prácticas y complicaciones metodológicas (Zuckerlandl y Pauling, 1965). Uno de los más importantes trabajos de este tipo generó el primer *árbol universal* de la vida

(Woese, 1987, Woese 1990), que se construyó mediante la comparación de las secuencias conocidas de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (rRNA) de numerosas especies. El árbol filogenético resultante mostraba una estructura donde se distinguen claramente tres grandes grupos o dominios separados: *Eubacteria*, *Archaeobacteria* y *Eukarya*. Un resultado muy relevante en ese momento, fue la distinción clara entre dos tipos diferentes de procariontes: *Eubacteria* (*Bacteria*) y *Archaeobacteria* (*Archaea*), sin embargo, las relaciones entre los tres grupos no eran claras debido a que se obtuvo un árbol sin raíz, por lo que no podía más que suponerse un origen simultáneo para los tres dominios (Woese, 1987). Trabajos posteriores donde se efectuaron comparaciones entre genes parálogos (los genes parálogos son genes homólogos producto de una duplicación génica ocurrida antes de un evento de especiación, en este caso particular, previamente a la separación de los tres linajes), que codifican para los factores de elongación EF-Tu/1a y EF-G/2 (Iwabe, 1989), la RNA polimerasa (Pulher, 1989) y las subunidades α y β de las V/F-ATPasa (Gogarten, 1989), respectivamente, permitieron relacionar filogenéticamente los dominios *Archaea* y *Eukarya* en una rama separada del grupo *Bacteria* (ver figura 1).

En años recientes esta visión sobre la clasificación de la vida ha sido fuertemente cuestionada debido a los resultados del análisis de genomas completos de procariontes y eucariontes y la secuenciación de genomas de organelos (Mayr, 1998, Pennisi, 1999, Doolittle, 1999). También existe controversia sobre los sistemas de clasificación, que repercute de alguna manera en los modelos que explican el origen de los eucariontes; y es un hecho que trabajos de grande biólogos como Lynn Margulis (Margulis, 1996) y Ernst Mayr (1998) sugieren la desaparición de la dicotomía de los procariontes en Archaea y Bacteria, originada por los trabajos de Woese (1987), proponiendo retomar el esquema de cinco grandes grupos (reinos) o por una sola división en el árbol universal: procariontes y eucariontes. Si bien el problema no es trivial dentro del campo de la biología evolutiva y la sistemática, no modifica en esencia las interpretaciones del origen eucarionte por eventos de endosimbiosis.

Sin dejar de lado los fuertes cuestionamientos a la visión tricotómica de la diversidad celular (*Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*), tomaremos este esquema como contexto principal, ya que las propuestas recientes que han sugerido nuevos o diferentes fenómenos simbióticos para el origen de los eucariontes se enmarcan dentro de esa idea.

A continuación haremos un resumen de las diversas propuestas para el origen de los eucariontes.

La Teoría Serial de Endosimbiosis (TSE)

La propuesta de Margulis (Margulis, 1970, Margulis, 1993) ha sido el punto de partida para las diversas ideas que se han desarrollado en años recientes, sin embargo, no es posible entender cada propuesta como alternativa absoluta y excluyente, pues resulta muy claro que entre todas las variantes que se han elaborado existen numerosos puntos comunes y en algunos casos suposiciones similares. Trataré de destacar los puntos relevantes en cada caso y matizar los aportes clave para aclarar los argumentos que permitan acercarnos a un posible entendimiento del origen de los eucariontes.

En la idea original de endosimbiosis serial de Lynn Margulis (1970) se proponía un origen para el núcleo y las estructuras citoplásmicas (nucleocitoplasma) a partir de un ancestro procarionte heterótrofo que ya poseía algún tipo de citoesqueleto y un sistema endomembranal (incluida una membrana nuclear). Este ancestro se alimentaba preferentemente de otros procariontes mediante endocitosis y poseía un metabolismo anaerobio. En estas condiciones es posible que algunas de las células de las que se alimentaba el ancestro eucarionte (proto-eucarionte), una vez englobadas, pudieron mantenerse vivas por algún tiempo en el citoplasma antes de ser digeridas, convirtiéndose en

simbiontes (endosimbiontes) sí es que podían otorgar algún beneficio al depredador-hospedero, permaneciendo así hasta que alguna contingencia ambiental permitiera el establecimiento de una simbiosis mutualista interdependiente. La hipótesis sugiere que algunas de las células de vida libre que lograron establecer una relación simbiótica de este tipo con el protoeucarionte fueron bacterias púrpuras facultativas (similares a *Paracoccus*), lo que permitió al hospedero aprovechar el metabolismo aerobio de su nuevo endosimbionte y tolerar el oxígeno libre, que incrementó su concentración atmosférica debido a la fotosíntesis oxigénica cianobacteriana. De ese modo la alta producción de ATP por el simbiote, debido a la fosforilación oxidativa dependiente de oxígeno, proveyó el beneficio para el hospedero, al poder disponer de un gran aporte energético extra, convirtiéndose la bacteria en el ancestro directo de la mitocondria. En cambio, la bacteria simbiote se benefició al tener una fuente continua de compuestos oxidables del hospedero (como lactato o piruvato), sustituyendo la obtención irregular de dichos compuestos del ambiente. Análogamente, este nuevo tipo de célula (eucariontes aerobios) por medio una posterior relación simbiótica con cianobacterias, adquirió la capacidad fotosintética que eventualmente derivó en la aparición de los cloroplastos. De un modo similar también se propuso que las estructuras de movilidad, llamados

undulipodia, son también el resultado de una diferente asociación simbiótica del protoeucarionte ancestral con bacterias parecidas a las del género *Spirochaeta*. Datos recientes sobre la comparación de secuencias genómicas y génicas han revelado discrepancias entre las filogenias reconstruidas a partir de diversos genes (Gupta & Golding, 1996, Brown y Doolittle, 1997, Ribeiro y Golding, 1998). Esto ha dado como resultado la propuesta de un origen quimérico por fusión del eucarionte ancestral, ó nucleocitoplasma en el esquema de la TSE. Esto podría explicar las características en mosaico que presentan los eucariontes actuales, donde se distinguen algunos aspectos que los relacionan con arqueas (mecanismos de replicación, transcripción y traducción), y con bacterias (metabolismo energético), respectivamente (Golding y Gupta, 1996, Feng et al 1997, Jain et al, 1999). En este nuevo contexto, la propuesta inicial de Margulis se ha modificado con un nuevo paso inicial: en un medio anaerobio ocurrió una asociación entre un arqueano que carecía de pared celular, pero tenía un sistema endomembranal (como *Thermoplasma acidophilum*) y una bacteria fermentadora (como *Spirochaeta*), dando lugar a una fusión genómica permanente, originando la naturaleza quimérica de los componentes de la rama eucarionte. Con esto es posible explicar, simultáneamente, las discrepancias en las filogenias moleculares dependiendo del origen del gen ancestral

que se compare (Margulis, 1996). En la figura 2 se esquematiza la teoría serial de endosimbiosis.

Si bien el origen por fusión podría explicar algunos aspectos de la biología eucarionte, es importante abordar con mayor detalle las evidencias que han conducido a elaborar esquemas donde el origen de los eucariontes ocurrió después de una fusión entre procariontes.

El origen quimérico por engoblamiento y fusión genómica

A partir de los trabajos iniciales de Woese (1987) la elaboración de filogenias moleculares tomo gran relevancia en la biología y desde entonces se han generado grandes bases de datos que han permitido la aparición de árboles filogenéticos cada vez más robustos (Brown & Doolittle, 1997). Es durante la primera mitad de los años noventa cuando surgen algunos datos que discrepan de la propuesta inicial de Woese (Woese, 1987), apuntalada por Iwabe y Gogarten (1989). Básicamente existen algunos resultados que no favorecen una relación filogenética entre los linajes *Archea* y *Eucarya*, como para que puedan ser considerados como grupos hermanos, separados de la rama bacteriana (Gupta, 1995, Brown y Doolittle, 1997, Doolittle y Hardy, 1998). Uno de los ejemplos importantes es el de las proteínas de choque térmico de 70 KDa (Hsp70), donde el análisis de secuencias demostró la existencia de varias copias homólogas del gene en eucariontes. Dichos genes codifican para proteínas que

se localizan en diferentes compartimentos celulares (citoplasma, RER, mitocondrias y cloroplastos, respectivamente). Es claro que las proteínas de citoplasma y RE son productos de genes parálogos y que poseen un segmento característico (27 aminoácidos) en la secuencia que los relaciona directamente con los genes homólogos de bacterias Gram-negativas, pero que los separa de los homólogos de bacterias Gram-positivas y arqueanos (Gupta & Golding, 1996), que no poseen el mencionado segmento. La evidencia mencionada, apoyada con análisis completos de secuencia (Gupta et al, 1994), permite suponer, por un lado, una relación filogenética entre bacterias Gram-negativas y eucariontes y bacterias Gram-positivas con arqueanos por otro (Gupta et al, 1994b). Asimismo, análisis similares efectuados con diversos genes muestran filogenias con el mismo esquema *anómalo*: la glutamato deshidrogenasa (Benachenhou-Lahfa, et al, 1993), la glutamina sintetasa (Brown et al, 1994), la ferredoxina, la aspartato aminotransferasa, la fosforibosil-formilglicinamidina sintetasa (Gupta y Golding, 1996) y las aminoacil tRNA sintetisas (Doolittle y Hardy, 1998). Sin embargo, como se sabe, existe otro número de genes que apoya la visión típica donde los arqueanos agrupan junto con los eucariontes en una rama separada de las bacterias (Gupta y Goding, 1996, Brown y Doolittle, 1997, Doolittle y Handy, 1998).

Considerando que los resultados obtenidos no son producto de un intenso transporte horizontal de genes o comparaciones entre genes no ortólogos (los genes ortólogos son genes homólogos que han divergido después de un evento de especiación y son los que deben emplearse para la construcción de filogenias confiables), se propone que el origen del núcleo eucarionte tuvo lugar mediante una fusión celular, después de que una bacteria Gram-positiva, carente de pared celular, logro rodear (englobar) completamente a su simbionte arqueano (*Crenararchaea*) por medio de numerosas proyecciones de la membrana plasmática. Llegó un momento en que la membrana englobada se separó de la membrana celular bacteriana, generando pliegues internos alrededor del arquea; en este momento es posible que el endosimbionte tendiera a perder su propia membrana, ya que resultaba redundante. Lo anterior podría explicar la inexistencia de lípidos tipo arqueano en los eucariontes actuales (Gupta y Golding, 1996).

El genoma arqueano, rodeado de pliegues debió convertirse en el núcleo de la nueva célula y las membranas en el RE, pero antes de esto debieron duplicarse los genes de Hsp70 y demás chaperonas (citoplásmicas y de RE) que participan activamente en los mecanismos de tráfico de proteínas, fundamental en la biología eucarionte (Gupta y Golding, 1996). Finalmente, el genoma de la bacteria hospedera original debió ser transferido al

nuevo compartimento, el núcleo, tal vez por sistemas similares a los que han transferido genes de organelos hacia el genoma nuclear.

En el esquema de la teoría por fusión los eucariontes actuales son el resultado de una selección intergenómica inicial (Gram-negativa – arqueano) que se refleja en un mosaico bioquímico y celular entre características bacterianas y arqueanas, debido a la *mezcla* génica de los ancestros. Esta mezcla no lo es en el sentido estricto de la palabra, por ejemplo, sabemos que los mecanismos de manejo de la información genética y su expresión son de naturaleza arqueana, interpretando que la selección de genes pudo darse, inicialmente, por bloques, facilitando así su funcionamiento. No se debe dejar de considerar que los eucariontes modernos poseen genes que provienen de otros simbiontes bacterianos (mitocondrias, cloroplastos) posiblemente posteriores al sugerido evento de engoblamiento, y que dificultarían este tipo de análisis.

