



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**INCORPORACIÓN DE FOSFATO EN PROTEÍNAS DE *Symbiodinium* SPP.
DURANTE EL CRECIMIENTO Y BAJO DIVERSOS ESTÍMULOS EXTERNOS.**

Trabajo de tesis para optar al grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD QUÍMICA ACUÁTICA

Presenta
RAÚL EDUARDO CASTILLO MEDINA

Director de tesis
Dr. Marco A. Villanueva Méndez
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Comité tutorial
Dra. Patricia E. Thomé
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dr. Antonio Peña Díaz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Edgar Zenteno Galindo
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Puerto Morelos, Quintana Roo, Junio 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al proyecto PAPIIT IN200409 de la UNAM por el financiamiento de este trabajo de investigación; a CONACyT, por el apoyo de beca económica de tesis de maestría otorgado durante dos años; al programa de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por darme la oportunidad de estudiar y hacer realidad el grado de Maestría; a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) por el apoyo de vivienda e infraestructura; y a la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de Cuernavaca, UNAM, a cargo del Dr. Cesar Batista, por el apoyo en el secuenciamiento de proteínas.

Especialmente, agradezco al Dr. Marco Villanueva por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo de tesis de Maestría en su laboratorio, por su dirección, tanto en el diseño de cada experimento y el análisis de los resultados obtenidos, y así llevarlo a buen término. Agradecerle también, su confianza, paciencia, tiempo y dedicación.

Agradezco a los miembros de mi comité, a la Dra. Patricia E. Thomé y Dres. Antonio Peña Díaz, Edgar Zenteno Galindo, Píndaro Días Jaimes, por su tutoría en esta tesis, por corregir, dirigir y evaluar en cada tutorial el desarrollo de la misma, e igualmente agradecerles por su apoyo en las correcciones de este escrito. Además, a la Dra. Thomé, por el uso de algunos equipos y reactivos de su laboratorio.

Agradezco a mis amigos de laboratorio, M.C. Alma Rosa Almaral Mendivil por su apoyo técnico en el laboratorio, Tania por sus buenos comentarios y sugerencias en algunos resultados, Mario y Esmeralda apoyo en el desarrollo de algunos experimentos y a todos por la sana convivencia que me brindaron en el laboratorio. Además, mi agradecimiento se extiende a toda la comunidad de la UASA que sin pensarlo contribuyeron en alguna forma en el desarrollo de esta Tesis.

A mis padres y hermanos, siempre les estaré inmensamente agradecido por su apoyo incondicional y por la confianza que siempre me han tenido, pero sobre todo, por su amor, cariño y ejemplo.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	ANTECEDENTES.....	5
A.	Morfología y ciclo vida de <i>Symbiodinium</i>	5
B.	Interacciones celulares de la simbiosis cnidaria-dinoflagelado.....	6
C.	Transducción de señales.....	7
D.	Fosforilación/Desfosforilación.....	9
	1. Efecto de la fosforilación en proteínas blanco.....	10
	2. Mecanismos de especificidad en la fosforilación de proteínas.....	11
E.	<i>Symbiodinium</i> y su respuesta a estímulos.....	13
F.	Blancos de cinasas y su papel en la percepción de la luz.....	15
IV.	JUSTIFICACIÓN:.....	18
V.	HIPÓTESIS.....	18
VI.	OBJETIVOS.....	18
VII.	MATERIALES Y METODOS.....	20
A.	Material biológico.....	20
B.	Preparación de los extractos de proteínas totales.....	20
C.	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	21
D.	Inmunodetección (Western blot).....	21
E.	Tinción de los geles de poliacrilamida.....	22
F.	Anticuerpos primarios y secundarios, y sonda secundaria.....	23
G.	Análisis con anticuerpos que reconocen residuos fosforilados de proteínas en extractos de <i>Symbiodinium</i>	24
H.	Análisis de extractos de proteínas de <i>Symbiodinium</i> de cultivos de diferentes días de crecimiento con los anticuerpos.....	24
I.	Tratamientos con agentes químicos a células de <i>Symbiodinium</i>	24
J.	Tratamiento con extracto de tejido de <i>Cassiopeia xamachana</i> sobre células KB8.....	25

K.	Tratamientos con luz /oscuridad a células de <i>Symbiodinium</i> en cultivo.	26
1.	Tratamiento con luz en células adaptadas a oscuridad.	26
2.	Tratamiento con luz y oscuridad en células adaptadas a oscuridad.	26
3.	Tratamiento con oscuridad y luz a células adaptadas a luz.	27
L.	Tratamientos con luz /oscuridad a células de <i>Symbiodinium</i> en simbiosis.	27
M.	Análisis de solubilización diferencial de proteínas microsomales.	28
N.	Aislamiento y secuencia parcial de la proteína de 75 kDa.	29
VIII.	RESULTADOS	31
A.	Inmunodetección de proteínas de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11 con anticuerpos anti-fosfoserina, -fosfotreonina y -fosfotirosina.	31
B.	Cambios en el estado de fosforilación de proteínas durante el crecimiento de células de <i>Symbiodinium</i> en cultivo.	32
C.	Efecto de estímulos químicos en la fosforilación de Thr en proteínas de células KB8 cultivadas <i>in vitro</i>	39
D.	Efecto de un extracto de la medusa <i>C. xamachana</i> en la fosforilación de Thr en las proteínas de cultivos <i>in vitro</i> de KB8.	40
E.	Efecto de estímulos de luz y oscuridad en el nivel de fosforilación de Thr en proteínas de <i>Symbiodinium</i>	42
1.	Efecto de la luz en células <i>Symbiodinium</i> adaptadas a oscuridad.	42
2.	Efecto de la oscuridad en células <i>Symbiodinium</i> adaptadas a oscuridad después de estímulo con luz.	43
3.	Efecto de la oscuridad en células <i>Symbiodinium</i> adaptadas a luz.	45
4.	Efecto de la luz en células <i>Symbiodinium</i> en simbiosis adaptadas a oscuridad.	46
F.	Análisis de fracciones membranales microsomales y solubilizadas diferencialmente. Posible localización subcelular de pp75.	48
G.	Aislamiento e identidad de pp75.	49
IX.	DISCUSIÓN	58
A.	Anticuerpos anti-fosfoaminoácidos son capaces de inmunodetectar proteínas fosforiladas en <i>Symbiodinium</i> spp.	58
B.	La pp75 mostró una fosforilación diferencial aparente dependiente del grado de proliferación celular.	60

C. La pp75 no mostró una fosforilación diferencial aparente dependiente de estímulos químicos.	61
D. La fosforilación diferencial aparente de pp75 fue influenciada fuertemente por cambios de luz y oscuridad.....	62
E. Relación de pp75 con estadios simbióticos de <i>Symbiodinium</i>	64
F. Aislamiento, secuencia y localización subcelular de pp75.	65
G. Vía posible en la que pudiera participar pp75/HSP90 en <i>Symbiodinium</i> spp.	68
X. CONCLUSIONES	71
XI. PERSPECTIVAS	72
XII. FIGURAS COMPLEMENTARIAS	73
XIII. REFERENCIAS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y esquema del ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i>	6
Figura 2. Esquema general de los pasos de una transducción de señal	9
Figura 3. Regulación de la fosforilación y la desfosforilación de proteínas por la actividad de proteínas cinasas.	10
Figura 4. Ilustración de un fosfo-grupo como un centro organizador que establece uniones bidentadas a residuos de arginina.	11
Figura 5. Las proteínas cinasas comparten un mecanismo y plegado común	12
Figura 6 . Algunos factores a los que habitualmente esta expuesto <i>Symbiodinium</i> en su entorno.	14
Figura 7. Modelo propuesto para la expresión génica regulada por la luz.	17
Figura 8. Inmunodetecciones de fosfoaminoácidos presentes en proteínas de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11 con anticuerpos anti-pSer, anti-pTyr y anti-pThr.....	32
Figura 9. Inmunodetecciones con anticuerpos anti-pThr de proteínas de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11, en diferentes días de crecimiento <i>in vitro</i>	35
Figura 10. Inmunodetecciones con anticuerpos anti-pTyr de proteínas de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11, en diferentes días de crecimiento <i>in vitro</i>	36
Figura 11. Inmunodetecciones con anticuerpos anti-pSer de proteínas de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11, en diferentes días de crecimiento <i>in vitro</i>	37
Figura 12. Cinética de crecimiento de células de <i>S. kawagutii</i> , KB8 y Mf11 analizada por Western blot con los anticuerpos anti-pThr.....	38
Figura 13. Comportamiento en el grado de fosforilación aparente de la proteína de 75 kDa en células KB8 sometidas a diversos estímulos.	40
Figura 14. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en simbiontes recién aislados y células KB8 <i>in vitro</i> tratadas con tejido de <i>C. xamachana</i>	41
Figura 15. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos <i>in vitro</i> de <i>S. sp.</i> KB8 (A), <i>S. kawagutii</i> (B) y <i>S. sp.</i> Mf11 (C), adaptados a oscuridad y después de un estímulo de luz.	44

Figura 16. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos <i>in vitro</i> de KB8 adaptados a oscuridad y después de un estímulo de luz seguido de retorno a condiciones de oscuridad.....	45
Figura 17. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos <i>in vitro</i> de KB8, adaptados a luz y retornados a oscuridad.	47
Figura 18. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en simbiontes recién aislados de <i>C. xamachana</i> , adaptadas a oscuridad y después de un estímulo de luz.	48
Figura 19. Análisis por Western blot con anticuerpos anti-pThr de fracciones obtenidas por solubilización diferencial de fracciones microsomales de KB8.	49
Figura 20. Análisis de las muestras obtenidas de las columnas de DEAE-SEPHACEL (A) y de hidroxapatita (B) para inmunodetectar a pp75 con anticuerpos anti-pThr.	51
Figura 21. Aislamiento de pp75 en una banda libre de otras proteínas, en un gel de SDS-PAGE.....	52
Figura 22. Alineamiento de secuencias parciales de dos péptidos de pp75 con las secuencias de aminoácidos de Hsp90 de <i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Ectocarpus siliculosus</i> , y <i>Symbiodinium</i> sp. C3.	52
Figura 23. Alineamiento de secuencias de péptidos derivados de pp47 kDa con las secuencias de aminoácidos de la enzima RNA helicasa que muestra los dominios DEAD/DEAH de <i>Dictyostelium discoideum</i>	53
Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias homólogas a HSP90 de KB8.	56
Figura 25. Efecto de la fosforilación/desfosforilación sobre HSP90.	70

ABREVIATURAS

Pi-aminoácido=fosfo-aminoácido

pSer=fosfo-serina

pThr=fosfo-treonina

pTyr=fosfo-tirosina

MAPK= Mitogen activated protein kinase (proteínas cinasas activadas por mitógenos)

RTK= receptor tirosine kinase (receptor cinasa de Tyr)

SH2= Src Homology 2 (dominio homólogo de Src)

Grb2= Growth factor receptor-bound 2 (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento).

SH3= Src Homology 3 (dominio homólogo de Src)

Sos= Son of Sevenless

PTB=Phospho-Tyrosine Binding (dominio de unión a Tyr)

CDK2= Cyclin-dependent 2 Kinase (cinasa dependiente de ciclina 2)

PKA= Protein Kinase A (proteína cinasa A)

-AP= -Alkaline Phosphatase (conjugado a fosfatasa alcalina).

psi= Pounds per Square Inch (libras por pulgada cuadrada)

BLAST= Basic Local Alignment Search Tool (herramienta de búsqueda de alineamientos básica).

BLASTp= herramienta para la búsqueda de alineamientos entre secuencias de proteínas.

tBLASTn= herramienta para búsqueda en una base de nucleótidos traducidas usando una secuencia de proteína

I. RESUMEN.

Symbiodinium spp. son organismos dinoflagelados simbióticos y fotosintéticos que suelen encontrarse tanto en vida libre como en asociación con invertebrados marinos y algunos organismos protistas. En ambas condiciones de vida, *Symbiodinium* responde a estímulos ambientales y externos, y a señales del huésped mediante proteínas de transducción, a través de mecanismos que involucran modificaciones de fosforilación y desfosforilación en sitios específicos en las proteínas. Debido a la importancia de estas modificaciones, se llevó a cabo un análisis de proteínas fosforiladas y/o capaces de fosforilarse de manera diferencial en células en cultivo *in vitro* de *Symbiodinium* spp., durante su crecimiento y bajo diversos estímulos externos. Para llevar a cabo estos análisis se usaron anticuerpos que detectan aminoácidos fosforilados de proteínas a través de la técnica de Western blot. Los resultados demostraron que ocurren patrones de fosforilación diferencial en proteínas de *Symbiodinium* durante el crecimiento en cultivo, así como cambios en la fosforilación como respuesta, tanto a estímulos de luz, como a extractos de tejido de su hospedero. Una proteína de 75 kDa (pp75), que sufrió cambios en su nivel de fosforilación en treonina (Thr), dependiente de proliferación celular y ante dichos estímulos, fue seleccionada para su caracterización. Adicionalmente, los resultados sugieren que los cambios en la fosforilación de esta proteína son influenciados por el hospedero. La proteína fue aislada y su secuencia parcial de aminoácidos la identificó como una proteína tipo HSP90. Su probable secuencia completa de aminoácidos (SymHSP90-5) se obtuvo de una base de datos de EST (Expressed Sequence Tag) de *Symbiodinium* filotipo KB8. El análisis *in silico*, y sus propiedades solubles, sugieren que podría estar localizada en el estroma de los cloroplastos. Se propone un escenario con la función más probable que podría desempeñar SymHSP90-5/pp75 en *Symbiodinium*. Los resultados sugieren que durante la proliferación celular existen procesos de fosforilación/desfosforilación y que la luz, es un factor que desencadena dichos procesos en *Symbiodinium* spp.

II. INTRODUCCIÓN.

En el ambiente marino relaciones íntimas, como la endosimbiosis entre organismos dinoflagelados e invertebrados, se han identificado desde el siglo XIX. Los dinoflagelados simbióticos son protistas unicelulares que forman relaciones mutualistas con una amplia variedad de invertebrados marinos y protistas unicelulares, tanto en aguas tropicales como templadas (Trench, 1979; Banaszak et al., 1993). De manera particular, *Symbiodinium* es un género de dinoflagelados simbióticos que suelen encontrarse en asociación con invertebrados marinos y protistas como Cnidarios, Platelminos, Moluscos, Poríferos y Foraminíferos (Trench, 1979; Pawlowski et al., 2001). La relación mutualista más significativa ecológicamente es la que existe entre las algas dinoflageladas del género *Symbiodinium* y los Cnidarios, tales como corales, medusas y anémonas. En esta asociación mutualista, los hospederos se benefician de los esqueletos de carbonato que son fijados a través de los procesos fotosintéticos en el dinoflagelado y así adquieren las sustancias nutritivas para crecimiento y desarrollo en su hábitat, al mismo tiempo que obtienen la energía para llevar a cabo sus procesos metabólicos. Debido a esto, hospederos como es el caso de los corales, proveen el soporte a una amplia variedad de formas de vida en su medio ambiente al crear un importante sustrato para el asentamiento de otros organismos. Por otro lado, el dinoflagelado se beneficia de acceso a nutrientes poco fluctuantes en aguas de mar oligotróficas en las que habita. En esta compleja relación, es evidente que los dinoflagelados simbióticos son fundamentales para el sostén de las abundantes formas de vida en los arrecifes. Sin embargo, *Symbiodinium* es capaz de vivir fuera de su hospedero en vida libre, lo cual le permite también ser cultivado *in vitro* bajo condiciones controladas en un laboratorio.

Tanto la simbiosis como la misma fisiología del simbiote requieren, para regular su propia homeostasis, de una compleja red de mecanismos de interacción bioquímica del dinoflagelado con el medio ambiente, y a su vez, entre los organismos involucrados en el establecimiento de la simbiosis. Las células de *Symbiodinium* deben responder tanto a los estímulos ambientales y externos, como a las señales del huésped para encontrar y establecerse en su huésped ideal y específico. Para poder responder a las señales y a

cambios o estímulos diversos en el medio ambiente, tanto en las interacciones simbióticas, como en su ciclo de vida, se requiere de proteínas de transducción para la interpretación de dichas señales externas específicas (Jones et al., 2007). Las proteínas de transducción se activan por diversos estímulos que incluyen luz y oscuridad, nutrientes, factores de crecimiento, estrés, y hormonas. Por lo tanto, estas proteínas y las cascadas de señalización son también fundamentales para el ciclo de vida normal de *Symbiodinium*, tanto en su forma de vida libre, como en la de endosimbionte.

Los procesos evolutivos han resultado en la modificación y selección de caracteres que en la mayoría de las cadenas de eventos son capaces de generar la respuesta apropiada para cada estímulo; modificaciones que involucran cambios conformacionales, y/o modificaciones postraduccionales en proteínas para regular la mayoría de las vías bioquímicas involucradas que incluyen numerosas cascadas de ésta transducción de señales. La gran variedad de señales fisicoquímicas a las que las células pueden responder, ha resultado en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señales. En los animales se han logrado conocer muchos de los elementos que conforman estas vías, así como su interconexión con otros procesos celulares (Cohen, 1997). Una parte de la regulación, ocurre a través de procesos de fosforilación y desfosforilación, y se da a través de sustratos proteicos, lipídicos y sacáridos cruciales (Yaffe, 2002). Las reacciones de fosforilación y desfosforilación son llevadas a cabo por enzimas cinasas y fosfatasa, respectivamente, que actúan sobre residuos de Tyr, Ser, Thr e His; y más frecuentemente en residuos de Ser y Thr que en los de Tyr, con una proporción aproximada de 1800:200:1 para pSer/pThr/pTyr (Kalume et al., 2003). Además, diversas proteínas también son fosforiladas en aminoácidos de arginina, cisteína, lisina, y aspartato, o en moléculas de origen lipídico derivadas del glicerol.

La fosforilación es una modificación post-traducciona frecuente en las células eucarióticas. Las actividades proteicas generalmente reguladas por fosforilación están relacionadas con procesos como el plegamiento estructural, incremento o inhibición de la actividad enzimática, sitio de unión para el ensamblaje de otras proteínas, sitio de reconocimiento para otra modificación posterior, y cambios en la localización subcelular (Preisinger et al., 2008).

Debido a la importancia de las modificaciones con los grupos fosfatos en las cascadas de señalización que se dan como respuesta a una gran variedad de estímulos, en este trabajo, se llevó a cabo una exploración de la presencia de proteínas capaces de incorporar fosfato en células en cultivos de *Symbiodinium* spp, durante su crecimiento y bajo diversos estímulos externos , con el objeto de encontrar alguna o algunas proteínas que pudieran responder a dichos estímulos a través de modificaciones diferenciales en su estado de fosforilación. La presencia de fosforilaciones diferenciales sobre algunas proteínas en respuesta a estímulos podría implicarlas en importantes procesos fisiológicos fundamentales en estos organismos, que abarcan desde el ciclo normal de vida, hasta procesos de interacción célula-célula.

III. ANTECEDENTES

A. Morfología y ciclo vida de *Symbiodinium*.

Muchos dinoflagelados poseen tanto un estado móvil como uno vegetativo, también conocido como cocoide, en su ciclo de vida (fig. 1; Freudenthal, 1962; Schoenberg y Trench, 1980). La forma cocoide posee un diámetro de entre 5 y 15 μm , y contiene compartimentos citosólicos característicos de las células eucariotas. Además también contiene cloroplastos irregulares periféricos en forma de disco que contienen membranas tilacoidales paralelas multilobuladas, productos de asimilación, granos de almidón y una o dos vacuolas (Freudenthal, 1962). Esta forma cocoide es haploide y además es la forma dominante en el estado endosimbiótico con los invertebrados y ha demostrado estar bajo el control del huésped (Mitsuru et al., 2000). En estado endosimbiótico, la división celular de *Symbiodinium* parece ser controlado por el hospedero a través de señales químicas, secuestrándolo en su forma cocoide (Koike et al., 2004), y manteniendo así una densidad poblacional según sus necesidades.

El forma cocoide de *Symbiodinium* puede seguir una de varias rutas dentro de su ciclo de vida. Una es la reproducción asexual, en la cual se producen dos o tres células hijas en cultivo. Alternativamente, *Symbiodinium* en forma cocoide también puede formar zoosporas móviles con la adición de platos tecales y un par de flagelos, uno longitudinal y otro transverso. Esta zoospora móvil es activa bajo iluminación y la movilidad está regulada en un ciclo circadiano entre periodos de luz y oscuridad (Yacobovitch et al., 2003). El desarrollo de gametos se ha propuesto, pero no se ha demostrado la reproducción sexual ni se ha identificado la formación de gametos (Freudenthal, 1962; Trench, 1997). Sin embargo, la evidencia molecular indica que los dinoflagelados de *Symbiodinium*, al menos en estado vegetativo, son haploides (Santos y Coffroth, 2003). Los cromosomas de los dinoflagelados algunas veces carecen de histonas y permanecen condensados a través de su ciclo celular. Debido a que los dinoflagelados simbióticos son virtualmente idénticos en la forma cocoide vegetativa, y varían ligeramente en la forma móvil, la clasificación taxonómica a nivel especies ha sido muy cambiante. Antes de los recientes avances en la tecnología molecular, todos los filotipos de *Symbiodinium* eran erróneamente incluidos en

una sola especie, *Symbiodinium microadriaticum*, independientemente de la especie del huésped. Ahora se sabe que existen al menos 6 diferentes filotipos o clados, presuntamente cada uno con características que los hacen específicos para ciertos huéspedes.

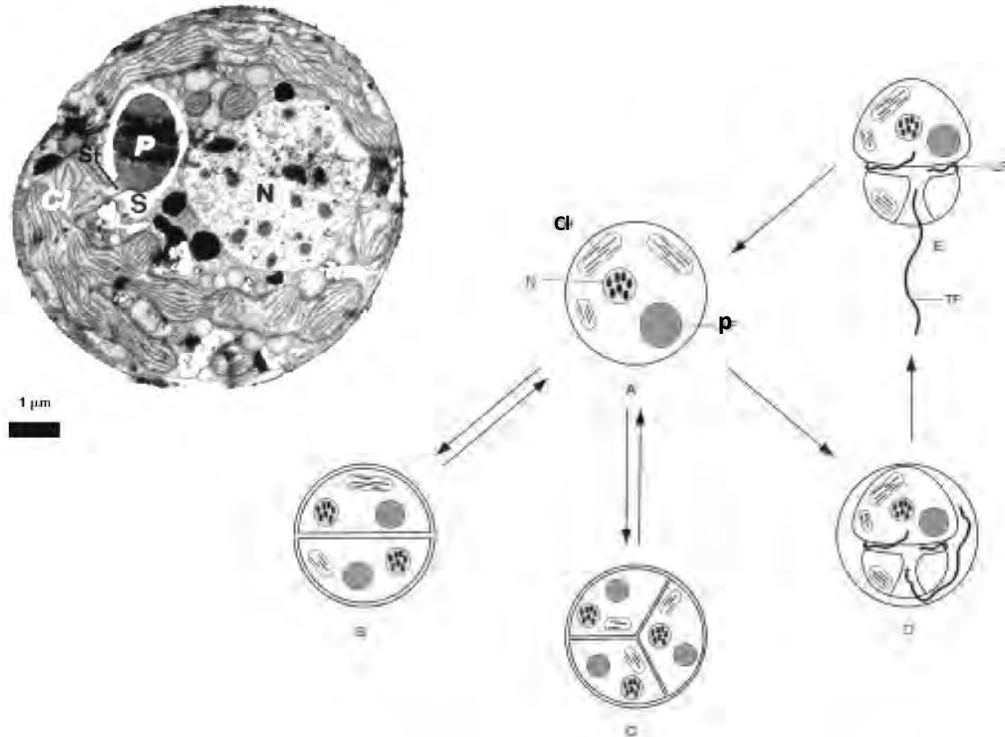


Figura 1. Morfología y esquema del ciclo de vida de *Symbiodinium*. A, quiste vegetativo, B, división del quiste vegetativo produciendo dos células hijas, C, quiste vegetativo produciendo tres células hijas, D, zoospora en desarrollo, y E, zoospora móvil. Cl=cloroplasto, N=núcleo, P=pirenoide, S= almidón, LF= flagelo longitudinal y TF= flagelo trasversal. Fotografía de Misaki Takabayashi y esquema tomado de Stat Michael (2006).

B. Interacciones celulares de la simbiosis cnidaria-dinoflagelado.

Symbiodinium vive dentro de las células de al menos cinco filas que incluyen Cnidarios (corales, medusas y anémonas), Moluscos (caracoles), Platelminotos (gusanos planos), Poríferos (esponjas), y Protista (foraminíferos) (Pawlowski et al., 2001). En la mayoría de los casos, *Symbiodinium* está localizado en las células endodérmicas de la cavidad gastrovascular del huésped. La relación Cnidario-dinoflagelado está centrada alrededor de intercambios de nutrientes; los simbiosntes dinoflagelados translocan el 95% de su carbono fijado fotosintéticamente al huésped, principalmente como glicerol, pero también en forma de péptidos, aminoácidos, azúcares y carbohidratos complejos (Hoegh-

Guldberg, 2004). El alga en cambio, recibe nutrientes inorgánicos de desechos metabólicos del hospedero que incluyen amonio y fosfatos. Además, los huéspedes Cnidarios abrigan al simbionte unicelular en vacuolas (simbiosomas) dentro de las células del tejido gastrodérmico (Yellowlees et al., 2008) que se presupone ideal para *Symbiodinium*.

Esta íntima relación celular involucra necesariamente una intercomunicación bioquímica que incluye, el reconocimiento específico entre las combinaciones huésped-simbionte y entrada del simbionte, la habilidad de los simbiontes para colonizar las células del hospedero, la correspondiente habilidad de los huéspedes para tolerar la presencia del simbionte y regular su crecimiento poblacional, las adaptaciones para el mutuo intercambio y transporte de nutrientes, y la disfunción y ruptura de la simbiosis.

El reconocimiento puede ocurrir inicialmente en la etapa de interacción célula-célula a través de proteínas de la superficie celular y/o después de ingestión de los simbiontes dinoflagelados por el hospedero (Trench, 1979). En la anémona *Anthopleura elegantissima*, la Sym32, una proteína con dominios homólogos a la familia de las fasciclinas-I involucradas en la adhesión celular, se identificó como una posible proteína de reconocimiento entre *Symbiodinium* y la anémona (Reynolds et al., 2000). En el octocoral *Sinularia lochmodes* se identificó una lectina de la superficie celular, la cual en estudios inmunohistoquímicos demostró unirse a la superficie del dinoflagelado simbiótico (Jimbo et al., 2000). Además, en el coral scleractinio *Fungia scutaria* se encontró que la interacción de las proteínas de superficie celular Lectinas/Glicanos, juega un papel en el reconocimiento y especificidad durante el inicio de simbiosis (Wood-Charlson et al., 2006). Qué eventos de reconocimiento ocurren después de la interacción Lectina/Glicano permanecen inciertos.

C. Transducción de señales.

La comunicación celular es básica para el desarrollo y organización de la misma, y para coordinar las respuestas celulares a factores externos. De esta comunicación dependen funciones tan importantes como el desarrollo embrionario, la proliferación y diferenciación celular, las respuestas al estrés, la percepción sensorial, el movimiento, la respuesta inmune, la regulación metabólica, entre otras. Denominamos transducción de señales al

proceso que ocurre dentro de una célula luego de que esta recibe una señal o estímulo externo. Dicha señal, en la mayoría de los casos, se produce cuando una molécula (o ligando) se une específicamente con un receptor presente en la membrana celular. La gran variedad de señales fisicoquímicas a las que las células pueden responder, ha resultado en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, como consecuencia a procesos selectivos del medio, la evolución ha cambiado y adaptado la mayoría de las cadenas de eventos que son capaces de generar la respuesta apropiada para cada estímulo, a modificaciones que involucran cambios conformacionales, y reacciones de fosforilación y desfosforilación.

Se ha demostrado que en todas las células eucarióticas, se encuentran estructuras especializadas para la percepción de señales y dichas estructuras generalmente están constituidas por proteínas receptoras en la membrana plasmática y en diferentes compartimentos celulares (Yaffe, 2002; Alberts et al., 1994; Darnell et al., 1995). Los receptores son moléculas complejas que interaccionan de manera específica con sustancias del entorno celular (p. ej. hormonas). Una vez ocurrida la interacción, los receptores sufren una alteración en su estructura tridimensional para transmitir la señal hacia el interior de la célula. Esto ocasiona cambios en la concentración de ciertas moléculas (segundos mensajeros) que amplían la señal y que median la respuesta final a las modificaciones en el medio ambiente detectadas a través de los receptores, llámese regulación de una ruta metabólica, regulación de una expresión génica o cambios en el citoesqueleto (Yaffe, 2002) (fig. 2A).

