

NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRAZAS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN CILIADOS AMBIENTALES ANAEROBICOS: INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DEL SITIO ACTIVO Fe-S DEL COMPLEJO MITOCONDRIAL I, Y OTRAS PROTEÍNAS

S. B Pertuz Belloso*^a, T. A. Marín^b, M. Macek^b, M. Chávez^b, P. Bonilla Lemus^b.

^aDepartamento de Biología Comparativa. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Circuito Interior. Coyoacán. México-DF.

^bUIISE. FES-Iztacala. Universidad Autónoma de México. Avenida de los Barrios no. 1, Colonia los reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado de México.

*Autor de correspondencia, email: silvanapertuz@comunidad.unam.mx.

Recibido: Junio 2015. Aprobado: Abril 2016.

Publicado: Junio 2016.

RESUMEN

El sitio activo Fe-S es uno de los sitios enzimáticos más conservados entre los eucariotas incluyendo a los protistas anaeróbicos. Este sitio activo integrado por varios complejos proteínicos se encuentra localizado, entre otras sub-unidades, en la proteína 3 de la super-familia del complejo mitocondrial I, y ha sido encontrado integrando a los complejos asociados a la respiración celular de los eucariotas anaeróbicos. La respiración celular anaeróbica yace en varias estructuras, entre ellas mitosomas, hidrogenosomas, y organelos asociados a mitocondrias. El metabolismo energético y los organelos en los que se lleva a cabo la respiración celular no han sido completamente caracterizados en ciliados anaeróbicos ambientales y la idea de este trabajo fue identificar las proteínas asociadas a organelos relacionados a mitocondria en ciliados anaeróbicos aislados del Lago de Alchichica. Para eso, se realizó inmunocitoquímica con anticuerpos contra proteínas de la cadena respiratoria, proteína 3 hierro-azufre (30 kDa) del Complejo I, Citocromo Oxidasa C, (57kDa), y contra la Hsp70 (70 Kda), una proteína presente en la matriz de estos organelos. La intensidad de la sub-unidad 3 del complejo I eucariótico y de la proteína Hsp70 fueron analizadas en este trabajo en los diferentes ciliados anaeróbicos ambientales aislados del Lago de Alchichica. Las marcas de estas proteínas fueron concentradas en estructuras de los ciliados de diferentes especies mostrando en algunas especies menor intensidad de expresión de las proteínas asociadas a los organelos asociados a mitocondria.

Palabras claves: Complejo Mitocondrial, organelos relacionados con mitocondria, ciliados anaeróbicos, Lago de Alchichica, Proteínas Fe-S, hidrogenosomas, Hsp-70.

PROTEIN EXPRESSION LEVELS TRACES OF THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN IN ENVIRONMENTAL ANAEROBIC CILIATES: FLUORESCENCE INTENSITY OF THE ACTIVE SITE FE-S MITOCHONDRIAL COMPLEX I, AND OTHER PROTEINS

ABSTRACT

The Fe-S active point is an enzymatic conserved site between eukaryotes include to anaerobic protists. This active site was found localized in the 3 protein of the Mitochondrial Complex I, and this proteins complex has been associated to anaerobic cellular respiration in eukaryotic. The anaerobic cellular respiration occurred on the many structures between mitosomes, hydrogenosomes and Mitochondrial associated organelles. The organelles associated to with cellular metabolism have been not characterize completely from environmental anaerobic ciliates, and the idea of this work was identified the proteins associated to this organelles in anaerobic ciliates from Alchichica Lake. For this, We make the immuno-cito-chemistry used to antibodies against Mitochondrial Complex I (30 kDa; Fe-S 3 protein), Citochrome Oxidase C (57 kDa), and Hsp70, an matrix protein of this organelles. The intensity of 3 subunit of Eukaryotic Complex I and Hsp70 were analyzed in this work from different environment anaerobic microorganism. The marks of these proteins were concentrated on the specific structure of the different species showing low intensity in the some species.

Keywords: Mitochondrial Complex I, MROs, Organelles relates to Mitochondrial, Anaerobic Ciliates, Alchichica Lake, Fe-S proteins, hydrogenosomes, Hsp-70.

INTRODUCCION

La mitocondria y las proteínas asociadas con el metabolismo energético han sido sujeto de complejos cambios evolutivos. Los complejos proteínicos que se han acoplado a estos organelos para la generación de ATP han evolucionado en un amplio espectro funcional en los diferentes organelos. Los complejos proteínicos integrados en la cadena respiratoria mitocondrial aeróbica modelo está integrada por I-V sub-complejos proteínicos. Estos complejos se han encontrado de forma muy reducidas en microorganismos de vida anaerobia, así se ha mencionado la conservación de al menos el complejo mitocondrial I, sin que se conserven los otros complejos, y generando ATP sin que el ultimo aceptor de electrones sea el oxígeno. Así, se ha creado una clasificación en la cual existen al menos 5 variantes de estos organelos obedeciendo a la integración o no de los complejos mitocondriales [1]. Entre ellos podemos mencionar a los hidrogenosomas organelos de doble membrana que generan hidrógeno y ATP, y que se presentan en microorganismos eucarióticos que viven en ambientes con déficit de oxígeno; los mitosomas, organelos asociados a mitocondrias, mitocondrias anaeróbicas, principalmente [1]. La producción de ATP podría estar relacionada con un incipiente sistema de oxido-reducción semejante al que encontramos en las mitocondrias y esto quedo determinado con la identificación, en *Cryptosporidium parvum*, de un complejo de proteínas, la piruvato-NAD oxidoreductasa, que tiene un dominio de unión al citocromo P450 reductasa [2]. La producción de hidrogeno molecular como compuesto final está a cargo de las Fe-hidrogenasas que actúan como aceptores de electrones y se encargan de la producción del hidrógeno molecular [3, 4]. Proteínas asociadas con el metabolismo del piruvato y de aminoácidos, tales como las enzimas glicina descarboxilasa y serina hidroximetil-transferasa han sido identificadas en hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis*, encargadas de la producción de

ATP [5]. Las subunidades 24, 51 y 75 KDa del complejo I mitocondrial fueron identificadas en hidrogenosomas del ciliado anaeróbico, *Nyctotherus ovalis* [5]. El origen evolutivo de las proteínas asociadas al metabolismo energético es controversial todavía, algunas de las secuencias en el N-terminal de las ferredoxinas y proteínas de choque térmico encontradas en mitosomas de *Giardia lamblia* e hidrogenosomas de *Trichomonas* han sido identificadas en alfa-proteobacterias [6,7,8,9]. El origen controversial de estos organelos así como su caracterización metabólica han impulsado el estudio de estas estructuras en eucariotas ambientales, especialmente en los organismos anaeróbicos debido a que en este espectro de protistas no existen suficientes registros. Embley [2], plantea la importancia de realizar estudios con los ciliados anaeróbicos para caracterizar organelos o estructuras donde se lleva a cabo la respiración celular tanto metabólicamente como evolutivamente dado la poca información que hasta el momento se tiene sobre estos organelos. Existe muy poca documentación sobre los ensamblaje biológicos en ambientes anaeróbicos, especialmente entre los ciliados anaeróbicos. Entre los integrantes de este grupo de eucariotas hay registros de la presencia de hidrogenosomas en varios géneros que habitan principalmente en sedimentos marinos, agua fresca, y en el intestino de animales [10]. Desde el punto del vista del metabolismo energético y su evolución existen muy poco estudios en ciliados anaeróbicos, y las estructuras u organelos en los se llevan a cabo estas funciones no han sido todavía completamente descritas. La hipótesis de que estos eucariotas anaeróbicos tienen hidrogenosomas llevo al objetivo principal de caracterizar estas estructuras u otros organelos asociados partiendo de los hallazgos realizados en ciliados anaeróbicos provenientes del intestino animales que asumían la presencia de genes del Complejo Mitocondrial I y II. Poca información se tiene sobre la biología y la clasificación de los ciliados anaeróbicos del lago de Alchichica (Puebla). Desde el

punto de vista metabólico no se tienen registros del tipo de moléculas y del tipo de metabolismo que tienen estos eucariotas. El lago de Alchichica, por su parte, es un cráter muy antiguo con un ensamblaje y dinámica de poblaciones muy particular [11]; en el cual bajo las condiciones anaeróbicas que imperan en este sistema suponemos que ciliados aislados en la columna de agua con muy baja concentración de oxígeno podrían presentar hidrogenosomas o algún tipo de mitocondria anaeróbica, en los que se mostrará un metabolismo energético al menos con el Complejo I eucariótico, y un aceptor final de electrones. Como hemos mencionado una de las secuencias más conservadas entre las proteínas de los complejos mitocondriales, que constituyen la cadena respiratoria, que soporta el metabolismo energético, es la que encuentra en el complejo I mitocondrial que está asociado al intercambio de electrones desde el sustrato hasta la fosa de quinonas. Clásicamente, el sitio activo enzimático está conformado por la sub-unidad Fe-S, aquí se identifico este sitio en ciliados anaerobios aislados del Lago de Alchichica, para caracterizar las estructuras asociadas, y poder aproximarnos a lo que sería el tipo de metabolismo de estos eucariotas. Los objetivos de este trabajo fueron principalmente identificar proteínas asociadas al complejo I eucariótico, y a proteínas de matriz de los organelos encargados de la respiración celular, partiendo de la identificación de los ciliados anaeróbicos y las estructuras asociadas al metabolismo energético. Nosotros encontramos las marcas contra el sitio activo Fe-S conservado en los ciliados anaeróbicos aislados del lago de Alchichica.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de Muestreo, y Toma de Muestra. Las muestras fueron tomadas en el Lago de Alchichica (Estado de Puebla; at 19° 24' N; 97° 24' W, con una altitud de 2340 m.a.s.l.), siguiendo el protocolo estandarizado por Macek et al [12]. Las muestras fueron tomadas de Junio-Diciembre del 2009, y fueron tomadas en el fondo del

lago (60 m), donde la concentración del oxígeno fue de 0 mg/ml, por duplicado. Las muestras fueron fijadas con Bouin concentrado modificado que básicamente contiene [5 partes de ácido pícrico (Solución saturada en 40% de paraformaldehído), y 2 partes de ácido acético (concentrado)].