Existen modelos previos similares donde se ha sugerido la fusión u otro tipo de asociación de bacterias y arqueanos para la aparición de los eucariontes (Zillig, 1991, Lake y Rivera, 1994, Sogin, 1991), todos elaborados para explicar las características de los actuales eucariontes y que, en mayor o menor grado, comparten con los dos grandes grupos de procariontes.

La idea de Gupta y Golding (1996) indica que los eucariontes provienen de un solo

evento de fusión, ya que se pueden encontrar los genes de Hsp70 similares a Gram-negativas en todos los eucariontes, incluidas ramas antiguas, como metamonadidos (Gupta, 1994b) y no muestran relación directa con lo encontrado en otro tipo de genes homólogos bacterianos (α -protobacterias) para poder argumentar un transporte horizontal de genes anterior o simultáneo a la adquisición de los ancestros mitocondriales como simbioses (ver figura 3).

Las hipótesis por simbiosis metabólica

En años recientes se han elaborado nuevas ideas sobre el origen de los eucariontes que han tomado en cuenta fenómenos que ocurren, o que pudieron ocurrir, en las comunidades microbianas, dando una gran relevancia a los fenómenos mutualistas, conocidos como simbiosis metabólica o *sintrofia* (Lopez-Gracia y Moreira, 1999). De manera similar a las hipótesis anteriores de origen por englobamiento o fusión, estas propuestas pretenden explicar las características del mosaico génico que manifiestan los eucariontes. Existen dos propuestas similares basadas en la posible asociación entre arquea metanógenas y protobacterias facultativas ocurridas en un medio anaerobio. Si bien esta premisa coincide con algunas propuestas anteriores, es claro que se tienen nuevas perspectivas al considerar ahora la genómica comparativa junto con la

ecología microbiana, fortaleciendo así sus posiciones. Describiremos ambas.

La hipótesis del hidrógeno

Un importante punto de partida de esta idea es el conocimiento de los diversos tipos de metabolismo eucarionte moderno para la obtención de energía. Es posible considerar tres diferentes tipos de organismos en forma general: amitocondriados, amitocondriados con hidrogenosomas y mitocondriados (Martin & Muller, 1998). La elección de este contexto obedece a la falta de elementos en otras hipótesis, a juicio de los autores, que expliquen, por un lado, la existencia de genes y metabolismo de tipo bacterianos en organismos amitocondriados; la ausencia de estructuras citológicas en arqueanos que sean homólogas a las existentes en eucariontes (teoría serial de endosimbiosis) y por otro lado, la explicación del origen de otras estructuras eucariontes diferentes al núcleo y retículo endoplásmico (origen por fusión o englobamiento). Es claro que en ideas previas se ha manifestado explícita o implícitamente que el hospedero del ancestro mitocondrial era un eucarionte (protoeucarionte) heterótrofo y con un metabolismo anaerobio, las ideas de Muller y Martín, modifican profundamente esta visión.

La hipótesis del hidrógeno pretende explicar simultáneamente las características de los diferentes metabolismos eucariontes actuales, además considera y fundamenta el origen

común de mitocondrias e hidrogenosomas, que ya había sido propuesto anteriormente (Muller, 1993, Horner *et al.*, 1996. Germot *et al.*, 1996), mediante la evidencia que sugiere el origen bacteriano de la mayoría de las enzimas (genes) involucradas en el metabolismo energético eucarionte (Hrdý y Müller, 1996). Así, derivan algunas suposiciones fundamentales: todos los eucariontes actuales descienden de un ancestro que mantuvo asociados a los simbioses ancestrales de mitocondrias e hidrogenosomas; la existencia de eucariontes amitocondriados es producto de una pérdida secundaria del organelo, sin embargo, es posible localizar genes, hoy parte del genoma nuclear, que los relacionan directamente con el pasado bacteriano del simbiote (Horner *et al.*, 1996, Germot *et al.*, 1996, Roger *et al.*, 1998, Martín-Embley, 1998).

Una de las suposiciones más aceptadas en la historia de los eucariontes es la relación entre el ancestro mitocondrial y las α -protobacterias, derivado esto del análisis de secuencia del 16S rRNA (Yang, *et al.* 1985, Gray y Lang, 1999). La evidencia anterior también es parte medular de la propuesta, pero se han modificado profundamente las situaciones que se han considerado clásicas para el establecimiento de la simbiosis, y que se basan en el supuesto aporte de ATP (producido por un metabolismo aerobio) del simbiote bacteriano al hospedero arqueano heterótrofo e incapaz de un

metabolismo aerobio. El modelo clásico (SET) contiene suposiciones poco plausibles que señalan a la disponibilidad de energía como la principal causa para la consolidación de la relación simbiótica: no hay porque esperar que el hospedero tuviera un metabolismo con deficiencias energéticas y tampoco la existencia de un mecanismo en el simbiote bacteriano que le permitiera expulsar ATP al exterior. La hipótesis del hidrógeno surge como una alternativa que se sustenta en nuevos criterios energéticos como fundamentales para que ocurriera una asociación simbiótica; se basa también en una simbiosis arqueano-bacteria para el origen del linaje eucarionte, considerando que la bacteria participante en la asociación fue la misma que dio origen a las mitocondrias, una α -protobacteria, pero en un contexto distinto al comúnmente aceptado. Como lo indica su nombre, la propuesta asume que la disponibilidad de hidrógeno en el medio fue la llave metabólica para la simbiosis. Veamos.

Existe evidencia de que gran parte de las enzimas involucradas en el metabolismo energético eucarionte, aun en organismos amitocondriados, son codificadas por genes de origen bacteriano (Keeling and Doolittle, 1997, Rosenthal *et al.*, 1997). Esto permite suponer que todos los eucariontes descienden de un ancestro que mantuvo una relación simbiótica con algún tipo de bacteria facultativa, misma que dio origen a las mitocondrias,

hidrogenosomas y a las enzimas necesarias para la obtención de energía en organismos amitocondriados. En la actualidad, algunas protobacterias de la división α poseen un metabolismo energético facultativo que recuerda al encontrado en eucariontes (glucólisis, ciclo de Krebs, cadena respiratoria, ferredoxina óxido-reductasa e hidrogenasas). Descartando al ATP como el intermediario principal de la simbiosis y considerando un contexto sintrófico, el simbiote protobacteriano solo podría *ofrecer* a un hospedero arqueano CO_2 , acetato e H_2 , dependiendo de las condiciones (aerobiosis o anaerobiosis), a cambio de compuestos reducidos de carbono, utilizados por este tipo de bacterias. Sin embargo, entre los arqueanos conocidos solo existen dos tipos que producen como desecho compuestos reducidos de carbono: los fermentadores y los metanógenos. Así el panorama se restringe: es poco probable una simbiosis entre un arqueano fermentador y una protobacteria facultativa, pues existiría competencia. En este marco solo quedaría un camino para la simbiosis: un arqueano metanógeno asociado una α -protobacteria metanótrofa. No obstante, el tipo de metabolismo bacteriano que emplea metano solo se da en organismos aerobios estrictos, y es esta última característica la que impide pensar en esta asociación, pues la metanogénesis arqueana solo ocurre en

anaerobiosis. No existen evidencias que apoyen esta posibilidad, ya que muy difícilmente encontraríamos organismos con estos metabolismos compartiendo un mismo hábitat. Pero el metano no necesariamente sería la única conexión. El otro aspecto metabólico considerado es el hidrógeno libre. Algunos arqueanos metanógenos anaerobios (litoautotróficos estrictos) emplean H_2 , por un lado, y CO_2 como única fuente de carbono, que en este caso son productos de desecho del metabolismo anaerobio de las ya mencionadas α -protobacterias. Adicionalmente, la metanogénesis arqueana solo ocurre en ausencia de oxígeno libre. Parece convincente una sintrofia en este análisis teórico, basado en la bioquímica comparada dentro de un contexto ecológico. Aquí cabe un fuerte punto a favor de la propuesta: en medios anaerobios existen actualmente asociaciones metabólicas similares entre metanógenos y productores de hidrógeno. La asociación debió ocurrir en un medio anaerobio donde el arqueano metanógeno dependía inicialmente de una fuente geológica de CO_2 y H_2 y la α -protobacteria empleaba un metabolismo que oxidaba compuestos orgánicos con la liberación concomitante de CO_2 y H_2 . Si por alguna razón la fuente geológica de gases se agotara, sería provechoso para el arqueano la asociación con la bacteria para utilizar los productos secundarios (CO_2 y H_2), volviéndose dependiente

Incluso de la cercanía física y evitar la disipación de los gases. De esta forma, una extensión de la membrana plasmática alrededor de las bacterias favorecería al arqueano, sin embargo, un aislamiento del simbiote bacteriano del medio impediría la toma de sustratos oxidables. En esa situación sería necesario que al arqueano, ahora hospedero, pudiera proveer al endosimbionte de estos sustratos. Lo anterior pudo darse por la transferencia desde la bacteria al hospedero arqueano de los genes responsables de los mecanismos del transporte de carbohidratos, y que estos se expresaran correctamente en la membrana del hospedero, otra posibilidad pudo ser un rearrreglo funcional de los sistemas acarreadores propios del hospedero.

Un problema que debió resolverse fue el flujo de las vías metabólicas, ahora coexistentes, pues debieron generarse ciclos fútiles, como el empleo inverso del ATP respecto al metabolismo de los carbohidratos y el tráfico de dichos compuestos. Para solucionarlo debieron aparecer mecanismos nuevos de regulación que redirigieran los sustratos hacia el simbiote o que, como lo indica la evidencia bioquímica y molecular, éste transfirió los genes encargados del metabolismo de los carbohidratos al genoma hospedero. Después fue necesario la supresión de alguna de las vías contrarias, una anabólica (del hospedero) y otra catabólica (endosimbionte), el único camino que

favorecería la simbiosis sería la pérdida de la ruta biosintética del arqueano (Martin y Muller, 1998).

Al evolucionar de este modo, la asociación simbiótica transformó al hospedero autótrofo, pero dependiente de H_2 y CO_2 , en un heterótrofo a expensas del metabolismo adquirido del simbiote. Posteriormente la metanogénesis pudo perderse al ser remplazada por un metabolismo versátil (gracias a naturaleza facultativa de la protobacteria simbiote), que en la actualidad vemos reflejado en la fosforilación oxidativa dependiente de O_2 en mitocondrias y los metabolismos anaerobios de hidrogenosomas y eucariontes sin organelos.

Como se mencionó al principio tenemos una hipótesis que explica los diversos metabolismos eucariontes con relación al origen bacteriano del endosimbionte. La propuesta recurre también a una explicación basada en la transferencia de genes de la bacteria al hospedero. Con el tiempo esta asociación divergió para dar origen a los distintos tipos de metabolismos energéticos eucariontes. Un esquema del proceso se ilustra en la figura 4.

Es claro que esta hipótesis no aborda el origen de otras estructuras eucariontes fundamentales para la definición del grupo, como la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico. En el caso del citoesqueleto, se propone que éste no es necesario para un organismo autótrofo (como un arquea metanógeno), y que el

origen de esta estructura fue posterior. Por otro lado, se sugiere que el origen de la asociación arquea-metanógeno con el ancestro bacteriano de la mitocondria-hidrogenosoma, es simultáneo a la aparición del linaje que derivó directamente en los eucariontes, y también el hecho de no suponer la existencia de una membrana nuclear se debe a que todo el proceso de simbiosis ocurrió en un estado similar al de la *mitosis abierta* (los cromosomas *libres* en el citoplasma), que ocurre en el ciclo celular de los eucariontes modernos.