En ciertos casos, los propios receptores tienen capacidad para modificar moléculas y convertirlas a segundos mensajeros, como es el caso de los receptores tirosina cinasa en la ruta de las Ras/MAPK, en donde el receptor tirosina cinasa (RTKs: Receptor Tyrosine Kinase) después de la unión al ligando, se activa autofosforilándose en aminoácidos de Tyr, que son reconocidos de manera específica por el dominio SH2 de la Grb2 (Growth factor receptor-bound 2). A su vez, Grb2 contiene dos dominios SH3, uno de los cuales recluta a Sos (Son of Sevenless) hasta la membrana plasmática. Sos activa a Ras (proteína GTPasa pequeña) promoviendo el intercambio de su GDP (estado inactivo) a GTP (estado activado) (Schlessinger, 2000). Ras activada se disocia de Sos y promueve la señal hasta el núcleo por medio de las MAPK (fig. 2B). Normalmente estos procesos son rápidos, y sensibles y

específicos al estímulo, donde los elementos que participan en la respuesta regulan la intensidad del estímulo al promover o restringir la transducción de la señal generada.

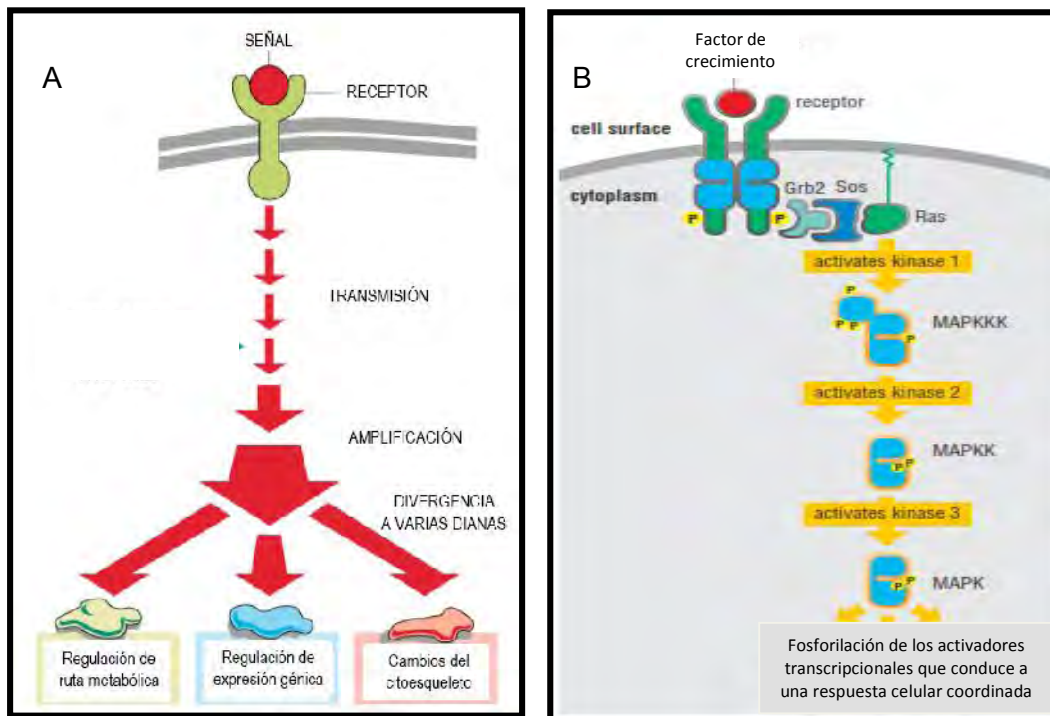


Figura 2. A) Esquema general de los pasos de una transducción de señal (Tomado de [19.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail6.htm](http://19.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail6.htm)). B) Una cascada de activaciones por cinasas en una vía de señalización que regula crecimiento celular, a través de un receptor con actividad catalítica intrínseca, después de ser activada por un ligando (New Science Press 2004).

D. Fosforilación/Desfosforilación.

La fosforilación de proteínas es la modificación pos-traducciona l más extensamente utilizada por las células en la transducción de señales (Manning et al., 2002a). La modificación covalente en las proteínas blanco mediante la adición de un grupo fosfato es catalizada por enzimas cinasas y fosfatasas. Las proteínas cinasas catalizan la transferencia del γ -fosfato de ATP (o GTP) a su proteína sustrato en residuos determinados de aminoácidos como Ser, Thr o Tyr, mientras las proteínas fosfatasas catalizan la transferencia del fosfato de una proteína fosforilada a una molécula de agua (fig. 3). Esta fosforilación reversible provee de un mecanismo para regular muchos procesos celulares básicos, que incluyen, metabolismo, crecimiento, división, diferenciación, movilidad,

tráfico de organelos, transporte en membranas, inmunidad, aprendizaje, memoria y transducción de señales (Manning et al., 2002b).

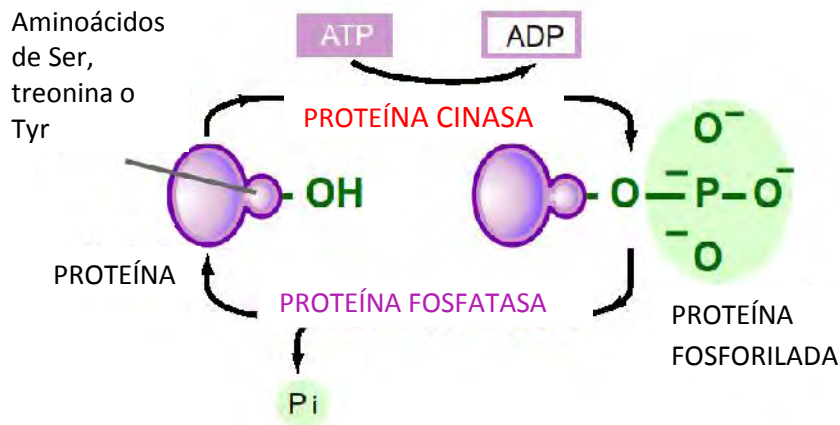


Figura 3. Regulación de la fosforilación y la desfosforilación de proteínas por la actividad de proteínas cinasas. La fosforilación reversible puede funcionar como un “Switch” binario, regulando la actividad de un estado “on” u “off”. La fosforilación puede funcionar como una señal de activación o inhibición, dependiendo del sustrato y sitio de fosforilación. Muchas proteínas tienen múltiples sitios de fosforilación que son regulados por diferentes proteínas cinasas permitiendo la integración de múltiples rutas de señalización. (grafica Jane Wang; <http://www.scq.ubc.ca/images/phosphorylation.ai>).

1. Efecto de la fosforilación en proteínas blanco.

La adición covalente de un grupo fosfato a la cadena lateral de Ser, Thr, Tyr, histidina o ácido aspártico, pueden tener efectos profundos sobre la función de la proteína (Johnson y Lewis, 2001). Los residuos fosforilados adquieren así un grupo iónico que posee la propiedad de una doble carga negativa (una propiedad que no posee algún aminoácido naturalmente) y la capacidad del formar redes de puentes de hidrógeno (Johnson 2009). Hay dos tipos de interacción predominante, una es la que ocurre entre el grupo fosfato con la cadena lateral de uno o más residuos de arginina, en sitios de fuerte unión que dan estabilidad al estado conformacional (fig. 4), y la otra es la interacción del grupo fosfato con la cadena principal de nitrógenos al inicio de una α -hélice, utilizando la carga positiva de la hélice bipolar.

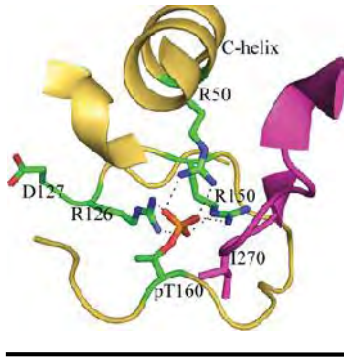


Figura 4. Ilustración de un fosfo-grupo como un centro organizador que establece uniones bidentadas a residuos de arginina. El sitio es la fosfotreonina 160 (pT160) del complejo CDK2-ciclina A. El fosfo-grupo interactúa con tres residuos de arginina: la arginina 50 (R50) de la α -helice, la arginina 126 (R126) de la hebra catalítica donde el ácido aspártico 127 (D127) es el residuo catalítico, y la arginina 150 (R150) del comienzo del segmento de activación. El fosfo-grupo queda parcialmente protegido por la isoleucina 270 (I270) de la ciclina A (Jonhson, 2009).

La fosforilación puede afectar a las proteínas blanco en dos maneras, que no son mutuamente exclusivas. El primer efecto consiste en cambios considerables o sutiles en la actividad de la proteína blanco. Estos cambios de actividad pueden provenir únicamente del volumen y propiedades de carga inherentes del grupo fosforilo, o puede resultar de un gran cambio conformacional en la proteína, o ambos (Serber, 2007). El segundo efecto de la fosforilación sobre la función de una proteína blanco es perturbando la superficie de interacciones proteína-ligando sin inducir algún cambio conformacional. Igualmente, la fosforilación puede también crear plataformas de nuevos sitios de reconocimiento para la interacción con otras proteínas. Tales interacciones proteína-proteína suelen involucrar dominios de interacción especializada en la segunda proteína que reconoce el segmento peptídico fosforilado. Por ejemplo, la fosforilación de Tyr de algunas proteínas celulares crea sitios de anclaje para dominios SH2 (ver, por ejemplo, la unión de Grb2 a la cola del receptor fosforilado en figura 2B) y dominios PTB (Yaffe, 2002).

2. Mecanismos de especificidad en la fosforilación de proteínas.

Una proteína cinasa típica debe reconocer entre uno y pocos cientos de sitios de entre aproximadamente 700 000 residuos potencialmente fosforilables en una célula eucariota (Jeffrey, 2007) y el hecho de que muchas proteínas cinasas eucariotas son estructuralmente similares (Hanks, 1995), demuestran la alta especificidad de estas cinasas. Una proteína cinasa típica posee un dominio catalítico de aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, el cual consiste de un pequeño lóbulo de β -láminas en el N-terminal y un gran lóbulo de α -hélices en el C-terminal (Jeffrey, 2007). El ATP se une en

una hendidura entre los dos lóbulos, de modo que el resto de la adenosina está enterrado en un bolsillo hidrofóbico con el esqueleto de fosfato hacia el exterior y orientada hacia la solución. El sustrato de la proteína se une a lo largo de la hendidura y un conjunto de residuos conservados dentro del dominio catalítico de la cinasa catalizan la transferencia del terminal de γ -fosfato del ATP al oxígeno del hidroxilo de la Ser, Thr o Tyr del sustrato (fig. 5, a y b). Aunque todas las proteínas cinasas clásicas comparten un pliegue común, difieren en términos de la carga y la hidrofobicidad de los residuos superficiales (fig. 5 c); estas diferencias son importantes para la especificidad de las cinasas.

El primer nivel de especificidad de sustrato surge de las características estructurales del sitio activo de la cinasa. Las características específicas del sitio activo, incluyendo su profundidad y quizás carga o hidrofobicidad, con frecuencia aumentan en gran medida su preferencia de unión para sustratos con características complementarias. Las proteínas cinasas de Tyr tienen una hendidura catalítica más profunda que las cinasas de Ser/Thr: un

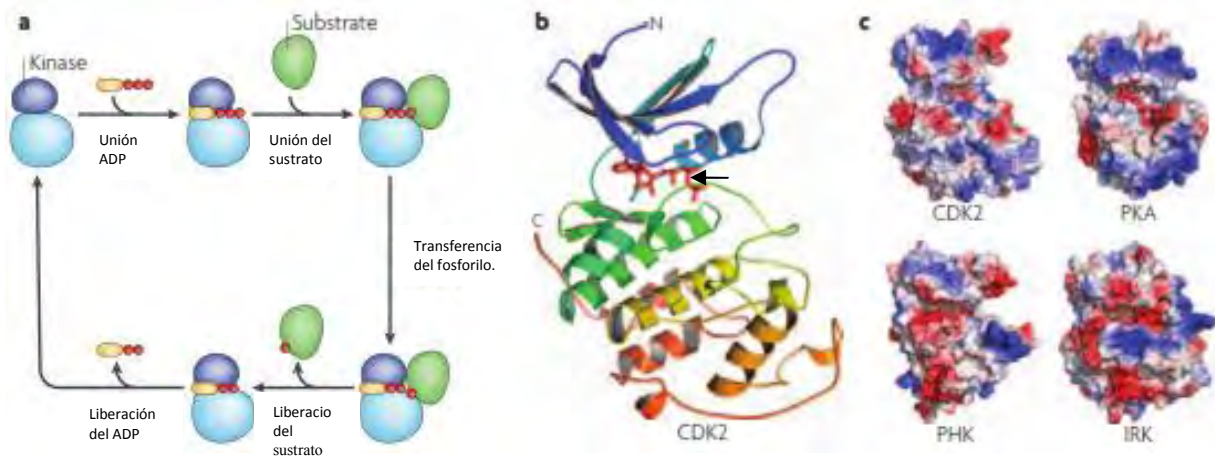


Figura 5. Las proteínas cinasas comparten un mecanismo y plegado común. a) El ciclo catalítico básico para la fosforilación del sustrato por una cinasa. En la caricatura, comenzando por la parte superior izquierda, el ATP se une al sitio activo de la cinasa. Esto es seguido por la unión del sustrato al sitio activo. Una vez unido, el γ -fosfato del ATP (rojo) se transfiere a un residuo de Ser, Thr o Tyr del sustrato. Después de la fosforilación, el sustrato se libera de la cinasa. El último paso que se muestra es la liberación de ADP desde el sitio activo. El orden de los pasos es diferente para diferentes cinasas. b) Todas las proteínas cinasas tienen un plegamiento similar que consta de dos lóbulos: un lóbulo consiste principalmente de una estructura β -laminar (azul) y el otro lóbulo consiste en α -hélices (verde, naranja y amarillo). El ATP es modelado unido en la hendidura (rojo, indicado por la flecha). c) Se muestran las representaciones electrostáticas superficiales de cuatro cinasas diferentes: tres cinasas de Ser/Thr: CDK2, PKA y PHK, y la cinasa de Tyr del receptor de insulina. Las superficies cargadas positivamente se muestran en azul y las superficies cargadas negativamente en rojo. (Jeffrey, 2007)

residuo de Tyr puede abarcar la distancia entre el esqueleto del péptido y el γ -fosfato del ATP, pero los grupos laterales más pequeños de Ser y Thr no pueden (Brown, 1999).

Los aminoácidos N-terminal y C-terminal del sitio de fosforilación contribuyen sustancialmente al reconocimiento cinasa-sustrato. En la mayoría de los casos, el sitio activo de la cinasa interactúa con cuatro aminoácidos a cada lado del sitio fosforilable. Las secuencias que están más lejos del sitio fosforilable pueden interactuar con porciones de la proteína cinasa que están justo fuera del sitio activo (Knighton, 1991). Por ejemplo, en CDK2 (en la que el sitio de fosforilación de consenso es S/T-P-X-K/R, donde X es cualquier aminoácido), la unión de cualquier sustrato que no tiene un residuo Pro en la posición P +1 es desfavorable, debido a la imposibilidad de un enlace de hidrógeno del átomo de nitrógeno en la cadena principal del sustrato (Brown, 1999).

E. *Symbiodinium* y su respuesta a estímulos.

Todos los organismos parecen tener la capacidad de detectar estímulos del medio ambiente que los llevan a realizar tareas de respuesta a los mismos para contender con las condiciones cambiantes de su entorno. Estos incluyen respuestas a la disponibilidad de nutrientes y sales, a condiciones cambiantes de luz, a la matriz extracelular, y a moléculas del hospedero, en el caso particular de organismos que establecen algún tipo de simbiosis, como es el caso de *Symbiodinium* (fig. 6).

Los organismos tienen la habilidad de detectar la disponibilidad de nutrientes de momento a otro para ajustar el flujo a través de las vías metabólicas y de señalización a través de eventos de transducción de dichas señales. Se sabe que en células epiteliales, nutrientes, tal como el aminoácido de arginina, en ausencia de insulina u otros factores de crecimiento, provocan severa y rápida estimulación de fosforilación sobre la proteína ribosomal S6K1 (Wang, 1998), que participa en la síntesis de proteínas, a través de la vía mTOR. En *Symbiodinium* no se conoce el mecanismo de asimilación de nutrientes, sin embargo, algunos aminoácidos puros o como principales componentes en una mezcla de aminoácidos, tales como glutamato, glicina y arginina, estimularon un incremento en la fijación y liberación de productos de fotosíntesis, en los simbiosis recién aisladas del coral *Pocillopora damicornis* y *Aiptasia pulchella*, (Gates et al, 1995).

La presencia de ^{14}C en el tejido animal empleando bicarbonato radioactivo, demostró que el carbón que fija *Symbiodinium* a través de su fotosíntesis exportado hacia el hospedero (Muscatine, 1967). Desde entonces, varios estudios han demostrado que en simbiontes recién asilados al ser incubados con el homogenado de tejido del animal hospedero estimulan la liberación y fijación de carbono (Muscatine, 1967; Trench, 1971a, Gates, 1995); lo que ha sugerido que alguna señal química presente en el animal promueve dicha respuesta. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido esclarecer la existencia y naturaleza de esta señal.

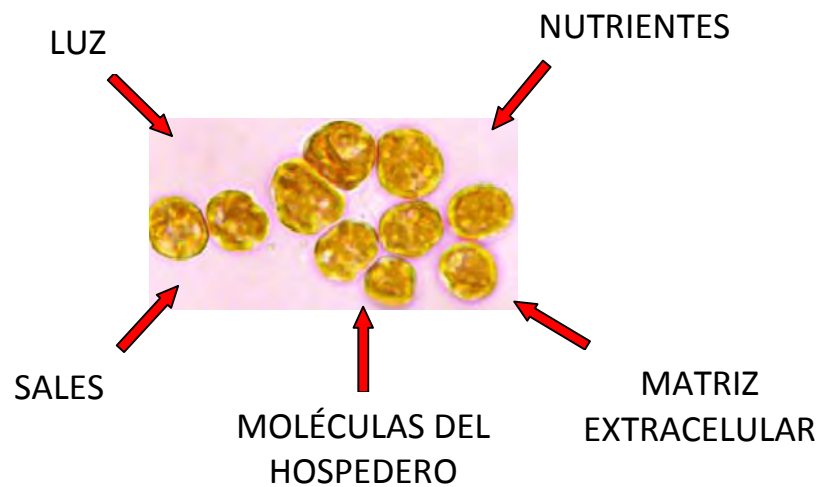


Figura 6 . Algunos factores a los que habitualmente esta expuesto *Symbiodinium* en su entorno.

Igualmente, estímulos que promueven la migración celular son importantes para escapar de condiciones adversas, o contrariamente, aquellos que dictan que las condiciones son propicias para que un individuo en proceso de volverse sésil se ancle a su sustrato. Entre estos se incluyen los estímulos provocados por integrinas y sus receptores (Campbell y Humphries, 2010). Estas integrinas participan como receptores en la interacción de adhesión célula-matriz celular o célula-célula, y a su vez que promueven procesos de fosforilación (Kornberg et al., 1991). Los mecanismos en la interacción *Cnidario-Symbiodinium* requiere de moléculas de adhesión celular (Weis et al. 1999); interesantemente un homólogo de una integrina en *Plasmodium*, participa en la especificidad del huésped en el proceso de infección (Sultan 1999) y este podría ser un

mecanismo común en *Symbiodinium*. Una estrategia muy usada para estimular a este tipo de proteínas es a través del tripéptido RGD (arg-gly-asp). Esta secuencia de aminoácidos es un motivo conservado en proteínas presentes en la matriz extracelular, a través del cual interaccionan con la mayoría de proteínas de la familia de las integrinas presentes en la superficie celular (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984).

Por otro lado, el Ca^{2+} es un regulador y segundo mensajero clave en muchos procesos de transducción de señales en todos los organismos. En Apicomplexans, un *Phylum* muy cercano al de los Dinoflagelados, el Ca^{2+} controla muchos eventos críticos en su ciclo de vida que incluyen secreción de proteínas, movilidad y desarrollo. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} en el citosol activan proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs; Billker et al., 2009), las cuales fosforilan un gran número de proteínas sustrato.

Symbiodinium es un organismo que vive usualmente como endosimbionte en hospederos arrecifales. Debido a su naturaleza fotosintética, debe contar con mecanismos sensores finos para responder a las condiciones cambiantes de luz en el medio ambiente. Más aún, la luz generalmente le llega de manera limitada debido a las profundidades variables a las que dichos hospederos viven en el arrecife, el ángulo con relación al sol, densidad de simbiontes y morfología del esqueleto. Por otro lado, el estrés térmico y de luz excesiva pueden provocar daños en su aparato fotosintético (Warner et al. 1999), por lo que también tienen que responder de manera expedita a estos retos. Esto hace que las condiciones de luz/oscuridad sean un probable estímulo que genere cascadas de transducción de señales capaces de desembocar en eventos bioquímicos y respuestas fisiológicas para responder a estos retos.

F. Blancos de cinasas y su papel en la percepción de la luz.

En un escenario de una vía de transducción de señales en respuesta a estímulos, participan varios protagonistas: los estímulos en forma de ligando, las proteínas receptoras, las proteínas adaptadoras, las proteínas cinasas y fosfatasa, sus proteínas blanco o efectoras, y los segundos mensajeros.

Después de la fosforilación de alguna proteína, los sustratos de las cinasas que la fosforilaron son los que se encargan de dirigir la señal bioquímica hasta la última

consecuencia fisiológica, usualmente causada por la expresión *de novo* de genes a través de la activación de la transcripción. Estos blancos pueden ser: enzimas que participan en alguna ruta metabólica, factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto o que interaccionan con él, entre otras, que a la postre modifican la conformación de la célula (fig. 2A). Adicionalmente, el blanco puede ser otra cinasa de la vía que se encuentre corriente abajo de la percepción del estímulo, o inclusive tratarse de la misma cinasa que se autofosforila. Ejemplos de estos últimos son las MAPKKK's que fosforilan a las MAPKK's y MAPK's en cascada (fig. 2B y Maosong et al., 2005), y los fitocromos durante la percepción de la luz (Gyula et al., 2003), respectivamente.

En el caso de los fotoreceptores especializados, tales como los fitocromos y criptocromos, la recepción de la energía lumínica impacta a cerca de 2500 genes en *A. thaliana*, y esto eventualmente habilita a la planta para responder a cambios en la iluminación a un nivel fisiológico (Gyula et al., 2003). Fitocromo A (PHYA) es un fotoreceptor que presenta actividad de cinasa e induce una cascada de señalización mediada por iones Ca^{2+} y cGMP en el citoplasma (fig. 7); en su conformación activa (Pfr) puede ser rápidamente translocado al núcleo donde interactúa con factores de transcripción que a su vez, regulan la expresión de genes inducidos por la luz. PHYA puede autofosforilarse y así mismo, es capaz de fosforilar otras proteínas blanco como el sustrato de cinasa de fitocromo (PKS1; Colon-Carmona et al., 2000). Por otro lado, se ha sugerido que la fosforilación dependiente de luz mediada por caseína cinasa II (CK II) sobre su sustrato, regula la estabilidad y actividad transcripcional de HY5 (Elongated Hypocotil in Light 5), un componente clave de la cascada de señalización controlada por fitocromos y criptocromos (Hardtke et al., 2000). Lo anterior subraya el importante papel que desempeñan los blancos de las cinasas corriente abajo de las cascadas de señalización.

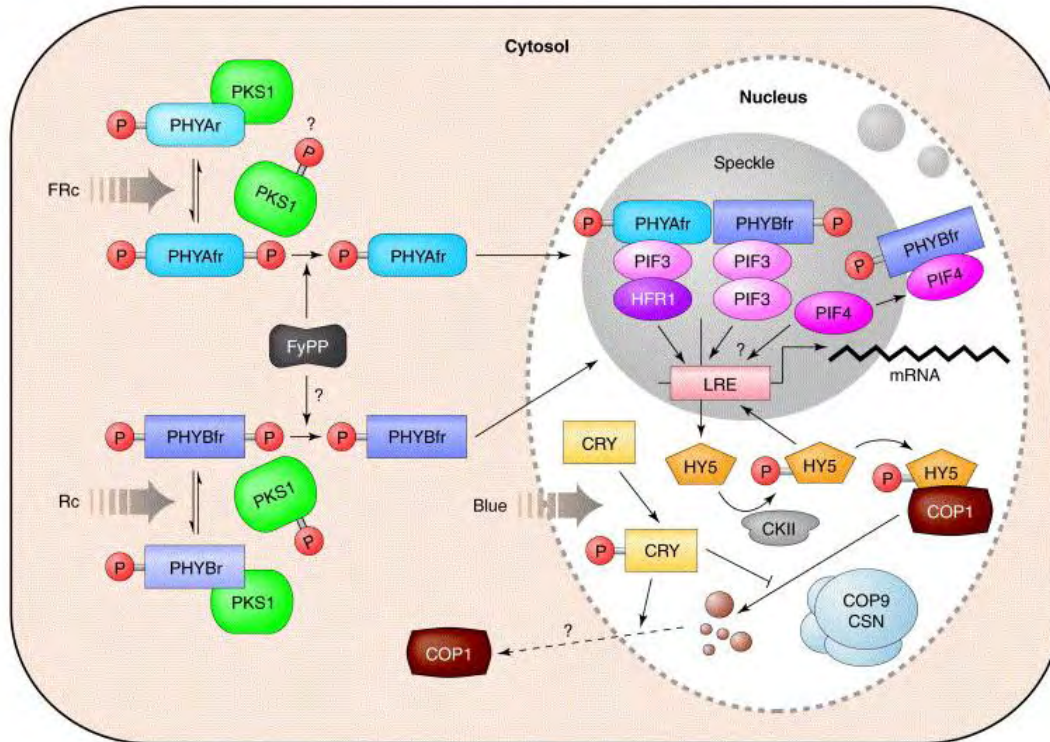


Figura 7. Modelo propuesto para la expresión génica regulada por la luz. Fitocromos (PHY's) están localizados en el citosol en la oscuridad. Ante irradiación de luz apropiada, cambian a su conformación activa (Pfr) y autofosforilada. PHY's fosforilan diferentes proteínas en el citosol, como PKS1. PKS1 puede funcionar como un factor de retención citoplasmático, cuya actividad es regulada por fosforilación reversible. Las formas fosforiladas activas de PHY's pueden tener funciones citoplasmáticas. Desfosforilación por una fosfatasa (FyPP) puede desencadenar la translocación de PHY's a núcleo, donde interactúan con factores de transcripción y promueven la formación de cuerpos subnucleares llamados "speckles". Speckles es un complejo regular que está involucrado en el control de la transcripción de genes modulados por la luz. El nivel de transcripción de los promotores que contienen el elemento de respuesta a luz (LRE) es determinado por la concentración de factores de transcripción activos en el sitio específico de acción. La selección del sitio de unión es lograda por la heterodimerización de factores de transcripción (por ejemplo PIF3, HFR1). Tanto PIF4, como PIF3, están probablemente unidos al promotor en la oscuridad. En contraste a PIF3, PIF4 es desplazado probablemente por PHYB activo. PHY'S regula la expresión de varios factores de transcripción, incluyendo HY5. HY5 es un regulador clave de la fotomorfogénesis, y su abundancia también está regulada a nivel de estabilidad de proteína. En la oscuridad, HY5 está destinada a la degradación proteolítica por COP1. En luz, este proceso se inhibe, en parte, por la acción de criptocromos (CRY's), posiblemente mediante la purga de COP1 del núcleo. Esto permite que se acumule HY5 activo y se una a promotores dependientes de luz que contienen cajas G (G-boxes). CKII, caseína cinasa II; CSN, signalosoma COP9; FRc, far-red (la luz roja lejana) continua; Rc, luz roja continua. (Gyula et al., 2003).

IV. JUSTIFICACIÓN:

Las proteínas que se fosforilan juegan un papel fundamental, tanto en la fisiología de los organismos, como en las interacciones célula-célula. Conocer las proteínas involucradas en los procesos de señalización en el contexto de la fisiología del dinoflagelado es el punto de partida para conocer más a fondo dicha fisiología y sus interacciones célula-célula. La identificación y caracterización de las moléculas que se fosforilan y participan en el crecimiento celular y en las interacciones célula-célula, podría ser un primer paso para entender cómo ocurre la comunicación bioquímica en diversos procesos, incluyendo la simbiosis.