Reactivos. Anticuerpos monoclonales contra la subunidad α del complejo I de la cadena respiratoria (Santa Cruz) 1:100, goat anti-mouse; la citocromo oxidasa C (Santa Cruz) 1:100 goat anti-mouse; Hsp70 acoplado a FITC (Santa Cruz) 1:50 anti mouse. Anticuerpo secundario IgG2a acoplado a FITC (Santa Cruz) 1:100 anti-mouse. Demás materiales usados provienen de Sigma-Aldrich e invitrogen.

Tratamiento Previo de las Muestras. Todas las muestras fueron filtradas a través de membranas de policarbonato (2-3 μ m, 47mm). Para algunas muestras, las membranas se guardaron a -20°C, hasta su uso, y posteriormente, estas se incubaron con agarosa al 1%, y se dejaron secar toda la noche. Cada una de las membranas colectadas fue fraccionada en partes de 1 mm, para un total de 47 submuestras.

Identificación de Ciliados Anaeróbicos en Estratos Anóxicos del Lago de Alchichica. Los ciliados atrapados en membranas de policarbonato fueron identificados usando la tinción de núcleos con DAPI (4',6-Diamidino-2-FenilIndol). Los ciliados fueron incubados con DAPI (2 μ M) durante 2 min a temperatura ambiente. Las muestras analizadas en imágenes directas fueron captadas y recolectadas para determinar el tamaño de cada uno de los ciliados en el software IMAGE PRO. 6.0. Láminas de tinción de permanente fueron realizadas siguiendo los protocolos estándar para la tinción por plata coloidal [11]. Cada uno de los ciliados aislados fue identificado siguiendo las claves para clasificación taxonómica de protistas [12,13].

Marcaje de Proteínas del Complejo I de la Cadena Respiratoria En Hidrogenosomas. Para detectar las proteínas de cadena respiratoria se uso un protocolo

estándar para Inmunofluorescencia indirecta con modificaciones, brevemente. Las muestras fueron permeabilizadas con el buffer Tripton X-100 (0.01%)-paraformaldehído (0.5%), y luego las células fueron incubadas con el anticuerpo primario, contra la subunidad 3 del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (1:100), y la citocromo oxidasa c mitocondrial (1:100), ambas proteínas de membrana, respectivamente. Estas proteínas, posteriormente, se detectaron usando un segundo anticuerpo (IgG2a; 1:500), acoplado FITC (490/525 [Isotiocianato de Fluoresceína]), luego de la tinción de los núcleos con DAPI (358/461 [4',6-Diamidino-2-FenilIndol]). Para cada una de las muestras procesadas, fueron realizados controles de muestras sin tratamiento alguno, controles de muestras sin el anticuerpo primario, controles de muestras sin el anticuerpo secundario, y cada muestras fue montada por duplicado.

Marcaje de Proteínas de la Matriz de los Hidrogenosomas. Para detectar las proteínas de la matriz de los hidrogenosomas se usó un protocolo estándar para Inmunofluorescencia directa con modificaciones, brevemente. Las membranas conteniendo los ciliados se lavaron con buffer Tripton X-100 (0.01%)-paraformaldehído (0.5%), para permeabilizar y se incubaron en el mismo buffer durante 20 minutos. Los ciliados sobre las membranas fueron lavados con PBS (pH 7.4), y luego incubados con un buffer PBS-Tween 20 (0.05%)-paraformaldehído (0.5%)-anti-Hsp70 (1:100) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas nuevamente durante 30 minutos a 4°C. Luego, los ciliados fueron incubados con DAPI (358/461,10:1000) durante 2 minutos a temperatura ambiente para la tinción de núcleos. Las muestras fueron visualizadas por epifluorescencia, y las imágenes obtenidas fueron analizadas vía una cámara CCD monocromática con sensibilidad a infrarrojo, y procesadas con el programa IMAGE-PRO EXPRESS (6.0).

Procesamiento de Datos y Análisis de Densidad de las Proteínas del Complejo Eucariótico I y de Matriz. Las imágenes de cada uno de los ciliados aislados fueron captadas y analizadas a través del programa IMAGE-PRO EXPRESS (6.0), como fue mencionado anteriormente. Los ciliados anaeróbicos fueron primero analizados para el tamaño y las características taxonómicas generales. Posteriormente, de cada uno de los 900 ciliados analizados e identificados fueron analizados para determinar la densidad de las marcas de las proteínas a determinar, en este caso Complejo I eucariótico, Hsp70 y Citocromo Oxidasa C. Los datos arrojados en graficas en 2 ejes (X-Y) o en los tres ejes (X,Y, Z) muestran la densidad de las proteínas en unidades arbitrarias señalando la zona del espectro de luz.

Análisis ultraestructural de los hidrogenosomas.

Para corte. Los pellets fijados con paraformaldehído (2.5%), fueron centrifugados (6000 rpm/ 6 min), y el botón celular obtenido se concentró en un pool, y se postfijo con glutaraldehído (3.7%). A este pool celular se le adicionó Agar (1 %), y fue luego sometido al proceso estándar para el montaje de muestra para microscopia electrónica de transmisión, con modificaciones. Brevemente, las muestras cortadas en cubos se sometieron a deshidratación con etanol en forma creciente (1 hr/cada uno), dos veces y luego incubadas con tolueno absoluto, para realizar una tinción con Tetraóxido de osmio. Posteriormente, las muestras son incluidas en resina, y montadas en rejilla, para su observación al ME de barrido.

Para FORMVAR. Los ciliados fueron montados con una rejilla recubierta previamente con una membrana tipo FORMVAR (0.25%) en solución de cloroformo, y se procedió a realizar el protocolo estándar para el procesamiento de muestra para microscopia electrónica según se describió anteriormente.

Tabla I. Condiciones anaeróbicas, y la prevalencia de especies durante el muestreo en el Lago de Alchichica.

Muestreo	Concentración de oxígeno	Genero identificado	Presencia del Complejo I, 30 kDa
Junio	0 mg/ml	Cyclidium Uronema Christigera	Negativo
Julio	0 mg/ml	Cyclidium Uronema Christigera	Negativo
Agosto	0 mg/ml	ND	ND
Septiembre	>1 mg/ml	Cyclidium	Positivo
Octubre	0 mg/ml	Cyclidium Christigera	Positivo
Noviembre	0 mg/ml	Uronema Cyclidium	Positivo
Diciembre	0 mg/ml	ND	ND

RESULTADOS

Los ciliados anaeróbicos del lago de Alchichica presentaron señal contra el sitio activo Fe-S asociada al complejo I mitocondrial eucariótico. La marca contra el complejo mitocondrial I (Superfamilia Complejo I, subunidad 30 kDa, proteína 3), estuvo concentrada en zonas específicas del citoplasma de los ciliados anaerobios. El ultimo aceptor de electrones de estos eucariotas no es el oxígeno debido a que los ciliados identificados no presentaron la marca contra la Citocromo oxidasa C, ratificando que son eucariotas anaeróbicos con un incipiente sistema de generación de

ATP. Las marcas contra el complejo I eucariótico estuvieron acopladas a la proteína de matriz Hsp70 con lo cual se determina la presencia de organelo, posiblemente organelos asociados a mitocondria. El análisis ultraestructural de estos eucariotas muestra estructuras redondeadas en el citoplasma (**Figura 1**), determinando con ello la presencia de un organelo parecido a mitocondria en estos eucariotas anaeróbicos. Los ciliados identificados en el estrato anaeróbico del Lago de Alchichica se muestran en la **Figura 2** y **Tabla I**. En resumen la **Tabla I** muestra las condiciones anaeróbicas, y la prevalencia de las especies que toleran estas condiciones. Cyclidium presente en todos los meses de muestreo fue el género que más especies presentaron la señal contra el complejo I. Las **Figuras 2a y b** muestran a *Cyclidium glaucoma* (Descrito por Macek et al, 2008). En las **Figura 2c y e** se muestran otras especies del genero Cyclidium, sin clasificación. Otras especies del Complejo Cyclidium/Isocyclidium/Christigera fueron identificadas en este ambiente anòxico como *Christigera* sp (**Figura 2d**). Por último, algunas de las especies identificadas no pertenecen al complejo Cyclidium/Isocyclidium/Christigera sino que pertenecen al género Uronema (**Figura 2e**). Estas especies de ciliados anaeróbicos fueron analizadas para la detección y determinación de la intensidad de las proteínas asociadas con el metabolismo energético, y como observamos en su mayoría pertenecen al género Cyclidium. La **Figura 3** muestra el panel de tinciones que se realizaron que demuestran la marca asociada al sitio activo Fe-s del complejo I y la localización en el citoplasma. En el panel superior de esta figura observamos la batería de controles de los anticuerpos primario y secundario, respectivamente. Las imágenes en los canales del espectro de luz verde (FITC; 488nm, excitación máxima), y azul (DAPI, 380nm, excitación máxima). Los ciliados marcados con DAPI no muestran marcas en los respectivos controles, y en las células sin tratamiento. Para llevar a cabo la determinación del