La hipótesis *sintrófica*

De manera similar e independiente de la propuesta previa, esta idea retoma la estrecha relación que pudo ocurrir entre arqueanos metanógenos y protobacterias en el origen de los eucariontes. Sin embargo, el análisis de los datos disponibles y las ideas que surgen son considerablemente distintos (Moreira & López-García, 1998).

Para Moreira y López, las hipótesis actuales de fusión genómica o englobamiento (Zillig, 1991, Gupta & Golding, 1996) entre arqueanos (*Crenarchaea*) y algún tipo de bacterias para el origen de los eucariontes presentan algunos puntos débiles: en la actualidad no se conocen asociaciones simbióticas de este tipo, además, tampoco conocemos alguna variedad de bacterias Gram negativas capaces de fagocitar, tal y como se ha sugerido en las hipótesis de englobamiento. La alternativa planteada se

basa en el hecho que para argüir una asociación *sintrófica* puede que no se requieran demasiados supuestos difíciles de comprobar, como en el caso de una fusión genómica, que también implica la compatibilidad génica (duplicación, transcripción y traducción similares), que es poco probable exista en grupos tan distantes, aunque tal vez no lo eran tanto hace 2, 500 millones de años.

El tipo de simbiosis existentes entre arqueanos y bacterias en el marco del origen de los eucariontes remite a los autores a la asociación mutualista (ya mencionada en otra hipótesis), entre protobacterias productoras de hidrógeno y arqueanos metanógenos, que ocurre con frecuencia en ambientes anaerobios o microaerobios (López-García y Moreira, 1999). Para que la asociación mutualista funcione, se requiere de la formación de consorcios microbianos, lo que implica la estrecha relación física entre los socios, favorecida por la producción de mucilagos adherentes. Un hecho importante es que en este tipo de simbiosis actuales el tipo de protobacterias asociadas con arquea metanógenas pertenecen normalmente a la rama δ (no a la α como se entiende en la hipótesis del hidrógeno) tales como *Desulfovibrio* o *Sintrophobacter*, ambas reductoras de azufre.

Una de las ideas más interesantes, considera que el ancestro arqueano que participó en el consorcio pertenecía a la rama *Euryarchaea*, esto es diferente a lo

sugerido en otras propuestas, donde se postula a la rama *Crenarchaea* (Rivera y Lake, 1992, Gupta y Golding, 1996). La evidencia que apoya lo anterior se basa en varios puntos: el primero se debe a la similitud estructural y de secuencia entre el tipo de histonas H3 y H4 presentes en eucariontes y proteínas homólogas existentes en metanógenas del grupo *Euryarchaea* (matanococales y metanobacteriales), lo que relaciona a ambos grupos, más aun si se considera que en bacterias y *Crenarchaea* no se han encontrado este tipo de proteínas. El siguiente punto se refiere a la existencia de proteínas homólogas a la topoisomerasa IV eucarionte en arqueanos, que no se han encontrado en bacterias. Relacionado con lo anterior, también se menciona la distribución de la actividad de superenrollamiento de algunas topoisomerasas, que permite ver un gradiente de expresión, donde la actividad de girasa reversa aparece como un rasgo de hipertermofilia entre las *Euryarchaea*, y aunque es posible encontrar los genes de la girasa reversa en metanógenas termófilas y mesófilas, éstas solo poseen girasas normales. Interesantemente, existe una especie (*Metanobacterium thermoautotrophicum*) que no tiene ninguna de las dos actividades, sino que, como ocurre en eucariontes, solo presenta topoisomerasas de relajamiento e histonas. Basándose en estos datos la sugerencia es que la aparición de las histonas, junto con la modificación en la

actividad de topoisomerasas en metanógenas termófilas o mesófilas, son rasgos que relacionan al grupo *Euryarchaea* con los eucariontes. Finalmente, el tercer punto se refiere a la naturaleza de los lípidos de la membrana plasmática, normalmente punto débil para argumentar el origen arqueano del hospedero. Parece claro que los lípidos de algunas metanógenas euriarqueales presentan una estructura con uniones tipo éster, típicas de eucariontes, a diferencia de lo encontrado en otros arqueanos, donde el tipo de unión es éter de glicerol-isoprenos. También se han encontrado similitudes en la estructura de algunas cabezas polares.

El simbiote bacteriano, como ya se dijo, es ubicado en la rama de las δ -protobacterias, específicamente se menciona a las mixobacterias, las cuales presentan varias características bioquímicas y metabólicas compartidas con eucariontes, como son la presencia de cinasas de treonina y serina, ciclos del fosfatidilinositol, posiblemente con participación de proteínas G, existencia de transcriptasa reversa; así como ciclos celulares complejos, donde se desarrollan complicados estadios de asociación, lo que en un tiempo llevo a clasificarlas como hongos (Moreira & López García, 1998).

El establecimiento de la asociación debió ocurrir en un medio anaerobio, donde metanógenas y δ -protobacterias reductoras de azufre mantenían, tal y

como ocurre ahora, una relación mutualista dentro de un consorcio microbiano. El contacto directo entre proyecciones de la membrana plasmática de ambos simblontes favorecía el intercambio de CO_2 y H_2 (productos del metabolismo anaerobio de la reducción del sulfato) desde la protobacteria hacia el arqueano metanógeno, de manera similar a lo propuesto por la hipótesis del hidrógeno. Debido a que se encontraban dentro de un consorcio, donde la cantidad de células de ambos tipos era elevada (Moreira y López-García, 1998), es probable que las bacterias se asociaran alrededor del arqueano mediante el desarrollo de invaginaciones acopladas con la membrana de la metanógena.

Más adelante, pudo suceder una fusión membranal de las bacterias dando como resultado una célula metanoarqueana rodeada de una capa bacteriana continua. En un estado como el mencionado, debió ocurrir la pérdida de una de las membranas plasmáticas. Cualquiera de los dos casos puede explicarse si se recurre a la conservación de alguna de las maquinarias de síntesis de lípidos y la posterior interacción de sus productos. Sin importar cual membrana se perdió, la hipótesis propone que el remanente de la célula arqueana rodeada por una gran cantidad de pliegues membranales dio origen a las estructuras precursoras del núcleo y el retículo endoplásmico.

El contacto entre ambos citoplasmas favoreció, por mecanismos aun no claros,

el flujo de genes, preferentemente desde las bacterias hacia el arqueano, generando en algunos casos un *reemplazo simbiótico de genes*, cuando genes bacterianos pudieron sustituir en función a sus homólogos del genoma hospedero. Sin embargo, esto no ocurrió en todos los casos: las enzimas que mantenían un gran número de interacciones con otros complejos proteicos o enzimáticos, no pudieron ser reemplazados fácilmente, debido a ello hoy encontramos algunas vías fundamentales con características relacionadas con solo uno de los ancestros (Jain et al., 1999). La simbiosis se convirtió en una asociación obligada al transferirse los genes de vías completas o enzimas clave de algunas rutas importantes. Los fenómenos mencionados llevaron al surgimiento de un genoma de mayor tamaño y ubicado en compartimento membranal, que codificaba las enzimas para un metabolismo básicamente bacteriano y un procesamiento de la información tipo arqueano, tal como sucede en los eucariontes modernos.

En algún momento de la formación del nuevo tipo celular el consorcio perdió totalmente la capacidad metanogénica, debido probablemente a que adquirió un nuevo metabolismo muy eficiente que tornó en poco ventajoso el ser autótrofo. En este punto toma importancia la aparición de la mitocondria: algunas α -protobacterias son metanótrofas en anaerobiosis o aerobiosis, así que

posiblemente algunas bacterias de éste tipo también formaban parte del consorcio, empleando el metano liberado por el eucarionte primitivo, tal como ocurre actualmente. En tal caso, el metabolismo aeróbico de los eucariontes se debe a que en el momento que comenzó a elevarse la concentración de oxígeno libre en la atmósfera, ya poseían el repertorio aerobio de la α -protobacteria, que se manifestó y llevó a los eucariontes a sustituir la metanogénesis anaerobia por la fosforilación oxidativa. Este posible fenómeno debió ocurrir en el grupo ancestral, pues algunos desarrollaron hidrogenosomas anaerobios derivados del mismo ancestro α -protobacteriano. Pareciera que la asociación endosimbiótica que originó la mitocondria es independiente de la *presión selectiva* del oxígeno y de la *versatilidad* que le pudo otorgar, en ese momento, un metabolismo aerobio al consorcio. Por lo anterior se propone que la capacidad de un metabolismo energético dependiente de oxígeno es un rasgo derivado en los eucariontes modernos. En la figura 5 se muestra un esquema del proceso.

Las hipótesis anteriores rescatan elementos importantes al profundizar en el metabolismo y ecología bacteriana, empleándolos como punto de partida para justificar sus ideas, incorporando datos importantes provenientes de la genómica. Además permiten elaborar esquemas con un menor número de suposiciones

tomando la evidencia de la microbiología actual. Ambas ideas coinciden en que el ancestro arqueano fue una metanógena autótrofa anaerobia asociada a una protobacteria facultativa, conviviendo en un medio anaerobio, o posiblemente microaerofílico. También suponen un origen simultáneo o muy cercano, de las mitocondrias (por diferentes procesos) al de la naturaleza eucarionte, restándole importancia a la presencia del oxígeno como un elemento fundamental en la simbiosis.

Una variante sobre hipótesis de fusión

En un trabajo reciente (Karin et al, 1999) es retomada la suposición del origen por fusión de los eucariontes, pero adicionando nuevos elementos y puntos de vista mediante el uso de métodos alternativos para estudios de comparación de secuencia. Se ha recurrido a un sistema experimental para la comparación de secuencias, pero no en el sentido típico de construcción de filogenias. Alternativamente, han empleado un concepto conocido como *firma genómica*, que se refiere a la frecuencia con que dos nucleótidos se localizan juntos en una secuencia particular respecto a lo esperado por el azar. Por trabajos previos existe la evidencia de que la firma genómica, dentro de un mismo genoma, se mantiene constante para distintos pares de nucleótidos en regiones diferentes y mayores a 50 nucleótidos, también se presentan diferencias significativas al confrontar estos datos con los obtenidos

de genomas distintos. De manera interesante, esta diferencia en la firma genómica disminuye entre especies cercanas y aumenta entre grupos distantes. Adicionalmente y como sustento teórico para la hipótesis, se ha comprobado que la similitud entre los valores de firma genómica son parecidos entre algunos virus y sus hospederos, así como entre plásmidos y los receptores potenciales del vector.

Empleando lo anterior como marco teórico, se calcularon las firmas genómicas de diversos genomas procariontes (*Bacteria* y *Archaea*) y mitocondriales, así como las diferencias promedio en firma genómica (δ) entre dos genomas distintos a y b ($\delta_{a,b}$). Esto permitió obtener valores numéricos que pueden ofrecer información sobre la similitud existente entre firmas genómicas, que pueden ir desde *muy similares* ($\delta < 50$) y *moderadamente similares* ($55 > \delta < 85$) a *lejanas* ($150 > \delta < 185$), pasando por *poco similares* ($90 > \delta < 115$) y *lejanamente similares* ($120 > \delta < 145$). La hipótesis sugiere que una mayor similitud entre firmas genómicas indica la existencia de una mayor *compatibilidad génica*, lo que debe entenderse como la coexistencia funcional de dos o más genomas, mediante la transferencia exitosa de genes, lo que implica la expresión correcta del gen, funcionalidad de las proteínas producidas en el hospedero y posiblemente interacción

directa de los procesos informacionales (transcripción y duplicación).