V. HIPÓTESIS

Los procesos de fosforilación/desfosforilación median múltiples cascadas de transducción de señales en todos los organismos. Por lo tanto, deben de ocurrir de manera regulada fosforilaciones en aminoácidos específicos tales como Tyr, Ser, Thr en *Symbiodinium* spp durante su crecimiento, homeostasis y en respuesta a estímulos bióticos y abióticos.

VI. OBJETIVOS

Detectar a las proteínas con mayor grado de fosforilación en diversas fases del crecimiento celular y como respuesta a diversos estímulos externos e identificar aquella(s) que presente(n) una mayor modificación.

Específicos:

- Analizar aminoácidos fosforilados, en extractos obtenidos de tres diferentes filotipos de *Symbiodinium* para identificar proteínas de interés.

- Llevar a cabo el análisis en diferentes días de crecimiento de *Symbiodinium* en cultivo *in vitro* para determinar posibles diferencias en los grados de fosforilación y seleccionar una proteína que evidencie estas diferencias como respuesta a las condiciones experimentales.
- Determinar si existe fosforilación diferencial en la proteína seleccionada, o en otras proteínas de *Symbiodinium*, en respuesta a diversos estímulos físicos y químicos
- Aislar e identificar a dicha proteína a través de la secuenciación parcial de sus aminoácidos para obtener información acerca de su posible función en la transducción de señales.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Material biológico.

Se utilizaron células de tres filotipos de dinoflagelados de género de *Symbiodinium*: *Symbiodinium kawagutii* (filotipo F2) *Symbiodinium* sp. KB8, (filotipo A1), *Symbiodinium* sp. Mf11.5b.1 (filotipo B17), que para fines didácticos nos referiremos de aquí en adelante como *S. kawagutii*, KB8 y Mf11, respectivamente. *S. kawagutii* fue donado de la colección cultivos del Dr. Robert K. Trench de la Universidad de California, Santa Barbara, y KB8 y Mf11 de la colección de cultivos de la Dra. Mary Alice Coffroth de la Universidad de Bufalo, USA. Estos simbioses fueron originalmente aislados de tres especies de cnidarios simbióticos; *S. kawagutii* del coral *Meandrina meandrites* (LaJeunese 2001), KB8 de la medusa *Cassiopeia xamachana* y Mf11 del coral *Montastrea faveolata*.

Los cultivos se mantuvieron en medio de cultivo ASP-8A (McLaughlin y Zahl 1966), en luz de fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a una intensidad de luz de 60-80 $\mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$ y una temperatura de 25°C.

B. Preparación de los extractos de proteínas totales.

Las células en medio de cultivo ASP-8A se colectaron por centrifugaciones a 1400 g por 8 min. El precipitado de células se suspendió con 500 μl de buffer de Laemmli 1X (60 mM Tris-HCl, pH 6.8; 1% (p/v) dodecil sulfato de sodio (SDS); 10% (v/v) glicerol, 3% (v/v) β -mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol) (Laemmli 1970) y se colocaron en viales de polipropileno de rosca con 0.25 ml de perlas de vidrio (465-600 μm de diámetro) previamente enfriados. Posteriormente, las células se lisaron con una agitación vigorosa en un MINI-BEAD BEATER™ (Biospec products) a máxima velocidad durante 3 min. Después, el lisado celular se calentó a 95°C por 5 min, y se centrifugó a 16000 g durante 10 min. El sobrenadante se usó para análisis en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE (acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) y Western blot.

C. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).

En éste análisis las proteínas se separaron en geles desnaturizantes discontinuos (Laemmli 1970), de 10 o 12% de acrilamida en la zona de separación [375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 12 o 10% (p/v) acrilamida/bis-acrilamida; 0.1% (p/v) SDS; 0.1% (p/v) persulfato de amonio (APS); 0.106% (v/v) N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED)], y de 4 % de acrilamida en la zona de apilamiento [125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% acrilamida; 0.137 % bisacrilamida; 0.1% SDS; 0.1% APS; 0.066% (v/v) TEMED]. Para la separación también se utilizó un buffer de corrida que contiene Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, 0.1% (p/v) SDS. Las muestras de proteínas y marcadores de peso molecular preteñidos (Novex Sharp, Invitrogen, USA) se cargaron en los pozos del gel y se corrieron a 10 mA en la zona de apilamiento y 15 mA en la zona de separación en aparatos minigel de Hoefer® (Hoefer, Inc; Holliston, MA). Las corridas se detuvieron antes de que el colorante indicador del frente de proteínas se saliera de la matriz del gel.

D. Inmunodetección (Western blot)

Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida desnaturizantes, éstos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El gel se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa (Inmobilon™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hidratada previamente en buffer de transferencia sin metanol (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 10% isopropanol) (Villanueva, 2008) con papeles filtros y esponjas tanto debajo de la membrana como encima del gel; posteriormente se ensamblaron en el módulo de transferencia húmeda según instrucciones del fabricante (miniProtean® de BioRad; Hercules, CA). El cartucho se colocó en la cámara conteniendo buffer de transferencia y se le aplicó una corriente constante de 300 mA por 1 h. Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas se incubaron en una solución de 3% albúmina de suero de bovino (BSA: Bovine Serum Albumin) en buffer de sales de fosfato (PBS; 2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, 136.9 mM NaCl, pH 7.5) durante 1 h a 50°C y con agitación constante para bloquear los espacios vacíos y sitios inespecíficos en la membrana.

Posterior al bloqueo, a las membranas se les adicionaron los anticuerpos primarios con las diluciones adecuadas para cada uno (ver más adelante en anticuerpos primarios), y se incubaron durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente. Se hicieron cinco lavados en 0.01% Tritón X-100 en PBS (PBS-T), 5 min cada vez con agitación. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios o proteína A, asociados a fosfatasa alcalina, durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente, en diluciones de 1:2500 o 1:500 en PBS-T, respectivamente. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces 5 min en agitación con PBS-T, y un enjuague breve con la solución del revelador (100mM tris, 5mM MgCl, 100mM NaCl). Finalmente, se revelaron con una solución comercial de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) de acuerdo con fabricante (Promega; Madison, WI).

E. Tinción de los geles de poliacrilamida

Para la tinción con azul de Coomassie, los geles se incubaron en una solución de 0.1% (p/v) azul de coomassie (R250, Sigma) en agua:ácido acético glacial (19:1). Para desteñir se incubaron en una solución de 40% etanol, 10% ácido acético en agua destilada.

Para la tinción con plata amoniacal (Wray et al. 1981), los geles se incubaron en una solución de 30% etanol, 10% ácido acético, en agua desionizada durante 30 min y agitación continua. Para eliminar el ácido acético se enjuagó con agua, posteriormente se incubó en etanol al 20% por 30 min, seguido por dos lavados en agua por 10 min cada vez con agitación durante el proceso. En el último lavado se preparó la solución de plata amoniacal, añadiendo de gota en gota 2 ml de 1.177 M AgNO₃ en 30 ml de una solución de 0.975 μM NaOH, 2.3% (v/v) NH₄OH y la mezcla se aforó hasta 50 ml. Después de los lavados, los geles se incubaron durante 15 min en la solución de plata amoniacal. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua por 5 min, y finalmente, se incubó en una solución reveladora (0.01% (p/v) ácido cítrico, 0.038% (v/v) formaldehído), hasta que se visualizaron las bandas de proteínas. La reacción del revelado se detuvo con varios lavados en 20 % etanol.

F. Anticuerpos primarios y secundarios, y sonda secundaria.

Anticuerpo anti-Fosfotreonina (pThr; Cell Signaling Technology™, Inc; Danvers, MA). Anticuerpo policlonal producido por inmunización de animales con péptidos sintéticos que contienen fosfo-treonina, y está purificado con proteína A por cromatografía de afinidad, con lo cual se detectan proteínas y péptidos fosforilados en residuos de Thr de manera muy independiente de la secuencia de aminoácidos que los rodean. En los ensayos se usó una dilución de 1:1000.

Anticuerpo anti-Fosfoserina (pSer; Cell Signaling Technology™). Detecta los niveles endógenos de muchas proteínas celulares sólo cuando está fosforilada en residuos de Ser rodeado de arginina ó lisina en las posiciones -2 y +2 y un residuo hidrofóbico en la posición 1. Los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con los residuos de Ser no fosforilada, ni con fosfo-treonina. En los ensayos se usó una dilución de 1:1500.

Anticuerpos anti-Fosfotirosina. (pTyr, PY20; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Anticuerpo anti-fosfotirosina monoclonal. Detecta residuos de fosfotirosina. En los ensayos se determinó usar una dilución de 1:500.

Anticuerpos anti-conejo-AP: anti-IgG de conejo levantado en cabra conjugados a fosfatasa alcalina (Zymed™-Life Technologies; Grand Island, NY). Reconoce las secuencias constantes en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G (IgG) de conejo (anticuerpos primarios policlonales de conejo). La fosfatasa alcalina desfosforila y posteriormente oxida el BCIP a índigo, esta reacción se acopla a la reducción de NBT a diformazan para formar un precipitado morado oscuro que permite visualizar las bandas. Para las pruebas de inmunodetección de las IgG de conejo, se utilizó para todos los casos una concentración de 1:2500 en PBS-T.

Anticuerpos anti-ratón-AP: anti-IgG de ratón levantados en cabra conjugados a fosfatasa alcalina (Zymed™-Life Technologies). Reconoce las secuencias constantes (cadenas pesadas) de las inmunoglobulinas G (IgG) de ratón (anticuerpos primarios monoclonales de ratón).

Proteína A-AP: Proteína A acoplada a una fosfatasa alcalina (Sigma) se une a las regiones constantes en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G de muchos mamíferos, excepto de rata, cabra y oveja.

G. Análisis con anticuerpos que reconocen residuos fosforilados de proteínas en extractos de *Symbiodinium*.

Se realizaron las extracciones de las proteínas totales de células de *S. kawagutii*, Mf11 y KB8. Posteriormente, las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE de 12 % de acrilamida, y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron primero con los anticuerpos específicos, anti-pTyr, anti-pThr y anti-pSer en Buffer PBS-T a diluciones de 1:500, 1:1000 y 1:1500, respectivamente y después con anticuerpos secundarios. En los casos en los que se utilizaron anticuerpos primarios policlonales (anti-pSer o anti-pThr) se usó como secundario anti-conejo-AP o Proteína A-AP; en el caso del anticuerpo monoclonal anti-pTyr, se usó anti-ratón-AP o Proteína A-AP.

H. Análisis de extractos de proteínas de *Symbiodinium* de cultivos de diferentes días de crecimiento con los anticuerpos

Para detectar posibles cambios en el estado de fosforilación de las proteínas a lo largo del crecimiento de *Symbiodinium* y determinar si alguna de ellas estaría ligada en alguna de las fases de crecimiento, se realizaron cuatro siembras para cada uno de los tres filotipos (*S. kawagutii*, KB8 y Mf11). A 450 ml de medio ASP-8A fresco se inocularon 50 ml de cultivo con células en fase estacionaria, en cuatro matraces para cada cepa. Los cultivos se dejaron crecer en condiciones controladas de fotoperiodos de luz/oscuridad de 12h y se realizaron extracciones de proteínas celulares, a los 3, 9, 15 y 20 días. Las muestras se corrieron en geles 12% acrilamida y cargas iguales por carril de los extractos se estandarizaron mediante tinciones de los geles con azul de Coomassie. Posteriormente, las muestras se analizaron por Western blot con los anticuerpos específicos anti-pTyr, anti-pThr y anti-pSer.

I. Tratamientos con agentes químicos a células de *Symbiodinium*

Células de KB8 crecidas durante seis días en 1L de cultivo ASP-8A se colectaron por centrifugación a 1400 g por 8 min y se suspendieron en 10 ml de medio fresco, del cual

se dividieron en 10 alícuotas homogéneas de 1 ml y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml. Las células se concentraron y suspendieron en 10 ml de medio ASP-8A fresco (control) o adicionado con 0.1% (p/v) caseína, 10 mM glicina, 10 mM arginina, 10 mM de ácido glutámico, 100 µg/ml de los tripéptidos RAD (Arg-Ala-Glu) o RGD (Arg-Gly-Glu) (CALBIOCHEM[®]-Millipore; Billerica, MA), 15 mM de ácido etilén glicol-bis(2-aminoentileter)-NNN'-tetrácetico (EGTA), o 20 mM CaCl₂. Todas las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y finalmente se concentraron las células, seguido de su extracción de proteínas con perlas de vidrio. Cargas iguales de proteínas se analizaron por Westen blot.

J. Tratamiento con extracto de tejido de *Cassiopeia xamachana* sobre células KB8.

Se cortaron seis tentáculos de una medusa de *C. xamachana* y se les realizaron tres lavados con medio de cultivo ASP-8A para remover el agua de mar y limpiar la superficie de los tentáculos. Los tentáculos se maceraron en frío con un homogenizador de vidrio tipo pistilo en 15 ml de ASP-8A fresco. El homogenado se filtró a través de una malla de luz de 300 µm para descartar los restos de tejido, y el filtrado se centrifugó por 2 min a 1400 g. El sobrenadante libre de simbioses obtenido se usó para estimular a las células de KB8 en cultivo. Por otro lado, las células KB8 de un litro de cultivo de seis días de crecimiento se concentraron en una pastilla celular por centrifugación y se suspendieron con 10 ml del mismo cultivo; el suspendido de células se dividieron en cinco alícuotas homogéneas de 2 ml y se les adaptaron a 12h oscuridad. Después, las células de cada alícuota se concentraron por centrifugación, en una se suspendieron con 3 ml de medio ASP-8A fresco (control), y en las otras con 3 ml del homogenado de tejido de medusa. Se incubaron bajo condiciones de oscuridad por 15, 30, 60 y 120 min, y se realizaron extracciones de proteínas después de cada tiempo. La extracción control se realizó a los 120 min.

Por otro lado, al precipitado de simbioses con restos de tejido de medusa se le aplicó tres lavados con 10 ml PBS-T, se suspendió en un vortex y se concentró por centrifugación a 1400 g por 2 min. Al precipitado de simbioses lavado se le sometió a extracción de proteínas (ver en VII.B).

Las muestras de proteínas de simbiontes crecidos *in vitro* después de los tratamientos con tejido de medusa, y de proteínas de simbiontes recién aislados de la medusa, se analizaron en geles de SDS-PAGE de 10% de acrilamida y por Western blot.

K. Tratamientos con luz /oscuridad a células de *Symbiodinium* en cultivo.

1. Tratamiento con luz en células adaptadas a oscuridad.

Células KB8, Mf11 y *S. kawagutii* en cultivos de seis días de crecimiento se concentraron y suspendieron en 40 ml de medio ASP-8A fresco. Se colocaron alícuotas iguales de cada filotipo en cuatro tubos Falcon de 15 ml forrados con papel aluminio. Las células en los tubos se dejaron adaptar en oscuridad (12 h) durante su ciclo nocturno. Transcurrido dicho periodo, las células de uno de los tubos se concentraron y rompieron con perlas de vidrio sin exponerlo a la luz en todo el proceso (control), y a los otros tres tubos se les liberó del papel aluminio para exponerlos a la luz en el cuarto de cultivo. De forma secuencial, se realizaron extracciones de proteínas a los 30, 60 y 240 min, concentrando y lisando con perlas de vidrio en cada tiempo. Cargas iguales de proteínas se estandarizaron mediante tinciones con azul de Coomasie en geles de SDS-PAGE de 10% de acrilamida y finalmente los extractos se analizaron por Western blot.

2. Tratamiento con luz y oscuridad en células adaptadas a oscuridad.

Células KB8 en cultivo de seis días de crecimiento se concentraron y suspendieron en 40 ml de medio ASP-8A fresco. Alícuotas iguales y homogéneas se transfirieron en cuatro tubos Falcon forrados con papel aluminio. Las células en los tubos se dejaron adaptar en oscuridad (12 h) durante su ciclo nocturno. Después, las células de uno de los tubos se concentraron en un precipitado para realizar la extracción de proteínas bajo condiciones oscuras (control). A los otros tubos se les liberaron de los forros de aluminio, para estimular las células con la luz del cuarto de cultivo durante 30 min. Después, se realizó otra extracción de proteínas de uno de los tubos, y los restantes se cubrieron

nuevamente con los forros de papel aluminio, para estimular a las células con oscuridad. Finalmente, se realizaron extracciones de proteínas de manera secuencial, después de 15, 30 y 60 min bajo condiciones de oscuridad. Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE de 10% de acrilamida y se analizaron por Western blot.

3. Tratamiento con oscuridad y luz a células adaptadas a luz.

Células KB8 en cultivo de seis días y en periodo de oscuridad de su ciclo, se concentraron y suspendieron en medio ASP-8A fresco, en condiciones de oscuridad. Se colocaron alícuotas iguales de concentración de células en tubos Falcon y se les dejó adaptarse naturalmente durante el periodo de luz de su ciclo en el cuarto de cultivo. Previo a cumplir su periodo diurno de 12 h, se realizaron dos extracciones de proteínas, una a las 10 h y otra justo al final del periodo (12 h). Los tubos se cubrieron con papel aluminio en sincronía con el inicio del periodo oscuro de su ciclo (cuando se apaga la luz del cuarto de cultivo). Después, se realizaron extracciones secuenciales a 15, 30, y 60 min de oscuridad. También, en el minuto 60 otro tubo se liberó del forro de aluminio y de nuevo se expusieron las células a estímulo de luz, y a los 30 min se le sometió a la extracción de proteínas. Estas muestras, las de 10 y 12 h luz, las de 15, 30 y 60 min oscuridad y la de retorno a 30 min luz se estandarizaron en geles de SDS-PAGE de 10% de acrilamida y se analizaron por Western blot.

L. Tratamientos con luz /oscuridad a células de *Symbiodinium* en simbiosis.

Tres medusas de *Cassiopeia xamachana* con tamaños iguales, se trataron con oscuridad por 9 horas. Posteriormente, a una se le sometió a extracción de proteínas de sus simbiosis y a las otras dos se les sometió a estímulo con luz. A estas últimas, de igual forma se les extrajeron las proteínas de sus simbiosis después de 30 y 60 min.

Paralelamente, también se realizaron extracciones a células KB8 en cultivo, como control.

La extracción de proteínas del simbiote implica en un primer paso el aislamiento para separarlas de su huésped. Para ello, se cortaron dos tentáculos de la medusa y se

maceraron con 10 ml de PBS-T en un homogenizador de vidrio. El homogenado se filtró una vez con una doble malla de 300 μm , y el filtrado se centrifugó 30 seg a 1400 g; el precipitado se lavó dos veces: se suspendió con 10 ml de PBS-T, maceró en homogenizador y centrifugó a 1400 g por 30 seg. Al precipitado de simbiontes lavado se le sometió a extracción de proteínas (ver en VII.B). Estos aislamientos de simbiontes se realizaron bajo condiciones de luz u oscuridad según las necesidades de cada caso.

Las tres muestras de proteínas tanto del simbionte recién aislado y de células de KB8 en cultivo se estandarizaron para obtener cargas iguales de proteínas para cada caso. Después las muestras se analizaron por Western blot con los anticuerpos.

M. Análisis de solubilización diferencial de proteínas microsomales.

Se colectaron células crecidas en un litro de cultivo ASP-8A en una precipitado a la que se aplicó un lavado en PBS. Posteriormente, el precipitado de células se suspendió en 12 ml de PBS adicionado un coctel comercial de inhibidores de proteasas (Complete®, Roche, Basel, Suiza; PBS-C) y 0.2 mM de NaVO_3 , y 10 mM de NaPPi como inhibidores de fosfatasa a 4°C. Las células se rompieron pasándolas tres veces a través de una prensa de French (SLM-AMINCO French® pressure cell press) con presión máxima de 20000 psi. El homogenado obtenido se procesó de acuerdo con Islas-Flores et al. (2009). Primero se centrifugó a 20 000 g durante 10 min a 4°C, para sedimentar el material insoluble y las células no rotas; se recuperó el sobrenadante. Después, se centrifugó a 100 000 g por 1 h a 4°C (el precipitado de 100 000 g contiene los microsomas). El nuevo sobrenadante (fracción soluble en PBS-C), se almacenó a -70°C para su análisis posterior, y el precipitado se suspendió en 12 ml de 0.5 M KCl en PBS-C (se tomó una alícuota para su análisis por Western blot), y se incubó por 30 min a 4°C con agitaciones cada 10 min para liberar las proteínas unidas por interacciones iónicas, luego se centrifugó a 100 000 g por 1 h a 4°C, y el sobrenadante (fracción soluble en KCl), se almacenó para análisis posteriores; el precipitado se suspendió en 12 ml de 0.5% TX-100 en PBS-C, y se incubó 30 min a 4°C para liberar las proteínas unidas a membranas; esta fracción se centrifugó a 100 000 g por 1 h a 4°C y el sobrenadante (fracción soluble en TX-100), se almacenó para análisis posteriores; el precipitado se suspendió en 12 ml de 0.1 M Na_2CO_3 en PBS-C e incubó por

30 min a 4°C con agitaciones cada 10 min para liberar proteínas de membrana no liberadas con el detergente; después se centrifugó a 100 000 g por 1 h a 4°C y el sobrenadante (fracción soluble en Na₂CO₃) se almacenó para análisis posteriores; el precipitado final (Pf) se suspendió en un volumen mínimo de buffer de Laemmli 1X y se calentó 5 min a 95°C para su completa solubilización. Los solubilizados de microsomas de los sobrenadantes y del precipitado final fueron analizados en geles de poliacrilamida desnaturalizante y Western Blot.

N. Aislamiento y secuencia parcial de la proteína de 75 kDa.

Apartir de los resultados que se obtuvieron del análisis de crecimientos de *Symbiodinium* en diferentes días y del estímulos con luz y oscuridad (ver en resultados), seleccionamos a la proteína de 75 kDa para desarrollar su caracterización más profunda. Con el objetivo de obtener su identidad, se realizaron análisis cromatograficos secuenciales de los extractos de proteínas, primero en una columna de DEAE-SEPHACEL y después en una de Hidroxiapatita. Finalmente, la proteína se logró confinar a una banda aislada correspondiente a 75 kDa que se cortó de un gel de acrilamida corrido por SDS-PAGE.

Cromatografía en una columna de DEAE-SEPHACEL: Para obtener una concentración de 0.02 M de NaCl, un volumen del extracto de proteínas del sobrenadante microsomal soluble en PBS-C (ver en VII.M) se disolvió con 7 volúmenes de PB (2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, pH 7.7). La muestra disuelta se pasó por una columna con 600 µl de volumen de lecho de DEAE-SEPHACEL, previamente equilibrada con 50 ml de 0.02 M NaCl en PB. Después, la columna se lavó con 10 ml de PB. Después, la columna se eluyó con un gradiente lineal desde 0.075 a 0.4 M NaCl en PB y se colectaron 20 fracciones de 1 ml. Las muestras antes y después, lavado y las fracciones eluidas de la columna se analizaron en geles de SDS-PAGE de 10% de acrilamida y Western blot con los anticuerpos correspondientes.

Cromatografía en una columna de Hidroxiapatita: Después del análisis de las muestras del lavado, elusiones y/o el después de columna de DEAE-SEPHACEL, las que presentaron la proteína de 75 kDa se disolvieron con PB hasta una concentración aproximada de 0.02M de NaCl. Posteriormente, la muestra se pasó a través de una columna

con 500 µl de hidroxapatita previamente equilibrada con 50 ml de PB. La columna se lavó con 10 ml de una solución 0.05 M de fosfatos (14 mM NaH₂PO₄, 36 mM Na₂HPO₄). Después, se realizó la elución de la columna con un gradiente de 0.05 a 0.2 M de fosfatos en PB, colectando el volumen total en fracciones de 1 ml. Todas las muestras se analizaron por Western blot con los anticuerpos.

Aislamiento de la banda de 75 kDa por SDS-PAGE: Se colectaron todas las fracciones eluidas de la columna de Hidroxapatita en las cuales se detectó la presencia de la proteína de 75 kDa, y después se concentró en filtros centrífugo (CENTRICON[®], Millipore) de diámetro de corte de 10 kDa. La muestra concentrada se separó en geles de SDS-PAGE de 10% de acrilamida de mayor longitud y con tiempos de corrida prolongados a fin de promover una mayor separación entre proteínas, y después de la corrida y electro-transferencia, se analizaron con los anticuerpos por Western blot.

Se preparó un gel de 8% de acrilamida bajo cuidados especiales de limpieza, para eliminar la posibilidad de contaminación de otras sustancias. Se corrió la muestra en este gel y, después de tinción con azul de Coomassie (BioSafe), se obtuvo una banda aislada correspondiente a la proteína de 75 kDa. Una vez identificada, la banda de 75 kDa se cortó del gel con una navaja limpia y estéril de acero inoxidable. La banda se envió a la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos para obtener la secuencia parcial de aminoácidos.

Finalmente, con las secuencias parciales de aminoácidos obtenidas de la proteína de 75 kDa se realizaron alineamientos en diversas bases de datos de secuencias de proteínas. Para obtener la identidad inequívoca de la pp75 a partir de los péptidos parciales obtenidos, se realizaron comparaciones empleando el programa BLASTp, contra la base de datos de secuencias de proteínas del NCBI (GenBank, National Center for Biotechnology Information). Adicionalmente, para tratar de encontrar la secuencia completa correspondiente a pp75, se hicieron comparaciones con los mismos péptidos parciales de pp75 contra la base de datos de EST's de células KB8, desarrollada en el laboratorio de la Dra. Mónica Medina en la Universidad de California, Merced (Bayer et al., 2012).

VIII. RESULTADOS

A. Inmunodetección de proteínas de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 con anticuerpos anti-fosfoserina, -fosfotreonina y -fosfotirosina.

Se analizaron extractos de proteínas de las tres filotipos en estudio, con los tres anticuerpos anti-pAminoácidos por Western blot. A pesar de que en esta primera etapa exploratoria la edad de los cultivos no fue uniforme, los anticuerpos anti-pThr revelaron algunas proteínas en forma de bandas intensas y otras débiles, con masas moleculares relativas (M_r) de 30, 32 y 75 kDa en *S. kawagutii* (fig. 8, carril 5); otras de M_r 39, 55, 75 y 110 kDa en KB8 (fig. 8, carril 6); y otras más de M_r 31, 32 y 53 kDa en Mf11 (fig. 8, carril 7). Estos datos sugieren que todas estas bandas corresponden a proteínas que están fosforiladas en Thr(s) presente(s) en su estructura.

Los anticuerpos anti-pTyr revelaron bandas débiles con M_r 32 kDa en *S. kawagutii*, 38 kDa en KB8 (fig. 8, carril 2 y 3, respectivamente) y tres de M_r 30, 39 y 53 kDa en Mf11 (fig. 8, carril 4), lo que sugiere que estas bandas corresponden a proteínas fosforiladas en residuos de Tyr. Anticuerpos anti-pSer revelaron bandas con M_r 53 y 63 kDa en *S. kawagutii* (fig. 8, carril 8), de M_r 38 kDa en KB8 (fig. 8, carril 9), y de M_r 53 y 63 kDa en Mf11 (fig. 8, carril 10). Estos resultados sugieren que estas bandas corresponden a proteínas fosforiladas en residuos de Ser.

Se seleccionaron proteínas que se revelaron con señales claras y de manera expedita con el sustrato del anticuerpo secundario, además de que estuvieran en los tres filotipos analizados. Por un lado, las proteínas detectadas con los anticuerpos anti-pThr con M_r 30 y 32 kDa, ambas presentes en *S. kawagutii* y Mf11 (fig. 8 carriles 5 y 7, respectivamente), la de M_r 75 kDa con una señal débil en *S. kawagutii* y más intensa en KB8 (fig. 8 carriles 5 y 6, respectivamente); y por otro lado, las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-pSer con M_r 53 y 63 kDa ambas presentes en *S. kawagutii* y Mf11 (fig. 8 carriles 8 y 10). Además, la proteína de 110 kDa destacó por su intensa señal, lo cual sugiere que tiene un grado de fosforilación considerable (fig. 8 carril 6).