complejo I eucariótico y su asociación con los organelos parecidos a mitocondria se realizó una batería de análisis que incluyeron el marcaje contra la proteína de matriz mitocondrial, Hsp70, además de identificar un metabolismo anaeróbico usando el marcaje contra el complejo Citocromo Oxidasa C, que solo está presente en organismos aeróbicos. En la serie del complejo I eucariótico se observa a *Cyclidium* sp con la tinción para DNA (DAPI), mostrando los núcleos del microorganismo. La marca contra el complejo I eucariótico fue observada en el citoplasma concentrada en zonas específicas. La marca contra Hsp70 fue encontrada en el citoplasma coincidiendo con la marca contra el complejo I. El panel de la Citocromo Oxidasa C, muestra que la marca es negativa implicando un mecanismo anaeróbico para la obtención de ATP. En el *merge*, observamos los núcleos de la célula y la localización citoplasmática de las marcas. El complejo I eucariótico se observa en el citoplasma de manera concentrada en zonas cercanas al núcleo, y en otras zonas (**Figura 4**). Panel superior de la figura se muestran los controles de los anticuerpos primario y secundario sin marca, al igual que las células sin tratamiento, que solo son marcadas con DAPI. El complejo I se observa en el citoplasma de *Cyclidium* sp concentrado en zonas específicas (zonas puntadas). **Figura 4(a)** *Cyclidium* sp mostrando núcleos (DAPI), y **Figura 4(b)** *Cyclidium* sp mostrando las marcas contra el complejo I eucariótico, zonas punteadas con mayor densidad de la marca contra el complejo I. **Figura 4 (c-d)** mostrando otro *Cyclidium* sp con las marcas contra el complejo I eucariótico (zonas punteadas), con mayor densidad en el citoplasma. **Figura 4 (e-f)** mostrando marcas con menor densidad en el citoplasma (FITC) y los núcleos (DAPI). La detección de la proteína de choque térmico-70 (Hsp70), en los ciliados anaerobios aislados del Lago de Alchichica establece la presencia de las estructuras del metabolismo energético, como los organelos relacionados con mitocondria. La **Figura 5** nos muestra la señal de esta proteína y la

localización citoplasmática de la señal. La señal de Hsp70 es de alta intensidad en el citoplasma de los ciliados anaerobios (**Figura 5 b**). La marca está localizada en el citoplasma en sitios específicos que podrían dar la impresión de rosetas en las cuales la intensidad del señal es muy alta, y en donde la proteína se concentra (**Figura 5 a y d**). La **Figura 5 c**, muestra a un ciliado anaerobio del genero *Christigera* sp que presenta la marca localizada en zonas específicas con alta intensidad. Aunado a esta proteína encontramos que estos ciliados no presentan la Citocromo Oxidasa C (**Figura 5 e-f**). El análisis de densidad fue realizado con el Software IMAGE PRO-6, como fue mencionado anteriormente. Las graficas representan las unidades de intensidad y el espectro en la que la señal es emitida. La **figura 6** presenta tres ciliados del genero *Cyclidium* que muestran el análisis del componente de intensidades de fluorescencia de las proteínas. Las proteínas que presentan una alta intensidad en el canal para de DAPI (380nm), son las proteínas nucleares, cuyas unidades van desde 208 0000-255 0000 unidades arbitrarias (**Figura 6 A**). Demás proteínas en muy baja intensidad son aquellas que podrían estar asociadas con la cubierta de estos ciliados anaeróbicos, así como proteínas asociadas a endosimbiontes que corresponden con la intensidad de 192 0000 unidades arbitrarias. El complejo I mitocondrial en estos organismos anaerobios se muestra en el canal para FITC (480 nm), y en zonas punteadas observamos la concentración de la proteína localizada en estructuras específicas del citoplasma en una intensidad de 144 0000 unidades arbitrarias (**Figura 6 B**). La **Figura 6 C** muestra otros dos ciliados anaerobios del genero *Cyclidium* que presentan la señal de las proteínas nucleares en alta intensidad en el canal para DAPI (canal azul, 380 nm). La marca del complejo I eucariótico está presente en alta intensidad en zonas específicas, posiblemente mitocondrias anaerobias (fechas rojas), la intensidad fue de 144 0000 unidades arbitrarias (**Figura 6 D**). Un control negativo sin marca para la proteína del

complejo eucariótico fue incluido para demostrar la ausencia de las marcas contra esta proteína, así como señales inespecíficas (**Figura 7 A-B**). Ciliados anaeróbicos del Complejo Cyclidium/Isocyclidium/Christigera fueron positivos para la marca contra el complejo I eucariótico. La **Figura 7 C** muestra los dos ciliados con picos de intensidad muy altos (255 0000 unidades arbitrarias) en el núcleo (Canal azul) en un análisis expresando el eje z. Las intensidades de estos ciliados para la proteína marcada fue muy baja (48 0000 unidades arbitrarias) en ambas células. El complejo I eucariótico se detectó en estos eucariotas en zonas delimitadas (zonas punteadas, y fechas rojas; canal

verde). *Christigera* sp presentó la marca contra la proteína Hsp-70, la cual se observa en zona concéntricas, que podrían representar mitocondrias anaeróbicas (**Figura 8 B**). Los núcleos del protozoario en el canal azul (**Figura 8 A**), mostrando macronúcleo y micronúcleo, muy característico de este grupo de protistas. La intensidad de la proteína Hsp-70 fue de 96 0000 unidades arbitrarias, en zonas concéntricas (**Figura 8 B**). La Citocromo Oxidasa C no fue detectada en estos ciliados corroborando que son anaeróbicos (**Figura 8 D**). Proteínas nucleares observadas en el análisis en los tres ejes (X,Y, Z), en el canal azul y con tinción DAPI para núcleos (**Figura 8 C**).

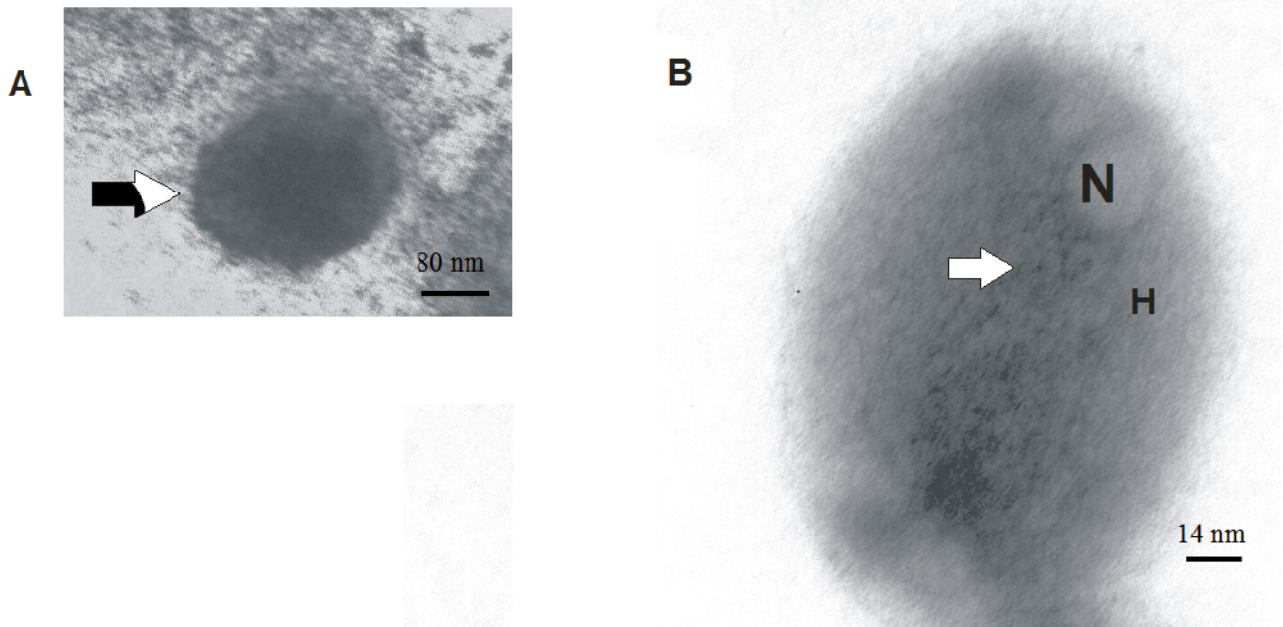


Fig. 1. Análisis de la ultraestructura de *Cycidium* sp anaeróbico proveniente del Lago de Alchichica (Puebla-México). Las muestras procesadas para microscopía electrónica según el protocolo estándar fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión para observar hidrogenosomas. A. Hidrogenosomas en *Cycidium* sp provenientes de estratos anaeróbicos del Lago de Alchichica. Flecha indicando hidrogenosoma en forma redondeada. B. *Cycidium* sp mostrando zona de hidrogenosomas en citoplasma coincidiendo con los análisis de fluorescencia. N. Núcleos. H. hidrogenosomas. Flecha. Indicando zona de hidrogenosomas.