Los resultados de la comparación muestran que bacterias Gram positivas del género *Clostridium* y arqueanos (*Crenarchaea*) del género *Sulfolobus* tienen una *similitud moderada* de firmas génicas entre sí, y más que ningún otro grupo con DNA mitocondriales animales. Esto indicaría una compatibilidad génica potencial entre organismos ancestrales de *Clostridium* y *Sulfolobus*, y de las mitocondrias. Estos mismos tipos de análisis alejan a las α -proteobacterias de la posibilidad de ser los ancestros de las mitocondrias.

La propuesta concreta es que una fusión genómica entre organismos relacionados con *Clostridium* y *Sulfolobus*, respectivamente, ocurrió como un paso anterior al origen de los eucariontes, ya que encontramos rastros de sus firmas genómicas en DNAs mitocondriales actuales.

Existen datos bioquímicos y celulares empleados para fortalecer la idea de que una fusión entre una bacteria tipo *Clostridium* y un arqueano similar a *Sulfolobus* dio origen al grupo eucarionte: es posible un complemento entre el metabolismo anaerobio estricto de *Clostridium* que libera acetato, CO_2 y H_2 mediante la degradación de compuestos orgánicos, empleando el tipo de enzimas que hoy podemos observar en los hidrogenosomas. Asimismo, este gas

pudo ser utilizado por un metabolismo similar al de *Sulfolobus* (un ancestro anaerobio, considerando que la mayoría de los arquea de este grupo son aerobios y no se localizan en sitios en los que habitan bacterias anaerobias similares a *Clostridium*) que es capaz de emplear el hidrógeno como donador de electrones primario en su cadena respiratoria para reducir azufre a H₂S, además de que posee citocromos y quinonas, así como enzimas del ciclo de Krebs, lo que podría parecer una conexión con el metabolismo mitocondrial. Otra opción podría ser la utilización del acetato por medio del ciclo de Krebs, que como se mencionó, existe en *Sulfolobus*. Adicionalmente, algunos arqueanos sulfolobales no poseen pared celular, lo que pudo favorecer una fusión mediante una membrana plasmática flexible que presenta lóbulos prolongados e irregulares. Los miembros del género *Clostridium* tienen la capacidad de generar endoesporas, que en un contexto de fusión pudo permitir la aparición de compartimentos que pudieron dar origen al sistema endomembranal del eucarionte ancestral. De este modo pudo existir una quimera celular derivada de la fusión *Clostridium-Sulfolobus*, donde se llevó a cabo un intenso intercambio de genes entre los dos genomas originales, favorecido por el complemento metabólico y la compatibilidad genómica existente, manteniendo una asociación simbiótica estable que permitió la selección,

sustitución y pérdida de genes redundantes.

Después de ocurrida la fusión, la célula quimérica poseía dos genomas rearrreglados y compatibles que intercambiaban genes entre sí constantemente. Bajo ciertas condiciones se generaron endoesporas, por las características celulares heredadas de *Clostridium*, de esta forma la aparición de los septos intracelulares funcionó como un mecanismo que separó los dos genomas, compartimentalizándolos dentro de estructuras de doble membrana derivadas de las endoesporas. Ahora, los dos genomas separados físicamente, uno que conservaba mayormente información original de *Clostridium* y otra el remanente de *Sulfolobus*, divergieron, manteniendo la compatibilidad génica, pero dando origen al genoma nuclear y al núcleo, por un lado, y a las mitocondrias, por otro, respectivamente. Sin embargo otro tipo de evidencia bioquímica y celular, obliga a sugerir nuevas y diferentes transferencias horizontales de genes desde otros tipos bacterianos (posiblemente de α -proteobacterias), antes de que el oxígeno se volviera abundante y que proporcionaron al eucarionte primitivo los elementos génicos para el desarrollo posterior del metabolismo mitocondrial, pues en los ancestros propuestos (*Clostridium*, *Sulfolobus*) no se encuentran, por ejemplo, los genes que codificantes de

muchas de las proteínas de la cadena respiratoria.

Por otro lado, también se contempla que la *degeneración* de la proto-mitocondria debida la continua exportación de genes hacia el núcleo y un metabolismo predominantemente anaerobio, llevó a que solo se conservaran enzimas como la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa y la hidrogenasa, participantes del metabolismo anaerobio de *Clostridium*, que finalmente dieron origen al metabolismo del hidrogenosoma eucarionte. Esta hipótesis sugiere un origen común para la formación del compartimento membranal que dio lugar tanto a mitocondrias como a hidrogenosomas, pero arguye que la naturaleza del metabolismo actual de ambos organelos proviene de distintas fuentes y no son resultado completo de un origen genómico común.

La naturaleza de los simbioses propuestos difiere totalmente del propuesto por las otras hipótesis. Se trata de resolver el problema de la fusión empleando el concepto, de la *firma genómica*, que debió tener gran importancia en el éxito de la coexistencia funcional de genes provenientes de organismos distintos.

Conclusiones y perspectivas

La idea del origen por simbiosis de los eucariontes es parte constitutiva de la biología contemporánea, y hoy que tenemos acceso a grandes bases de datos donde se aglutinan secuencias de

alrededor de 20 genomas microbianos completos (Pennsi, 1999), se abren nuevas expectativas para profundizar cada vez mas en análisis de la información en un contexto evolutivo. De la misma manera, el empleo de los conocimientos sobre ecología microbiana y los mecanismos de transferencia de genes deben aportar mucho en el futuro cercano para esclarecer, o confundir, la historia evolutiva del linaje eucarionte. ¿Pero por que podría confundir?. Del fenómeno cada vez más evidente de filogenias disímiles, que no concuerdan con el modelo clásico de tres grandes linajes, surgen nuevas ideas: la evolución de los grupos celulares ha sido fuertemente afectada o dirigida por un intenso y continuo intercambio de genes (Jain, 1999). Este intercambio es de tal magnitud que hace prácticamente imposible discernir entre filogenias moleculares, pues tienden a mostrar la historia de grupos génicos y no de linajes celulares. Esto mostraría que la historia de la vida es tan compleja que no se puede representar en un árbol como el de rRNA. No obstante las objeciones anteriores sabemos que los árboles tradicionales son capaces de proporcionar explicaciones parsimoniosas para eventos clave sobre el origen de los eucariontes. En este sentido se ha sugerido que para conservar el marco de los árboles universales es necesario visualizar a los organismos como algo más que una suma de genes. Se debe entender como un continuo entre los aparentes linajes,

donde cada uno manifiesta propiedades emergentes que permiten reconocerlos, sin embargo, no pueden ser interpretados si no se contempla su historia conjunta. Normalmente, se tiende a identificar un grupo por los genes conservados al interior y no por los que comparte con otros (Doolittle, 1999). Tal vez una mejor forma de observar el árbol de la vida es como una red continua de conexiones entre los grupos debida a la transferencia de genes, tal como lo sugiere Martin (Martin, 1999).

Aun considerando la controversia sobre la validez de los arboles universales y ubicándonos dentro del esquema simbiótico, podemos encontrar algunos puntos coincidentes en las diversas hipótesis sobre el origen de los eucariontes: primero, debido al mosaico génico que poseen los eucariontes es muy posible que hayan ocurrido (una vez por lo menos) fusiones celulares entre arqueanos y bacterias, derivadas éstas de asociaciones simbióticas (sintróficas) en un medio anaerobio, o posiblemente microaerofílico. Segundo, dadas algunas evidencias génicas, es posible situar el origen de la mitocondria y/o los hidrogenosomas estrechamente relacionado con la aparición de los eucariontes, muy posiblemente estos organelos son descendientes de protobacterias simbioses. Las protobacterias son en su mayoría fototróficas, pero también las hay quimiolitotrofas y quimioorganótrofas. Constituyen el grupo más diverso dentro

del linaje *Bacteria*, existen grupos internos que se pueden diferenciar (ramas α , β , γ , δ y ϵ), y no obstante que aun hay puntos por precisar, el origen del metabolismo energético eucarionte proviene, muy probablemente, de un ancestro protobacteriano. Tercero, la evidencia actual indica que ha ocurrido un gran intercambio de genes en la historia de la evolución celular, propiciando la sustitución de elementos enzimáticos y reguladores, así como de vías completas en los organismos (genomas) receptores. Lo anterior, que puede ocurrir como un proceso independiente a la posible fusión celular y/o genómica, ha incrementado la capacidad de respuesta al medio del hospedero o la eficiencia de la asociación simbiótica en conjunto. Todavía resta por profundizar en los posibles mecanismos para la transferencia de genes, pero se sugiere que debió existir una compatibilidad genómica para que esto pudiera suceder.

La mitocondria y el hidrogenosoma

En las propuestas recientes, ya descritas, para el origen de los eucariontes se hace mención sobre el papel importante que pudo tener el ancestro mitocondrial en la aparición de los eucariontes. Las hipótesis sintróficas apoyan la idea previa de la relación estrecha que guardan hidrogenosomas y mitocondrias, sustentando esto se ha reportado recientemente (Akhmanova et al, 1998) la existencia de rRNA (rDNA) de tipo mitocondrial en un protista ciliado

amitocondriado (*Nycotherus ovalis*) que posee hidrogenosomas, además del sorprendente hallazgo de DNA en el propio hidrogenosoma, lo que refuerza la idea de un origen común de mitocondrias e hidrogenosomas a partir de un ancestro bacteriano. Esto abre una gran ventana en el estudio de los eucariontes: existen hidrogenosomas en diversos grupos eucariontes (ciliados, parabasalidos, percolozoarios, hongos) (Martin- Embley & Martin, 1998, Keeling, 1998), ¿Son estos organelos y sus genomas herencia de un solo ancestro mitocondrial que ha originado un metabolismo energético anaerobio similar varias veces en la historia del grupo?, ¿O se trata de casos separados de transferencia horizontal de genes?. El estudio de los genomas y/o de los genes individuales involucrados deberá aclarar este punto en el futuro.

Recientemente fue secuenciado el genoma completo de la α -protobacteria *Rickettsia prowasekii* de 1.1 Mb (Andersson et al, 1998) corroborando la evidencia de que las α -protobacterias, específicamente el grupo de *Rickettsia*, es el relacionado más estrechamente con el ancestro mitocondrial. Sin embargo la organización genómica es muy distinta, sugiriendo que los genomas mitocondriales y de *R.prowasekii* derivan por vías independientes de las α -protobacterias, por lo que será necesario avanzar en el conocimiento de distintos miembros del grupo de las protobacterias para conocer

mejor el posible ancestro de las mitocondrias (Gray, 1999). Aun cuando parece evidente la relación de las mitocondrias con las protobacterias tipo α , hay datos moleculares que muestran una discrepancia importante: Según el reloj molecular del rRNA el origen de la mitocondria ocurrió mucho antes (2,100 millones de años) de la separación del grupo de protobacterias del resto del linaje bacteriano (850 millones de años) (Sogin, 1997). Una posibilidad puede ser que las distancias evolutivas de los grupos eucariontes que hipotéticamente se separaron muy temprano estén sobrestimadas y en realidad no reflejan un periodo de tiempo tan largo; otra puede ser que el reloj molecular de las α -protobacterias no refleja claramente la antigüedad del grupo, o posiblemente debido a transferencias génicas horizontales.

Con un gran número de datos proveniente de diversas áreas de la biología hoy tenemos una idea contundente sobre de la importancia de la simbiosis en el origen de los eucariontes y el proceso evolutivo en general; pero dentro de esa gran hipótesis también podemos ofrecer evidencias precisas que apuntan a grupos y condiciones ecológicas particulares que permitieron la aparición de linaje *Eucarya*. Es necesario fortalecer los puntos en común de las diversas ideas y tener en mente, continuamente, la compleja red de conexiones génicas entre los organismos

evitando, en la medida de lo posible, la construcción de hipótesis *ad hoc* a partir de la transferencia horizontal de genes. Tarea muy difícil, sin duda.