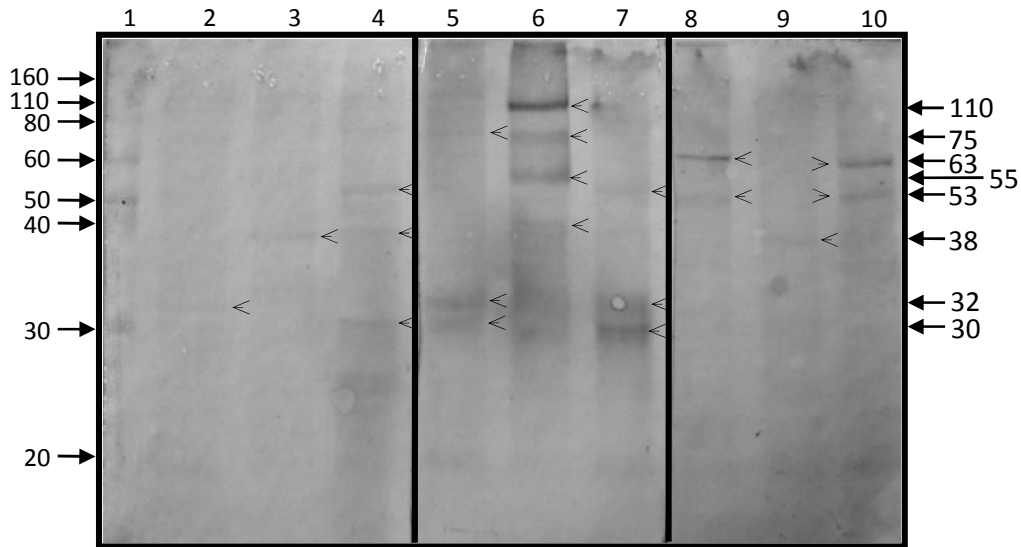


Figura 8. Inmunodetecciones de fosfoaminoácidos presentes en proteínas de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 con anticuerpos anti-pSer, anti-pTyr y anti-pThr. En la figura los carriles corresponden a: marcadores de pesos moleculares (carril 1); inmunodetecciones con anticuerpos anti-pTyr de extractos de proteínas de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 (carriles 2, 3 y 4, respectivamente); inmunodetecciones con anticuerpos anti-pThr de extractos de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 (carriles 5, 6 y 7, respectivamente); inmunodetecciones con anticuerpos anti-pSer de proteínas de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 (carriles 8, 9 y 10, respectivamente). Las puntas de flechas dentro de la figura indican las bandas de proteína reveladas y las flechas a la derecha e izquierda indican los pesos moleculares relativos de las bandas.

B. Cambios en el estado de fosforilación de proteínas durante el crecimiento de células de *Symbiodinium* en cultivo.

Se observaron cambios de fosforilación en las proteínas durante las diferentes etapas del crecimiento de los cultivos *in vitro* en los tres filotipos de *Symbiodinium*. Los datos de los Mr's correspondientes a las bandas reveladas con los anticuerpos anti-pThr (fig. 9), anti-pTyr (fig. 10) y anti-pSer (fig. 11), se resumen en la tabla 1. En ella se puede observar que una mayoría de proteínas fosforiladas se encuentran principalmente en el día 9 de crecimiento para las tres filotipos y con los tres anticuerpos. Esto sugiere la ocurrencia de procesos de fosforilación que aumentan en la fase de crecimiento celular exponencial.

Las proteínas de Mr~ 75 y 110 kDa fueron detectadas nuevamente en al menos dos de los filotipos ensayados con los anticuerpos anti-pThr. La proteína de 75 kDa además de *S. kawagutii* y KB8, también se le encontró en Mf11 (fig. 9C, carril 3). Su comportamiento también demostró características interesantes pues a los tres días se le encontró ligeramente

fosforilada en *S. kawagutii* (fig. 9A, carril 2), y sin fosforilación detectable en KB8 y Mf11 (fig. 9B y C, carriles 2). Sin embargo, a los 9 días se observó un grado máximo de fosforilación en los tres filotipos (fig. 9A, B y C, carriles 3), el cual fue indetectable o de baja intensidad a los 15 y 20 días (fig. 9A, B y C, carriles 4 y 5, respectivamente). Por otro lado, la proteína de Mr~ 110 kDa, se observó a los 9 días y este estado fosforilado se mantuvo hasta los 15 y 20 días

La proteína de Mr~ 63 kDa detectada por anti-pSer estuvo presente en *S. kawagutii*, y aparentemente en KB8 a los 9 días (fig. 11A y B, carriles 3), pero no en Mf11 en ninguno de los días ensayados (fig. 11C).

Adicionalmente, los anticuerpos anti-pSer, y principalmente anti-pTyr, detectaron otras proteínas con gran intensidad de Mr~ 45 y 55 kDa a los 9 días, tanto en *S. kawagutii* como en Mf11 (figs. 10A y C, y 11A y C, carriles 3), pero éstas resultaron ser inespecíficas debido a que Western blots donde se omitieron los anticuerpos primarios y se incubaron sólo anticuerpos secundarios revelaron las mismas bandas.

En resumen, la proteína de 75 kDa fue detectada de manera clara y reproducible con los anticuerpos anti-pThr, lo que sugiere que está fosforilada en residuos de Thr. Esta también estuvo presente en los tres filotipos de *Symbiodinium*, lo cual también fue uno de nuestros criterios para asegurarnos que no fuera una particularidad de algún filotipo. Además, se le encontró asociada a las extracciones hechas a los 9 días de crecimiento (fig. 9A, B y C, carriles 3), tiempo en el cual los cultivos de los tres filotipos se encontraron en fase exponencial. Esto sugiere que esta proteína participa de forma activa en eventos asociados a proliferación celular y que pudiera ser clave para mecanismos de señalización compartidos en los tres filotipos de *Symbiodinium*. En base a estos datos se seleccionó a esta proteína para desarrollar una caracterización más completa con el objeto de encontrar claves importantes acerca de su función. A partir de entonces la denominamos como pp75.

Otra proteína interesante por su estado hiperfosforilado aparente fue una proteína de Mr~ 110 kDa que también fue detectada con los anticuerpos anti-pThr, aunque ésta solo se encontró en KB8. Esta proteína fue detectada en los extractos de 9 días y mantuvo su estado de fosforilación hasta los 15 y 20 días (fig. 9B, carriles 3, 4 y 5).

Las inmunodetecciones con los anticuerpos anti-pTyr fueron débiles, no reproducibles o inespecíficas. Además, extractos de controles positivos tampoco revelaron

bandas de proteínas cuando se analizaron con estos anticuerpos (figura complementaria 2). Esto sugiere que los anticuerpos eran demasiado específicos contra dominios particulares conteniendo fosfo-tirosina, o que la funcionalidad de los anticuerpos no fue la óptima.

	<i>Symbiodinium kawagutii</i>				<i>Symbiodinium</i> sp. KB8				<i>Symbiodinium</i> sp. Mf11			
	3d	9d	15d	20d	3d	9d	15d	20d	3d	9d	15d	20d
anti-pTyr (fig. 10)		45 53 55	-	-	53	30 41 53 60	-	-	-	45 53	-	-
anti-pThr (fig. 9)	75	45 55 75 110 130	-	-	-	36 55 63 75 110	49 58 110	58 110	-	48 53 75	-	-
anti-pSer (fig. 11)	55	45 53 55 63	-	-	38	38 45 53 63	40	40	-	45 53	-	-

Tabla 1. Datos de los pesos moleculares (kDa) relativos de las proteínas detectadas con los anticuerpos anti-pTyr, -pThr y -pSer en los tres tipos de *Symbiodinium* a los diferentes días del crecimiento mostrados en las figuras 8, 9 y 10. En rojo se muestran las bandas detectadas inespecíficamente.

La siguiente estrategia para continuar con la caracterización de la pp75 y búsqueda de otras proteínas, fue el someter a las células a diversos estímulos y observar si se presentaban cambios en el estado de fosforilación como respuesta a los mismos. Para ello, era necesario conocer el comportamiento de fosforilación de esta proteína en intervalos de tiempo más cercanos, y así detectar el periodo previo a su fosforilación máxima. Esto permitiría determinar el tiempo adecuado para aplicar los estímulos. Por lo tanto, para este efecto, nuevas extracciones de proteínas se realizaron a los 3, 6, 9 y 12 días de proliferación celular de los tres filotipos. Los extractos se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-pThr, y como sonda secundaria, de ahí en adelante se usó proteína A acoplada a fosfatasa alcalina (AP; dilución 1:500), para reducir al máximo la detección de falsos positivos.

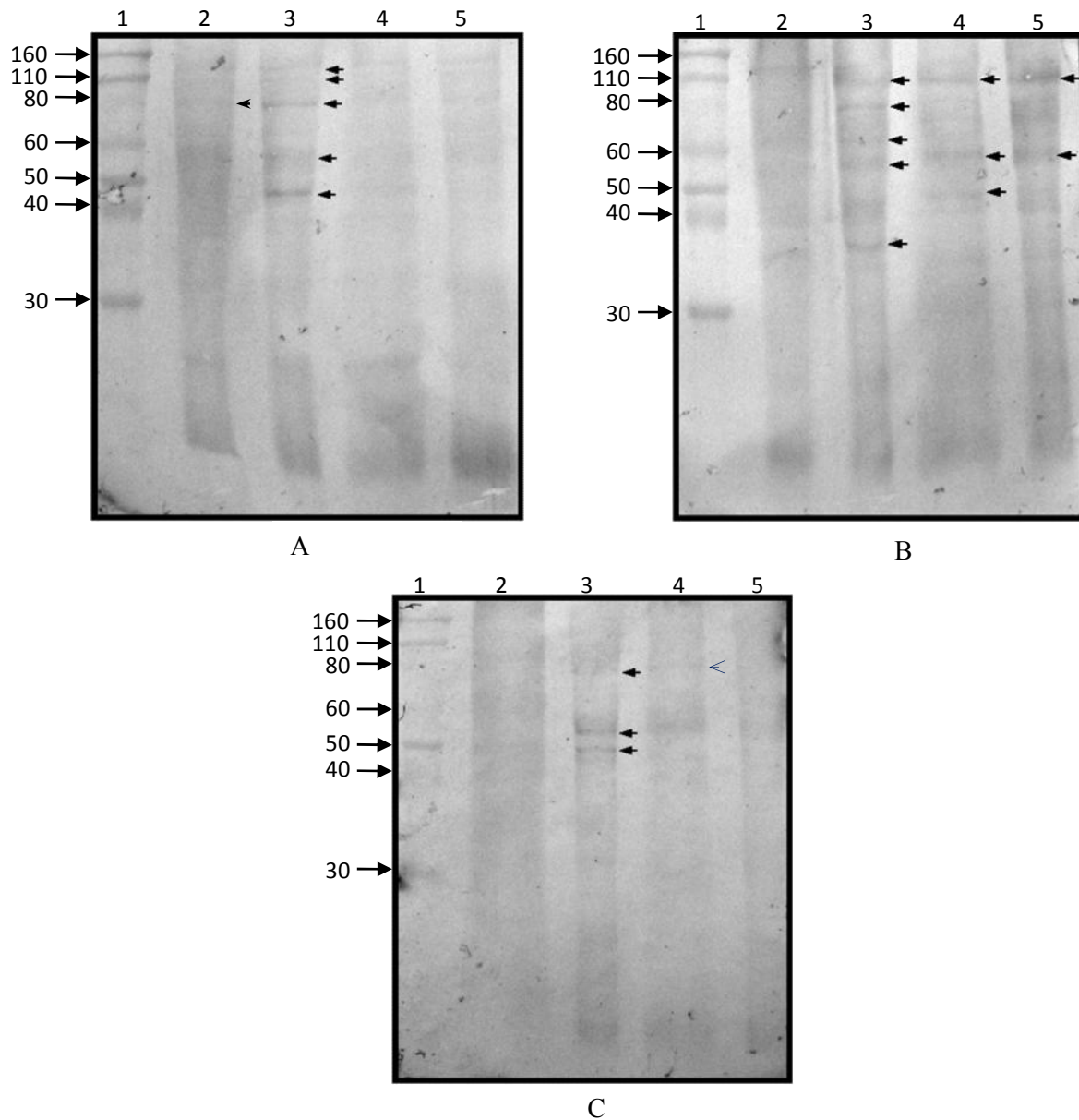


Figura 9. Inmunodetecciones con anticuerpos **anti-pThr** de proteínas de *S. kawagutii* (A), KB8 (B) y Mf11 (C), en diferentes días de crecimiento *in vitro*. En los tres paneles, los carriles 1 corresponden a marcadores de peso molecular; Extractos de proteínas de células en cultivos de 3 (carriles 2), 9 (carriles 3), 15 (carriles 4) y 20 (carriles 5) días de crecimiento. Las flechas dentro de la figura indican las bandas de proteína reveladas y las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores de referencia en cada panel.

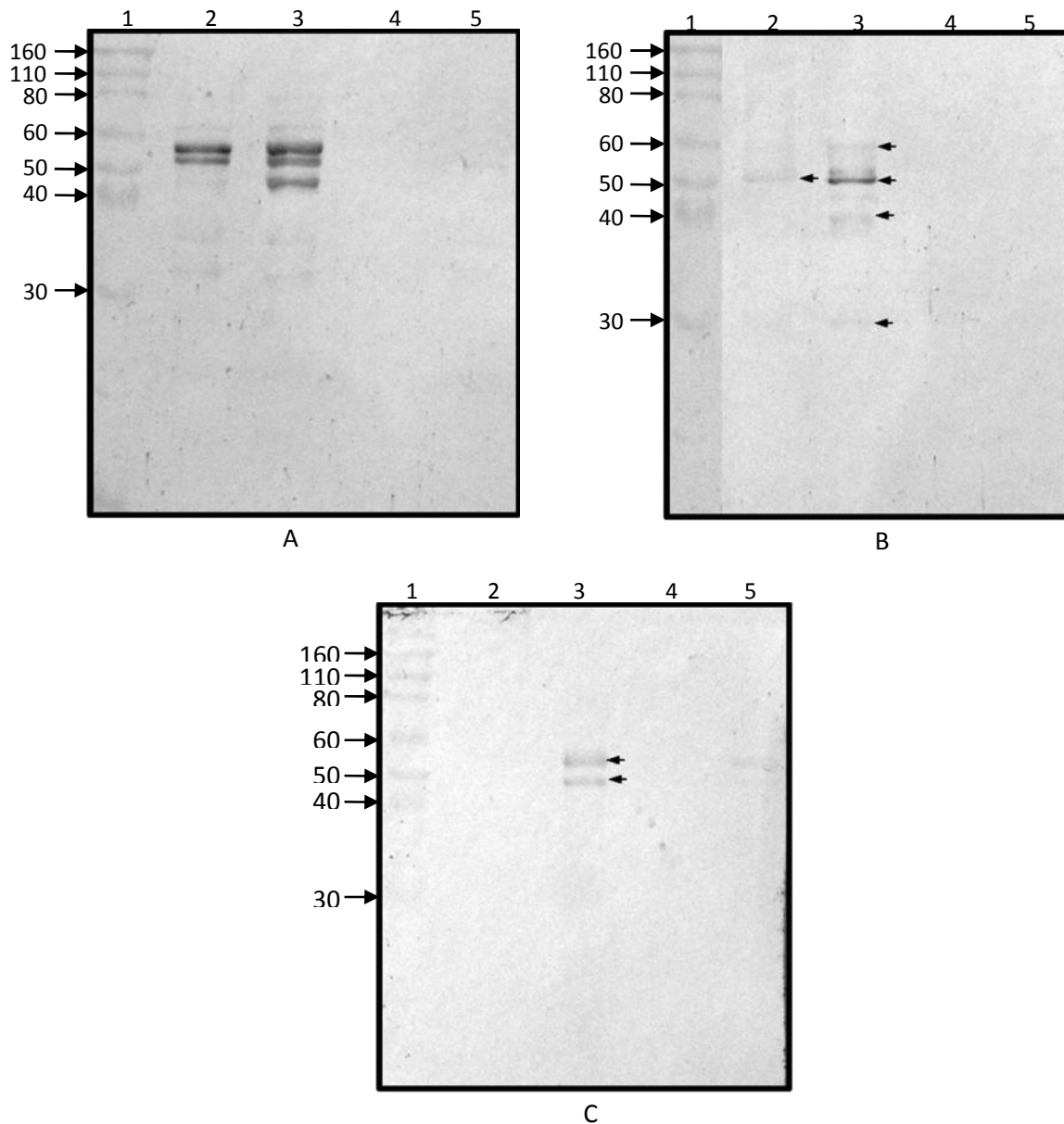


Figura 10. Inmunodetecciones con anticuerpos **anti-pTyr** de proteínas de *S. kawagutii* (A), KB8 (B) y Mf11(C), en diferentes días de crecimiento *in vitro*. En los tres paneles, los carriles 1 corresponden a marcadores de peso molecular; Extractos de proteínas de células en cultivos de 3 (carriles 2), 9 (carriles 3), 15 (carriles 4) y 20 días de crecimiento (carriles 5). Las flechas dentro de la figura indican las bandas de proteína reveladas y las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores de referencia en cada panel.

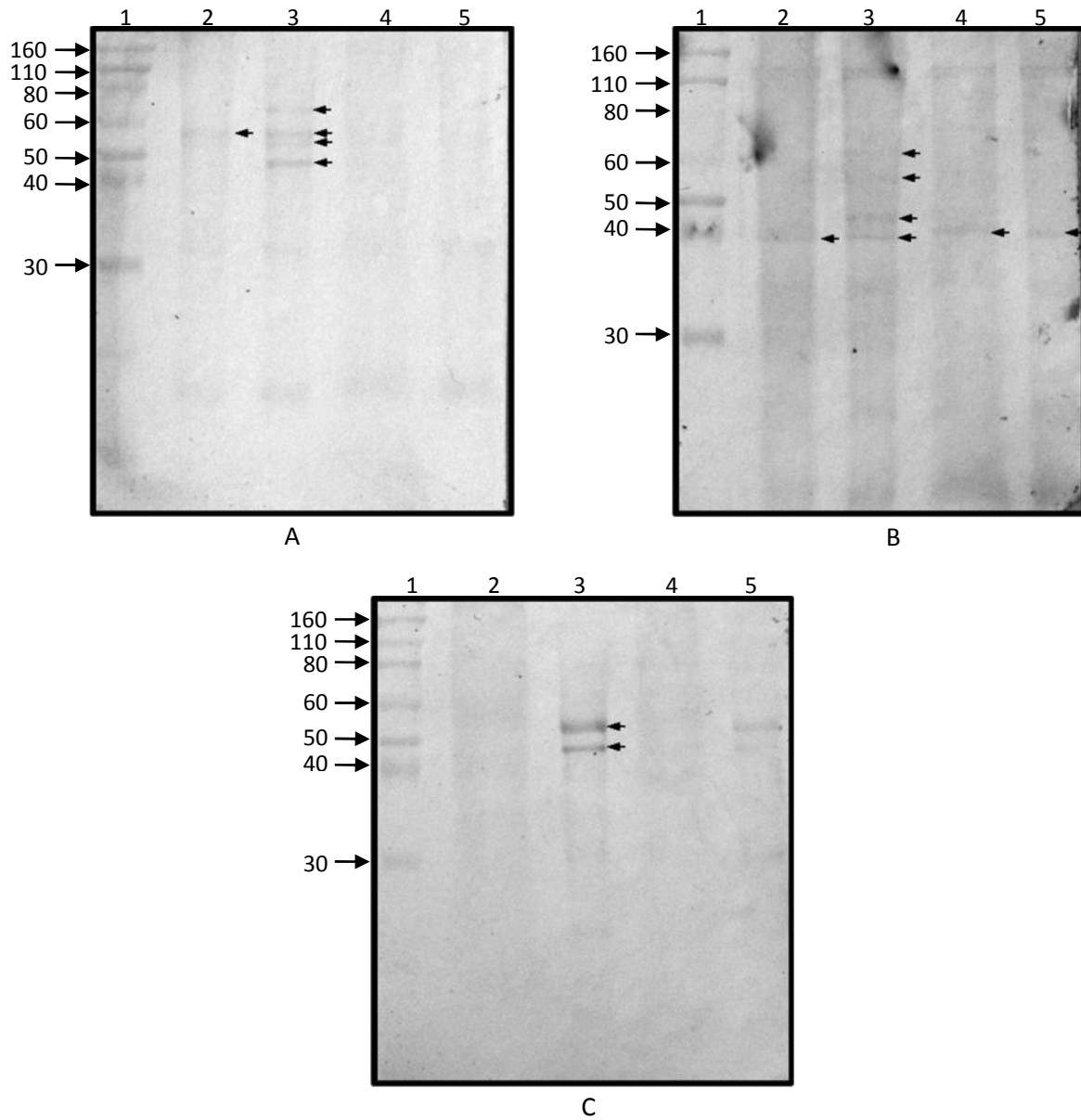


Figura 11. Inmunodetecciones con anticuerpos **anti-pSer** de proteínas de *S. kawagutii* (A), KB8 (B) y Mf11 (C), en diferentes días de crecimiento *in vitro*. En los tres paneles, los carriles 1 corresponden a marcadores de peso molecular; Extractos de proteínas de célula en cultivos de 3 (carriles 2), 9 (carriles 3), 15 (carriles 4) y 20 días de crecimiento (carriles 5). Las flechas dentro de la figura indican las bandas de proteína reveladas y las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores de referencia en cada panel.

Con la proteína A-AP como sonda secundaria los resultados de los Western blot fueron más claros. La pp75 incrementó su nivel de fosforilación aparente en Thr en el sexto día de cultivo *in vitro* en los tres filotipos de *Symbiodinium* (fig. 12, carriles 3, 7 y 11), pero a una tasa menor o similar a la detectada a los nueve días en los tres filotipos (fig. 12 carriles 4, 8, y 12). Por ello, se determinó que el día seis de cultivo *in vitro* era el indicado para realizar los estímulos. Las proteínas de Mr's ~ 55, 53 y 39 kDa se detectaron de forma constante en *S. kawagutii* y Mf11 durante el curso de los días (fig. 12 carriles 2-5 y 10-13, respectivamente). La señal de pp75 fue más intensa en KB8 que en los otros dos filotipos. Adicionalmente, KB8 es un dinoflagelado perteneciente al clado A que es el simbiote predominante de la medusa *Cassiopeia xamachana*. En la etapa de scifostoma de este hospedero, éstos carecen del simbiote y pueden propagarse asexualmente *in vitro* de forma indefinida. Debido a esto, presenta la ventaja de poder ser utilizado para su infección con KB8 y subsecuente disparo de la metamorfosis, lo cual permitiría seguir el desarrollo de los procesos de transducción de señales que son inducidos concomitantes a este fenómeno.

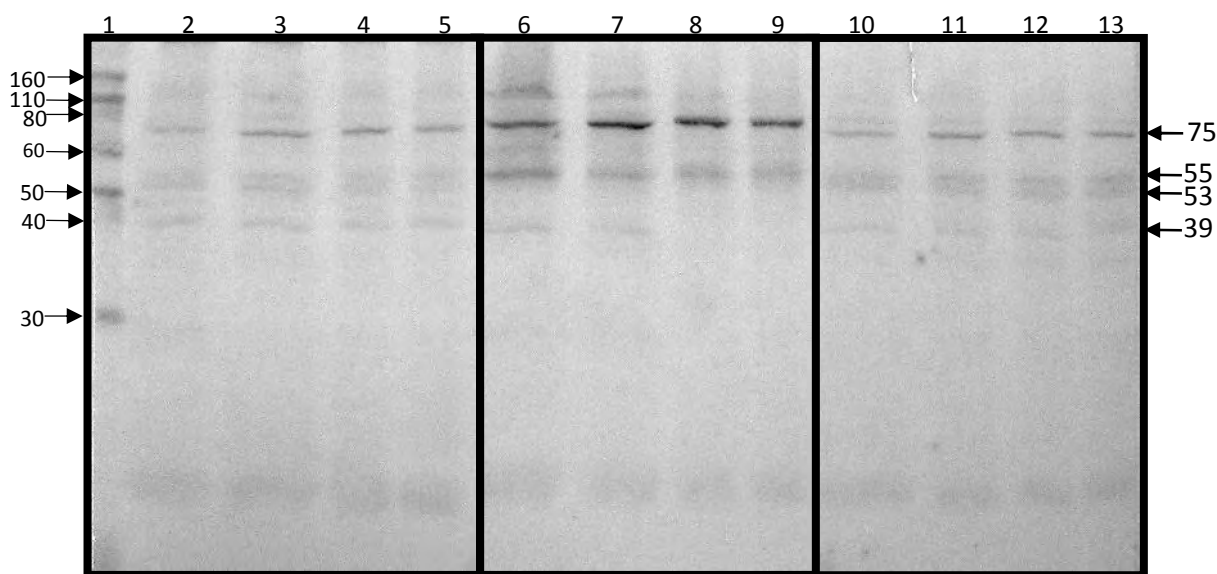


Figura 12. Cinética de crecimiento de células de *S. kawagutii*, KB8 y Mf11 analizada por Western blot con los anticuerpos **anti-pThr**. Carril 1, marcadores de peso molecular, extractos de *S. kawagutii* de 3, 6, 9 y 12 días (carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente); extractos de KB8 de 3, 6, 9 y 12 días (carriles 6, 7, 8 y 9 respectivamente); extractos de Mf11 de 3, 6, 9 y 12 días (carriles 10, 11, 12 y 13 respectivamente). Las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores de peso molecular y las de la derecha indican los pesos moleculares relativos de las proteínas inmunodetectadas.

Finalmente, también se cuenta con una base de datos de EST's (Expressed Sequence Tags) de KB8 desarrollada en el laboratorio de la Dra. Mónica Medina en la Universidad de California, Merced, que permitirían hacer análisis de secuencias de genes codificantes de proteínas. Por esto, se decidió usar KB8 para llevar a cabo la caracterización de pp75.

C. Efecto de estímulos químicos en la fosforilación de Thr en proteínas de células KB8 cultivadas *in vitro*.

Con el objetivo de percibir algún cambio en el estado de fosforilación de pp75 o de otras proteínas, las células se sometieron a diversos estímulos químicos como potenciales inductores de fosforilación.

Todos los organismos parecen tener la capacidad de detectar la disponibilidad de nutrientes de momento a momento, y para ajustar el flujo a través de las vías metabólicas y de señalización. Por lo cual, se probaron como estímulos nutricionales, aminoácidos puros por separado, al igual que un hidrolizado de caseína. Ninguno de los aminoácidos glicina, arginina, ácido glutámico, ni el hidrolizado de caseína generaron cambios en el estado de fosforilación, ni de pp75 ni de ninguna otra proteína (fig. 13, carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente), con respecto al control no estimulado (fig. 13, carril 1). Paralelamente, se probó el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) que se sabe es un inhibidor del pegado de integrinas a sus receptores, y su control no activo RAD (Arg-Ala-Asp). Los tripéptidos RGD no provocaron cambios en la fosforilación de la pp75 ni de alguna otra proteína en las células de KB8 (fig. 13, carril 6), en comparación con el control sin estímulo (fig. 13, carril 1). Por otro lado, el tripéptido RAD provocó un ligero incremento en la fosforilación de pp75 y de otra proteína de Mr~ 41 kDa (fig. 13 carril 7). Finalmente, tampoco se observaron alteraciones en el patrón de fosforilación, ni cuando se incrementó la concentración de CaCl₂ en el medio (fig. 13, carril 8), ni cuando se secuestraron iones de calcio con EGTA (fig. 13, carril 9), en comparación con el control (fig. 13, carril 1).

Estos datos sugieren que la fosforilación de la proteína pp75 de KB8 no es afectada por estímulos nutricionales, cambios en la matriz extracelular mediados por integrinas, o cambios en la concentración de Ca²⁺ en el medio.

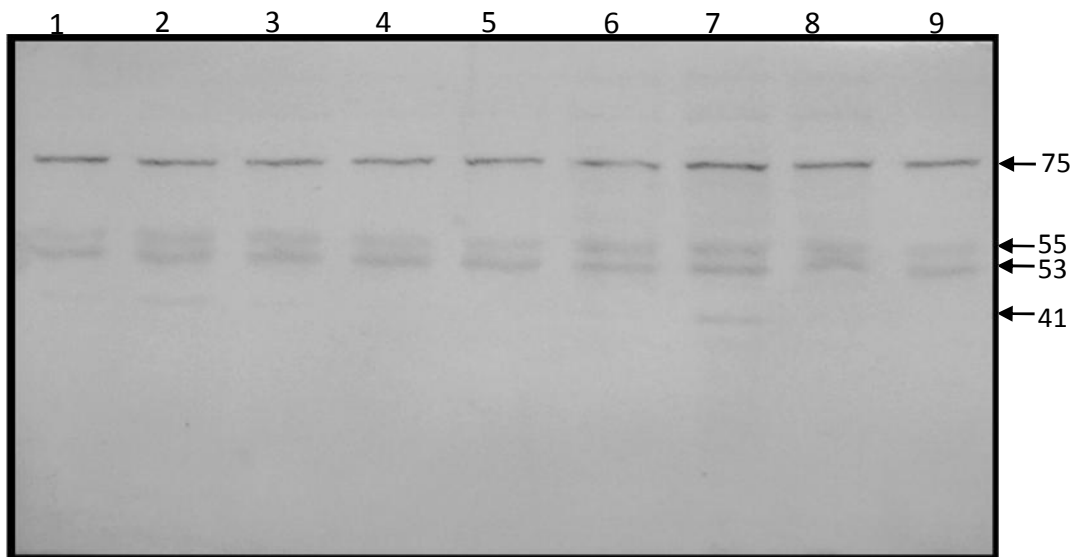


Figura 13. Comportamiento en el grado de fosforilación aparente de la proteína de 75 kDa en células KB8 sometidas a diversos estímulos. Extractos de proteínas de células incubadas en medio ASP-8A (control; carril 1) o adicionadas con 0.1% (p/v) hidrolizado de caseína (carril 2), 10 mM glicina (carril 3), 10 mM arginina (carril 4), 10 mM de ácido glutámico (carril 5), 100 µg/ml de tripéptidos RGD (carril 6) o RAD (carril 7), 15 mM de ácido etilen glicol tetraacético (EGTA, por sus siglas en inglés; carril 8), o 20 mM de CaCl₂ (carril 9). Las flechas a la derecha indican los pesos moleculares de las proteínas inmunodetectadas con los anticuerpos anti-pThr en kDa.