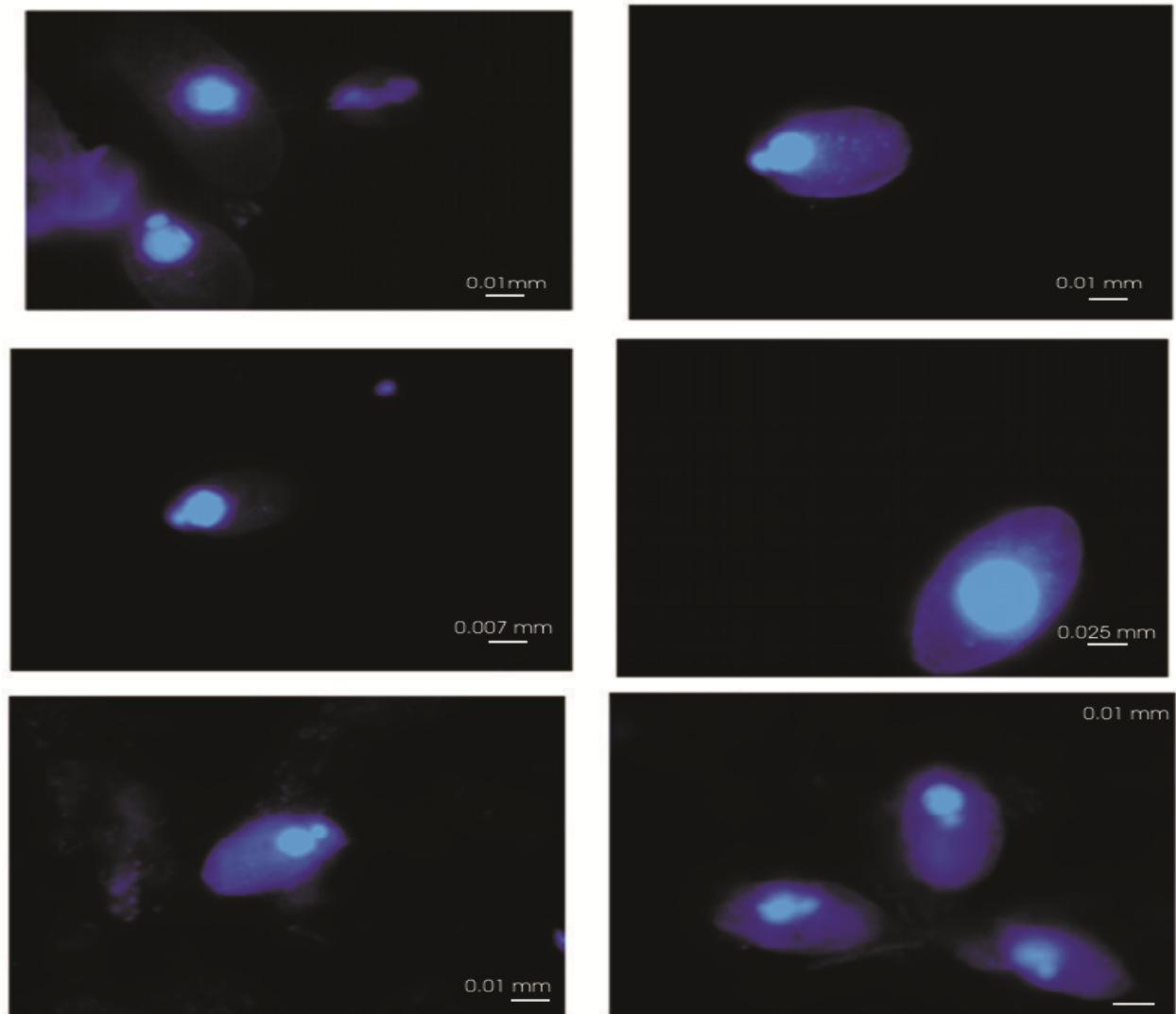


Fig. 2. Comunidad de Ciliados anaeróbicos identificados en el lago de Alchichica. Las muestras fueron tomadas, fijadas con Bouin modificado, y filtradas a través de membranas de policarbonato. Los ciliados atrapados en membranas recubiertas de agarosa (1%), fueron teñidos con DAPI (1:1000 del stock). Observaciones hechas por microscopia de fluorescencia. Imágenes en 100x.

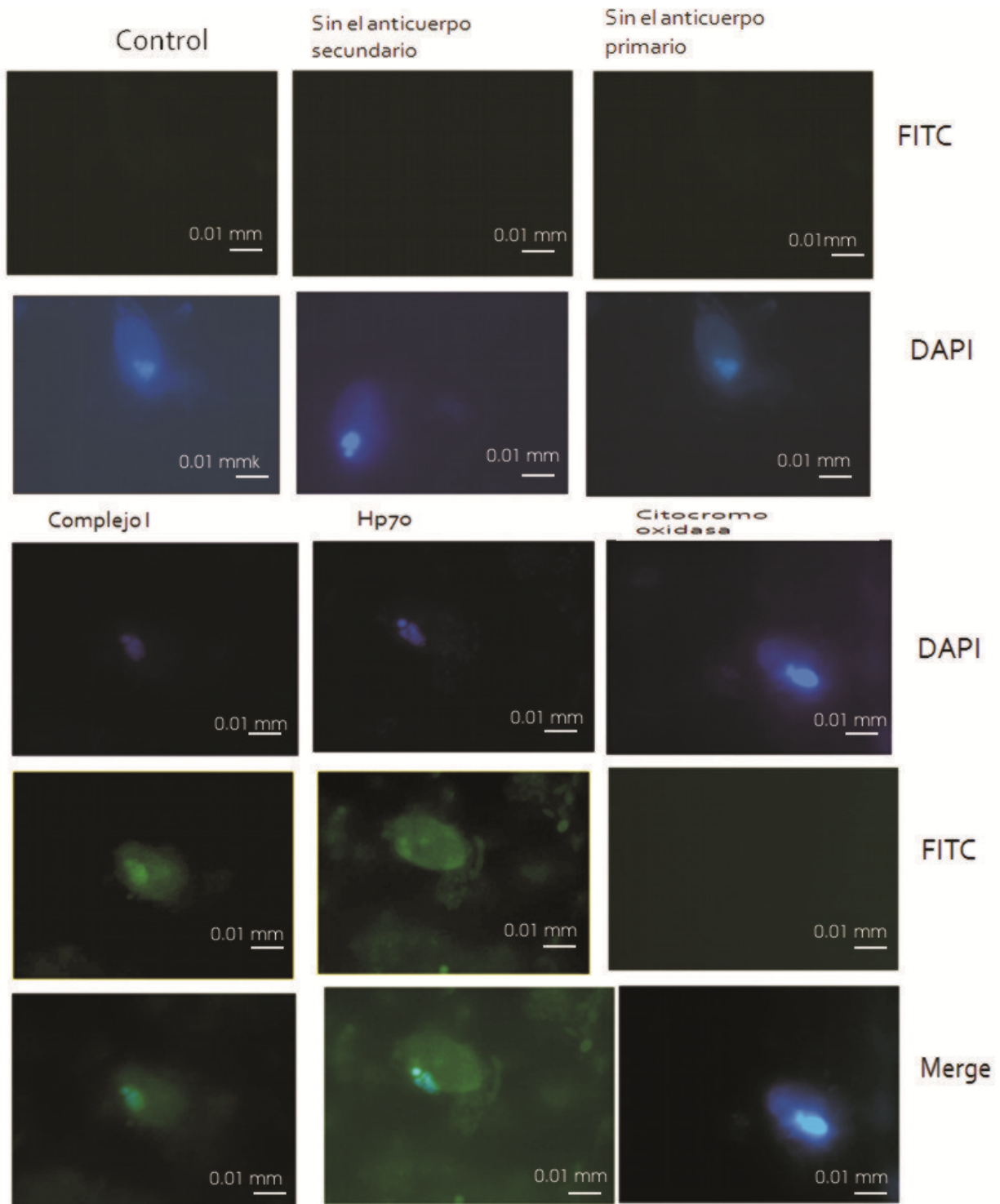


Fig. 3. Complejo I y otras proteínas mitocondriales en eucariotas anaeróbicos. Los ciliados concentrados sobre membrana fueron permeabilizados con Tripton X-100 (0.01%), y luego incubados con el anticuerpo primario (1:100) contra la subunidad α del centro activo del Complejo I, o contra Hsp70, o contra Citocromo oxidasa c, y posteriormente con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (1:100). Finalmente, los microorganismos fueron incubados con DAPI, y montados para su observación en el microscopio de fluorescencia. Controles. 100 \times . Ciliados anaerobios. Mostrando las marcas contra las proteínas mitocondriales en estos eucariotas anaeróbicos. Panel superior. Ciliados entrampados en membrana con la contra-tinción de DAPI (Izquierda, 100 \times). Ciliados mostrados en contraste de fases (Derecha, 100 \times). Panel medio. Ciliados mostrados en canal para FITC, mostrando áreas de tinción para Citocromo Oxidasa C (Izquierda), zonas punteadas. Merge mostrando el núcleo y la zonas punteadas que contienen la marca (Derecha, 100 \times). Panel inferior.