Referencias

- Akhmanova, A., Voncken, F., van Allen, T., van Hoek, A., Boksmas, B., Vogels, G., Veenhuis, M., Hackstein, J.H.P. (1998). **A hydrogenosome with a genome.** *Nature* 396: 527-528
- Andersson S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A., Winkler, H.H. and Kurlan, C.G. (1998). **The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria.** *Nature* 396: 133-140
- Benachou-Lahfa, N., Forterre, P., Labedan, B. (1993). **Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life.** *J.Mol. Evol.* 36: 335-346
- Biagini, G.A., Finlay, DJ and Lloyd, D.(1997). **Evolution of the hydrogenosome.** *FEM Micr. Lett.* 155: 133-140
- Brown JR and Doolittle WF. (1997). **Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition.** *Micr. Mol. Biol. Rev.* 61(4): 456-502
- Brown, J., Masuchi, Y., Robb, F.T., and Doolittle, W.F. (1994). **Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes.** *J. Mol. Evol.* 38: 566-576
- De Long E. (1998). **Archaeal means and extremes.** *Science* 280: 542-543
- Doolittle R.F.(1998). **Microbiol genomes opened up.** *Nature* 392: 339-342
- Doolittle RF and Handy J. (1998). **Evolutionary anomalies among the aminoacyl-tRNA synthetases.** *Curr. Op. Gen. Dev.* 8: 630-636
- Doolittle WF. (1997). **Fun with genealogy.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12731-12753
- Doolittle WF. (1998). **A paradigm gets shifty.** *Nature* 392: 15-16
- Doolittle WF. (1999). **Phylogenetic classification and the universal tree.** *Science* 284: 2124-2128
- Doolittle WF.(1998). **You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes.** *Trends in Genetics* 14(8): 307-311
Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite entamoeba histolytica. *J. Bacteriol.* 179(11): 3736-3745.
- Feng DF, Cho, G and Doolittle RF. (1997). **Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation.** *Proc. Natl. Acad. Sci* 94: 13028-13033
- Germot, A., Philippe, H and Le Guyader, H. (1996). **Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14614-14617
- Gogarten JP., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L, Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T, Oshima, T, Konishi, J., Denda, K. and Yoshida, M. (1989). **Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implication of the origin of eukaryotes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6661-6665
- Gray MW, Burger, G and Lang, BF. (1999). **Mitochondrial Evolution.** *Science* 283: 1476-1481
- Gray MW. (1998). **Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection.** *Nature* 396: 109-110
- Gupta RS & Golding GB. (1996). **The origin of eukariotic cell.** *TIBS* 21: 166-171
- Gupta RS (1995). **Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins in the origin of eukaryotic cells.** *Mol. Microbiol.* 15 (1): 1-11

- Gupta, R.S., Aitken, K., Falah, M. and Singh, B. (1994). **Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91(8):2895-2899
- Gupta, R.S., Golding, G.B. and Singh, B. (1994)b. **Hsp70 phylogeny and the relationship between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes.** *J.Mol.Evol.* 39: 537-540
- Hilario E. and Gogarten JP. (1998). **The Prokariote-to-Eukaryote transitions reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits.** *J.Mol. Evol.* 46: 703-715
- Horner DS, Hirt, RP, Kilvington, S, Lloyd D., Martin Embley, T. (1996). **Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont.** *Proc. R. Soc. Lond.* 263: 1053-1059
- Hrdý, I. and Müller, M. (1996). **Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote, *Trichomonas vaginalis*.** *J. Mol. Evol.* 41: 388-396.
- Iwabe, N, Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S., Miyata, T. (1989). **Evolutionary relationship of achaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred phylogenetic trees of duplicated genes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9355-9359
- Jain, R., Rivera, MS. And Lake JK. (1999). **Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 3801-3806
- Karlin, S, Brocchier, L. Mrázek, J. Campbell, A.M. and Spormann A.M. (1999). **A chimeric prokaryotic ancestry of mitochondria and primitive eukaryotes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9190-9195
- Keeling, P.K.(1998). **A kingdom's progress: archezoa and the origin of eukaryotes.** *BioEssays* 20: 87-95
- Keeling, P.K., and Doolittle, W.F. (1997). **Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1270-1275.
- Knoll, A.H. (1992). **The early Evolution of the Eukaryotes: a geological perspective.** *Science* 256: 633-627.
- Lake, JA and Ribera MC. (1994). **Was the nucleus the first endosymbiont?.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2880-2881
- López-García, P and Moreira, D. (1999). **Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes.** *TIBS* 24: 88-93
- Margulis L. (1996). **Archaeal-eubacterial mergers in the origin of the eukarya: phylogenetic classification of life.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1071-1076
- Margulis, L. (1970). **Origin of eukaryotic cell.** Yale University Press, New Haven, C.T.
- Margulis. L. (1993). **Symbiosis in cell evolution** 2nd edition, WH Freeman & co.
- Martin Embley T. And Hirt, RP. (1998). **Early branchig eukaryotes?.** *Curr. Op. Gen. Dev.* 8: 624-629
- Martin Embley T. and Martin W.(1998). **A hydrogen producing mitochondrion.** *Nature* 396: 517-519
- Martin W and Muller M. (1998). **The hydrogen hypothesis for the first eukaryote.** *Nature* 392: 37-41
- Martin W. and Herrmann R.G.(1998). **Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, wath happens, an why?.** *Plant Physiology* 118: 9-17
- Martin W. and Schanarrenberger, C. (1997). **The evolution of the Calvin cycle: form pokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways trough endosymbiosis.** *Current Genetics* 32: 1-18
- Martin W.(1999). **Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes** *BioEssays* 21: 99-104
- Mayr E. (1998). **Two empires or three?.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9720-9723

- Mereschkowsky, C. (1905). **Über natur und ursprung der chromatophores in pflanzenteilen.** *Biol Zentralbl* 25: 593-635
- Moreira, D and López-García P. (1998). **Symbiosis between methanogenic Archaea and δ -proteobacteria as the origin of Eukariotes: The syntrophic hypothesis.** *J. Mol. Evol.* 47: 517-530.
- Muller, M. (1993). **The hydrogenosome.** *J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889
- Pennisi, E. (1999). **It is time to uproot the tree of life?.** *Science* 284: 1305-1307
- Pulher, G. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci* 86: 4569-4573
- Ribeiro S & Golding GB. (1998). **The mosaic nature of the eukariotic nucleus.** *Mol. Biol. Evol.* 15(7): 779-788
- Rivera, M.C. and Lake J.A. (1992). **Evidence that eukaryotes and eocyte prokaryotes are immediate relatives.** *Science* 257: 74-76
- Roger, AJ, Graham Clark, and Doolittle, WF. (1998). **A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14618-14622
- Roger, AJ, Svard, SG, Tovar, J, Graham Clark, C, Smith, MW, Gillin, FD, Sogin, ML (1998). **A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 229-234
- Rosenthal, B, Mai, Z., Caplibski, D., Ghosh, S., De la Vega, H., Graf, T and Samuelson, J. (1997).
- Sánchez, LB, Hashimoto T, Muller, M (1996). **Sequence of malic enzyme gene of *Giardia lamblia*.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 82: 145-151
- Sogin Ml. (1997). **History assignment: when was the mitochondrion founded?** *Curr. Op. Gen. Dev.* 7: 792-79
- Sogin, M.L., (1991). **Early evolution and the origin of eukaryotes.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 457-466
- Szathmary E and Smith JM. (1995). **The major evolutionary transitions.** *Nature* 374: 227-232
- van der Giezen, M, Sjollema, KA, Artz, RRE, alkema W and Prins RA. (1998). **Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome.** *Current Genetics* 33: 131-135
- van der Giezen, M., Kiel, J.A.K.W., Sjollema, K.A. and Prince, R.A. (1998). **The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the mehylotrophic yeast *Hansenulla polymorpha*.** *Curr. Genet.* 33: 132-135
- Vellai T, Takács, K. and Vida, G. (1998). **A new aspects to the origin and evolution of eukaryotes.** *J. Mol. Evol.* 46: 499-507
- Woese C.R. (1998). **Default taxonomy: Ernst Mayr's view of the microbial world.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 11043-11046
- Woese, C.R. (1987). **Bacterial evolution.** *Microbiol. Rev* 51: 221-271
- Woese, CR, Kandler, O, Wheelis, ML. (1990). **Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576-4579
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, GJ, Woese, CR. (1985). **Mitochondrial origins.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4443-4447
- Zillig, W. (1991). **Comparative biochemistry of archaea and bacteria.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 544-551
- Zuckerandl, E. and Pauling, L.. (1965). **Molecules as documents of evolutionary history** *J. Theor. Biol.* 8: 357-366

Bacteria

Archaea

Eukarya

Crenarchaeota

Euryarchaeota

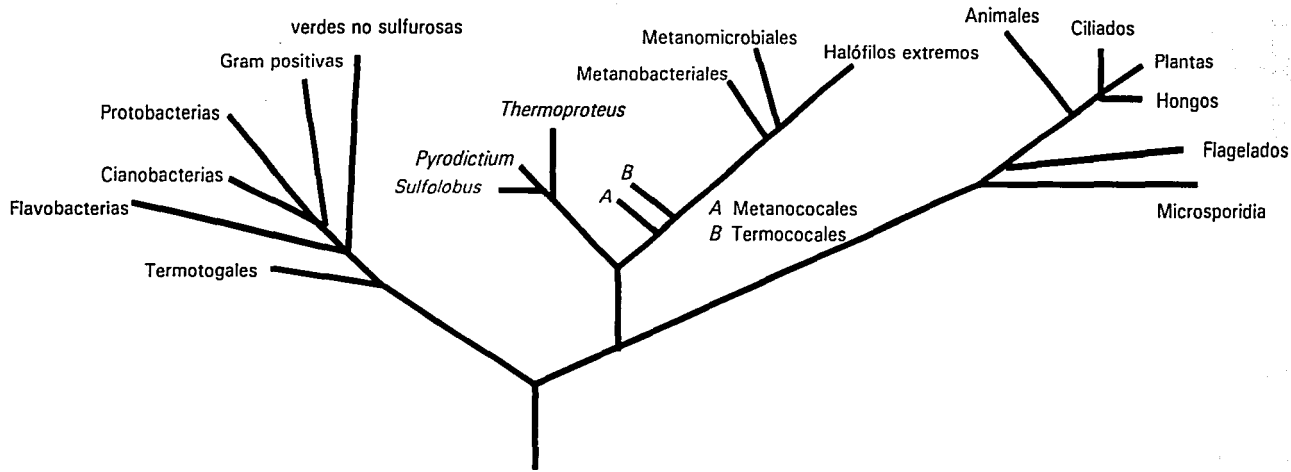


Figura 1. Arbol filogenético universal generado por comparación de secuencias de rRNA 18s. Este sistema de clasificación universal se ha empleado como base para la ubicación de los posibles grupos procariontes que por medio de relaciones simbióticas pudieron generar los ancestros directos de la rama *Eucarya* (eucariontes). En color se destacan algunos de los grupos que han sido considerados por sus características en el desarrollo de distintas hipótesis sobre el origen del linaje eucarionte. Tomado y modificado de Woese et al. 1990.