D. Efecto de un extracto de la medusa *C. xamachana* en la fosforilación de Thr en las proteínas de cultivos *in vitro* de KB8.

Cuando se determinó el grado de fosforilación aparente en Thr de proteínas de KB8 sometidas a estímulos de tejido de la medusa *C. xamachana*, se observó un ligero decremento en la intensidad de la banda correspondiente a pp75. Este cambio se pudo observar cuando las células se estimularon con el extracto de *C. xamachana* durante 15 min (fig. 14, carril 3), y esta variación fue mayor aún después de 30, 60 y 120 min (fig. 14, carriles 4, 5 y 6, respectivamente) en comparación con las células control no estimuladas (fig. 14, carril 2). Estos resultados indicaron que el extracto del hospedero tuvo un efecto de desfosforilación sobre pp75. Adicionalmente, se observó una señal débil de pp75 en el extracto de proteínas del simbionte recién aislado (fig. 14, carril 1). En conjunto, estos datos que demuestran un ligero efecto de desfosforilación con extractos de tejido de *C.*

xamachana y la presencia de pp75 en simbiontes recién aislados en un estado casi desfosforilado, sugieren que la fosforilación de esta proteína es influenciada por la medusa.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-pThr detectaron una proteína de Mr~ 61 kDa en extractos del simbionte recién aislado (fig. 14, carril 1). Contrariamente, los anticuerpos anti-pThr no detectaron a ésta proteína en células KB8 en cultivo, ya sea con o sin tratamiento de tejido de *C. xamachana* (fig. 14, carriles 2 y 3-6, respectivamente). Tampoco se detectó la presencia de la proteína en extractos de *C. xamachana* libres de endosimbiontes (fig. 18, carril 8). Aunque estos resultados sugerían que esta era una proteína de *Symbiodinium* en estado endosimbiótico cuyo nivel de fosforilación aparente estaba asociado a dicho estado, su inmunodetección no fue reproducible en ensayos posteriores.

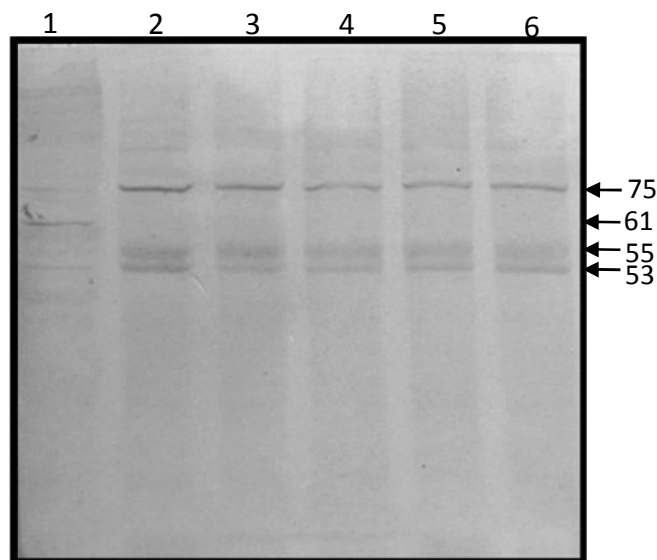


Figura 14. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en simbiontes recién aislados y células KB8 *in vitro* tratadas con tejido de *C. xamachana*. En la figura los carriles corresponden a: Extracto de proteínas del simbionte recién aislado de la medusa *C. xamachana* (carril 1), extractos de proteínas de células KB8 en medio ASP-8A fresco (control, carril 2) o tratadas con sobrenadante de tejido de *C. xamachana* durante 15 (carril 3), 30 (carril 4), 60 (carril 5) y 120 min (carril 6). Las flechas a la derecha indican los pesos moleculares relativos en kDa de las proteínas detectadas con los anticuerpos anti-pThr

E. Efecto de estímulos de luz y oscuridad en el nivel de fosforilación de Thr en proteínas de *Symbiodinium*.

1. Efecto de la luz en células *Symbiodinium* adaptadas a oscuridad.

El análisis por Western blot con anti-pThr en células adaptadas a oscuridad durante la fase oscura del fotoperiodo de 12 h, demostró que pp75 mantiene un grado considerable de fosforilación aparente en Thr ya que los anticuerpos la detectaron de forma clara (fig. 15A, carril 1). Posteriormente, cuando células KB8 fueron estimuladas con luz por 30 min y analizadas por Western blot, se observó que la intensidad de la banda de pp75 tuvo un decremento drástico (fig. 15A, carril 2). La intensidad de la banda se recuperó paulatinamente de modo que la intensidad se incrementó ligeramente a los 60 min y casi completamente a los 240 min de exposición a la luz (fig. 15A, carriles 3 y 4). Estos resultados indican que esta proteína, durante la fase oscura, se encuentra significativamente fosforilada en Thr y se (es) desfosforila(da) ante un “shock” de luz; y después, paulatinamente recupera su estado fosforilado a medida que las células se readaptan a la luz.

Resulta interesante resaltar, el comportamiento contrario que se observó en una proteína de Mr~ 41 kDa ante el estímulo de luz en células KB8. Ésta proteína se encontró aparentemente desfosforilada en Thr cuando la célula estuvo adaptada a oscuridad (fig. 15A, carril 1). Sin embargo, después de 30 min los anticuerpos anti-pThr detectaron una banda intensa, reflejando un estado hiperfosforilado (fig. 15A, carril 2), que después fue disminuyendo de forma paulatina (fig. 15A, carriles 3 y 4).

Debido a que el criterio inicial fue el que la proteína estuviera presente en los tres filotipos de *Symbiodinium* analizados, era importante saber si en los otros dos filotipos este comportamiento de fosforilación en Thr de su proteína homóloga, pp75 sería similar. Por ello, se realizó exactamente el mismo ensayo en células de *S. kawagutii* y Mf11 y se encontró que los homólogos de pp75 de ambas filotipos también responden a los estímulos de luz. Aunque las diferencias fueron de menor intensidad, en células de ambos, *S. kawagutii* y Mf11 se observó una ligera desfosforilación en Thr de la proteína cuando se le aplicó el estímulo de luz por 30 min (fig. 15B y C, carril 2), en comparación a las células

adaptadas a oscuridad antes del estímulo (fig. 15B y C, carril 1). Las proteínas pp75 paulatinamente fueron incrementando su nivel de fosforilación aparente a los 60 min, y la recuperación en el nivel de fosforilación en Thr fue total a los 240 min en ambos casos (fig. 15B y C, carriles 3 y 4, respectivamente). Por otra parte, en células de *S. kawagutii* y Mf11 la proteína de Mr~ 41 kDa no varió su nivel de fosforilación aparente en Thr ante los diferentes tiempos del estímulo de luz (fig. 15B y C, carriles 2-4), en comparación con el control (células adaptadas a oscuridad; fig. 15B y C, carril 1). Esto sugiere que la respuesta de fosforilación en Thr es de mayor intensidad y mucho más sensible a los estímulos de luz, en KB8 comparado con los otros filotipos.

2. Efecto de la oscuridad en células *Symbiodinium* adaptadas a oscuridad después de estímulo con luz.

A partir del resultado anterior, donde se observó una fosforilación aparente considerable de pp75 en Thr bajo condiciones de oscuridad en células KB8, surgió el interés por saber si la oscuridad es el factor que estimula el cambio hacia un estado de fosforilación. Por tal motivo se procedió al siguiente experimento en el que células adaptadas a 12 h de oscuridad se trataron con 30 min luz y después se regresaron a la oscuridad a diferentes tiempos.

El análisis confirmó que pp75 se encuentra normalmente con un significativo nivel de fosforilación aparente en Thr en células de KB8 adaptadas a oscuridad (fig. 16, carril 1), y que ésta disminuye su nivel de fosforilación con un estímulo de 30 min de luz (fig. 16, carril 2). Después, cuando se regresa el cultivo a la oscuridad, comienza a restablecerse la fosforilación de la proteína a partir de los 15 min (fig. 16, carril 3). Esta recuperación es más evidente aún después de 30 y 60 min de retorno a las condiciones de oscuridad (fig. 16, carriles 3, 4 y 5, respectivamente). Estos resultados indican que: a) la fosforilación aparente en Thr de pp75 es máxima en condiciones de adaptación a oscuridad; b) el estímulo de luz produce un efecto de rápida desfosforilación de las Thr's; c) la fosforilación aparente en Thr se restablece ya sea que las células se queden en condiciones constantes de luz o se retornen a oscuridad; y d) la re-fosforilación ocurre más rápidamente en condiciones

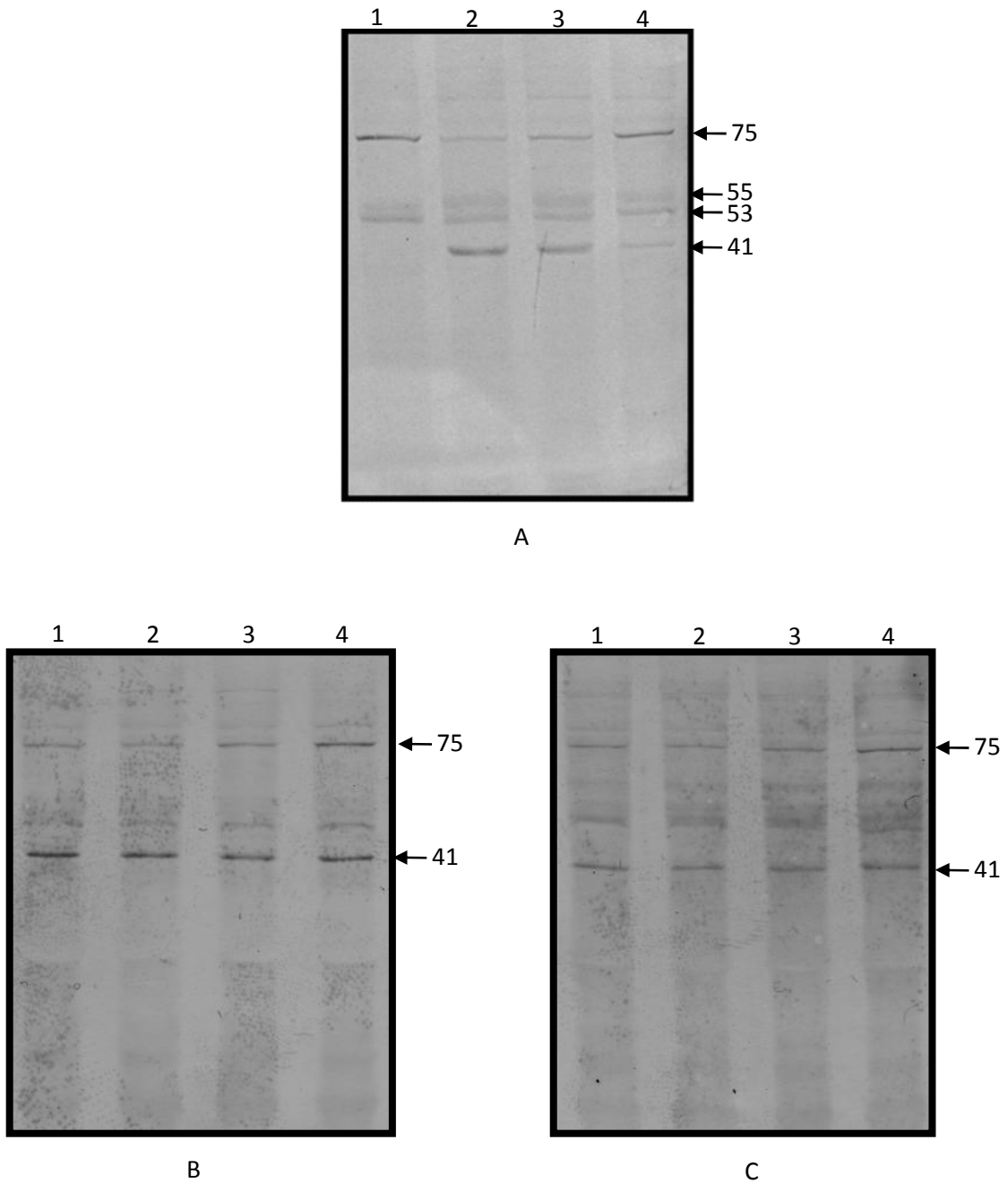


Figura 15. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos *in vitro* de *S. sp.* KB8 (A), *S. kawagutii* (B) y *S. sp.* Mf11 (C), adaptados a oscuridad y después de un estímulo de luz. Para los tres paneles A, B y C: extractos de proteínas de células adaptadas a oscuridad (12 h) (carril 1), estimuladas con luz 30 (carril 2), 60 (carril 3) y 240 (carril 4) min. Las flechas muestran la posición relativa de la migración de las proteínas en kDa.

de retorno a la oscuridad que cuando las células se mantienen en la luz. El estado elevado de fosforilación de pp75 en células adaptadas a oscuridad y la re-fosforilación acelerada en condiciones de retorno a oscuridad después de estímulo de luz, sugieren que el estado aparentemente hiperfosforilado en Thr's de esta proteína está asociado a condiciones de oscuridad y que la luz debe ser estímulo al que responde *Symbiodinium*, con una desfosforilación en esta proteína.

Por otro lado, se detectó nuevamente en las mismas células que la proteína de Mr~41 kDa aumenta su nivel de fosforilación aparente en Thr ante el estímulo de luz (fig.16, carril 2), pero a diferencia a la de 75 kDa, el retorno a condiciones de oscuridad no conlleva a un proceso de desfosforilación acelerado (fig.16, carriles 3-5).

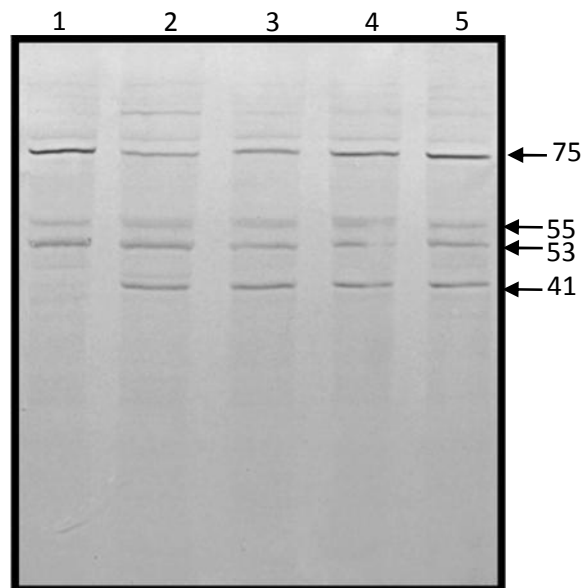


Figura 16. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos *in vitro* de KB8 adaptados a oscuridad y después de un estímulo de luz seguido de retorno a condiciones de oscuridad. Extracto de proteínas de KB8 adaptadas a 12 h de oscuridad (carril 1), extracto de células tratadas con 30 min de luz (carril 2), extractos de células en oscuridad por 15, 30 y 60 min (carriles 3, 4 y 5, respectivamente) después de estímulo con 30 min luz. Las flechas indican la posición de migración relativa en kDa de las proteínas detectadas con los anticuerpos anti-pThr.

3. Efecto de la oscuridad en células *Symbiodinium* adaptadas a luz

Para probar el posible efecto contrario en el nivel de fosforilación en Thr de pp75, nos interesaba saber si la oscuridad sería capaz de generar un estímulo de incremento en la

fosforilación en células adaptadas a condiciones de 12h de luz. Sin embargo, cuando se ensayaron por Western blot las proteínas fosforiladas en Thr de células KB8 en cultivo, adaptadas a 12 h de luz (fig. 17, carril 3) y después de estímulos de oscuridad por 15, 30 y 60 min, no se observaron cambios en el nivel de fosforilación de pp75 (fig. 17, carriles 4, 5 y 6, respectivamente). Tampoco se observó variabilidad en la fosforilación aparente en Thr de ésta proteína entre las células adaptadas a luz por periodos de 10 y 12 h (fig. 17, carriles 2 y 3). Estos datos sugieren que la transición de luz hacia oscuridad no genera efectos de aumento en el nivel de fosforilación en Thr de ésta proteína, al menos no dentro de un periodo de una hora, y que existe una estabilidad en la fosforilación en Thr de pp75 durante periodos prolongados de luz.

También se analizó el posible cambio en el nivel de fosforilación en Thr de pp75 en células KB8 adaptadas a luz por 12 h, tratadas con oscuridad por 60 min y posteriormente retornadas a luz por 60 min. En este caso, tampoco se observó variación en el nivel de fosforilación en Thr de pp75 (fig. 17, carril 7).

Adicionalmente a pp75, en células adaptadas a periodos prolongados de luz, los anticuerpos anti-pThr detectaron otras proteínas con pesos moleculares de 39, 45, 47 y 85 kDa (fig. 17), sugiriendo estar fosforiladas en residuos de Thr. En células adaptadas a periodos prolongados de oscuridad los anticuerpos anti-pThr no las detectó (figs. 15A y 16, carriles 1), indicando el estado desfosforilado de las mismas. La transición de luz a oscuridad no generó algún cambio evidente en la desfosforilación en Thr sobre estas proteínas (fig. 17, carriles 3 y 4), y la transición de oscuridad a luz tampoco generó fosforilaciones inmediatas sobre estas proteínas (fig. 15A, carriles 1 y 2, y fig. 16 carriles 1 y 2).

4. Efecto de la luz en células *Symbiodinium* en simbiosis adaptadas a oscuridad

Estuvimos especialmente interesados en comprobar si el comportamiento de cambios en el nivel de fosforilación de pp75 en células recién asiladas del hospedero es igual al de las células KB8 en cultivo; esto es, cuando las medusas *C. xamachana* adaptadas a oscuridad son estimuladas con luz.

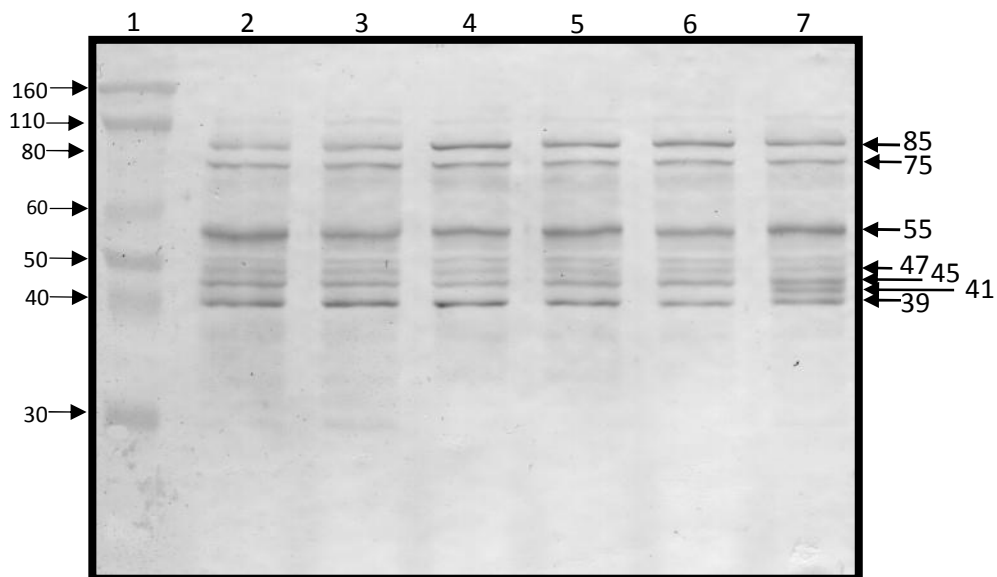


Figura 17. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en cultivos *in vitro* de KB8, adaptados a luz y retornados a oscuridad. En la figura el carril 1 son los pesos moleculares de referencia, carril 2 y 3 extracto de células adaptadas a 10 y 12 h de luz, respectivamente; carriles 4, 5 y 6 extractos de proteínas de células después de 12 h de luz y tratadas por 15, 30 y 60 min a oscuridad, respectivamente; carril 7: extractos de proteínas de las células tratadas por 60 min a la oscuridad (equivalentes a las analizadas en el carril 6) y analizadas después de 30 min de estímulo con luz. Las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares de los marcadores, y las de la derecha los pesos de las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-pThr en kDa.

El resultado del análisis con los anticuerpos anti-pThr en extractos de células recién aisladas de una medusa *C. xamachana* adaptadas a 12 h de oscuridad, demostró un bajo nivel de fosforilación de pp75 (fig. 18, carril 2), contrario al comportamiento observado en células en cultivo (fig. 18, carril 5). Esto sugiere que la medusa mantiene las Thr's desfosforiladas en ésta proteína en su simbionte bajo condiciones de 9 h de oscuridad y esto pudiera implicar la participación de la proteína en procesos simbióticos.

Cabe destacar que cuando la medusa adaptada a oscuridad es estimulada con luz, la pp75 de sus simbiontes aumenta ligeramente su nivel de fosforilación aparente en Thr (fig. 18, carril 3) en comparación con la que estaba bajo condiciones de oscuridad (fig. 18, carril 2). Este fue un resultado contrario al que ocurre en células en cultivo adaptadas a oscuridad (fig. 18, carril 5), que decrementan el nivel de fosforilación aparente de pp75 cuando son sometidas al estímulo de luz (fig. 18, carril 6).

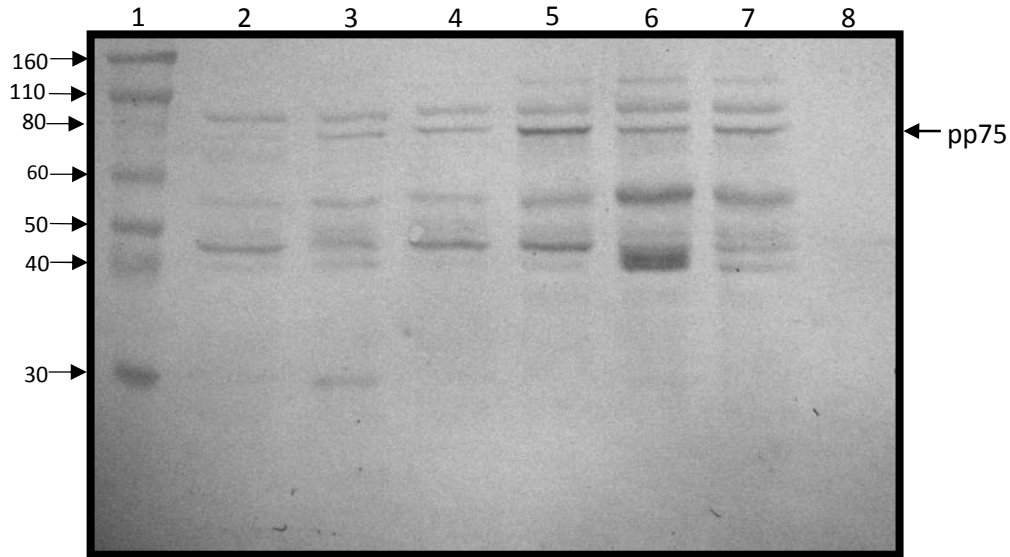


Figura 18. Inmunodetección de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr en simbioses recién aislados de *C. xamachana*, adaptadas a oscuridad y después de un estímulo de luz. Extractos de proteínas de *Symbiodinium* en simbiosis y en cultivo (como control), adaptadas a 9 h de oscuridad (carriles 2 y 5, respectivamente), estimuladas con 30 min de luz (carriles 3 y 6, respectivamente), o con 60 min de oscuridad después de luz (carriles 4 y 7, respectivamente), y extracto de proteínas del tejido de *C. xamachana* (carril 8). Las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares en kDa, y la de la derecha apunta a pp75

F. Análisis de fracciones membranales microsomales y solubilizadas diferencialmente. Posible localización subcelular de pp75

Se analizó la posible localización subcelular de pp75 y otras proteínas fosforiladas en Thr de células KB8 de cultivos *in vitro* por medio de Western blot con anticuerpos anti-pThr, sobre fracciones microsomales y fracciones extraídas de las mismas por diferentes agentes solubilizantes. La pp75 estuvo ausente de los microsomas bajo el criterio de inmunodetección (fig. 19, carril 1). Por el contrario, ésta se inmunodetectó de manera intensa en el sobrenadante de la fracción microsomal (fig. 19, carril 2). Como era de esperarse, los anticuerpos anti-pThr tampoco la inmunodetectaron en ninguna de las fracciones subsecuentes extraídas diferencialmente con los diferentes agentes solubilizantes (fig. 19, carriles 3-6).

Por el contrario, una proteína de Mr~ 110 kDa fosforilada en Thr, no fue detectada en el sobrenadante de la fracción microsomal (fig. 19, carril 2); sin embargo, fue detectada

claramente en los microsomas (fig. 19, carril 1). Adicionalmente, esta proteína se detectó en todas las fracciones extraídas subsecuentemente del precipitado microsomal con KCl, TX-100 y Na₂CO₃ (fig. 19, carriles 3, 4 y 5, respectivamente). Esta de resaltar que ésta se detectó de manera aún más intensa en el precipitado final extraída con buffer de Laemmli y calor (fig. 19, carril 6). Estos resultados sugieren que ésta es una proteína fosforilada en Thr que se encuentra íntimamente asociada a membranas poco solubles, probablemente asociada a estructuras de matriz interna, como núcleo o citoesqueleto resistentes a extracción por detergente.

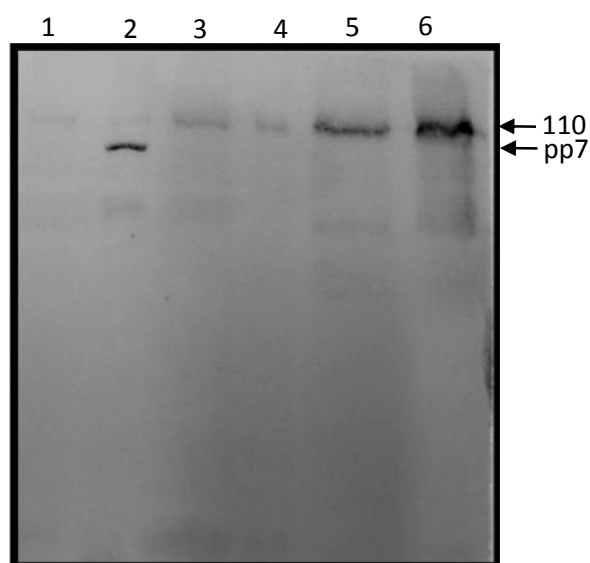


Figura 19. Análisis por Western blot con anticuerpos anti-pThr de fracciones obtenidas por solubilización diferencial de fracciones microsomales de KB8. La fracción microsomal (FM; carril 1); el sobrenadante de la FM (carril 2); proteínas de la FM solubles en 0.5 M KCl (carril 3); proteínas solubles extraídas subsecuentemente de la FM-KCl con 0.5% TX-100 (carril 4); proteínas de la extracción subsecuente de la FM-TX-100 con 0.1 M Na₂CO₃ (carril 5); proteínas extraídas de las FM- Na₂CO₃ con buffer Laemmli, presentes en el precipitado final (carril 6). Las flechas indican la pp75 y la proteína de 110kDa.