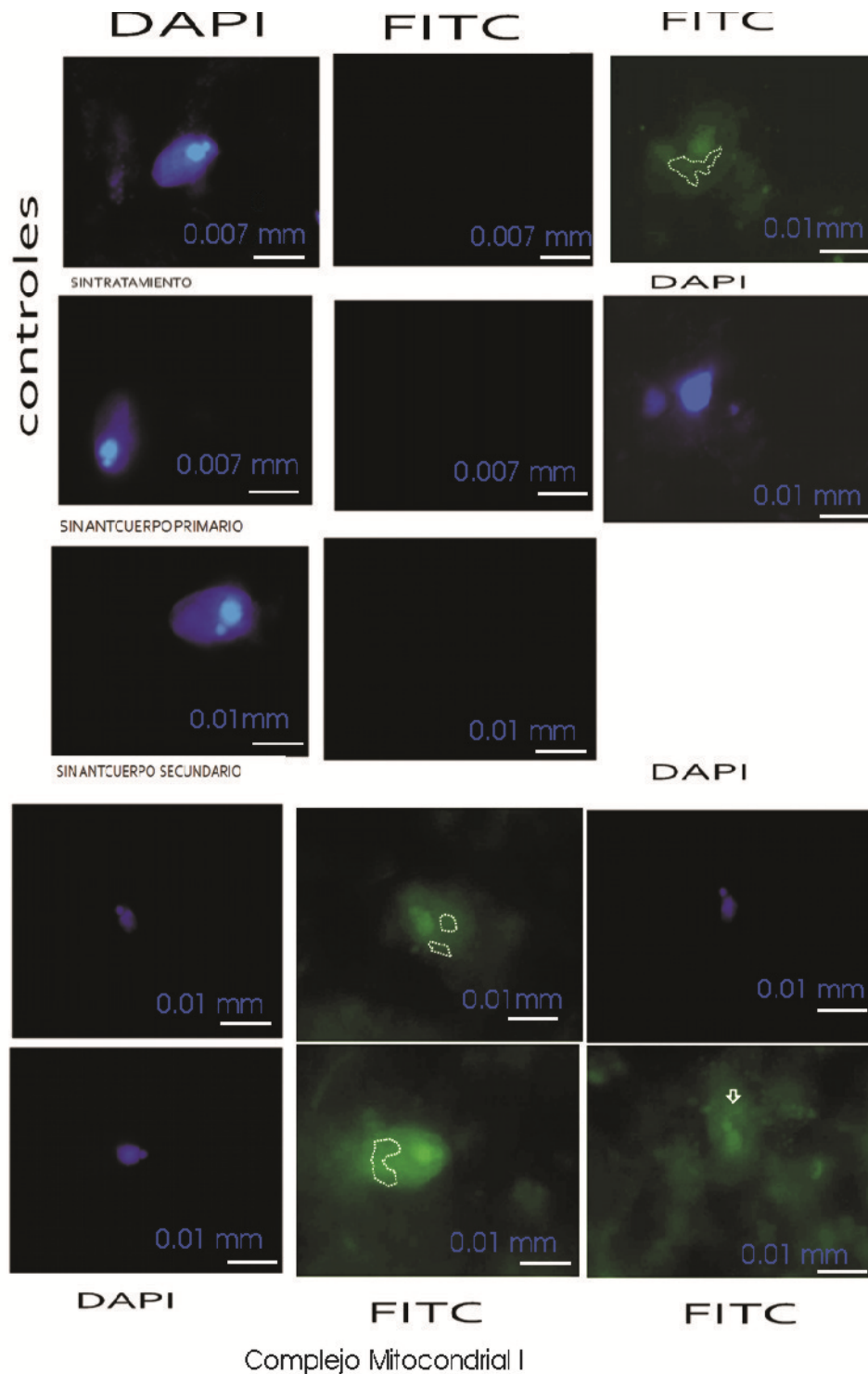


Fig. 4. Localización del Complejo I mitocondrial en ciliados anaeróbicos del complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera*. Los ciliados atrapados en membranas fueron teñidos por Inmunofluorescencia indirecta usando la combinación del anticuerpo primario contra la subunidad α del Complejo I mitocondrial, y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Las imágenes (100x) fueron analizadas con Image Pro Express 6.0 por microscopía de fluorescencia. **Controles.** Ciliados anaeróbicos sin tratamiento, con y sin los anticuerpos primario y secundario. No se observan marcas. Ciliados anaerobios del complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera* con la marca para el complejo I mitocondrial, zonas punteadas, y flecha. 100x.

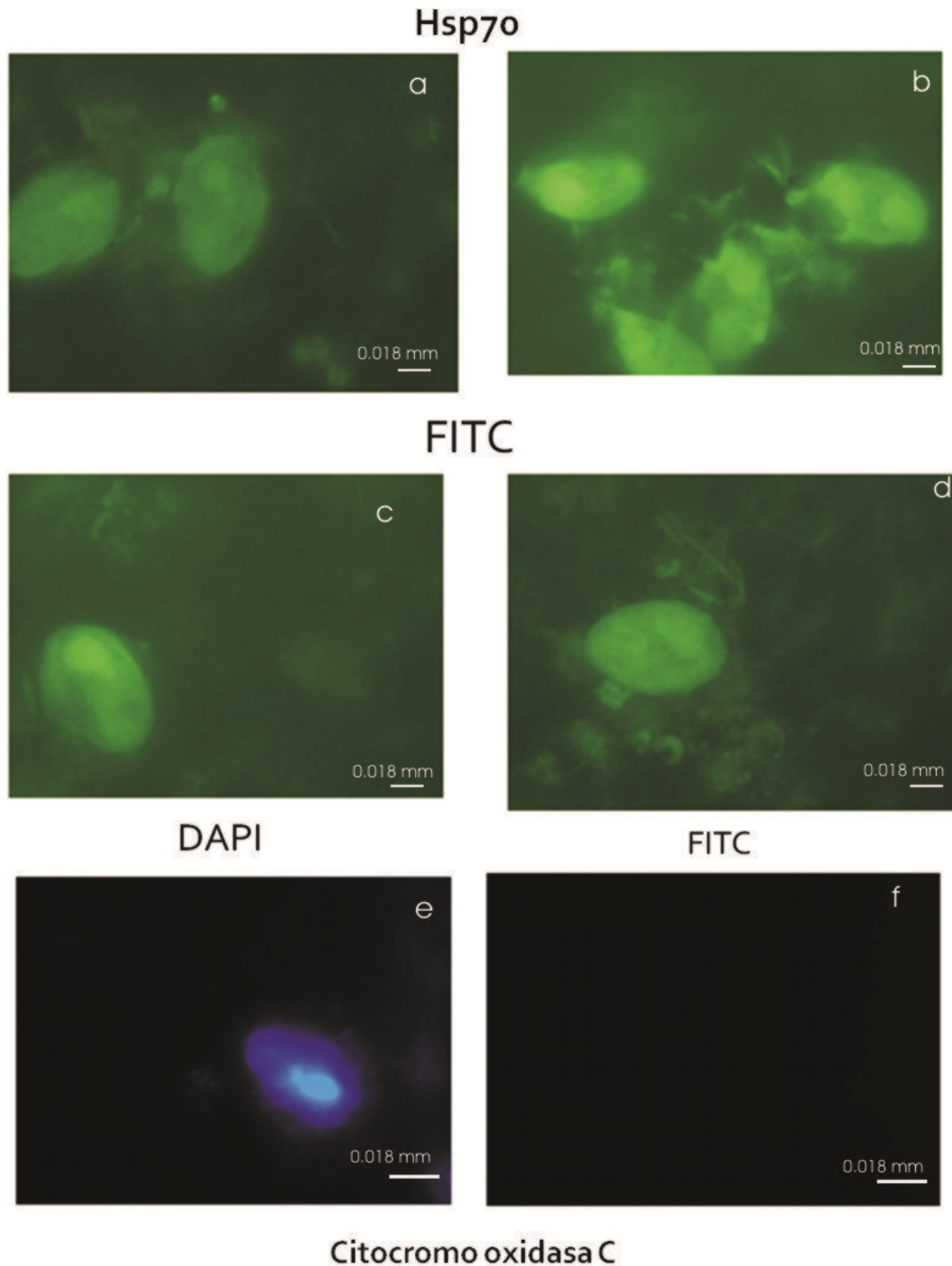


Fig. 5. Proteína de choque térmico 70 (Hsp70) en ciliados anaeróbicos. Los ciliados atrapados sobre membranas fueron incubados con el anticuerpo monoclonal contra la Hsp70 acoplado a FITC por Inmunofluorescencia directa muestran la presencia de Hsp70 en el citoplasma, y en muchos de los casos la marca coincide con la marca del complejo I mitocondrial (100x). Los ciliados fueron también tratados con el anticuerpo primario contra Citocromo Oxidasa C- anticuerpo secundario acoplado a FITC, siguiendo un protocolo para Inmunofluorescencia indirecta. Ciliados anaerobios sin Citocromo Oxidasa C, mostrando la anaerobiosis.

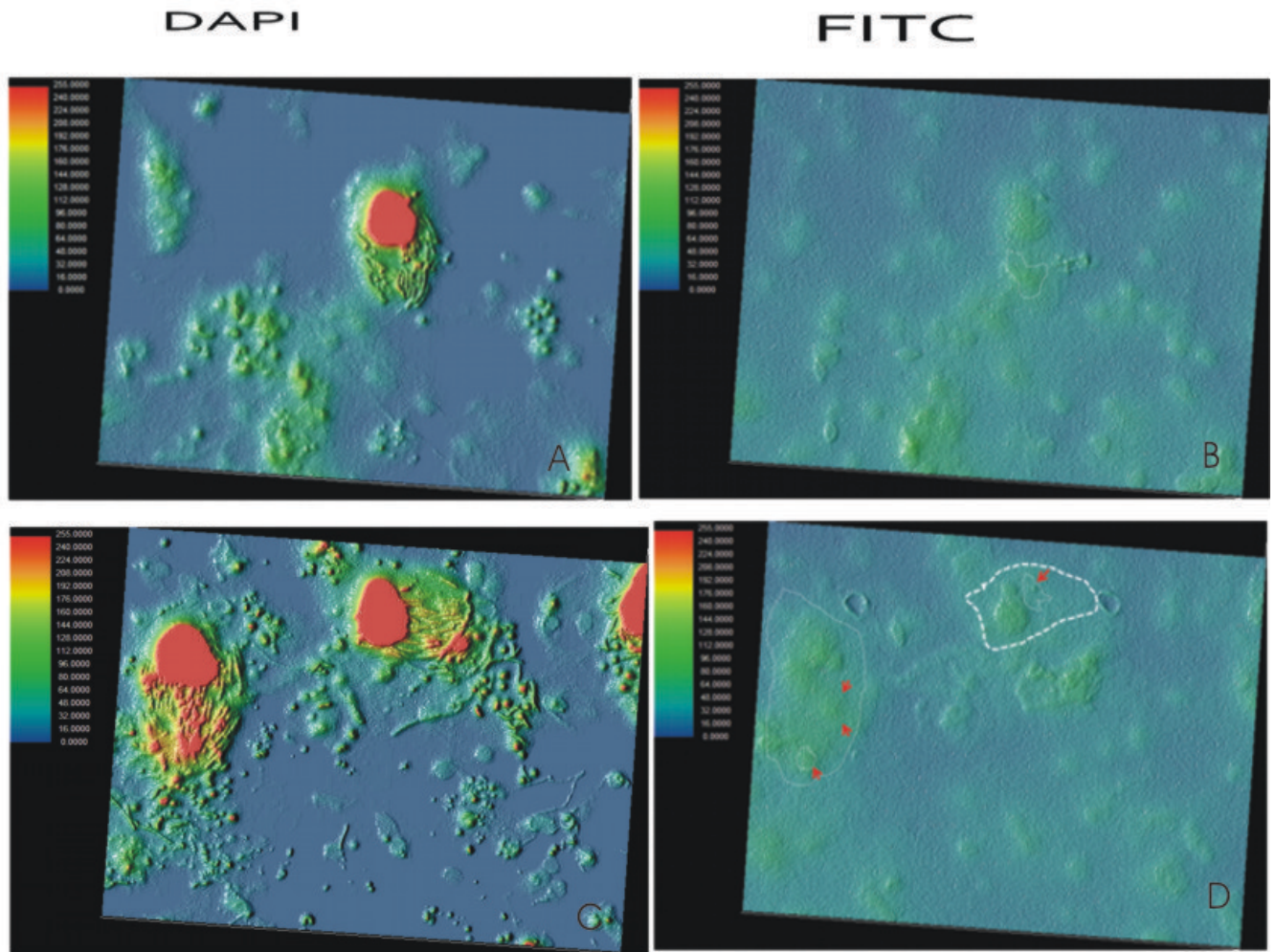


Fig. 6. Intensidad del complejo I mitocondrial en eucariotas anaeróbicos. Las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia en los canales específicos fueron procesadas en el Image Pro 6.0 para el análisis de intensidad de las marcas contra la proteína específica. Los datos en unidades arbitrarias muestran la presencia de la densidad de la proteína blanco.