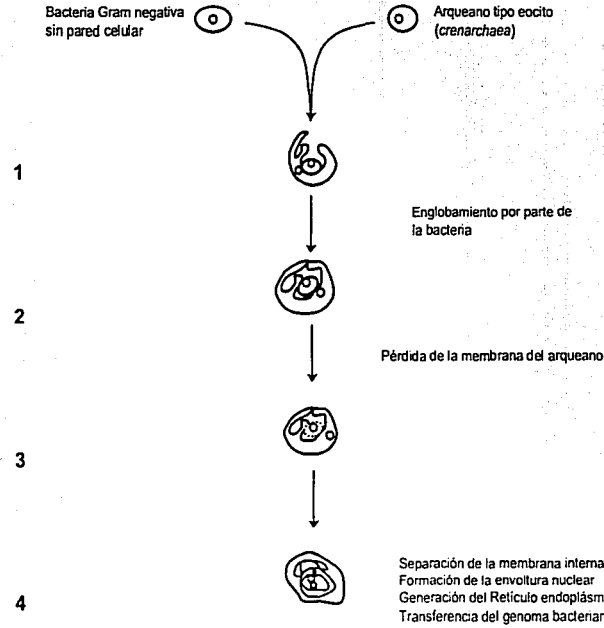
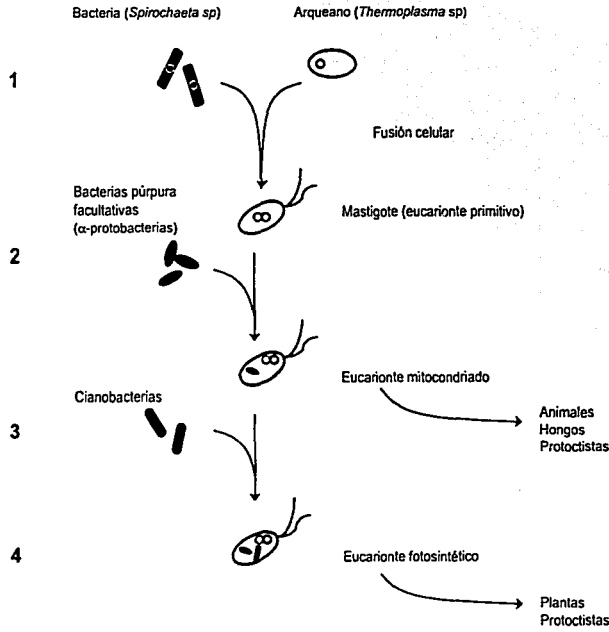


Figura 2. La teoría serial de endosimbiosis. Simbiosis entre un arqueano (*Thermoplasma*) y una bacteria fermentadora (*Spirochaeta*). La fusión permitió la aparición de estructuras de movilidad (undulipodia) en este nuevo tipo celular (mastigotes). 1. Los mastigotes heterótrofos se alimentaban de procariontes mediante endocitosis. Los mitocondrios derivan de un grupo de bacterias púrpura facultativas endosimbiontes. De este tipo de eucariontes derivaron las ramas animal, fungi y protistas no fotosintéticos. 2. Un evento endosimbótico posterior con cianobacterias generó los cloroplastos. 3. Más adelante aparecieron los grupos de protistas fotosintéticos, plantas y algas. 4. Los fenómenos de endosimbiosis se volvieron permanentes al existir una acelerada transferencia de genes al núcleo de las nuevas células, de modo que los simbiontes perdieron su autonomía informacional y operacional a cambio de un suministro constante de compuestos orgánicos del metabolismo hospedero.

Figura 3. El origen por fusión. El modelo químico sugiere que el origen de los eucariontes se dio después de un evento endosimbótico entre una bacteria Gram-negativa (G-) y un arqueano de la rama *Crenarchaea*. Ocurrió un englobamiento del arqueano por una bacteria G- que carecía de pared celular. 1. La célula arqueana fue rodeada totalmente por la membrana del hospedero, 2. esto propició que su membrana se tomara redundante, facilitando su desaparición. 3. Una separación de la membrana internalizada por la bacteria condujo a la formación de una cubierta alrededor del genoma arqueano (envoltura nuclear) y del retículo endoplásmico. Finalmente el genoma bacteriano fue internalizado hacia el recién formado núcleo, probablemente por un sistema similar al que ha llevado al núcleo genes provenientes de simbiontes posteriores, como cloroplastos y mitocondrias. 4.

Sintrofia en un medio anaerobio

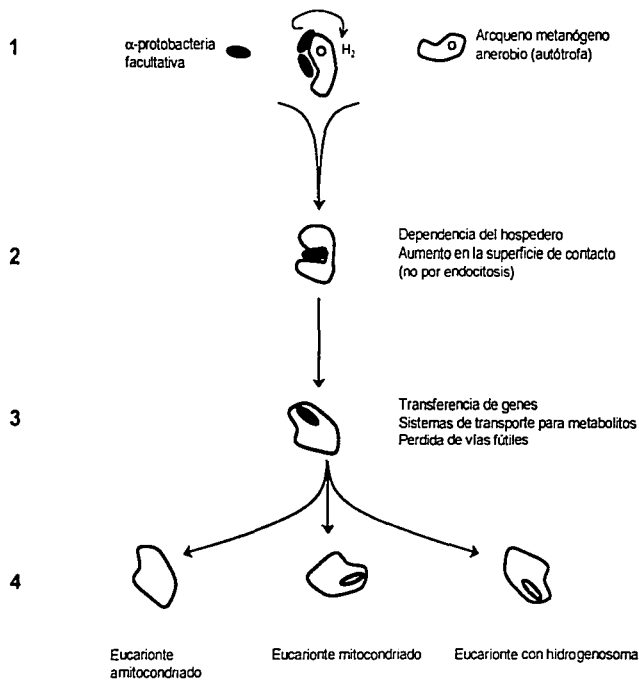


Figura 4. La hipótesis del hidrógeno. La asociación entre una α -protobacteria y el arqueano metanógeno se dio en un medio anaerobio, donde los productos del metabolismo bacteriano (CO_2 e H_2) se volvieron indispensables para las vías metabólicas del arqueano, ya que posiblemente la fuente geológica de dichos gases desapareció. 1. El desarrollo de proyecciones membranales del arqueano alrededor de la bacteria para la mayor captura de los gases debió ser favorable, 2, pero sin llegar al aislamiento del simbionte bacteriano, pues este requería de los sustratos orgánicos que obtenía del medio. Simultáneamente algunas vías metabólicas desarrollaron nuevos mecanismos de regulación y transporte para evitar la pérdida de los ciclos fútiles, 3, lo que llevó a la pérdida secundaria de la autotrofia y la metanogénesis del arqueano. Finalmente el metabolismo aerobio bacteriano se volvió importante hasta la aparición del oxígeno libre originando las mitocondrias. En algunos casos derivó a un metabolismo anaerobio (hidrogenosomas). En ciertas situaciones desapareció totalmente el simbionte-organelo, pero dejó su herencia genética que hoy podemos observar en eucariotes anaerobios sin organelos, 4.

Consortio microbiano en medio anaerobio o microaerófilico

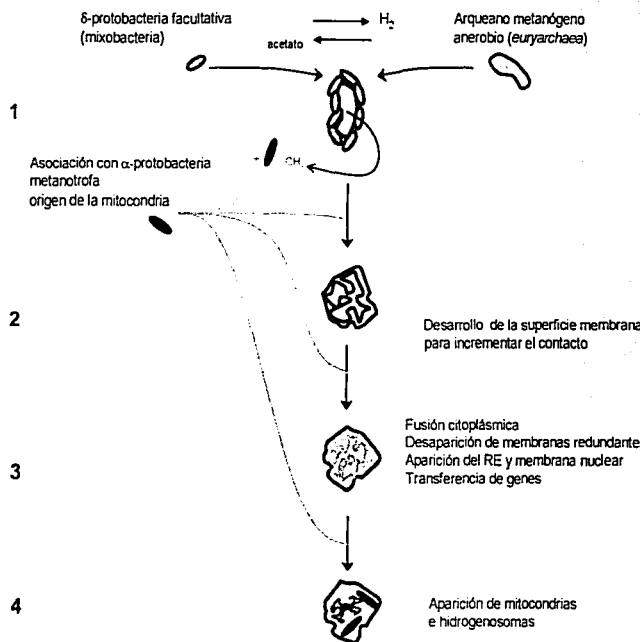


Figura 5. La hipótesis sintrofica. Considerando que hoy se encuentran asociaciones sintroficas entre δ -protobacteria y metanógenos se sugiere que en un consorcio primitivo un tipo similar de simbiosis originó a al linaje eucariote. Inicialmente el arqueano consumía el H_2 y el CO_2 producidos por el metabolismo reductor de sulfato de las bacterias. Posteriormente derivó en una fusión membranal y citoplásmica de los simbiontes, manteniendo al simbionte arqueano dentro de una capa bacteriana, 2. Algunas de las membranas debió de perderse al ser redundante, dando lugar a la aparición de una región pronuclear con el genoma arqueano incluido en su interior. La transferencia intensa de genes desde la bacteria a la región pronuclear llevó a la extinción del genoma bacteriano, donde solo se conservaron algunos genes, dando lugar a la naturaleza química del genoma eucariote, 3. Las mitocondrias son producto de una segunda simbiosis con α -protobacteria, también en un medio anaerobio, 4.

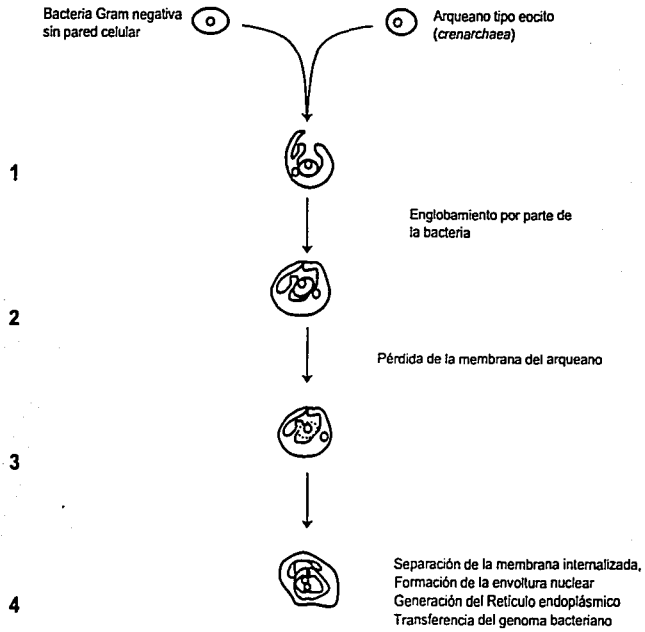


Figura 3. El origen por fusión. El modelo químérico sugiere que el origen de los eucariontes se dio después de un evento endosimbótico entre una bacteria Gram-negativa (G-) y una arqueano de la rama Crenarchaea. Ocurrió un englobamiento del arqueano por una bacteria G- que carecía de pared celular. 1. La célula arqueana fue rodeada totalmente por la membrana del hospedero, 2. esto propició que su membrana se tomara redundante, facilitando su desaparición 3. Una separación de la membrana internalizada por la bacteria condujo a la formación de una cubierta alrededor del genoma arqueano (envoltura nuclear) y del retículo endoplásmico. Finalmente el genoma bacteriano fue internalizado hacia el recién formado núcleo, probablemente por un sistema similar al que ha llevado al núcleo genes provenientes de simbiontes posteriores, como cloroplastos y mitocondrias, 4.

TESIS CON

ARTICULO III

Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallón, S, Herion, P., King, M.P.
and González-Halphen, D.

Apicomplexan split *cox2* genes indicate a green algal apicoplast ancestor

En revisión

Apicomplexan split *cox2* genes indicate a green algal apicoplast ancestor

Soledad Funes¹, Edgar Davidson², Adrián Reyes-Prieto¹, Susana Magallón³, Pascal Herion⁴,
Michael P. King², and Diego González-Halphen^{1*}

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., Mexico.

²Biochemistry and Molecular Pharmacology, Thomas Jefferson University, PA 19107, USA.

³Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., Mexico.

⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., Mexico.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: dhalphen@ifisiol.unam.mx

Members of the phylum Apicomplexa, that includes *Plasmodium* and *Toxoplasma* species of human pathogens, contain a vestigial plastid, the apicoplast (*J*), whose evolutionary history is controversial (*1,2,3,4*). Here we propose that distinctive chlorophyte (green algal) nuclear genes, encoding mitochondrial respiratory chain proteins, were transferred laterally to the ancestral apicomplexan, consistent with the apicoplast arising from secondary endosymbiosis of a green alga.

In most eukaryotes, the COXII subunit of the mitochondrial respiratory enzyme cytochrome *c* oxidase, is encoded by a single mitochondrial gene, *cox2*, but members of at least three genetic lineages lack *cox2* in the mitochondrial DNA (mtDNA). A number of leguminous plants have transferred a full-length *cox2* to the nucleus (*5*), where it acquired a region encoding a mitochondrial targeting sequence (MTS). Several chlorophyte algae lack *cox2* in the mtDNA (*6*). In *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp., two algae of the class Chlorophyceae, *cox2* is present in the nucleus as two distinct genes: *cox2a* encodes a protein (COXIIA) corresponding to the N-terminal, membrane domain of orthodox COXII, and *cox2b* encodes COXIIB corresponding to the C-terminal domain that is exposed to the mitochondrial intermembrane space. Both COXIIA and COXIIB are imported into the mitochondrion (*7*). A truncated *cox2* in the mtDNA of the chlorophyte alga *Scenedesmus obliquus* (*8*) can now be recognized as a *cox2a* homolog. We predicted that this alga would have a nuclear *cox2b* (*7*), and have confirmed this (*9*)(web Fig. S1), suggesting that *cox2a* and *cox2b* may be widespread in the class Chlorophyceae. The mitochondrial *cox2a* and nuclear *cox2b* of *S. obliquus*

indicates that an ancestral chlorophyte *cox2* was divided in the mtDNA, prior to the independent transfer of *cox2a* and *cox2b* to the nucleus. *S. obliquus* represents an intermediate stage in this transfer with *cox2a* retained on the mtDNA, possibly due to the divergence of the *S. obliquus* mitochondrial genetic code from the standard genetic code (8) occurring after the transfer of *cox2b* to the nucleus.

The third group of organisms lacking mtDNA-encoded *cox2* is the Apicomplexa, consisting of obligate endoparasites. We identified transcripts and cloned nuclear-encoded *cox2a* and *cox2b* homologs from *Toxoplasma gondii* (9)(web Fig. S1). Fragmented *cox2a* and *cox2b* genes are also present in *Eimeria tenella*, *Plasmodium yoelii*, and *Theileria parva*. The ancestral algal and apicomplexan *cox2* genes appear to have been split in identical locations (9)(web Fig. S1). In phylogenetic analyses of the available COXIIA and COXIIB sequences and representative conventional COXII sequences, apicomplexan COXIIA and COXIIB grouped with the chlorophyte sequences (Fig. 1). In contrast, apicomplexan mtDNA-encoded cytochrome *b* grouped independently from green algal cytochrome *b* sequences. This strongly argues that apicomplexan *cox2a* and *cox2b* derived from green algal genes and did not result from an independent splitting of *cox2*. All COXIIA proteins have a 125-170 amino acid N-terminal extension that is a cleavable MTS in algal COXIIA (7). The COXIIB proteins have a shorter N-terminal extension (43-60 residues) not cleaved in algae, with no equivalent in conventional COXII (7). The conserved PxxxPxxY motif in this otherwise poorly conserved novel region of COXIIB also indicates a common origin for apicomplexan and chlorophyte *cox2* genes (9)(web Fig. S1).

The *T. gondii cox2a* contains an intron that is conserved in location and phase with introns in *cox2a* of both *C. reinhardtii* and *Polytomella* (9) (web Figs. S1 and S2). This suggests a lateral transfer of *cox2a* and *cox2b* to the apicomplexan nuclear genome from the nucleus, not the mtDNA, of a green alga.

Analysis of the 35-kb circular DNA of apicoplasts, suggested that apicomplexan parasites evolved from a secondary endosymbiotic event (1,2). A green algal ancestor was proposed, based on similarity of *tufA* genes (2). In contrast, cladystic analysis of other genes (1,4) suggested a red algal origin. The mitochondrial genomes of a wide variety of red algae contain a single conventional *cox2* gene (6). Therefore, the nuclear *cox2a* and *cox2b* genes of the Apicomplexa indicate that the endosymbiont was a green alga (2), and specifically from the class Chlorophyceae.

That two genes encoding apicomplexan mitochondrial proteins are derived from a green algal precursor of the apicoplast, is a remarkable example of lateral gene transfer. A single *Toxoplasma* mitochondrial gene product, a component of a multisubunit enzyme, was replaced with two proteins

derived from green algae. The use of functional fragmented genes as atypical molecular markers has helped clarify the complex evolution of the causative agents of malaria and toxoplasmosis.

References and Notes

1. R.J. Wilson *et al.*, *J Mol Biol.* **261**, 155 (1996)
2. S. Köhler *et al.*, *Science* **275**, 1485 (1997)
3. G.I. McFadden, R.F. Waller, *Bioessays* **19**, 1033 (1997)
4. N.M. Fast, J.C. Kissinger, D.S. Roos, P.J. Keeling, *Mol. Biol. Evol.* **18**, 418 (2001)
5. K.L. Adams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13863 (1999)
6. M.W. Gray, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 678 (1999)
7. X. Pérez-Martínez *et al.*, *J. Biol. Chem.* **276**, 11302 (2001)
8. A.M. Nedelcu, R.W. Lee, C. Lemieux, M.W. Gray, G. Burger, *Genome Res.* **10**, 819 (2000)
9. See supplemental information available in Science Online.
10. Sequencing of *T. parva* was funded by the International Livestock Research Institute. The *P. yoelii* sequencing program is carried on by The Institute for Genomic Research in collaboration with the Naval Medical Research Center and is supported by the U.S. Department of Defense. We thank Drs. J.M. Quinn and S. Merchant (UCLA) for the *S. obliquus* genomic library, and A. Gómez-Puyou, D.W. Krogmann, and D.A. Maslov for critical comments. Work supported by TW01176 (NIH), HL59646 (NIH), and IN207201 (UNAM).

FIGURE LEGEND

Fig.1. *Maximum likelihood (ML) analyses showing the position of apicomplexan parasites based on cytochrome *b* and COXIIA + COXIIB sequences.* Sequences were obtained from GenBank. *S. obliquus cox2b* (AF499003) and *T. gondii cox2a* and *cox2b* (AF499004 and AF503914) are from this work. Preliminary sequence data of *P. yoelii* and *T. parva* were obtained from The Institute for Genomic Research. For phylogenetic analyses, see methods in supplementary material (9). *A. tumefaciens* was specified as the single outgroup. Bootstrap support >50% is indicated above branches. *Left panel.* ML analysis for mitochondrial cytochrome *b* (CYB). *T. parva*, *P. yoelii* and *T. gondii* form a strongly supported clade (96%). *C. reinhardtii*, *C. eugametos*, *Polytomella* sp., and *S. obliquus* form an independent, strongly supported clade (93%) which is sister to a clade that includes other green algae and land plants. The resulting chlorobiont clade is solidly supported (100%). *Right panel.* ML analysis for COXIIA and COXIIB, and homologous mitochondrial COXII sequences. COXIIA and COXIIB (excluding their extensions) were fused *in silico* as a single polypeptide, and aligned with orthodox mitochondrial COXII sequences. A clade that includes *T. parva*, *P. yoelii*, and *T. gondii* and the green algae *S. obliquus*, *C. reinhardtii*, and *Polytomella* sp. is formed (70%). Within it, the apicomplexans are grouped in a strongly supported monophyletic group (100%), and the green algae form its sister clade (89%).

SUPPORTING ONLINE MATERIAL

MATERIALS AND METHODS

Total DNA was obtained from tachizoites of *T.gondii* (Wiktor strain) grown *in vitro* in the presence of Vero cells. The *cox2a* and *cox2b* sequences were obtained by PCR amplification.

The *C. reinhardtii cox2b* gene was used to screen a genomic library of *S. obliquus* in Lambda-ZAP II (1). A positive clone was obtained from 5×10^4 plaque-forming units screened.

For phylogenetic analysis, nucleotide sequences were aligned using ClustalX (2), with subsequent manual refinements. Maximum likelihood (ML) analyses (3) were based on a HKY85 substitution model with gamma-distributed site to site rate variation, tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping, with a molecular clock not enforced. For mitochondrial cytochrome *b* sequences (CYB), the transition/transversion ratio (ti/tv=0.9735) and shape of the gamma distribution ($\alpha=0.7095$) of the single most parsimonious tree resulting from the same data (not shown) were obtained via ML. These parameters were used as input criteria in several heuristic ML searches with different starting conditions. All ML searches converged on the same tree, with score $-\ln L=25883.5709$. Support for branches was obtained through 100 replicate bootstrap searches (HKY + Γ) in which ti/tv and α were specified. For COXII sequences, a heuristic ML search was conducted to estimate a topology and its associated parameters. The resulting tree had a score of $-\ln L=21054.4690$, ti/tv=0.871018, and $\alpha=0.810477$. Bootstrap analysis was conducted as described above. The likelihood of an alternative topology where apicomplexans and green algae are not sister taxa was tested by conducting 5000 RELL replicates of the Shimodaira-Hasegawa test (4,5). The likelihood score for the ML topology for CYB, estimated using COXIIA, COXIIB and homologous sequence data via ML (HKY + Γ , with ti/tv and α specified), is $-\ln L=21165.7706$, significantly less likely ($P<0.05^*$) than the ML topology obtained using the same data and parameters.

REFERENCES

1. J.M.Quinn, S.Merchant, *J. Phycol.* **35**, 1253 (1999)
2. J.D. Thompson *et al. Nucl. Acids Res.* **24**, 4876 (1997)
3. J. Felsenstein, *J. Mol. Evol.* **17**, 368 (1981)
4. H. Shimodaira, M. Hasegawa, *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1114 (1999)
5. E.M Goldman, J.P. Anderson, A.G. Rodrigo, *Syst. Biol.* **49**, 652 (2000)

LEGENDS TO FIGURES

Fig. S1. *Amino acid sequence alignment of COXIIA and COXIIB subunits and comparison of intron positions.* The sequences of COXIIA and COXIIB of *C. reinhardtii*, *P. yoelii*, *Polytomella* sp., *S. obliquus*, *T. parva*, and *T. gondii* were compared with the orthodox, mitochondrial COXII sequences of *A. thaliana* and *M. viride* (shown in bold characters). Asterisks denote identical amino acids, and colons similar amino acids. Putative mitochondrial targeting sequences of COXIIA subunits are shown on a green background, and the PxxxPxxY motif is indicated in red. The C-terminal amino acid extensions of COXIIA are on yellow background, and the N-terminal amino acid extensions of COXIIB are shown on blue background. These unique extensions are hypothesized to interact for the assembly of COXIIA and COXIIB in the cytochrome *c* oxidase complex. The orange box indicates the experimentally determined N-terminal sequence of the mature COXIIA of *Polytomella* sp. The vertical black line separates COXIIA from COXIIB sequences. Inverted black triangles denote positions of introns in the corresponding genes. If the triangle is over an amino acid, it indicates that the corresponding intron is not in phase with the ORF.