G. Aislamiento e identidad de pp75.

Se diseñó un método con la finalidad de aislar a pp75 en una banda sola en un gel de SDS-PAGE, para su secuenciación parcial de aminoácidos. Los extractos del sobrenadante de microsomas en PBS se disolvieron con siete volúmenes de PB, para alcanzar una concentración de 0.02 M NaCl. Después, la muestra se pasó por una columna

de DEAE-SEPHACEL la cual se eluyó con un gradiente lineal de 0.075 a 0.4 M de NaCl en PB y se colectó en 20 fracciones de 1ml. Se encontró que pp75 se pegó a la columna y fue eluída desde la fracción 5 hasta la 13 (fig. 20A, carriles 9-17) que equivalen a fuerzas iónicas de 0.15 y 0.28 M NaCl en PB, respectivamente. Posteriormente, éstas fracciones se unieron y disolvieron hasta alcanzar nuevamente la concentración inicial aproximada de 0.02 M de NaCl en PB, para pasarla por una columna de hidroxiapatita.

Después de pasar las muestras de proteínas eluídas de la columna de DEAE-SEPHACEL a través de la columna de Hidroxiapatita (HA), la solución de lavado de 0.05M fosfato fue capaz de eluir una parte de proteína (fig. 20B, carril 4). La columna de HA se eluyó con un gradiente lineal de fosfato de 0.05 a 0.2 M que se colectó en 20 fracciones de 1 ml. Se encontró que a pesar de cierta pérdida de la proteína en el lavado, ésta se pegó a la columna y se eluyó desde la primera fracción (fig. 20B, carril 5) hasta la séptima fracción (fig. 20, carril 11). Estas fracciones se unieron y analizaron en un gel teñido con plata, en el cual se observaron dos bandas aisladas cercanas al peso de 75 kDa (fig. 21A). Después del análisis por Western blot con los anticuerpos anti-pThr, se logró identificar cuál de las dos proteínas fue la correspondiente a pp75 (fig. 21B). Las bandas no fueron visibles cuando se tiñeron con azul de coomasie (BioSafe™, G-250); por ello, las muestras fueron concentradas a través de filtros de Centricon™ con corte molecular de 10 kDa. Las proteínas concentradas se corrieron en otro gel y se visualizaron claramente con azul de Coomasie (G-250). De esta forma, las bandas correspondiente a pp75, y otra de Mr~ 47 kDa (pp47) que también se detectó con los anticuerpos anti-pThr y también resultó aislada en el gel (fig. 21C), se cortaron por separado con una navaja limpia y estéril. El análisis por Western blot con anticuerpos anti-pThr, de las proteínas contenidas en las bandas cortadas del gel, confirmó que ambas eran pp75 y pp47 (fig. 21D).

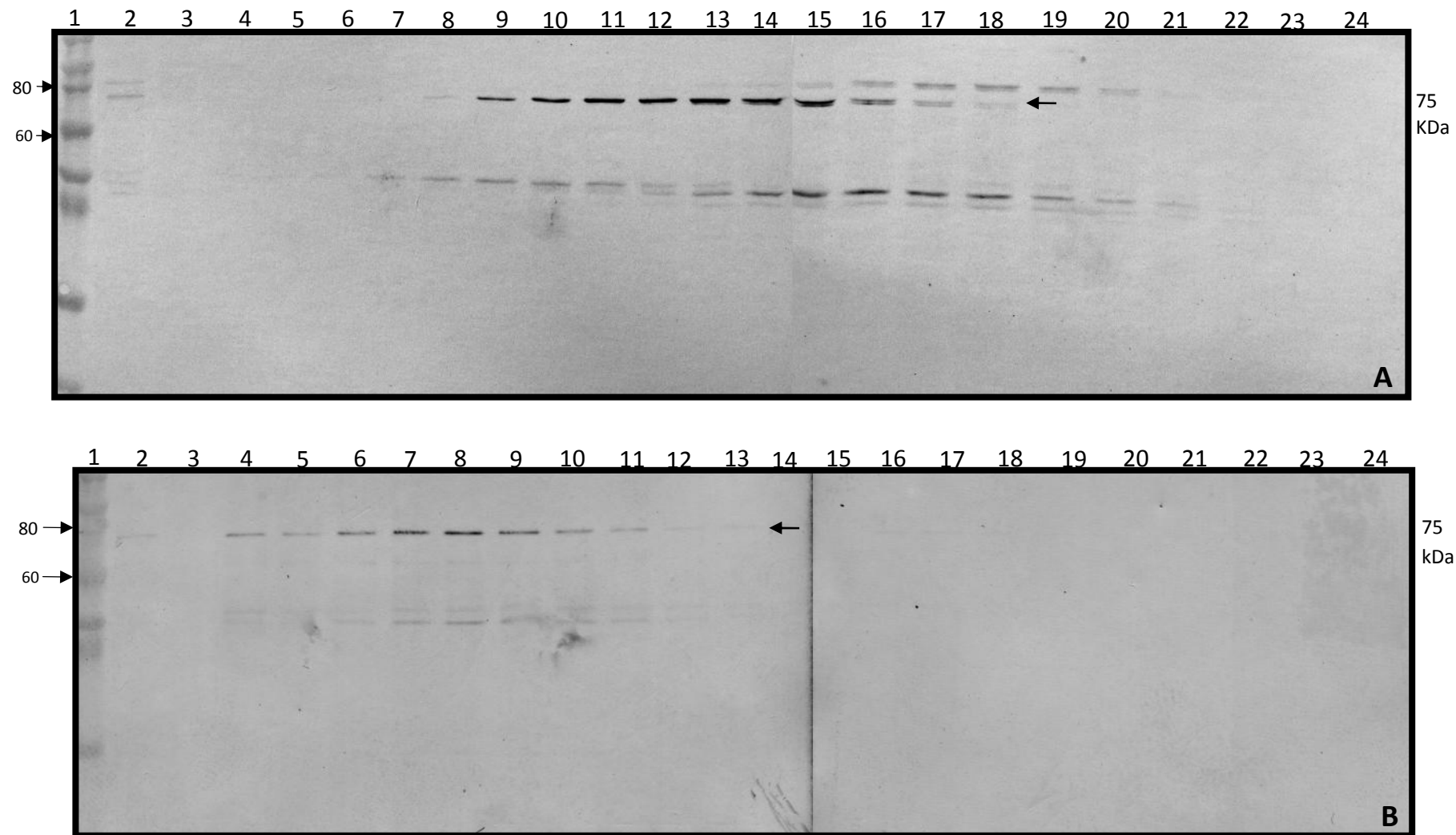


Figura 20. Análisis de las muestras obtenidas de las columnas de DEAE-SEPHACEL (A) y de hidroxiapatita (B) para inmunodetectar a pp75 con anticuerpos anti-pThr. Los carriles en A son: 1, marcadores de pesos moleculares; 2 y 3, extractos antes (sobrenadante de microsomas en PBS) y después de columna, respectivamente; 4, lavado de columna; y 5-24, las 20 fracciones eluidas de la columna. Los carriles en B son: 1, marcadores de pesos moleculares; 2, proteínas de antes de la columna de Hidroxiapatita (proteínas de las fracciones 5-13 eluidas en el ensayo de la columna de DEAE-SEPHACEL; 3, proteínas que no se unieron a la columna; 4, lavado de la columna; 5-24, fracciones eluidas de la columna. En las figuras las flechas internas indican las bandas correspondientes a pp75 y las flechas de la izquierda indican los pesos moleculares de referencia en kDa.

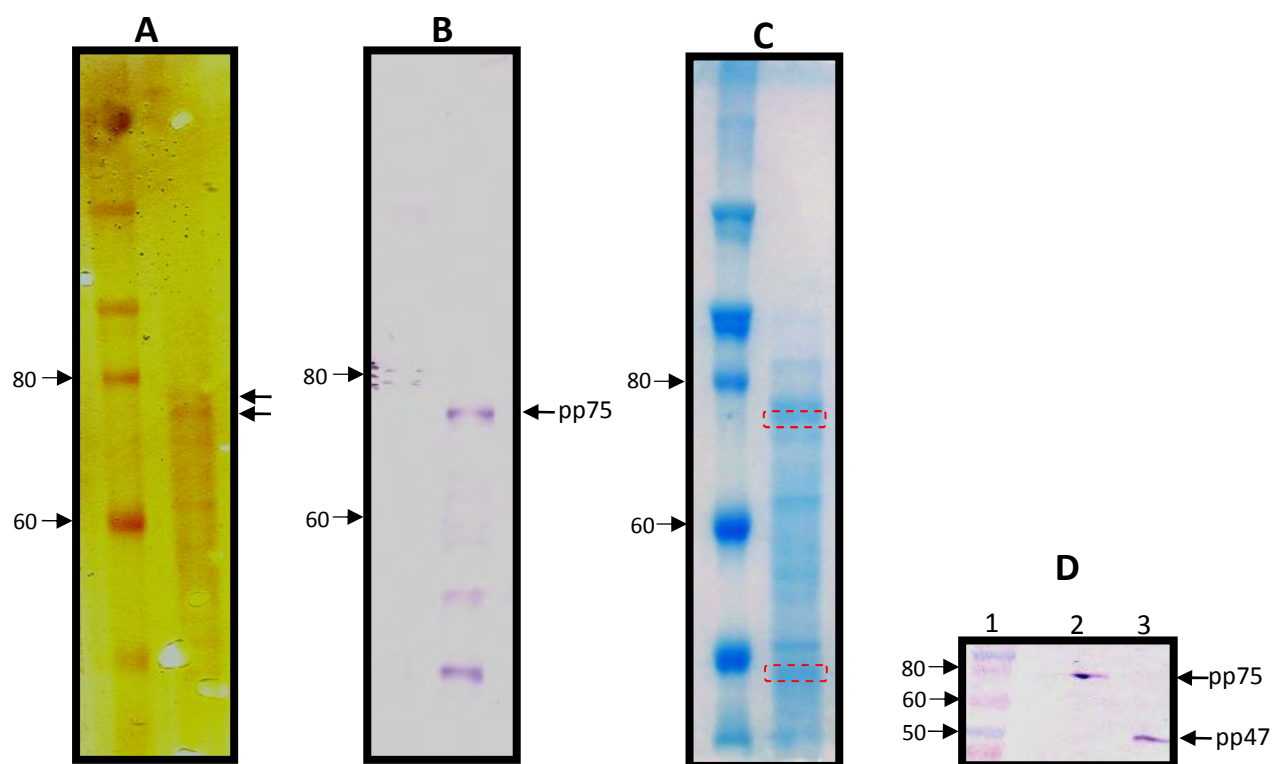


Figura 21. Aislamiento de pp75 en una banda libre de otras proteínas, en un gel de SDS-PAGE. En A, análisis de las fracciones 1-7 de la columna de hidroxiapatita en un gel teñido con plata; las flechas de la izquierda indican las bandas cercanas al peso de 75 kDa. En B, análisis de la misma muestra que en A con los anticuerpos anti-pThr. En C, análisis de la misma muestra que en A concentrada y teñida con azul de coomasie; las líneas discontinuas en rojo señalan la zona de corte del gel. En D, análisis por Western blot con anticuerpos anti-pThr de una parte de las bandas cortadas en C; carril 1 marcadores de pesos moleculares y carriles 2 y 3 proteínas puras de pp75 y 47 kDa, respectivamente.

De la banda aislada correspondiente a pp75 y secuenciada en un espectrómetro de masas, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de dos péptidos: INDKFEDIVPR y GVVDSIDLPLNVGR. El alineamiento de estos péptidos con el banco de secuencias de proteínas del NCBI arrojaron un alto porcentaje de identidad con proteínas de choque térmico (heat shock protein 90; HSP90) de *Thalassiosira pseudonana* y *Ectocarpus siliculosus* (fig. 22).

Péptidos derivados de pp75		INDKFEDIVPR	GVVDSIDLPLNVGR	
Hsp90 de <i>T. pseudonana</i>	398	INDKFEDIVPRWLNKLFV	GVVDSQDLPLNVSR	428
Hsp90 de <i>E. siliculosus</i>	430	INDKFEELLPRWLMFLR	GVVDSIDLPLNVGR	460
Hsp90 de <i>Symbiodinium</i> C3	347	IMDDCEELMPEWLN	FVKGVVDSIDLPLNISR	378

Figura 22. Alineamiento de secuencias parciales de dos péptidos de pp75 con las secuencias de aminoácidos de Hsp90 de *Thalassiosira pseudonana* (No. de acceso CM000640.1), *Ectocarpus siliculosus* (No de acceso CBJ27906), y *Symbiodinium* sp. C3 (No.de acceso DQ144978).

También se obtuvieron las secuencias de siete péptidos derivados de pp47: SASNKDDQLMKNEFESTYDKIVDSFDNMELPKDLLRGIYSYGFEEKPSAIQQR, GFDIIAQAQSGTGKTATFTGILSR, TIQVGLFSATMTDETLGITSK, KVDWLTSK, SSTHGDQK, DGILQAFRSGATRVLITDLLAR y AINFVTNSDVR. Los alineamientos de estos péptidos con el banco de secuencias de proteínas del NCBI demostraron una alta identidad con la enzima RNA helicasa, la cual tiene dominios característicos llamados DEAD/DEAH (fig. 23) por los aminoácidos que contiene. Sin embargo, no se encontraron estos dominios en los péptidos identificados provenientes de pp47, ni se hallaron secuencias completas que resultaran de alinear estos péptidos parciales en la base de datos de EST de KB8.

RNA helicasa	MSASNKDDQLMKNEFESTYDKIVDSFDNMELPKDLLRGIYSYGFEEKPSAIQQR
Péptidos de pp47	SASNKDDQLMKNEFESTYDKIVDSFDNMELPKDLLRGIYSYGFEEKPSAIQQR GFDIIAQAQS
RNA helicasa	GTGKTATFTVGILSRIDISVLKQCALIIAPTRELAQQIQKVVVLALGEYLHIKSYACIGGTKITDDIQALQ
Péptidos de pp47	GTGKTATFTVGILSR
RNA helicasa	SGVHVVGTPGRVFEMLSRGIINRDTIRIFCLDEADEMLSRGFKDQIYEIFRFLPKTIQVGLFSATMTDE
Péptidos de pp47	TIQVGLFSATMTDE
RNA helicasa	TLGITSKFMQNPVSIIVKDELTLLEGIRQFYVNVGVEQGFVLTDLYETLSITQSVIFCNTRRKVDWLT
Péptidos de pp47	TLGITSK KVDWLT
RNA helicasa	SKMTEQKFTVSSTHGDQKDRDGILQAFRSGATRVLITDLLARGIDVQQVSLVINFDLPTNIENYIHRIG
Péptidos de pp47	SK SSTHGDQK DGILQAFRSGATRVLITDLLAR
RNA helicasa	RSGRFGRKGVAINFITDAERGQIDELSRHYNTYIAEMPQDIGSFL
Péptidos de pp47	AINFVTNSDVR

Figura 23. Alineamiento de secuencias de péptidos derivados de pp47 kDa con las secuencias de aminoácidos de la enzima RNA helicasa que muestra los dominios DEAD/DEAH de *Dictyostelium discoideum* (No de acceso XP_645917).

El análisis con la base de datos de EST's de KB8 desarrollada en el laboratorio de la Dra. Mónica Medina en la Universidad de California, Merced, usando secuencias homólogas de HSP90, así como las secuencias de los péptidos identificados, revelaron siete secuencias completas de genes expresados correspondientes a proteínas tipo HSP90 en KB8. En la figura 24 denotados como SymHSP90-1 a -7.

Los siete miembros de la familia de HSP90 de KB8, guardan al menos 37% de identidad entre sus secuencias. Por otro lado, las secuencias comprendidas entre SymHSP90-1 a -4 tienen una mayor identidad; son al menos 99% idénticas entre ellas. Esto sugiere que ellas pueden ser funcionalmente redundantes (tabla 2).

	SymHSP90-1	SymHSP90-2	SymHSP90-3	SymHSP90-4	SymHSP90-5	SymHSP90-6	SymHSP90-7
SymHSP90-1	100	99	99	99	41	41	43
SymHSP90-2		100	99	99	41	41	43
SymHSP90-3			100	99	40	40	43
SymHSP90-4				100	41	41	43
SymHSP90-5					100	85	37
SymHSP90-6						100	39
SymHSP90-7							100

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las proteínas de la familia HSP90 de KB8.

Los dos péptidos parciales obtenidos de pp75 alinearon con las siete secuencias (fig. 24, sombreado en amarillo), y con un mayor porcentaje de identidad de 96% para ambas secuencias de SymHSP90-5 y -6, con un solo cambio de una isoleucina por una leucina. Esto indica que una de estas dos secuencias podría ser la secuencia de pp75.

La familia de las proteínas tipo HSP90 eucarióticas contienen 2 dominios altamente conservados: un dominio de unión a ATP en el lado N-terminal, y una región conectora rica en ácido glutámico. Estos dominios estuvieron presentes en algunas de las secuencias encontradas. El dominio de ATPasa estuvo presente en todos los miembros, y la región rica en ácido glutámico se encontró adyacente a este dominio (fig. 24), excepto en las secuencias de SymHSP90- 5 y -6, en donde una parte de esta región esta ausente. Por otro lado, las SymHSP90-5, -6 y -7, poseen una región altamente variable en el extremo amino-terminal. Este tipo de regiones son características de secuencias de péptidos señal para su transporte a diferentes organelos (fig. 24).

```

SymHSP90-1
SymHSP90-2
SymHSP90-4
SymHSP90-3
SymHSP90-7
SymHSP90-5      MRCLWQLAVIAAIGLAHGEEEEADKVVVDGFSNDRAKM 37
SymHSP90-6      MIPSRRQAQRGHSSPILRSLVGGFLVYFAGPAAFTILTSGRPSTLQSRGHRQFSLARR 58
SymHSP90-6      MAVKAGMADRRRTSSSLLTAVVFGLLASYLAPTAFSWLAKPAASGARGFRPRT-SL--R 56

SymHSP90-1      -----MAETFAFNADIQQLM SLI PPP INTFY SNKEIFLRRLISASALDKI 47
SymHSP90-2      -----MAETFAFNADIQQLM SLI --- INTFY SNKEIFLRRLISASALDKI 44
SymHSP90-4      -----MAETFAFNADIQQLM SLI --- INTFY SNKEIFLRRLISASALDKI 44
SymHSP90-3      -----MAETFAFNADIQQLM SLI --- INTFY SNKEIFLRRLISASALDKI 44
SymHSP90-7      AESS-----EKHEFQAEVNR LMDI I --- INSLYTDKQVFLRRLISAAALEKA 83
SymHSP90-5      AESAETATATEVADGEEFEFQAEVGRVMDI I --- INSLYSNKDVFLRRLVSAALACDKK 115
SymHSP90-6      AVEAATEVSTDAAE GEEFEFQAEVGRVMDI I --- VNSLYSNKDVFLRRLVSAALACDKK 113

```

-----Dominio ATPasa-----

SymHSP90-1 RYESITDPDKIEAQPNNFFIKIIPDKTNSTLTLEESLIGMTKNELINNLGTTAKSGTKAFM 107
 SymHSP90-2 RYESITDPDKIEAQPNNFFIKIIPDKTNSTLTLEESLIGMTKNELINNLGTTAKSGTKAFM 104
 SymHSP90-4 RYESITDPDKIEAQPNNFFIKIIPDKTNSTLTLEESLIGMTKNELINNLGTTAKSGTKAFM 104
 SymHSP90-3 RYESITDPDKIEAQPNNFFIKIIPDKTNSTLTLEESLIGMTKNELINNLGTTAKSGTKAFM 104
 SymHSP90-7 RFHVSQDESFLGDTKDLEVKIEHDADAKTISLITVGMISKADLNNLGTVAKSGTTFNVL 143
 SymHSP90-5 RFLALTESDAPPEPMKLRINT--NKDDRLLLLENNVGMNLKEELKENLGRARIASGTANFV 173
 SymHSP90-6 RFLALTESDAPPEPMKLQIKT--DKDARTLTLLENNVGMNLKAELEENLGRARIASGTANFV 171

-----Dominio ATPasa-----

SymHSP90-1 EAMAAGG-DISMIGQFVGVGFYSAYLVSDKVRVSKHNDDE-QYIWE--SGAGGSFTVQKD 163
 SymHSP90-2 EAMAAGG-DISMIGQFVGVGFYSAYLVSDKVRVSKHNDDE-QYIWE--SGAGGSFTVQKD 160
 SymHSP90-4 EAMAAGG-DISMIGQFVGVGFYSAYLVSDKVRVSKHNDDE-QYIWE--SGAGGSFTVQKD 160
 SymHSP90-3 EAMAAGG-DISMIGQFVGVGFYSAYLVSDKVRVSKHNDDE-QYIWE--SGAGGSFTVQKD 160
 SymHSP90-7 EAMAAGG-DANLIGQFVGVGFYSAYLVADKVSVTSKCNDDPVQHVWE--SSADASFVVD 200
 SymHSP90-5 KELGSGEADVSLIGQFVGVGFYSAYLVANQVDVYSKSFKKEEDGKIWKWSSSGSSYSIKEA 233
 SymHSP90-6 KDLGSGEADVSLIGQFVGVGFYSAYLVANKVEVYSKSFKKEEGEGKAHRWTSEGHSHYKLAEI 231

-----Región-----

SymHSP90-1 TELVHGEIKRGTKIICYLKEDQSEFLEERRLKDLVKKHSEFIGFPPIELYVEKSKEKEVTD 223
 SymHSP90-2 TELVHGEIKRGTKIICYLKEDQSEFLEERRLKDLVKKHSEFIGFPPIELYVEKSKEKEVTD 220
 SymHSP90-4 TELVHGEIKRGTKIICYLKEDQSEFLEERRLKDLVKKHSEFIGFPPIELYVEKSKEKEVTD 220
 SymHSP90-3 TELVHGEIKRGTKIICYLKEDQSEFLEERRLKDLVKKHSEFIGFPPIELYVEKSKEKEVTD 220
 SymHSP90-7 PRGNTLG--RGTRVTLHLKEDAHDYLSKDCLKESAKKYSQFIQFPIYVKVKEVDAAE-- 256
 SymHSP90-5 EETELFGEQSGTKIVLHLREEAQEYLDTGKLSDLLKKYSEFITFPPIELYNEKVQYDQVPD 293
 SymHSP90-6 DDGDFGEQSGTKIVLHLREEAQEYLDTGKLSDLLKKYSEFITFPPIELWNEKVQYDQVPD 291

rica en A. glutamico-----

SymHSP90-1 SEEEEEEKKKDEKEGDEPKIEEVDEEKEKEEKKKKTKKVKEVSHWEQLNKNKPLWMRKSE 283
 SymHSP90-2 SEEEEEEKKKDEKEGDEPKIEEVDEEKEKEEKKKKTKKVKEVSHWEQLNKNKPLWMRKSE 280
 SymHSP90-4 SEEEEEEKKKDEKEGDEPKIEEVDEEKEKEEKKKKTKKVKEVSHWEQLNKNKPLWMRKSE 280
 SymHSP90-3 SEEEEEEKKKDEKEGDEPKIEEVDEEKEKEEKKKKTKKVKEVSHWEQLNKNKPLWMRKSE 280
 SymHSP90-7 ----EEDDDDDDKDEEEKDDVETKDEEKEEEDKPKPKKTVFWEQVNTQKAIWLRAKE 312
 SymHSP90-5 ESAPP-----KEGEKQMKSVPRSVYEDDIMNKMKPIWLRNPD 332
 SymHSP90-6 ESAPP-----KEGEKQMKSVPRSVYEDVDMNKMKPIWLRNPD 330

SymHSP90-1 DVTNEEYASFYKSLSDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLF-ETKK-KRNN 341
 SymHSP90-2 DVTNEEYASFYKSLSDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLF-ESKK-KRNN 338
 SymHSP90-4 DVTNEEYASFYKSLSDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLF-ETKK-KRNN 338
 SymHSP90-3 DVTNEEYASFYKSLSDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLF-ETKK-KRNN 338
 SymHSP90-7 DVTEEEYNEFYKSLSDYLDPLAYTHFNAEGEIEFKSILFLPKKAPFDM-DNYWTKKSE 371
 SymHSP90-5 VVNESEYTEFYKTTFKAFDDPMTVTHFKVEGQIEFRALVFIPSTMPELTRDMFSPEGRA 392
 SymHSP90-6 VVNESEYTEFYKTTFKAFDEPLTTHFKVEGQIEFRALVFIPSTMPELTRDMFSPEGRA 390

SymHSP90-1 IKLYVRRVFIIMDDCEELMPEWLNFBKGVVDSDELPLNISRETLOQNKILRVIKKNLVKCC 401
 SymHSP90-2 IKLYVRRVFIIMDDCEELMPEWLNFBKGVVDSDELPLNISRETLOQNKILRVIKKNLVKCC 398
 SymHSP90-4 IKLYVRRVFIIMDDCEELMPEWLNFBKGVVDSDELPLNISRETLOQNKILRVIKKNLVKCC 398
 SymHSP90-3 IKLYVRRVFIIMDDCEELMPEWLNFBKGVVDSDELPLNISRETLOQNKILRVIKKNLVKCC 398
 SymHSP90-7 VKLFVRRVLVAEKFDDELLPRYLNFBKGVVDSDELPLNVSREQLQONKIMKVISKLLVRKV 431
 SymHSP90-5 MRLYVKRVFINDKFEDLVPRWLTFRGVVDSDELPLNVGREILQKSRTLKIIRKRVVRKV 452
 SymHSP90-6 MRLYVKRVFINDKFEDLVPRWLTFRGVVDSDELPLNVGREILQKSRTLKIIRKRVVRKV 450
 INDKFEDIVPR GVVDSDELPLNVGR

SymHSP90-1 LEMFAEIAEKKDDYK-----KFYEQFGKCLKLGVE 432
 SymHSP90-2 LEMFAEIAEKKDDYK-----KFYEQFGKCLKLGVE 429
 SymHSP90-4 LEMFAEIAEKKDDYK-----KFYEQFGKCLKLGVE 429
 SymHSP90-3 LEMFAEIAEKKDDYK-----KFYEQFGKCLKLGVE 429
 SymHSP90-7 LELMKKLAKDEESGGDDDEEKEDEEKEEKEEKKDEEGLWSKFWKEFNKNLKMGCYE 491
 SymHSP90-5 LDTIDDLRDKENPKFES-----FWTSYGKVFVGLVE 484
 SymHSP90-6 LDTIDDLREKEPTKFET-----FWTSYGKVFVGLVE 482

SymHSP90-1 DSTNRTKLAELLRYHTSKSGDEQISLKEYVDRMKEGQNDIYYITGESIAAVSSSPFLETL 492
 SymHSP90-2 DSTNRTKLAELLRYHTSKSGDEQISLKEYVDRMKEGQNDIYYITGESIAAVSSSPFLETL 489
 SymHSP90-4 DSTNRTKLAELLRYHTSKSGDEQISLKEYVDRMKEGQNDIYYITGESIAAVSSSPFLETL 489
 SymHSP90-3 DSTNRTKVAELLRYHTSKSGDEQISLKEYVDRMKEGQNDIFYITGESIAAVSSSPFLETL 489
 SymHSP90-7 DDSNRSKLSKLLRFFTTKSDGKEVSLDKYLDRMQESQESIYYMSGESLETMKKAPALQIF 551
 SymHSP90-5 DLDYKDELKRFVRFWSKSGDNQTSLEDEYISRMKEGQDKIYFVTGEGRRAAEIAPEMEKM 544
 SymHSP90-6 DLDYKDELKRFVRFWSKSGDNQTSLEDEYISRMKEGQDKIYFVTGEGRRAAEIAPEMEKM 542

SymHSP90-1 RKKGIEVLYMIDPVDEYSVQQLKEFDGKCLKSTTKEGLDI-EDEDEKKKLEEMKAEFEPL 551
 SymHSP90-2 RKKGIEVLYMIDPVDEYSVQQLKEFDGKCLKSTTKEGLDI-EDEDEKKKLEEMKAEFEPL 548
 SymHSP90-4 RKKGIEVLYMIDPVDEYSVQQLKEFDGKCLKSTTKEGLDI-EDEDEKKKLEEMKAEFEPL 548
 SymHSP90-3 RKKGIEVLYMIDPIDEYSVQQLKEFDGKCLKSTTKEGLDI-EDEDEKKKLEEMKAEFEPL 548
 SymHSP90-7 LKKDLEVLMLPDHLDEPCLQKLADYE GKKFVSIQKADVKLDETEDEKKKFNKIKDMYKPL 611
 SymHSP90-5 RLKDYEVLYMVDPLDEICQSIVDYDGKKLVDINKAGLDLEKSEDEKKEEMEETTKFEFEDL 604
 SymHSP90-6 REKDYEVLYMVDPLDEICQSIVDYDGKKLVDINKAGLDLDKSEDEKKEDEMDKVKVEYEDL 602

SymHSP90-1 TKLMKEVL-----GDKVEKVI VSSRMADSPCVLTTSEYGWSANMERIMKAQALR 600
 SymHSP90-2 TKLMKEVL-----GDKVEKVI VSSRMADSPCVLTTSEYGWSANMERIMKAQALR 597
 SymHSP90-4 TKLMKEVL-----GDKVEKVI VSSRMADSPCVLTTSEYGWSANMERIMKAQALR 597
 SymHSP90-3 TKLMKEVL-----GDKVEKVI VSSRMADSPCVLTTSEYGWSANMERIMKAQALR 597
 SymHSP90-7 TDWWKCLTDLTESGAMKEAGVKEKVEVSKRLTDSFVVVVTSSQFGYSAQQEKVMKSAQAFQ 671
 SymHSP90-5 ATWLKQQL-----GERVQKQVQISDRLVESPATLVQGEWGMSPMMQRYMKSQTTS 653
 SymHSP90-6 ATWLKQQL-----GERVQKQVQVSDRLVESMATLVQGEWGMSPMMQRYMKSQTTS 651

SymHSP90-1 DNSMTSYMVSKKT---MEVNPKHS IMAELKKKAAADKSDKTVKDLIWLFFDTSLLTSGFN 657
 SymHSP90-2 DNSMTSYMVSKKT---MEVNPKHS IMAELKKKAAADKSDKTVKDLIWLFFDTSLLTSGFN 654
 SymHSP90-4 DNSMTSYMVSKKT---MEVNPKHS IMAELKKKAAADKSDKTVKDLIWLFFDTSLLTSGFN 654
 SymHSP90-3 DNSMTSYMVSKKT---MEVNPKHS IMAELKKKAAADKSDKTVKDLIWLFFDTSLLTSGFN 654
 SymHSP90-7 NKEQLSMMAGRKT---LEVNPNHPIVDLLAKVKAASESDEAAAGTAEVLFQTALIESGFE 728
 SymHSP90-5 SASDSAFAI GSRNQAIL E INP SHNVVKALKNAYETKPD SVETEDMVMMIYETAALIGGYT 713
 SymHSP90-6 SASDSAFAI GSRNQAIL E INP QHNVIKALKNAMETQPEAAETEDMVMVYETAALIGGYT 711

SymHSP90-1 LDEPTQFAGRIHRMIKLGLSIDDDDEGLGDDDDLPPLLEEVEGADEASKMEEVD 711
 SymHSP90-2 LDEPTQFAGRIHRMIKLGLSIDDDDEGLGDDDDLPPLLEEVEGADEASKMEEVD 708
 SymHSP90-4 LDEPTQFAGRIHRMIKLGLSIDDDDEGLGDDDDLPPLLEEVEGADEASKMEEVD 708
 SymHSP90-3 LDEPTQFAGRIHRMIKLGLSIDDDDEGLGDDDDLPPLLEEVEGADEASKMEEVD 708
 SymHSP90-7 IADPSALVNHVYRLMSKELGVNPDAPLKEIEVPEEEEEAEAEEDKEEDDSEEDSKEDKEDL 788
 SymHSP90-5 IEDPGDFARVTKLMELQAE GEGAGTQDAEVVG 746
 SymHSP90-6 IEDPGDFAKRVTRLMEMQASEGTPGSVDAEVLA 744

Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias homólogas a HSP90 de *Symbiodinium* sp. KB8. En la figura las secuencias son denotadas como SymHSP90-1 a-7. Se muestran dos regiones conservadas: la de ATPasa y región cargada rica en ácido glutámico. Las regiones sombreadas: en amarillo son los motivos conservados que alinean con los péptidos parciales obtenidos de pp75; en gris un motivo carboxilo terminal típico de las HSP90 citosólicas; en rosado, un motivo conservado típico de las HSP90 de retículo endoplásmico; y en verde, posibles sitios de unión a ATP dentro del dominio de ATPasa.