Todos los ciliados anaeróbicos dentro del complejo Cyclidium/Isocyclidium/Christigera identificados en el Lago de Alchichica, Las graficas representando las unidades arbitrarias y los canales de fluorescencia (Y), y los microorganismos captados (X). A. Ciliado anaeróbico mostrando los niveles de proteínas asociadas al núcleo en el canal de DAPI. B. Ciliado anaeróbico mostrando los niveles del complejo mitocondrial I. En el canal de FITC niveles de sub-unidad α del complejo mitocondrial, con al menos 1.440.000 unidades de intensidad en zona delimitadas (zona punteada). C. Ciliados anaeróbicos del Cyclidium/Isocyclidium/ Christigera. Densidad de las proteínas acopladas al núcleo (DAPI). D. Densidad del complejo I mitocondrial. Flechas mostrando la concentración de la marca asociada al complejo I, zona punteada interna con concentración del complejo I, y punteado grueso demarcando a los microorganismos.

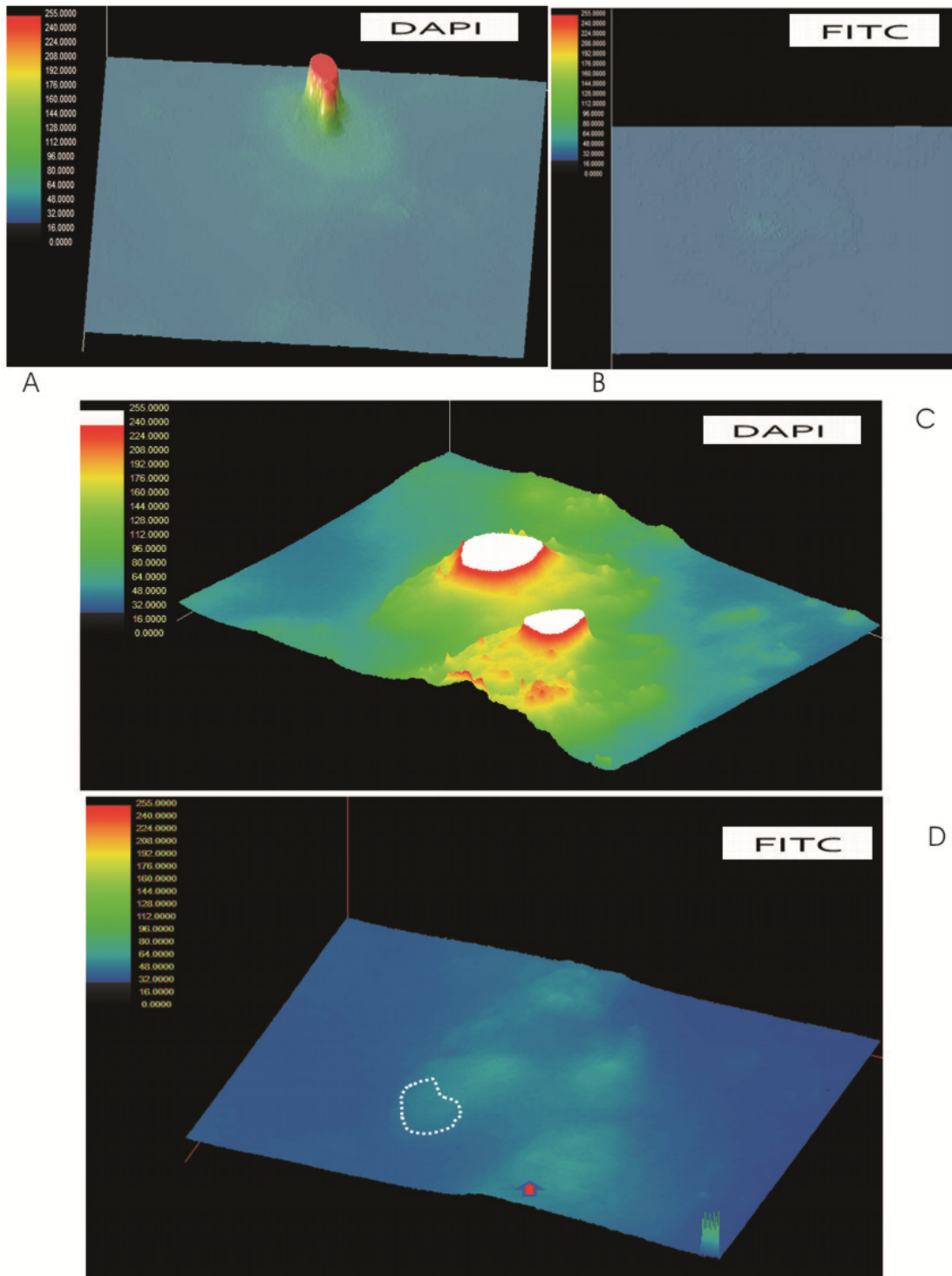


Fig. 7. Ausencia/presencia de la marca contra el Complejo mitocondrial I. Las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia en los canales específicos fueron procesadas en el Image Pro 6.0 para el análisis de intensidad de las marcas contra la proteína específica. Los datos en unidades arbitrarias muestran la presencia de la densidad de la proteína blanco. A. Ciliado anaeróbico del complejo Cyclidium/Isocyclidium/ Christigera. Niveles de proteínas nucleares (DAPI). B. Ciliado anaeróbico sin marca para el complejo mitocondrial. C. Ciliados anaeróbicos Cyclidium/Isocyclidium/Christigera. Niveles de proteínas nucleares. D. Niveles de intensidad de complejo mitocondrial I (zona puteada), 480.000 de unidades arbitrarias de intensidad. Flechas mostrando concentración de la marca en otro de los especímenes.

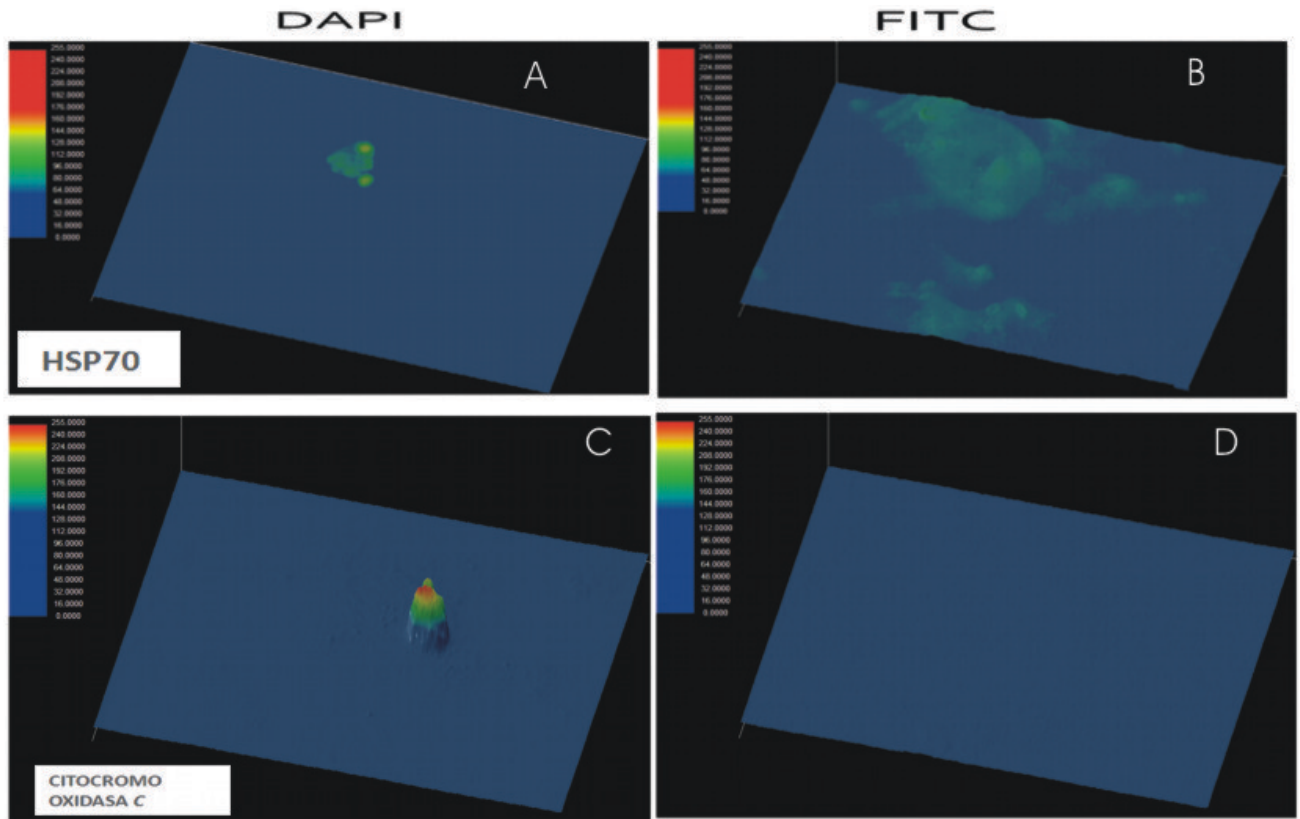


Fig. 8. Intensidad de la proteína de choque térmico-70 (Hsp70) de la matriz mitocondrial. Las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia en los canales específicos fueron procesadas en el Image Pro 6.0 para el análisis de intensidad de las marcas contra la proteína específica. Los datos en unidades arbitrarias muestran la presencia de la densidad de la proteína blanco. A. Ciliado anaeróbico mostrando los niveles de intensidad de las proteínas nucleares (DAPI). B. Ciliado anaeróbico mostrando los niveles de intensidad de la HSP70, en 1.280.000 unidades arbitrarias concentradas en zonas delimitadas. C. Ciliado anaeróbico mostrando los niveles de intensidad de las proteínas nucleares (DAPI). D. Ciliado anaeróbico marcado para la Citocromo oxidasa C sin marca.