Fig. S2. *Phases and flanking sequences of 5' and 3' splice sites for introns found in the cox2a and cox2b genes of chlorophyte algae and apicomplexan parasites.* For *cox2a* genes, introns 1, 2, 3, 4, and 5 of *Polytomella* sp. share positions and phases with introns 1, 2, 3, 4 and 5 of *C. reinhardtii*. Intron 6 of *Polytomella* sp., intron 7 of *C. reinhardtii*, and intron 1 of *T. gondii* also share positions and phases. In contrast, introns 6 and 8 of *C. reinhardtii* and intron 2 of *T. gondii* exhibit unique positions. For *cox2b* genes, intron 1 of *C. reinhardtii* shares position, but not phase, with intron 2 of *S. obliquus*. Finally, intron 1 of *S. obliquus* exhibits a unique position.

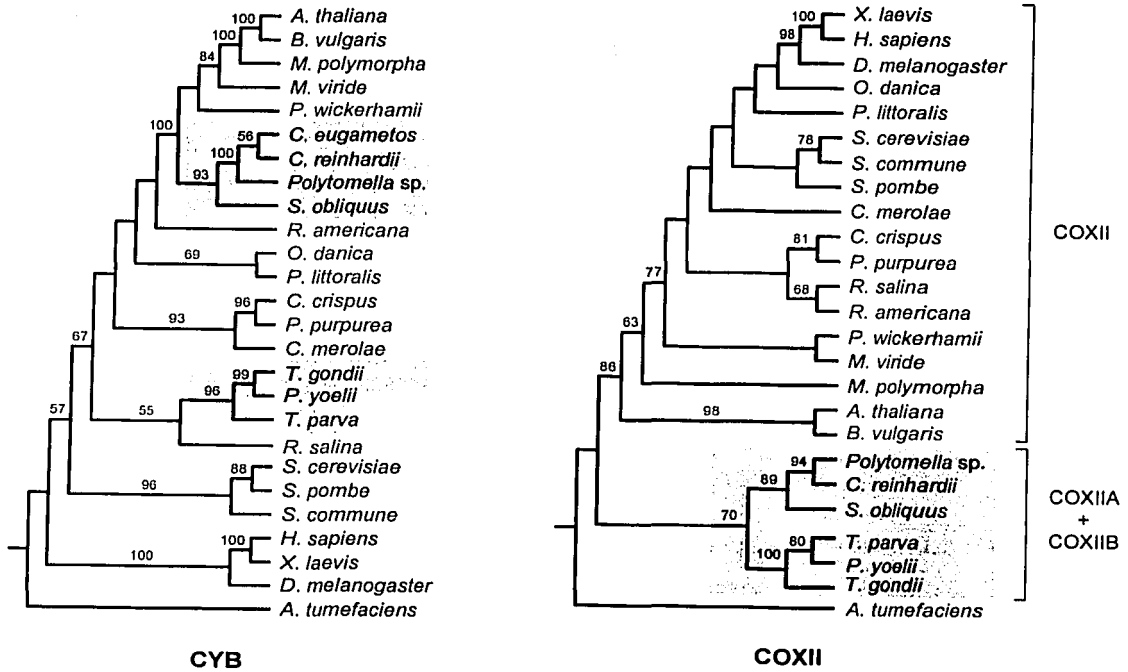


Figure 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COXIIA

Polytomella sp. MLAQRIS-----GNSTQCC-----KYMNNAAMGSKNIATVSETVQASTAATEVGAQFS-----FKEASAMASKQNVVY-----SGISLAS
 C. reinhardtii MLRQSGLS-----ANKLFGSNLLOSQKREGNLWVNAAMLFSSKAEGSVAQVQVWVASEGVQAVPQFS-----SEAAALAAKRRKRGIC-----SGISLAS
 S. obliquus
 T. parva MLTVYSGI-----NRRLPQSS-----ILKNTKPFQTPQSHFGILLVFNHVSORHIFTSRLLM-----FTRKREPEANNSTSDSSSSVM
 P. yoelii MFNLS-----SKLVEYC-----LRNTINQLTSMHKIYANSKRIVNFF-----FKNYNEFTTKDDNN-----NVKDI
 T. gondii MLAYFAASRELAVVFCVGTIPENIFLFLSRRLAIIIPASSPCSIAPFGSRLYPIR-----SOCGRPAGFPAAKIVVYVPLSAHTFPKQMPSSSLRFRYGHILHQFPRRFSSAQR-----GDVSI
 M. viride
 A. thaliana



Polytomella sp. RQTFSGS-----FAASAPSGAR-----AIATQAEAKAQETSSIKKFKIAAAVAALGLTAGTASAEARVAPQLGFDSDATSQAQAP-----FDLHHDIFFFLNTVTVLWVYFLYHIAIKFH
 C. reinhardtii SKPFAARGLTSAAKPAAAA-----AAGAQAQAQPADKYAGLKKVLAALAAALGLTITVYAAA-----DSQPQWQLLFQDSTATQAAMIDLHHDIFFFLITVTVLWVYFMFQITRFH
 S. obliquus
 T. parva KQKQKQFTHVSEFTGCKYAGTGLPKFVQCPEDLPSIEFGKPI-----GMVNFVREHQCDPRDLREDGRFKEK-----YATDGFHWYDAYTDPVKQRRTIIVNGEAMVLGVTRKMSBELFQVEQTKVPIY
 P. yoelii HDKTYAEKN-----NBHGGEH-----TKGLYRHVDHRRGNPRDHLTEDGTRRPE-----YDFDNYHWDYWANVPKQNIIVNGQKMIKGEETKPMYELFNVSQKIPFW
 T. gondii MLPRFSSSTASSVTKPQRTDAR-----AKHDEHDSHGGTNNFYH-----MPSHSPSRHHLNPDGTRRDI-----TTAETFTWHDHAEASTPAQQIVSNGKRMVKGVTRDLVLELFLVHQKIPFW
 M. viride
 A. thaliana MDAPRFWAMGFDQDPATPIMQGIIDLHHDIFFFLTAVTTFVIMLARILFHFH
MIVLKWLELTIISPCDAAEFPWQLGSDQAATPIMQGIIDLHHDIFFFLILILVFLMILVRLVHWFH

COXIIIB

Polytomella sp. YTKQALP-EKLTHTHTAEVI-----WTVIPTIIVVLIAPSLTLVYAI-----DSHNDKPGKLTVRVIGROWYNSYEMHDHLQHKLLDADRIVIAIKERTIK-----MSDAKDQLKEQLKAS-----PSFR-----AA
 C. reinhardtii YSKVLKP-EKLTHTHTMEVI-----WTIIPTLIVVHIAIPSLTLIYSLDQHTERPGLTVKIIGROWYNSYEMHDHLQHKLLDPPRLVIGIAEKALVK-----MSESKDQLKEKLRAD-----PSFR-----AA
 S. obliquus
 T. parva HRRRLNLWGDHKNALRAEFCFFWI-----PTFIIFSLAIPCYTMLYMLDESIVTTH-----TVXVIGHQWYVWVYEVESPPV
 P. yoelii SRTLNVWGNHNLVWVEFLFFWI-----PTLIIFSLAIPCFPTMLYMLDEIVHTTH-----TVXVIGROWYVYEVESPPEDDEE
 T. gondii PRMRNVWGNHDLMLKAEFLFFWT-----PTFITWSLAIIPMTLLYMLDEAVYAAM-----TVXVIGROWYVYEVESPVDDDEE
 M. viride EKKNPINPYLVHGSTLEIV-----WTLIPSFILMLIALPSFALLYSTDEIVDPAV-----TIKVIIGHQWYNSYEVESDY
 A. thaliana YKNAIP-QRIVHGTTEILR-----TIFPSIISMEIAIPSFALLYSMEDEVVDPAITIKAIHQWYRTEYVSDY

Polytomella sp. ELK-----DKLKAALLSKVPASOPIQIN-----FDSYMYVT-----DVQPGQLRMLEVDERLVLPTNTLVRLLVLTASDVIHSHWAVPSLGKMDAIPGRLNQILWLTINREGVYGGQCEICGAN
 C. reinhardtii ELK-----DRITKNALLSKVPASVPISTN-----FDSYMYLT-----EVQPGQLRVLEVDERLVLPTNTLIRLLEVTASDVLHSHWAVPALGVKMDAVPGRLNQVWNSINREGVYGGQCEICGAN
 S. obliquus
 T. parva IL-ERSR-----ERYPIPKKYLDNPWLIPIKYYS-----QSNLVTDDELQPGMLRQLEVDKRLTLPRTRHIRFLVLTATDVLHSHWSPSLGKMDAVPGRLTRINTFILREGVYGGQCEICGAN
 P. yoelii DLENTKAKNIR-----ADDYPTQPKYIENPDQIPKYAR-----QSNMVTDEDLQPGMLRQLEVDKRLTLPRTRHIFLITATDVIHSHWSPSLGKMDAIPGRLSKVTFFILREGVYGGQCEICGAN
 T. gondii CREENSVLLQSLKANSQQQKYLDDPKILPTIYV-----QSNMVTDEDLQPGMLRNLVVDKRLTLPRTRHIFLITATDVIHSHWAVPALGKMDAIPGRLQRIWTFIQREGVYGGQCEICGAN
 M. viride
 A. thaliana LSDEQDSNLFDSYMYVPEDELELDLRLLEVDNRVV-----IPAKTHVRFIITAADVLSHWAVPSLGKMDAIPGRLNQISILVQREGVYGGQCEICGAN
NSSDEQS-----LTFSYMIPEEDELGLQSRLELDVNRVVVPAKTHLRIVTSDADVPHSHWAVPSSGVKMDAVPGRLNQISILVQREGVYGGQCEICGAN

Polytomella sp. HSEMPIVVEAISPRALFTEYVKKWIQ
 C. reinhardtii HSEMPIVVEAISPROFLTEYVKKWIS
 S. obliquus HAEMPIVVEAVTPROFVNYLKKWME
 T. parva HGFMPVIEAVSPEKYAEHAKKYYQD
 P. yoelii HGFMPVIEAVSPEYAAHAKKYYRE
 T. gondii HGFMPVIEAVSPETAYAAHAKKYYKD
 M. viride HAFMPVIEAVSVEYIISWVSQKLFKINKR
 A. thaliana HAFTSIVVEAVPRKDYGRSVSNQILPQTGEA

Figure S1

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

cox2a

	Intron n°	Phase	5' splice site	3' splice site
<i>T. gondii</i>	1	0	CAA/GTACGTC	TTTTCAG/AAA
	2	1	CAA/GTAAGAG	TGCCGAG/TTC
<i>Polytomella sp.</i>	1	0	CAG/GTTAATA	TTTATAG/TGC
	2	0	CAG/GTAATTG	CTCACAG/GCC
	3	0	GAG/GTGCGGG	TGTAAG/GTT
	4	1	TCG/GTAAGTA	CACATAG/GCT
	5	0	AAG/GTAACGC	CCAATAG/GCC
	6	0	CAC/GTAAGTA	TTCGTAG/ATC
<i>C. reinhardtii</i>	1	0	CAG/GTGCGAC	CTTGCAG/AGC
	2	0	CAG/GTACAGG	ATTGCAG/CAA
	3	0	CAG/GTGCGAA	ATTTAAG/GCT
	4	1	GCA/GTAAGTC	CGTGCAG/GCG
	5	0	AAG/GTGGGGA	CGTGCAG/GCC
	6	0	CAG/GTGCGCC	TCGACAG/GCC
	7	0	CAG/GTGGGGC	ACCGCAG/ATT
	8	1	CAG/GTATGAT	GCTGTAG/GCC

cox2b

	Intron n°	Phase	5' splice site	3' splice site
<i>T. gondii</i>	1	0	CAG/TCAGCAC	GCCCCAG/AAA
<i>C. reinhardtii</i>	1	2	CGA/GTGAGTT	ATTGCAG/GTA
<i>S. obliquus</i>	1	0	CAG/GTGAGGG	GCGTCAG/GTG
	2	0	CAG/GTAGGCG	GCTGCAG/AAC

Figure S2