Nuestros resultados indican que hemos identificado una proteína de 75 kDa que estuvo presente en al menos tres filotipos de *Symbiodinium* y fue susceptible de ser fosforilada aparentemente en residuos de Thr. Se observaron cambios en su nivel de

fosforilación aparente en respuesta a estímulos de luz y oscuridad, determinados por Western blot. Estos cambios se detectaron tanto en el organismo crecido *in vitro* como en su estadio endosimbionte dentro de su hospedero. La proteína fue aislada e identificada por secuencia parcial y análisis bioinformático, como una proteína tipo HSP90. Se encontraron siete secuencias diferentes y completas de la proteína en una base de datos de EST de KB8, de las cuales la más parecida sugiere que se trata de una proteína de cloroplasto por la presencia y secuencia de un péptido señal.

IX. DISCUSIÓN.

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium*, son microorganismos fotosintéticos que viven en forma libre en los mares, o estableciendo una relación simbiótica mutualista dentro de los tejidos de invertebrados marinos. Tanto en estas interacciones simbióticas, como en su ciclo de vida, requieren vías de transducción de señales con sus respectivos juegos de proteínas receptoras, adaptadoras y efectoras. Hay muy poca información en *Symbiodinium* respecto a las proteínas que participan en procesos de fosforilación claves para la transducción de señales. En este trabajo se identificaron varias de ellas que contienen aminoácidos fosforilados, algunas con variaciones en su grado de fosforilación que depende del crecimiento celular y/o de algunos estímulos externos. Se seleccionó una de estas proteínas con base en su presencia en tres filotipos de dinoflagelados fotosintéticos y a su clara respuesta a estímulos de luz/oscuridad, y a estímulos con un homogenado de tejido de la medusa *C. xamachana*. Esta proteína denominada aquí como pp75, por el tamaño de la molécula, se caracterizó e identificó como una proteína con similitud a HSP90 (“HSP90-like”) por secuencia parcial de aminoácidos. Su probable secuencia completa se obtuvo mediante una búsqueda de secuencias homólogas en una base de datos de EST de KB8. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de sus dominios característicos así como la presencia de firmas características de dicha secuencia.

A. Anticuerpos anti-fosfoaminoácidos son capaces de inmunodetectar proteínas fosforiladas en *Symbiodinium* spp.

Un criterio que tomamos como punto de partida fue el enfocarnos en las proteínas que se revelaron con señales claras y de manera expedita con el sustrato del anticuerpo secundario, ya que esto descartaría falsos positivos y podría indicar un estado de fosforilación incrementada en dichas proteínas. Con base en estos criterios se identificó una proteína de Mr~ 63 kDa detectada con anti-pSer (fig. 5, carriles 8 y 10), y otras de Mr's~ 30, 32 (fig. 7, carriles 5 y 7), 55, 75 y 110 kDa (fig. 7, carril 6), detectadas con anticuerpos anti-pThr.

Otro criterio importante para seleccionar alguna(s) proteína(s) y desarrollar su(s) caracterización(es), fue el que estuviera(n) presente(s) en más de un filotipo. Esto indicaría que se trataría de una proteína conservada, que además pudiera participar en procesos celulares comunes.

Después de un análisis con estos criterios, inicialmente resultaron candidatas interesantes para seleccionar para su subsecuente caracterización, una proteína de Mr~ 63 kDa fosforilada en residuo(s) de Ser, y tres proteínas de Mr~ 30, 32 y 75 kDa (pp75) fosforiladas en Thr. Sin embargo, se observó que en algunos casos los resultados no fueron reproducibles o resultaron artefactos no específicos. Por ejemplo, las proteínas de Mr's ~ 30 y 32 kDa, detectadas en un primer ensayo, en ensayos posteriores ya no se pudieron detectar en ninguno de los tres filotipos (fig. 8 A, B y C). De forma similar, la proteína de Mr~ 63 kDa detectada por anticuerpos anti-pSer arrojó resultados inconsistentes; primero fue detectada en *S. kawagutii* y Mf11 y en el ensayo llevado a cabo en diferentes días de crecimiento en cultivos *in vitro* estuvo presente en *S. kawagutii*, y aparentemente en KB8 a los 9 días, pero no en Mf11. Estas proteínas fueron descartadas debido a esta falta de reproducibilidad en su detección. Por otro lado, bandas falsos positivos surgieron durante el análisis de cambios en el patrón de fosforilación aparente de proteínas durante la proliferación de células de *Symbiodinium* en cultivo, donde también se detectaron dos proteínas de Mr's ~ 45 y 55 kDa con los anticuerpos anti-pSer y anti-pTyr, tanto en *S. kawagutti* como en Mf11 (figs. 9A y C, y 10A y C, carriles 3). Sin embargo, un análisis posterior por Western blot de los mismos extractos de 3, 9, y 15 días, incubados solamente con anticuerpos secundarios (anti-Conejo y anti-Ratón), revelaron la mismas bandas de Mr's~ 45 y 55 kDa en los tres filotipos, especialmente al dejarlas incubando por más de 2 h. Estos resultados indicaron que se trataban también de bandas falsos positivos (fig. complementaria 3). Adicionalmente, se detectaron falsos positivos de Mr~53 kDa en los tres filotipos ensayados y de Mr~35 kDa en *S. kawagutii* y Mf11 (fig. complementaria 3). Estas proteínas reveladas por incubación sólo con los anticuerpos secundarios, podrían ser lectinas que se hayan renaturalizado por la incubación prolongada y que son capaces de capturar a las inmunoglobulinas a través de las cadenas glicosídicas presentes en su región constante (Villanueva, 2002). Este problema se resolvió usando como sonda secundaria la proteína A acoplada a la fosfatasa alcalina, lo cual apoya la hipótesis anterior.

Finalmente, una proteína de Mr~75 kDa cumplió con todos los criterios definidos y se seleccionó para su caracterización y análisis posterior, y se le denominó pp75

B. La pp75 mostró una fosforilación diferencial aparente dependiente del grado de proliferación celular

La pp75 fue detectada de manera clara y reproducible con los anticuerpos anti-pThr, lo que sugiere que está fosforilada en residuos de Thr en los tres filotipos de *Symbiodinium*. En dos ensayos independientes de proliferación de *Symbiodinium* en cultivo, el grado aparente de fosforilación de pp75 se observó incrementado a partir de los 6 días de crecimiento en los tres filotipos de *Symbiodinium* (fig. 12 carriles 3, 7 y 11; y fig. 9A, B y C, carriles 3). Esto concuerda con el periodo en el cual los tres filotipos se encuentran en la fase exponencial de su crecimiento (figura complementaria 1). Ello también sugiere que la fosforilación en esta proteína participa de forma activa en eventos asociados a la proliferación celular que ocurre de manera acelerada durante dicha fase exponencial, y que probablemente participa en mecanismos de regulación durante esta fase. Más aún, dichos mecanismos pudieran ser comunes en al menos los tres filotipos de *Symbiodinium* analizados, si no es que en todo el género.

En posteriores ensayos encontramos que la luz provoca un efecto de desfosforilación drástica aparente sobre pp75 en la transición de oscuridad a luz. El nivel de fosforilación aparente, antes de dicha desfosforilación, se recupera en un lapso de 4 h bajo condiciones de luz y no hay variaciones posteriores, inclusive en la transición de luz a oscuridad. Debido al desconocimiento inicial de esta propiedad, en nuestros primeros ensayos no se prestó atención a este factor. Sin embargo, la extracción de proteínas para ensayar la fosforilación aparente durante la cinética de crecimiento se realizó después de que las células estuvieron expuestas entre 6 y 12 h de luz, tiempos en los cuales el efecto de la luz es mínimo o nulo. Por ello, la variación en el grado de fosforilación aparente de pp75 en estos ensayos sí fue un dato real dependiente de los diferentes días de crecimiento de los cultivos. Esto fue corroborado en estudios posteriores bajo condiciones controladas de luz que reprodujeron la fosforilación diferencial aparente de pp75, en función de la tasa de proliferación celular.

En otros organismos, se han reportado proteínas que son fosforiladas en residuos de Thr y que participan en eventos de transducción de señales durante la proliferación celular como las observadas en la vía de las MAP cinasas activadas por mitógenos en líneas celulares humanas (Maosong et al., 2005). En *Symbiodinium* no se han reportado proteínas que sean susceptibles a la fosforilación en Thr's o eventos de fosforilación asociados a proliferación celular. Debido a lo anterior, nuestro análisis hacia este tipo de proteínas representa un estudio pionero en proteínas que potencialmente participan en eventos de transducción de señales y que no han sido estudiadas hasta ahora en estos organismos fotosintéticos simbióticos. Por ello, toma gran relevancia el proceder a su caracterización bioquímica y funcional.

C. La pp75 no mostró una fosforilación diferencial aparente dependiente de estímulos químicos.

En el presente estudio, se buscó estimular las células de KB8 en cultivo, para promover cambios en la fosforilación y encontrar proteínas que pudieran estar participando en alguna vía metabólica. Sin embargo, ninguno de los aminoácidos glicina, arginina, glutamato, ni un hidrolizado de caseína provocaron cambios en el grado de fosforilación aparente en Thr de alguna otra proteína incluyendo a pp75 (fig. 13, carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente), con respecto al control no estimulado (fig. 13, carril 1). Esto sugiere que pp75 no participa en estas vías de captura y metabolismo de nutrientes. No obstante, una explicación alternativa es que bajo las condiciones del ensayo, los anticuerpos fueron incapaces de detectar a pp75 o cualquier otra proteína que sufre procesos de fosforilación diferencial en Thr en respuesta al metabolismo de nutrientes.

La secuencia de aminoácidos RGD (arg-gly-asp) es un motivo conservado en proteínas presentes en la matriz extracelular, a través del cual interaccionan con la mayoría de proteínas de la familia de las integrinas presentes en la superficie celular (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984). Estas integrinas participan como receptores de adhesión que promueven procesos de fosforilación (Kornberg et al., 1991). Cuando se trataron a las células KB8 con los tripéptidos RGD, no se detectaron cambios en la fosforilación aparente de pp75 o alguna otra proteína (fig. 13, carril 6), en comparación con el control sin estímulo (fig. 13,

carril 1). Esto sugiere que el tripéptido RGD no provoca cambios que estimulen vías de transducción de señales que afectan la fosforilación aparente de pp75. Alternativamente, es posible que los anticuerpos anti-pThr sean incapaces de detectar otras proteínas fosforiladas en Thr que se encuentren cascada abajo, aún cuando éstas hayan sido estimuladas por el tripéptido. En contraste, el tripéptido RAD (no activo, control negativo de RGD) provocó un ligero incremento en la fosforilación de pp75 y otra proteína de Mr~41 kDa (fig. 13, carril 7). Sin embargo, en ensayos posteriores se observó que ambas, pp75 y la proteína de Mr~ 41 kDa cambian su grado de fosforilación en respuesta a la transición de oscuridad a luz en KB8 (fig. 15A, carril 2) y estos ensayos se realizaron precisamente en este proceso de transición (ver metodología). Por lo tanto, las diferencias en la fosforilación aparente de pp75 no fueron debidas al estímulo del tripéptido RAD, sino el reflejo del efecto generado por la luz durante el proceso de extracción de proteínas en estos experimentos.

Se sabe que el Ca^{2+} es un regulador y segundo mensajero clave en muchos procesos de transducción de señales en todos los organismos. Por ello, tuvimos interés en determinar si este ión era capaz de provocar cambios en la fosforilación aparente de pp75. El aumento en la concentración de CaCl_2 en el medio de incubación no produjo alteraciones en el patrón de fosforilación aparente de pp75 (fig. 13, carril 8), ni cuando se secuestraron iones de Ca^{2+} con EGTA (fig. 13, carril 9), en comparación con el control (fig. 13, carril 1). Los niveles de iones de Ca^{2+} y su difusión a través de la membranas plasmáticas son firmemente regulados (Billker et al., 2009) y el uso de otros agentes que puedan alterar su concentración intracelular, tales como ionóforos, podrían ayudar a promover eventos de fosforilación dependientes de Ca^{2+} y abordar el estudio de vías de señalización en las que este podría participar en *Symbiodinium*.

D. La fosforilación diferencial aparente de pp75 fue influenciada fuertemente por cambios de luz y oscuridad.

Symbiodinium es un organismo que vive usualmente como endosimbionte en hospederos arrecifales. Debido a su naturaleza fotosintética, debe contar con mecanismos sensores finos para responder a las condiciones cambiantes de luz en el medio ambiente. Por ello, probamos condiciones cambiantes en el ambiente lumínico para determinar la

posible reacción de pp75 a estímulos de luz/oscuridad que evidenciarían su participación en vías de transducción de señales desencadenadas por dichos cambios en el entorno. Nuestros ensayos demostraron que el estímulo de luz desencadenó evento(s) de desfosforilación aparente sobre pp75 en células de *Symbiodinium* adaptadas a oscuridad (12h) al exponerlas a condiciones de luz por al menos 30 min. Por otro lado, las células adaptadas a luz, expuestas previamente al menos a una hora de oscuridad y posteriormente estimuladas con 30 min luz, no mostraron tal efecto de desfosforilación. Esto sugiere que la desfosforilación de pp75, está sujeta necesariamente a condiciones de adaptación prolongada a la oscuridad y que la fosforilación aparente de pp75 no responde al estímulo de oscuridad en células adaptadas a luz (12h). Esto sugiere que existe una sensibilidad muy fina al estímulo de luz y que, una vez que la célula ya ha respondido y adaptado a dicho estímulo, si es llevada a condiciones oscuras, es incapaz de una respuesta inmediata al menos durante un periodo de una hora de tratamiento con oscuridad. Esto también sugiere que pp75 pudiera estar dentro de una vía corriente abajo de algún sensor de luz para la regulación de su respuesta a las nuevas condiciones. Esto podría significar un mecanismo de respuesta a un posible estrés de luz, que luego es atenuada a medida que se adapta a la nueva condición de luz. Alternativamente, pudiera tratarse de algún mecanismo de disparo de nuevas rutas metabólicas que marcan que la luz ya está presente en el entorno y la fotosíntesis ya puede ser iniciada (ciclo circadiano), en donde existe una participación de pp75 corriente abajo de dicho estímulo.

Después del evento de desfosforilación sobre pp75, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, ocurre una re-fosforilación en la proteína, hasta casi el mismo nivel que tenía antes de la desfosforilación. A partir de ese punto, variaciones posteriores bajo condiciones constantes de luz u oscuridad, son sutiles o inexistentes. De acuerdo a estas observaciones, el estadio fosforilado de dicha proteína podría representar su estado inactivo, ya que este estadio es el predominante durante los dos tipos de entorno, y la desfosforilación aparente es la que ocurre de manera más expedita y evidente. Concordante con esto, se observó que la recuperación del nivel de fosforilación después de la desfosforilación se alcanza más rápidamente en la oscuridad (1h) que en la luz (4h).

Este efecto se observa en los tres filotipos de *Symbiodinium*, aunque el grado de desfosforilación fue diferente entre filotipos, entre la cuales, KB8 demostró sufrir cambios

más evidentes en la fosforilación diferencial aparente. Sin embargo, el hecho de que el fenómeno se detectó en los tres filotipos probados, demostró que no es una particularidad de solamente un filotipo, sino que probablemente se trata de una proteína que participa en algún mecanismo común para *Symbiodinium* spp.

Finalmente, existe la posibilidad que los cambios en la intensidad de la banda correspondiente a pp75 por efecto de la transición de oscuridad a luz, puedan deberse a cambios en el nivel de expresión de esta proteína, a la vez que se encontrara fosforilada de manera constante. Los análisis comparativos por Western blot con anticuerpos anti-pThr y anticuerpos dirigidos específicamente contra la región peptídica de pp75 serían útiles para analizar esta posibilidad.

E. Relación de pp75 con estadios simbióticos de *Symbiodinium*.

Los resultados anteriores de la respuesta de pp75 a estímulos de luz en células adaptadas a oscuridad, se obtuvieron usando cultivos *in vitro* de *Symbiodinium* y son de primera instancia, muy interesantes para continuar la determinación del papel que pp75 juega en las vías de señalización involucradas. Sin embargo, aún más interesante sería el averiguar si eventos similares ocurren en el estadio endosimbiótico. KB8 es un endosimbionte del clado A y es el predominante en la medusa *C. xamachana*, por lo que se repitieron los ensayos en los simbioses recién aislados de este hospedero. Se encontró que en simbioses recién aislados de la medusa *C. xamachana*, pp75 también es reconocida por los anticuerpos anti-pThr, sugiriendo que también se encuentra fosforilada en residuos de Thr durante este estadio (fig. 14, carril 1). Los análisis con el mismo anticuerpo sobre extractos de proteínas del tejido de la medusa libres de simbioses no revelaron bandas de proteína, por lo que se indicó que la presencia de pp75 en el endosimbionte no fue producto de la presencia de una proteína homóloga en el tejido de la medusa durante el aislamiento del simbiote y la subsecuente extracción de sus proteínas.

Además, los resultados también demostraron que la fosforilación aparente en Thr de pp75 de KB8 es influenciada por su hospedero. Por un lado, el tratamiento a células en cultivo de KB8 por 15 min con el homogenado del tejido de *C. xamachana* provocó una ligera desfosforilación sobre pp75 (fig. 14, carril 3), y este efecto fue mayor aún, después de

tratamientos similares con el homogenado por 30, 60 y 120 min (fig. 14, carriles 4, 5 y 6, respectivamente) en comparación con las células control no estimuladas (fig. 14, carril 2). Por otro lado, considerando que en células de *Symbiodinium* en cultivo adaptadas a oscuridad, pp75 se encontró con una fosforilación aparente relativamente alta, a la vez que la luz provocó su desfosforilación. Se analizó este mismo efecto sobre células KB8 *in hospite* a través de estímulos de luz sobre a la medusa. Sorprendentemente, en tres experimentos independientes se demostró que en el estadio endosimbiótico las células KB8 adaptadas a oscuridad dentro de su hospedero demostraron un nivel de fosforilación menor que en células *in vitro* bajo las mismas condiciones de oscuridad; la luz también provocó un efecto contrario en pp75, en células *in hospite* promovió su fosforilación y en aquellas *in vitro*, su desfosforilación. Estos datos demuestran que los estados de fosforilación sobre pp75 son influenciados por su hospedero, y esto podría deberse a que las condiciones del entorno de *Symbiodinium* en simbiosis. En este estado endosimbiótico *Symbiodinium* está expuesto a diversas señales generadas por el huésped, y las condiciones de luz recibidas son diferentes de manera importante.

F. Aislamiento, secuencia y localización subcelular de pp75.

La proteína pp75 demostró ser responsiva en su fosforilación aparente en Thr, a estímulos de luz. Aunque las respuestas fueron opuestas en dinoflagelados cultivados *in vitro* comparadas con las obtenidas *in hospite*, se observaron cambios claros y reproducibles en la fosforilación aparente en respuesta al estímulo. Por ello, tal como se esperaba, pp75 resultó ser una proteína de gran interés para identificar y caracterizar, para poder saber más sobre ella y entender de qué manera podría estar participando en las vías de señalización estimuladas por luz. Para ello se diseñó una estrategia de enriquecimiento y aislamiento en un gel de SDS-PAGE, donde se obtuvo finalmente la proteína como una banda aislada la cual se cortó y mandó a secuenciar. Adicionalmente, se pudo co-aislar otra proteína de Mr~47 kDa (pp47) que también se envió para secuenciar.

Las secuencias obtenidas correspondieron a una proteína tipo HSP90 (HSP90-like) para pp75, y a una RNA helicasa para pp47.

Se han identificado y caracterizado una cantidad importante de proteínas de la familia de HSP90 y todas ellas están involucradas en múltiples mecanismos de transducción de señales (Richter y Buchner, 2001). Debido a la disponibilidad de una base de datos de EST de secuencias de KB8 de la Dra. Mónica Medina (Bayer et al., 2012), se llevó a cabo una búsqueda de secuencias homologas de HSP90 y se obtuvieron siete secuencias completas. Este es el mismo número de genes identificados en el genoma de *Arabidopsis thaliana* que codifican para proteínas de la familia de HSP90 (Krishna y Gloor, 2001). Esto indica que existen varios isogenes que codifican a esta proteína en *S. sp.* KB8 y será muy importante conocer la manera en la que son regulados; sobre todo por el hecho de que la proteína es fosforilada en Thr en respuesta a estímulos de luz. Será muy interesante determinar si existen diferentes niveles de regulación, tanto a nivel génico (cambios en la transcripción), como proteico (modificaciones postraduccionales).

El alineamiento de los dos péptidos parciales obtenidos de pp75 indicaron que la secuencia completa de esta proteína podría corresponder a la secuencias de SymHSP90-5 o 6; ambos péptidos alinean con una identidad de 96% en ambas secuencias, excepto por una isoleucina presente en uno de los péptidos en lugar de leucina (fig. 24). Por otro lado, pudieran ser que la secuencia es idéntica y se trate de un error en la asignación de los aminoácidos obtenidos durante la secuenciación *de novo*; el intercambio de estos aminoácidos es un error común en las secuencias obtenidas por este método (Han et al., 2005). Las SymHSP90-5 y 6, demostraron una identidad (85%) más cercana entre ellas que con los otros miembros de la familia y ambas proteínas carecen de la región cargada rica en ácido glutámico; esta región ha estado implicada en la formación de complejos receptores de esteroides con las HSP90 (Cadepond et al., 1994).

La familia de proteínas de HSP90 representa una clase de chaperonas abundante y altamente conservada. Su miembros se encuentran en la mayoría de las bacterias y en células eucariotas, en el citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y cloroplastos (revisado en Young et al., 2001). Entre las secuencias encontradas, las de SymHSP90-5 y 6 no contienen los péptidos C-terminal MEEVD, ni el KEDL, que aseguran la retención y localización de las HSP90 eucariotas en citoplasma y retículo endoplásmico, respectivamente (Krishna y Glor, 2001). Por otro lado, las secuencias de SymHSP90-5 y 6 arrojaron un 43 y 42% de identidad, respectivamente, con la HSP90 específica de

cloroplasto de *A. thaliana* (*AtHSP90-5*). Además, la HSP90 de mitocondria de *A. thaliana* (*AtHSP90-6*; Krishna y Gloor, 2001) arrojó una mayor identidad con SymHSP90-6 que con SymHSP90-5. Adicionalmente, ambas secuencias contienen en su amino terminal regiones con muy baja identidad entre ellas, que por lo regular son péptidos de tránsito para su transporte específico hacia diferentes organelos (fig 24). Los análisis con los programas de algoritmos ChloroP y TargetP (Emanuelsson et al., 2000), que predicen la localización subcelular en función de las secuencias de estos presuntos péptidos de tránsito, resultaron en la asignación de SymHSP90-5 como una proteína de cloroplasto, y SymHSP90-6 como una de mitocondria. En conjunto, estos datos sugieren que SymHSP90-5 y 6 pudieran estar localizadas en cloroplastos y mitocondria, respectivamente, aunque estos datos tendrían que ser corroborados experimentalmente.

El hecho de que pp75 responde a estímulos de luz, es consistente con una posible localización en cloroplastos. Las HSP90 de cloroplastos se han reportado localizadas en la parte hidrosoluble, como el estroma, o interaccionando con proteínas intramembranales; por ejemplo, la *AtHSP90-5* de la mutante *cr88* de *A. thaliana* demostró una localización en estroma (Cao et al., 2003), y HSP90C de *C. reinhardtii* está localizada tanto en el estroma como en la membrana tilacoidal (Willmund et al., 2005). Finalmente, en las cianobacterias, que son organismos precursores de los cloroplastos en los eucariontes, la HtpG (homólogo de HSP90 en procariontes), se ha encontrado en extractos de membranas, sugiriendo una interacción periférica a través de otras proteínas membranales (Watanabe et al., 2007). En nuestro análisis de fraccionado y solubilización diferencial de membranas, los anticuerpos anti-pThr, detectaron a pp75 en el sobrenadante soluble de la fracción microsomal (fig.19, carril 2), pero no en microsomas de membranas (fig.19, carril 1) ni en ninguna de las extracciones subsecuentes (fig. 19, carriles 3-6). Por lo tanto, pp75 podría estar localizada en el estroma del cloroplasto. Debido a que la fosforilación puede promover cambios de relocalización de proteínas en la célula, existe la posibilidad de que en el estado no fosforilado, pp75 pueda estar interaccionando débil y superficialmente con proteínas intrínsecas de membrana, de las cuales se disocia durante el proceso de fraccionado microsomal, y por ello, los anticuerpos anti-pThr no la detectan. La aplicación de ensayos con extractos de proteínas de cloroplastos aislados de *Symbiodinium* spp. y análisis con anticuerpos específicos dirigidos hacia la región peptídica de esta proteína en estudios de

fraccionado subcelular e inmunofluorescencia, ayudarían a confirmar la localización subcelular precisa de pp75.

Tomando todos los datos en conjunto, sería lógico suponer que SymHSP90-5, podría ser la misma pp75 de KB8, responsiva en su fosforilación aparente en Thr a cambios de luz y oscuridad, con una posible localización en el estroma de cloroplastos.