DISCUSIÓN

Ciliados anaeróbicos aislados del Lago de Alchichica, prevalentemente del género *Cyclidium*, presentaron la sub-unidad 3 conservada del complejo I eucariótico, que contiene la subunidad proteínica Hierro-Azufre, y que esta conservada también en estos microorganismos, lo cual significa que este grupo de ciliados posee parte de la maquinaria que lleva a cabo la respiración celular de la mitocondria. Otro hallazgo importante en este estudio fue que los ciliados anaeróbicos presentaron también Hsp70, una proteína que está presente en la matriz mitocondrial y de otros organelos asociados con la mitocondria. Estos eucariotas anaeróbicos no presentaron el complejo IV,

que para efectos de este estudio se buscó la marca contra la proteína Citocromo C oxidasa, y la cual no fue encontrada en los ciliados rastreados aislados de estrato anaeróbico. Por el contrario, los ciliados que reciben mayor aporte de oxígeno (0.5 a 1 mg/L) en estratos más superficiales de este lago, presentaron Citocromo Oxidasa C (Datos no mostrados). Los ciliados anaeróbicos que habitan este nicho con déficit de oxígeno pertenecientes al complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera* mostraron Complejo I, sin el Complejo IV, determinando con ello que el organelo de síntesis energética está asociado con la

mitocondria siendo posiblemente una mitocondria anaeróbica, o los llamados organelos relacionados con mitocondria. Muller et al. [1], realizan una clasificación funcional de los organelos que generan ATP/elemento energético dependiendo de los productos metabólicos que producen y de los constituyentes de los complejos de proteínas que integran los sistemas. Teóricamente, los organelos pueden ser vistos como aquellos que generan ATP y los que no lo hacen, existen entonces 5 clases a saber; Mitosomas (Clase 5), Mitocondrias (Clase 1) que producen ATP usando el oxígeno como último aceptor de electrones, Mitocondria anaeróbica (Clase II), que no generan hidrogeno, Mitocondria anaeróbica productora de hidrogeno (Clase 3), que poseen cadena respiratoria, y los Hidrogenosomas (Clase 4), que no tienen cadena respiratoria; asumiendo que existe entre los protistas organelos que se originaron a partir de un organismo con mitocondria y que evolucionaron en otro sentido; lo cuales son llamados organelos relacionados con mitocondria, como lo hemos asumido aquí. Las mitocondrias anaeróbicas que por definición son típicas mitocondrias que funcionan anaeróticamente usando otros compuestos diferentes al oxígeno como aceptor final de electrones. En nuestro trabajo hay que puntualizar que los resultados muestran organismos anaeróbicos con al menos el complejo Mitocondrial I, sin Citocromo Oxidasa C (metabolismo anaeróbico), sin oxígeno como aceptor de electrones. En un contexto en el que la matriz del organelo presenta Hsp70, una proteína muy común entre los organelos relacionados con mitocondria. Es muy posible que el organelo que presentan estos organismos sea de tipo mitocondria, una mitocondria anaeróbica. Muller et al. [1], muestran también la posibilidad, teórica, de que algunas de estas mitocondrias anaeróbicas pierdan varios de los elementos que integran el complejo sistema de producción de ATP, tales como los complejo II, III, y IV, permaneciendo el complejo V o la ATPasa. La presencia del Complejo I eucariótico en especies del complejo

Cyclidium/Isocyclidium/Christigera anaeróbicos no había sido descrita antes, y confirma la modificación evolutiva de la mitocondria bajo las presiones ambientales. Hjort et al [14], establecen, por otro lado, que estos organelos son homólogos a la mitocondria con diferencias en los mecanismos y en la forma de tales organelos. Este tipo de organelos relacionados con la mitocondria han sido identificados en varios protistas especialmente en protozoarios parásitos cultivables, entre ellos Giardia, Trichomonas y Blastocytis. Boxma et al. [15], encuentran en el genoma del organelo, hidrogenosomas, en este caso, los genes para la codificación de proteínas asociadas al complejo I y II de la cadena respiratoria mitocondrial en un modelo de hidrogenosomas provenientes de *Nyctotherus ovalis*, un ciliado anaeróbico aislado del estomago de cucarachas. No obstante, no se demostró que estos genes finalmente se expresaran en contexto del funcionamiento del organelo. En este trabajo se demostró que los Ciliados anaeróbicos del complejo Cyclidium/Isocyclidium/Christigera sintetizan las proteínas del Complejo I mitocondrial, y la sub-unidad del sitio activo donde se insertan las subunidades de Fe-S (asiendo del intercambio de electrones), localizadas en un organelo relacionado con mitocondria, como lo demuestran las observaciones realizadas con la Hsp70, que por ser una proteína de matriz permitió observar estructuras en las que también existe la marca contra el Complejo I eucariótico. El espectro metabólico de este grupo de organismos parecer ser muy amplia y presenta muchas modificaciones, no solo como en el caso de las especies de Cyclidium anaeróbico, en el cual se encontró que el sistema energético esta constituido del complejo I mitocondrial sin Citocromo oxidasa C, sino también se puede encontrar algunas enzimas del metabolismo energético en el citoplasma ejerciendo una función en la producción de hidrogeno, tal es el caso de *Naegleria gruberi*, un organismo aerobio facultativo que presenta mitocondria, pero que en condiciones de anaerobiosis genera

hidrogeno desde afuera del organelo [16]. La diversidad de estos organelos parece ser tan amplia como el espectro de organismos que componen este Phylum. Básicamente la función de estos organelos es generar ATP partiendo de un sustrato e hidrogeno a nivel de la fosforilación oxidativa, en organelos que pueden ir desde una versión en miniatura de la mitocondria hasta organelos relacionados con mitocondria con modificaciones y hasta la reducción de los complejos que integran la cadena respiratoria. Diversos organismos pertenecientes a Ciliophora presentan organelos parecidos a mitocondrias, al menos en *Nyctotherus*, *Dasytricha*, *Metopus*, *Trmyema* [17], aquí en miembros del Genero *Cyclidium* se corrobora la presencia de organelos parecidos a mitocondrias. Gray [18], quien incorpora el término de MORs (organelos relacionados con mitocondria) establece que los organelos descritos para organismos que habitan en ambientes con bajos niveles de oxígeno no son más que mitocondrias que han sufrido modificaciones posteriores, esto basado en el genoma nuclear de algunos de los eucariotas anaeróbicos estudiados. El *cluster* Fe-S del complejo mitocondrial I está presente en varios de estos organelos asociados con la mitocondria, a pesar de la reducción que ha ocurrido en estos organelos, argumentando la importancia que tiene este sitio activo para la función de la mitocondria, y los organelos asociados. Los organelos relacionados con la mitocondria retienen el complejo mitocondrial I, reduciendo el organelo y sus funciones perdiendo los complejos mitocondriales III, IV, y V, como observamos en las especies del genero *Cyclidium* anaeróbicos. La presencia del complejo mitocondrial I en los ciliados anaeróbicos analizados significa que se conserva parte de la cadena respiratoria, como ha sido también descrito para otros protistas anaeróbicos. Por otro lado, nuestros resultados basados en el análisis de de la intensidad del sitio Fe-S conservado mostraron que este complejo se expresa en las especies del Complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera* en alta intensidad,

con una variación en algunas de las especies estudiadas. Este centro activo que denota la presencia de un organelo asociado a mitocondria cumple una función trascendente tanto en el metabolismo energético como desde el punto de vista evolutivo, debido a esta secuencia ha sido rastreada en numerosos estudios determinando el origen de la mitocondria y los organelos asociados. El complejo mitocondrial I (NADH:Ubiquinona oxidoreductasa) constituido por 40 sub-unidades, un co-factor FMN y ocho *cluster* FeS, denominado Complejo I eucariótico por Remacle et al [19], ha sido caracterizado en todos los eucariotas, incluso en genoma nuclear de los eucariotas anaeróbicos o de vida parasitaria, como los ciliados anaeróbicos objeto de este estudio. La sub-unidad seleccionada para rastrear este complejo en este estudio está asociada a la sub-unidad α de este complejo mitocondrial en la que yacen parte de los *cluster* conservados FeS (NuoC ò NDUFS3). En los ciliados anaeróbicos muestreados se encontró la marca contra este sitio, y esta marca presento picos que se asociaron con las marcas contra la proteína de matriz mitocondrial, Hsp70. Hallazgos similares han sido reportados para otros eucariotas en los que existe un Complejo I eucariótico no clásico, como es caso de las especies del genero *Cyclidium* de los estratos anaeróbicos del Lago de Alchichica, asociados con organelos relacionados con mitocondria, tales como hidrogenosomas, mitosomas o mitocondrias anaerobias [19,20,21,22,23,24]. Partes del centro redox del Complejo mitocondrial I, las sub-unidades NuoF (24 kDa) y NuoE (51 kDa), también fueron determinadas acopladas a organelos relacionados con mitocondria en otros ciliados anaeróbicos parasitarios, *Nyctotherus ovalis* [20, 25]. Muy parecido a nuestros hallazgos fueron encontrados en *Blastocystis* que presento también un organelo asociado con mitocondria con proteínas del complejo mitocondria I (NADH), sin el resto de los complejos mitocondriales II, III, IV, e incluso V coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio [21]. Un ensamblaje del centro

Fe-S ha sido reportado en hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis* siendo parte conservada del complejo mitocondrial I en eucariotas [22]. Proteínas similares con centro Fe-S acopladas a organelos asociados con mitocondria han sido también encontradas en otros trichomonadales [23] confirmando nuestros hallazgos. Por otro lado, en este estudio encontramos la presencia de Hsp70 en los organelos relacionados a mitocondrias que observamos en los ciliados anaeróbicos provenientes del Lago de Alchichica. Esta proteína es utilizada por la maquinaria de los eucariotas para el ensamblaje del complejo Fe-S [25,26] y constituyen una familia de proteínas chaperonas que intervienen en una variedad de procesos de plegamiento en diferentes compartimientos intracelulares, con cierta especificidad hacia secuencias de péptidos y en diferentes estados de plegamiento de las proteínas; en específico la Hsp70 reconoce péptidos de proteínas mitocondriales [28]. Esta proteína es también muy conservada entre los eucariotas, y ha sido determinada en varios de los linajes de protistas sin mitocondria o con organelos asociados con mitocondrias. Hsp70 mitocondrial fue encontrada en *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolítica*, *Nosema lacustae*, *Vairimorpha necatri*, y *Trichomonas vaginalis* con secuencias muy conservadas [29,30,31,32]; según, Arisue et al [29] no existen los eucariotas amitocondriales o de transición sino una pérdida secundaria de la mitocondria en el pasado evolutivo de los eucariotas unicelulares de vida parasitaria o de condiciones anaeróbicas. Nuestros resultados muestran la Hsp70 concentrada en organelos parecidos a rosetas, con picos de intensidad altos en comparación con la marca del complejo I en varias de las especies anaeróbicas del complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera* corroborando la presencia de organelos relacionados con mitocondrias. Un hallazgo similar al encontrado aquí en este trabajo fue demostrado también en Apicomplexa; *Cryptosporidium parvum* presenta Hsp70 mitocondrial localizada en organelos relacionados con

mitocondria[33]. La Hsp70 mitocondrial probada en este trabajo muestra por su localización la presencia de un tipo de mitocondria en los ciliados anaeróbicos provenientes del Lago de Alchichica. Finalmente, secuencias de Hsp70 fueron rastreadas en *Paramecium* y *Euplotes*, y encontradas asociadas a mitocondria, entre miembros del grupo *Oligohymenophora* y *Hypotricha* [34]. Nuestros hallazgos muestran que los ciliados anaeróbicos identificados del Lago de Alchichica presentan proteínas Fe-S del complejo mitocondrial I y Hsp70 que confirman la presencia de organelos asociados a mitocondrias poniendo en debate la hipótesis de que los ciliados anaeróbicos presentan hidrogenosomas.

CONCLUSIONES

Los ciliados anaeróbicos pertenecientes al complejo *Cyclidium/Isocyclidium/Christigera* aislados del estrato anóxico del Lago de Alchichica presentan el sitio activo Fe-S del complejo mitocondrial I asociado con Hsp70 mitocondrial, lo cual es evidencia de que estos ciliados anaeróbicos presentan organelos asociados a mitocondrias.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo otorgado a través del programa de Becas para Estancias Posdoctorales y Sabáticas Nacionales 2009-2010 y 2010-2011.

Al Programa de apoyo a los profesores de carrera para la formación de grupos de investigación (PAPCA) de la FES-I, UNAM 2009-2010 por el financiamiento otorgado para llevar a cabo este proyecto.

Por su asistencia técnica a Fernando Bautista, Ximena Sánchez, Patricia Alley, Jesús Espinosa, y al grupo de Morfología del UIISCE de la FES Iztacala.

REFERENCIAS

- [1] Müller M., Mentel M., van Hellemond J.J., Henze K., Woehle C., Gould S.B., Yu R.Y., van der Giezen M., Tielens A.G., Martin W.F. (2012) "Biochemistry

- and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes” *Microbiol Mol Biol Rev.* 76:444-95.
- [2] Embley M., van der Giezen M., Horner D.S., Dyal P.L., Foster P. (2003) “Mitochondria and hydrogesomes are two forms to the same fundamental organelle” *Philosophical Transactions R Soc Lond B.* 258: 191-203.
- [3] Horner, D. S., Foster, P. G., Embley, T.(2000) “Miron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes” *Mol. Biol. Evol.* 17: 1695-1709.
- [4] Pütz S., Dolezal P., Gelius-Dietrich G., Bohacova L., Tachezy J., Henze K. (2006) “Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*” *Eukaryot. Cell.* 5: 579-586.
- [5] Mukherjee M, Sievers S.A, Brown M.T., Johnson P.J. (2006) “Identification and biochemical characterization of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*” *Eukaryotic Cell.*5:2072–2078.
- [6] Dyal S.D., Koehler C.M., Delgadillo-Correa M.G., Bradley P.J., Mper E.P. (2000) “Presence of a Member of the Mitochondrial Carrier Family in Hydrogenosomes: Conservation of Membrane-Targeting Pathways between Hydrogenosomes and Mitochondria” *Molecular and Cellular Biology.* 20:2488–2497.
- [7] Dolezal P., Smíd O., Rada P., Zubáková Z., Bursác D., Suták R., Tachezy J. (2005) “Giardia mitosomas and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targering”. *PNAS.* 102: 10924-10929.
- [8] Hug L.A., Stechmann A., Roger A.J. (2010) “Phylogenetic Distributions and Histories of Proteins Involved in Anaerobic Pyruvate Metabolism in Eukaryotes”. *Mol. Biol. Evol.* 27:311–324.
- [9] Derelle R., Lang B. F. (2012) “Rooting the Eukaryotic Tree with Mitochondrial and Bacterial Proteins”. *Mol. Biol. Evol.* 29:1277–1289.
- [10] Van Hoek A., Akhmanova A.S., Huynen M.A., Hackstein J.H.P. (2000) “A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*”. *Mol. Biol. Evol.* 17: 202-206.
- [11] Macek M., Pestova D., Martínez M.E. (2008) “Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico)”. *Hidrobiologica.* 18: 25-35.
- [12] Aladro Lubel M.A., Martínez Murillo M.E., Mayén Estrada R., (1990) *Manual de ciliados psamofilos marinos y salobres de México*, México, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, 169pp.
- [13] Patterson D.J., (2009) *Free-living freshwater protozoa. A colour guide*, Washington, Wolfe Publishing, 221pp.
- [14] Hjort K., Goldberg A.V., Tsaousis A.D., Hirt R.P., Embley T. M. (2010) “Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 365: 713-727.
- [15] Boxma B., de Graaf R.M., van der Staay G.W., van Alen T.A., Ricard G., Gabaldón T. (2005) “An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen”. *Nature.* 434:74-79.
- [16] Tsaousis A.D, Nyvltova E., Utak R.S., Hrdy I., Tachezy J. (2014). A Nonmitochondrial Hydrogen Production in *Naegleria gruberi*. *Genome Biol. Evol.* 6:792–799.
- [17] Ginger M. L., McFadden G. I., Michels P. A. (2010) “The evolution of organellar metabolism in unicellular eukaryotes”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 365: 693-698.
- [18] Gray M. W. (2012) “Mitochondrial evolution. Cold Spring Harbor perspectives in biology”. 4: a011403.
- [19] Remacle C., Barbieri M.R., Cardol P., Hamel P.P. (2008) “Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process”. *Molecular Genetics and Genomics.* 280. 93-110.

- [20] Boxma B., Ricard G., van Hoek H.A.M., Severing E, Moon-van der Staay S.Y. (2007) "The [FeFe] hydrogenase of *Nyctotherus ovalis* has a chimeric origin". *BMC Evolutionary Biology*, 7:230 doi:10.1186/1471-2148-7-230.
- [21] Pérez-Brocail V., Clark C.G. (2008) "Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization". *Mol Biol Evol.* 25:2475-82. doi: 10.1093/molbev/msn193.
- [22] Sutak R., Dolezal P., Fiumera H.L., Hrdy I., Dancis A., Delgadillo-Correa M., Johnson P.J., Müller M., Tachezy J. (2004) "Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10368-73.
- [23] Mazet M., Diogon M., Alderete J.F., Vivarès C.P., Delbac F. (2008) "First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*". *Int J Parasitol.* 38:177-90.
- [24] Gray M.W. (2004) "The hydrogenome's murky past". *Nature.* 434: 29-30.
- [25] Hrdy I., Hirt R.P., Dolezal P., Bardonová L., Foster P.G., Tachezy J., Embley T.M. (2004) "Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I". *Nature.* 432:618-22.
- [26] Schilke B., Williams B., Knieszner H., Puksza S., D'Silva P., Craig E.A., Marszalek J. (2006) "Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis". *Curr Biol.* 16:1660-5.
- [27] Huynen M.A., Snel B., Bork P., Gibson T.J. (2001) "The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly". *Hum Mol Genet.* 10:2463-8.
- [28] Artigues A., Crawford D.L., Iriarte A., Martinez-Carrion M. (1998) "Divergent Hsc70 binding properties of mitochondrial and cytosolic aspartate aminotransferase. Implications for their segregation to different cellular compartments". *J Biol Chem.* 273:33130-4.
- [29] Arisue N., Sánchez L.B., Weiss L.M., Müller M., Hashimoto T. (2002) "Mitochondrial-type hsp70 genes of the mitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians". *Parasitol Int.* 51:9-16.
- [30] Hirt R.P., Healy B., Vossbrinck C.R., Canning E.U., Embley T.M. (1997). "A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria". *Curr Biol.* 7:995-8.
- [31] Peyretilade E., Broussolle V., Peyret P., Méténier G., Gouy M., Vivarès C.P. (1998) "Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin". *Mol Biol Evol.* 15:683-9.
- [32] Germot A., Philippe H., 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 U S A.* 93:14614-7.
- [33] Slapeta J., Keithly J.S. (2004) "Cryptosporidium parvum mitochondrial-type HSP70 targets homologous and heterologous mitochondria". *Eukaryot Cell.* 3:483-94.
- [34] Budin K., Philippe H. (1998) "New insights into the phylogeny of eukaryotes based on ciliate Hsp70 sequences". *Mol Biol Evol.* 15:943-56.