G. Vía posible en la que pudiera participar pp75/HSP90 en *Symbiodinium* spp.

La HSP90 es una chaperona esencial, presente en todas las células eucarióticas. Está implicada en el plegamiento o maduración de un conjunto de proteínas sustrato, llamadas convencionalmente “clientes” de HSP90. Se cree que las clientes de HSP90 interactúan con esta chaperona en un estado casi nativo en la etapa final de plegamiento de su síntesis *de novo* (Buchner, 1999); Aunque aún no ha sido identificada una secuencia o estructura común en proteínas clientes de HSP90, muchos de ellos se han catalogado dentro de dos clases funcionales: factores de transcripción (Pratt et al., 2004) y proteínas cinasas (Sreedhar et al., 2004). Estas observaciones sugieren la participación de HSP90 en la modulación de vías de señalización. Por lo tanto, la HSP90 es considerada particularmente importante para control del ciclo celular, desarrollo del organismo, y en respuestas a estrés del entorno (Terasawa, 2005). La forma funcionalmente activa de HSP90 es como dímero, y la dimerización ocurre a través de aproximadamente 190 aminoácidos de la región carboxilo terminal.

El nivel de fosforilación aparente de pp75/HSP90 responde a estímulos de luz. Una relación directa entre la luz y la HSP90 se encontró en estudios realizados con la mutante *ch88* de *A. thaliana*. En ella, se encontraron diversas variaciones genotípicas y fenotípicas: exhibió una expresión reducida de genes inducibles por luz que incluyen, proteínas de unión a clorofila a/b (CAB), la subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (RBCS) y nitrato reductasa 2 (NR2); por otro lado, presentó una apariencia amarillo-verdosa debido a desarrollo retardado de sus cloroplastos (Ling y Cheng, 1997). Esta mutante demostró contener un punto de mutación en el lado carbono terminal de una HSP90 específica para estroma de cloroplasto que impide su correcta dimerización, y en

consecuencia, una aberración en su función (Cao et al., 2003). Los autores concluyeron que HSP90 (CH88) de cloroplasto puede estar involucrada en la transducción de una señal de luz responsable de la regulación de un set de genes relacionados a la fotosíntesis y/o desarrollo de cloroplastos. En este mismo contexto pp75 podría estar llevando a cabo un papel similar en KB8 en el desarrollo de cloroplastos. Esto concuerda con nuestras observaciones del nivel de fosforilación aparente incrementando en las etapas de mayor proliferación de *Symbiodinium*, en las cuales ocurre una división constante de cloroplastos.

Además, se ha demostrado que intermediarios de la biosíntesis de clorofila participan como moléculas de señalización para la inducción de genes del núcleo (Woodson, 2008). HtpG, el homólogo de HSP90 en Cianobacteria, controla la biosíntesis de clorofila regulando la actividad de la enzima uroporfirinogeno descarboxilasa (la proteína HemE) y este puede ser también el mecanismo por el cual los cloroplastos controlan la inducción de genes del núcleo dependiente de la luz.

La HSP90 de cloroplastos es expresada constitutivamente y es moderadamente inducida por estrés de calor y luz (Cao et al., 2003). Se ha visto que las proteínas de la familia de las HSP90 exhiben diferentes niveles de regulación que incluyen: a) asociaciones con co-chaperonas específicas (Wandinger et al., 2008); y b) modificaciones postraduccionales (Retzlaff et al., 2009). Hasta el momento, no se ha logrado identificar co-chaperonas de HSP90 de cloroplasto, por lo cual posiblemente el segundo escenario de un mecanismo de regulación de HSP90/pp75 a través de fosforilación/desfosforilación, es el que podría estar ocurriendo en *Symbiodinium* spp.

Interesantemente, en levaduras se ha encontrado que la fosfatasa Ppt1 desfosforila específicamente a una HSP90 del citoplasma (Vaughan et al., 2008). La ausencia de Ppt1 reflejó en un decremento en la activación de proteínas cliente en vivo (Wandinger et al., 2006), lo que sugirió que el estado fosforilado de HSP90 reduce su función de chaperona y la desfosforilación a través de Ppt1 la activa (fig. 25). Ahora se sabe que la fosforilación de HSP90 permite una regulación del ciclo conformacional a diferentes pasos, centrándose en los sitios de conmutación para la comunicación de las regiones remotas dentro de la HSP90 (Soroka et al., 2011).

Entonces, un posible escenario sería el que pp75 podría estar participando en un mecanismo de transducción de señal retrógrada desde el cloroplasto como respuesta a estímulos de luz, en procesos que involucran división y/o maduración de cloroplastos y/o en la activación de genes dependientes de luz en el núcleo, necesarios para la fotosíntesis. La desfosforilación en Thr de pp75 ocurre en los minutos subsiguientes (30 min) a la exposición a la luz, y esto debe ser a través de alguna fosfatasa, como es el caso de la Ppt1 que desfosforila a HSP90 en la levadura. Esta desfosforilación que podría resultar en su activación para su interacción con alguna o varias moléculas señal cascada abajo o para la activación de genes específicos en el núcleo, a fin de contener con las nuevas condiciones de luz. Después de la adaptación de *Symbiodinium* a las nuevas condiciones, pp75 activa (desfosforilada) ya no es requerida, y sería nuevamente fosforilada para inactivarla.

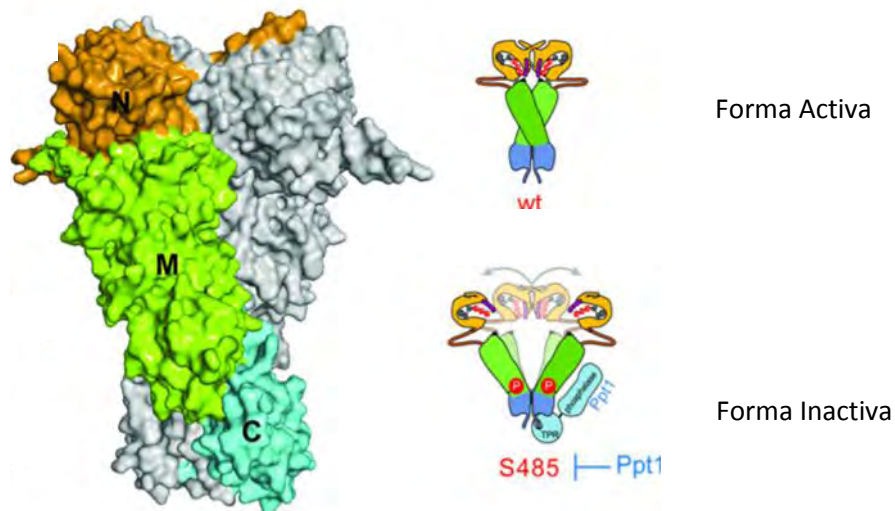


Figura 25. Efecto de la fosforilación/desfosforilación sobre HSP90. Los sitios de fosforilación están localizados en los dominios carboxilo terminal (Ser485 y Ser604). La fosforilación afecta varios aspectos del ciclo conformacional que incluyen la formación del sitio activo, la flexibilidad conformacional y principalmente en la interacción entre subunidades para la formación del dímero. El fosfogrupo Ser485 es específicamente desfosforilado por la fosfatasa Ppt1. En la figura se demuestra la estructura cristalográfica de la conformación dimérica y la forma activa e inactiva de HSP90; N representa el dominio amino-terminal, M, el dominio medio, y C el dominio carboxilo-terminal (figura tomada de Soroka y Buchner, 2012).

X. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que si existe procesos de fosforilación/desfosforilación durante la proliferación celular y que la luz es un factor que desencadena dichos procesos en *Symbiodinium* spp.

Una proteína de Mr~ 75 kDa (pp75), fue inmunodectada de forma clara y reproducible, y estuvo presente en los tres filotipos de *Symbiodinium*.

Esta proteína:

- 1) Está fosforilada en residuo(s) de Thr.
- 2) Incrementa su grado de fosforilación en etapas de alta proliferación celular.
- 3) Responde a estímulos de luz; es desfosforilada de forma drástica minutos después de la exposición del cultivo a luz y esto sólo ocurren cuando las células están adaptadas a fotoperiodos de oscuridad.
- 4) Tuvo comportamientos similares de fosforilación en respuesta a estímulos de luz y en función de la proliferación celular en cultivo, entre los tres filotipos de *Symbiodinium* analizados.
- 5) Varió en su estado fosforilado cuando se analizó en *Symbiodinium* en estado endosimbiótico, sugiriendo que es influenciada por su hospedero.
- 6) Se identificó como una proteína tipo HSP90 perteneciente a la familia de las HSP90.

XI. PERSPECTIVAS

El hecho de que pp75 esté presente en *Symbiodinium* KB8 nos proporciona una ventaja enorme para su caracterización funcional debido a que este es el simbiote natural y específico de la medusa *C. xamachana*. Esta medusa se puede cultivar asexualmente *in vitro* y su metamorfosis puede ser inducida por la infección con este simbiote. Esto nos proporciona de un modelo ideal para darle seguimiento a la expresión y cambios en la fosforilación de esta proteína durante el proceso de infección, metamorfosis y establecimiento de la simbiosis.

La búsqueda de ligandos que se acomplejen a esta proteína, así como la(s) cinasa(s) responsable(s) de fosforilarla, nos darán claves importantes para conocer las vías en la que participa. En este trabajo se encontraron proteínas fosforiladas en Thr que aparentemente co-purificaron con pp75 durante su fraccionado en columnas, lo que sugiere que este también podría ser el caso para esta proteína. En este sentido se pueden implementar ensayos de doble híbrido de levadura, expresarla para purificarla e inmovilizarla en columnas de afinidad para secuestrar sus posibles ligandos, y/o preparar anticuerpos específicos para inmunoprecipitaciones. Alternativamente, se pueden probar anticuerpos heterólogos para esto último.

La caracterización funcional de esta proteína nos dará información fundamental para los procesos de transducción de señales requeridos durante la fisiología normal del crecimiento de *Symbiodinium* spp., y en procesos inherentes a la simbiosis.

XII. FIGURAS COMPLEMENTARIAS

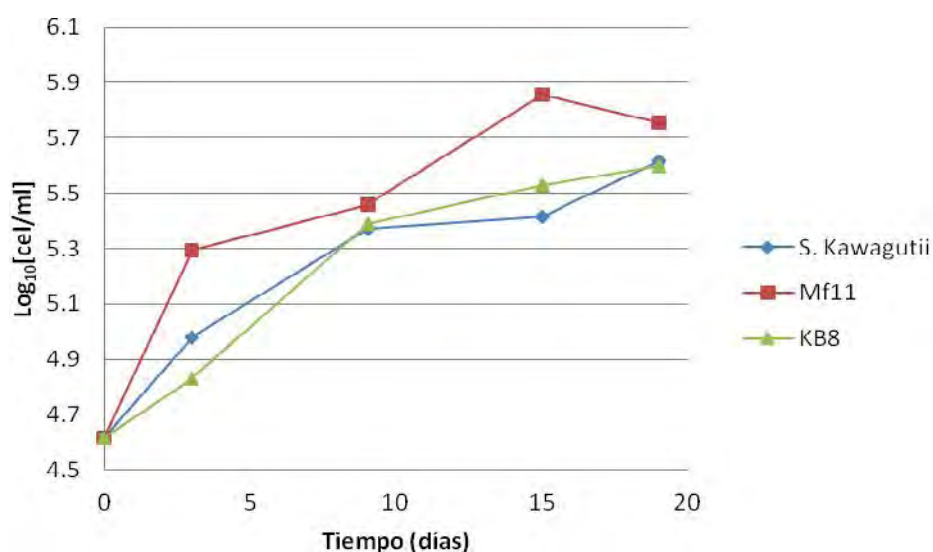


Figura complementaria 1: Gráfica que muestra las concentraciones celulares de los tres filotipos de *Symbiodinium* durante los días de crecimiento en los cuales se realizó extracción de proteínas.

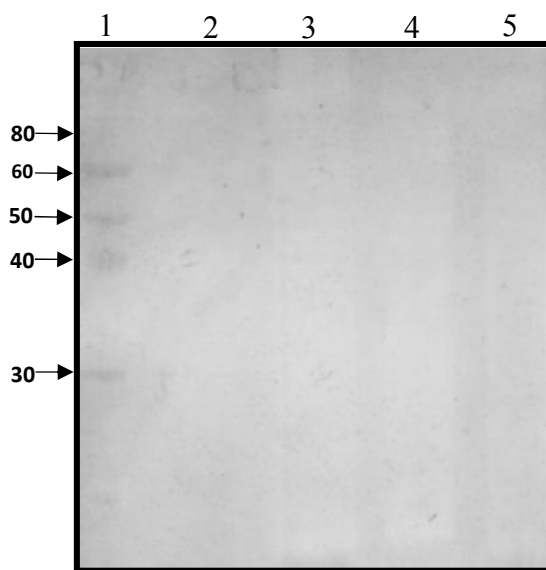


Figura complementaria 2. Ensayo de detección de proteínas con anticuerpos anti-ptyr en extractos de la línea celular a-431 y los tres filotipos de *symbidinium*. Marcadores de pesos moleculares en kDa (carril 1), extracto de proteínas de células epidérmicas de humano estimuladas con factor de crecimiento epidérmico (A-431+EGF, Santa Cruz Biotechnology ;carril 2) como control positivo y extractos de proteínas de *Symbiodium kawugutii*, KB8 y Mf11 (carriles 3, 4 y 5. respectivamente). Como sonda secundaria en este ensavo se usó la proteína A-AP.

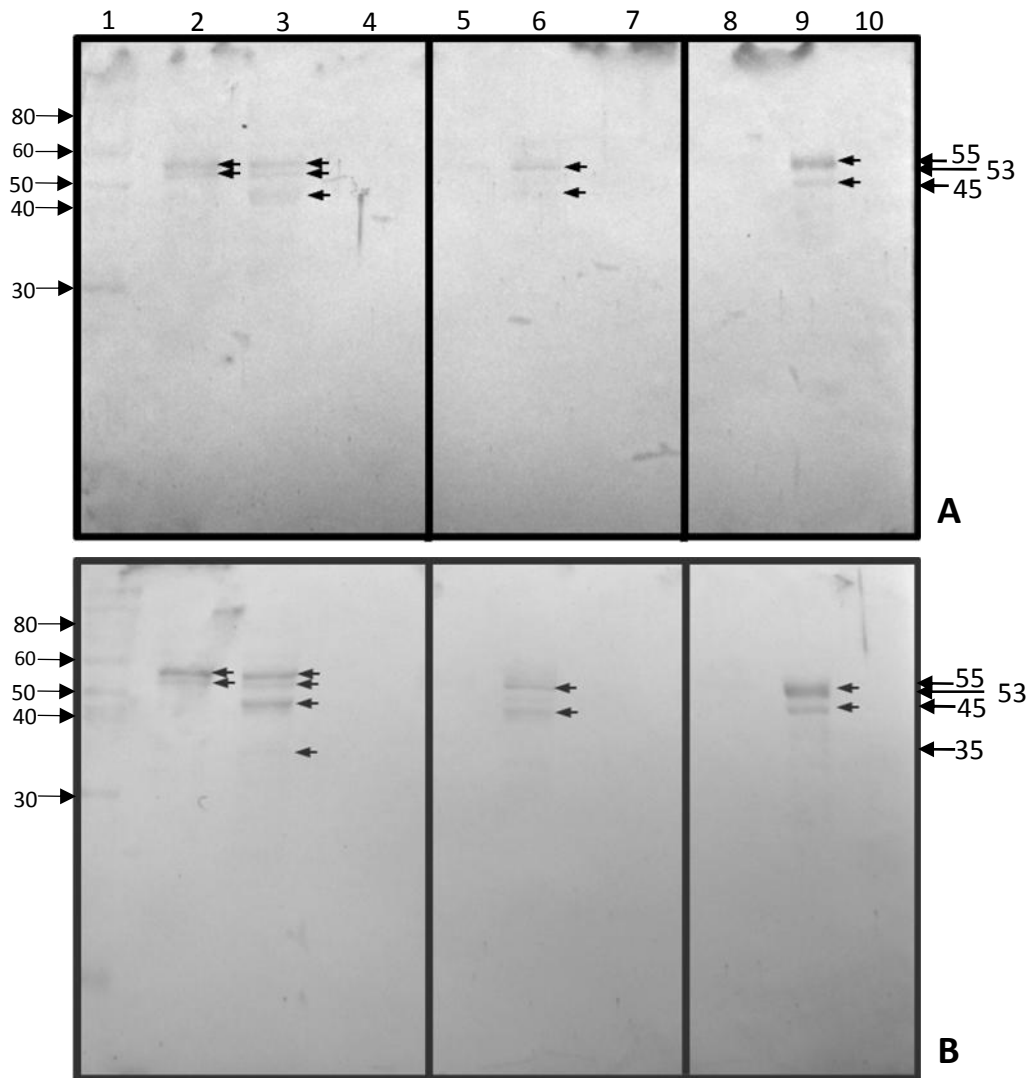


Figura complementaria 3. Falsos positivos. Análisis por Western blot de las extracciones de proteínas de *Symbiodinium* spp. en los días 3, 9 y 15 e incubando las membranas sólo con los anticuerpos secundarios anti-Conejo (panel A) y anti-Ratón (panel B). Proteínas de *S. kawagutii* (carriles 2-4), *S. sp. KB8* (carriles 5-7) y *S. sp. Mf11* (carriles 8-10). Se demuestra que las mismas proteínas son detectadas por los anticuerpos secundarios, lo que indica que todas las bandas inmunoteñidas son falsos positivos. Las flechas de la derecha indican las proteínas falsos positivos y las flechas de la izquierda las bandas de pesos moleculares de referencia.

XIII. REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. Molecular biology of the cell, 3rd ed. 1294 pp, (1994).
- Baker AC. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 661-689 (2003).
- Banaszak, AT, Iglesias-Prieto R y Trench RK. *Scrippsiella velellae* sp. nov. (Peridinales) and *Gloeodinium viscum* sp. nov. (Phytodinales), dinoflagellate symbionts of two hydrozoans (Cnidaria). *J. Phycol.* 29: 517-528 (1993).
- Bayer T, Aranda M, Sunagawa S, Yum LK, DeSalvo MK. Symbiodinium Transcriptomes: Genome Insights into the Dinoflagellate Symbionts of Reef-Building Corals. *PLoS ONE* 7(4), (2012).
- Billker O, Lourido S y Sibley LD. Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. *Cell Host Microbe*, 5:612–622 (2009)
- Brown NR, Noble ME, Endicott JA y Johnson LN. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cclin-dependent kinases. *Nature Cell Biol.* 1, 438–443 (1999).
- Buchberger A, Bakau B y Gething MJ (Ed.). *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-folding Catalysts*, Oxford University Press, Oxford, UK, p. 147 (1997).
- Buchner J. Hsp90 & Co-A holding for folding. *Trends Biochem Sci*, 24(4):136-141 (1999).
- Cadepond F, Jibard N, Binart N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I y Baulieu E-E. Selective deletions in the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) impede heterooligomeric complex formation with the glucocorticosteroid receptor (GR) or hormone binding by GR. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 48: 361–367 (1994).
- Campbell I y Humphries M. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi:10.1101/cshperspect.a004994 (2010).
- Cao D, Froehlich JE, Zhang H y Cheng CL. The *chlorate-resistant* and photomorphogenesis-defective mutant *cr88* encodes a chloroplast-targeted HSP90. *Plant J*, 33:10718 (2003).
- Cohen P. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci.*, 22, 245-51 (1997).

- Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation -a 25 year update. Trends Biochem. Sci. 25, 596–601 (2000).
- Dann SG y Thomas G. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. FEBS Lett. 580, 2821–2829 (2006).
- Darnell J, Lodish H y Baltimore D. *Molecular cell biology*, 1105 pp, (1995).
- Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD y Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90, p60, hsp70 foldosome complex. J Biol Chem, 273 (1998).
- Douglas AE. Symbiotic Interactions. Oxford Science Publications (1994).
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S y von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol 300: 1005–1016 (2000).
- Freudenthal HD. Symbiodinium gen. Nov. *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: Taxonomy, life cycle, and morphology. J Protozool 9:45-52 (1962).
- Gates R, Hoegh-Guldberg O, McFall-Nga MJ, Bil KY y Muscatine L. Freeamino acids exhibit anthozoan “host factor” activity: They induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates *in vitro*. Proc & atl Acad Sci USA. 92:7430-7434 (1995).
- Graves JD y Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. Pharmacol. Ther. 82, 111-21 (1999).
- Gyula P, Schafer E y Nagy F. Light perception and signalling in higher plants. Curr. Opin. Plant Biol, 6: 446–452 (2003).
- Han Y, Ma B y Zhang K. SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error. JBCB 3:697-716 (2005).
- Hanks SK y Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. 9, 576–596 (1995).
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K y Deng XW. HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. EMBO J, 19:4997-5006 (2000).
- Herzig S y Neumann J. Effects of serine/treonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. Physiol. Rev. 80, 173-210 (2000).

- Hirose M, Kinzie RA y Hidaka M. Early development of Zooxanthella-containing eggs of the corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* with special reference to the distribution of Zooxanthellae. *Biol. Bull.* 199, 68-75 (2000).
- Hoegh-Guldberg O. Coral reefs in a century of rapid environmental change. *Symbiosis* 37, 1–31, (2004).
- Holt LJ, Tuch BB, Villen J, Johnson AD, Gygi SP y Morgan DO. Global analysis of cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, vol. 325, no. 5948, pp. 1682–1686 (2009).
- Islas-Flores T, Guillén G, Islas-Flores I, San Román-Roque C, Sánchez F, Loza-Tavera H, Bearer E y Villanueva M. Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 137(3), 264-280 (2009).
- Jeffrey AU y James EF Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 530-541 (2007).
- Jimbo M, Yanohara T, Koike K, Sakai R, Muramoto K y Kamiya H. The d- lactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 125, 227-236 (2000).
- Johnson LN y Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* 101, 2209-2242 (2001).
- Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 627–641 (2009).
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME y Walker GC. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Rev. Microbiol.* 5, 619-633 (2007).
- Kalume DE, Molina H y Pandey A. Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 64-69 (2003).
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase. *Science* 253, 407–414 (1991).

- Koike K, Jimbo M, Sakai R, Kaeriyama M, Muramoto K, Ogata T, Maruyama T y Kamiya H. Octocoral chemical signalling selects and controls dinoflagellate symbionts. *Biol. Bull.* 207, 80–86 (2004).
- Kornberg L, Earp HS, Turner CE, Prockop C y Juliano RL. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering $\beta 1$ integrins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:8392-8396 (1991).
- Krishna P y Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*.6:238–246 (2001).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, (1970).
- LaJeunesse TC. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the internal transcribed spacer region: in search of a “species” level marker. *J Phycol* 37, 866–880 (2001).
- Lin Y y Cheng CL. A *chlorate-resistant* mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines anewHY locus. *Plant Cell* 9: 21–35 (1997).
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A y Scott PH.. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* 309, 361-75 (1995).
- Manning G, Plowman GD, Hunter T y Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27, 514–520 (2002b).
- Manning G, Whyte DB, Martínez R, Hunter T. y Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934 (2002a).
- McLaughlin JJ, Zahl PA y Henry SM (ed).. Endozoic algae. In *Symbiosis*. 1, 257-297. (1966).
- Mitsuru J, Yanohara T, Koike K., Sakai K., Muramoto K. y Kamiya H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellate. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 125, 227–236 (2000).
- Muscantine L. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science*, 156 pp. 516–519 (1967).

- Pawlowski J, Holzmann M, Fahrni JF, Pochon X y Lee JJ. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid Foraminifera: 2 dinoflagellates. *J. Euk. Microbiol.* 48, 368–373 (2001).
- Pierschbacher MD y Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309:30–33 (1984).
- Pierschbacher MD y Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5985–5988 (1984).
- Pratt WB, Galigniana MD y Morishima Y. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, 40:41-58 (2004).
- Preisinger C, von Kriegsheim A, Matallanas D y Kolch W. Proteomics and phosphoproteomics for the mapping of cellular signalling networks. *Proteomics* 8, 4402-4415 (2008).
- Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H y Buchner J. Hsp90 is regulated by a switch point in the C terminal domain. *EMBO Rep.*, 10:1147–1153 (2009).
- Reynolds WS, Schwarz JA y Weis VM. Symbiosis enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 126, 33–44 (2000).
- Richter K y Buchner J. Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol.*, 188(3):281-90 (2001).
- Santos SR, Gutierrez-Rodriguez C, Lasker HR y Coffroth MA. *Symbiodinium* sp. associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: high levels of genetic variability and population structure in symbiotic dinoflagellates. *Mar. Biol.* 143, 111–120 (2003).
- Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Review Cell*, 103, 211–225. (2000).
- Schoenberg DA, Trench RK. Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and its specificity in its symbiosis with marine invertebrates. II. Morphological variation in *Symbiodinium microadriaticum*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 207, 429–444 (1980).

- Serber Z y Ferrell JE “Tuning bulk electrostatics to regulate protein function,” *Cell*, vol. 128, no. 3, pp. 441–444 (2007).
- Soroka J, Wandinger SK, Buchner J y Schreiber T. Wandering Conformational Switching of the Molecular Chaperone Hsp90 via Regulated Phosphorylation *Molecular Cell*, 45: 517–528 (2012).
- Sreedhar AS, Soti C y Csermely P. Inhibition of Hsp90: A new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1697(1-2):233-242 (2004).
- Sultan AA. Molecular mechanisms of malaria sporozoite motility and invasion of host cells. *Int. Microbiol.* 2, 155-160 (1999).
- Terasawa K, Minami M y Minami Y. Constantly updated knowledgw of Hsp90. *J Biochem (Tokyo)*, 137(4):443-447 (2005).
- Trench RK. Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal–invertebrate symbioses. In: *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Sumposium*, vol. 2, pp. 1275–1286 (1997).
- Trench RK. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. II. Liberation of fixed ¹⁴C by zooxanthellae in vitro *Proc. R. Soc. Lond. B*, 177 pp. 237–250, (1971a).
- Trench RK.. The cell biology of plant–animal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*30, 485–531 (1979).
- Vaughan CK, Mollapour M, Smith JR, Truman A, Hu B, Good VM, Panaretou B, Neckers L, Clarke PA y Workman P. Hsp90dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol. Cell*, 31:886–895 (2008).
- Villanueva MA. Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly metanol-free transfer buffer. *Analytical Biochemistry*, 373, 377-379 (2008).
- Villanueva MA. Elimination of artifacts on native western blots arising from endogenous lectin activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50 (2-3): 141-149 (2002).
- Walton KM y Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem* 62, 101-20 (1993).

- Wandinger SK, Richter K, y Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 283, 18473–18477 (2008).
- Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H y Buchner J. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.*, 25:367–376 (2006).
- Wang JYJ y McWhirter JR. Tyrosine-kinase-dependent signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* 4:264-70 (1994).
- Wang, XM, Campbell LE, Miller CM y Proud CG. Amino acids availability regulates S6K1 and multiple translational factors. *Biochem. J.*, 334:251-257 (1998).
- Warner ME, Fitt WK y Schmidt GW. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8007–8012 (1999).
- Watanabe S, Kobayashi T, Saito M, Sato M, Nimura-Matsune K y Chibazakura T. Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochem Biophys Res Commun*, 352:36-41 (2007).
- Weis VM y Levine RP. Differential protein profiles reflect the different lifestyles of symbiotic and aposymbiotic *Anthopleura elegantissima*, a sea anemone from temperate waters. *J. Exp. Biol.*, 199, 883–892 (1996).
- Weis VM y Reynolds WS. Carbonic anhydrase expression and synthesis in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* are enhanced by the presence of dinoflagellate symbionts. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 307-316 (1999)
- Willmund F y Schroda M. HEAT SHOCK PROTEIN 90C is a bona fide Hsp90 that interacts with plastidic HSP70B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 138:2310-22 (2005).
- Wood-Charlson EM, Hollingsworth LL, Krupp DA y Weis VM. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cellular Microbiology*, 8, 1985-1993 (2006).
- Woodson JD y Chory J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet*, 9:383-95 (2008).
- Wray W, Boulikas T y Hancock R. Tinción con plata amoniaca. *Anal. Biochem.*, 118, 197-203 (1981).

Yacobovitch T, Benayahu Y y Weis VM. Motility of zooxanthellae isolated from the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens* (Cnidaria). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 298, 35–48 (2003).

Yaffe MB. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 177-186 (2002).

Yellowlees D, Rees TA y Leggat W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ*, 31, 679-694 (2008).

Young JC, Moarefi I y Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, 154: 267–273 (2001)