



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN E INTERACCIONES DE RACK1 Y PKC
DURANTE ETAPAS PRE Y POST SIMBIÓTICAS EN
Cassiopea xamachana"**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

Presenta:

Cristian Patricia Cabrales Arellano

Tutor:

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez

Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMyl (UNAM)

Comité tutor:

Dra. Patricia Elena Thomé Ortiz

Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMyl (UNAM)

Dra. María del Carmen Beltrán Núñez

Instituto de Biotecnología (UNAM)

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC)

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMyl (UNAM)

MÉXICO, CD. MX., Agosto, 2018



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN E INTERACCIONES DE RACK1 Y PKC
DURANTE ETAPAS PRE Y POST SIMBIÓTICAS EN
Cassiopea xamachana"**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:
Cristian Patricia Cabrales Arellano

Tutor:
Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMYL (UNAM)

Comité tutor:
Dra. Patricia Elena Thomé Ortiz
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMYL (UNAM)

Dra. María del Carmen Beltrán Núñez
Instituto de Biotecnología (UNAM)

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC)

Dra. Judith Sánchez Rodríguez
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMYL (UNAM)

MÉXICO, CD. MX., Agosto, 2018

DEDICATORIA

A mi esposo por su apoyo, cariño y tolerancia incondicional ¡Gracias por estar siempre a mi lado!

A mis padres por su gran amor y disponibilidad para escucharme siempre, y a mis hermanos por brindarme su alegría y comprensión en especial a Leo (Gatito). A mis tías Lily y Mague por sus consejos y a mis Primitas quienes siempre me levantaron el ánimo.

A mis amigos mil gracias por quererme y hacerme reír.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Marco Villanueva Méndez por aceptarme en su laboratorio y permitirme participar en este proyecto.

A la Dra. Patricia Thomé Ortiz y la Dra. Tania Islas Flores quienes siempre me ayudaron con sus comentarios y sugerencias así como su apoyo moral y amistad.

A mi comité tutorial Dra. Carmen Beltrán Núñez, Dra. Judith Sánchez Rodríguez y el Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte por sus invaluable correcciones y aportaciones para la mejoría de mi trabajo.

A la Dra. Mónica Medina y todo su equipo de laboratorio en especial a Aki Odhera, Bishoy Hanna y Viridiana Avila.

A los Dres. Roberto Iglesias Prieto y Ernesto Maldonado Olvera por su asesoría científica.

A mi amiguito Facundo Muñiz por su tiempo y asesoría en algunos experimentos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Esmeralda Pérez, Luis Parmenio Suescún, Daniel Rosas, Pijush Mallick, Celina Saavedra, Emma Rangel, Jacqueline, Gerard Traverse, Anthony Rashum Cerdán, Griselda Avila, Alexander Morales, Omar, Jessica Nava, Natalia Carabantes, Fernanda Franco, Jesús Roman, Yislem Beltrán, Oswaldo Bernal, David Sardineta y Karlita Rebolgar por su apoyo y convivencia; en especial a Raúl Castillo y Alejandra Herrerías.

Al M.C Fernando Negrete y la M.C. Cecilia Barradas por las facilidades y ayuda en los muestreos, así como al M.C. Francisco Ruiz, M.C. Edgar Escalante y M.C. Miguel Angel Gómez y a la M.C Guadalupe Barba por su disponibilidad para apoyarme en las diferentes áreas y ensayos.

A la M.C. Laura Celis por su apoyo en la parte bibliográfica, así como a todo el personal de la UASA y el PCMyL por su tiempo y atenciones en los trámites administrativos.

A CONACYT por otorgarme la beca de doctorado y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo para congresos.

Al Acuario de Veracruz y al parque Xcaret por el material biológico facilitado.

Este trabajo se realizó en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM y fue financiado por los proyectos PAPIIT (IN210514 y IN203718) y CONACYT (175951 y 285802).

ÍNDICE

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
1.1 Generalidades del filo Cnidaria	5
1.1.1 Generalidades de las medusas	6
1.2 Generalidades de <i>Cassiopea xamachana</i>	7
1.3 Ciclo de vida.....	8
1.4 El género <i>Symbiodinium</i>	11
1.5 Simbiosis dinoflagelado-cnidario	12
1.6 Proteína RACK1	13
1.7 RACK1 y sus ligandos	13
1.8 Proteína Cinasa C	16
1.9 Las interacciones entre RACK1 y PKC son fundamentales para señalización celular	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.- Material biológico	23
2.- Extracción de ácidos nucleicos.....	23
2.1. Extracción de ADN genómico.....	23
2.2.- Extracción de ADN plasmídico.....	24
2.3.- Extracción de ARN	24
2.4 Síntesis de cADN.....	25
3. Diseño de oligonucleótidos	26
4.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
4.1.- Amplificaciones mediante PCR	28

4.2. Purificación de los fragmentos amplificados.....	30
5. Digestiones enzimáticas.....	30
6. Electroforesis en gel de agarosa	31
7. Ligación de las amplificaciones y/o digestiones	31
7.1 Transformación en <i>E. coli</i>	33
8.- Secuenciación.....	33
8.1 Ácidos nucleicos.....	33
8.2 Proteínas	33
9.- Hibridación <i>in situ</i>	33
9.1 Generación de la sonda.....	34
9.2 Fijación del material biológico	34
9.3 Pretratamiento.....	34
9.4 Post-fijado.....	35
9.5. Bloqueo e incubación con anticuerpo.....	35
9.6. Revelado	36
10. Inmunolocalización.....	36
10.1 Inmunolocalización de RACK1	36
11. Expresión de CxRACK1 en <i>E. coli</i>	37
12. Purificación de la proteína recombinante (CxRACK1).....	37
13.- Identificación de la proteína RACK1 en <i>C. xamachana</i> mediante western blot.....	38
13.1 Preparación de las muestras para SDS-PAGE.....	38
13.2 Preparación de gel de SDS-PAGE.....	38
13.3 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	39
13.4 Visualización de proteínas transferidas a membrana y bloqueo de membrana	39
13.5 Incubación con anticuerpos	39
13.6 Revelado de membrana.....	42
13.7 Tinción de gel de SDS-PAGE	42
14. Doble dimensión de proteínas	42
14.1. Preparación de la muestra.....	42
14.2 Isoelectroenfoque.....	42
15. Identificación de interacciones RACK1-PKC en <i>C. xamachana</i>	43

15.1. Ensayo pull-down	43
15.2 Ensayo de doble híbrido de levadura.....	44
15.2.1 Ensayo de auto-activación	44
15.2.2 Preparación de células competentes	44
15.2.3 Co-transformación en <i>S. cerevisiae</i>	44
16. Análisis bioinformático	45
16.1 Análisis de secuencias nucleotídicas	45
16.2 Elaboración de la estructura tridimensional de CxRACK1	45
16.3 Construcción de árbol filogenético.....	45
17. Inducción de la estrobilación en <i>C. xamachana</i>	46
18. Análisis estadísticos.....	47
RESULTADOS	48
1. Muestreo y mantenimiento de material biológico	48
2. Extracción de ácidos nucleicos.....	49
3. Extracción de proteínas.....	51
4. Inducción de la estrobilación en <i>C. xamachana</i>	51
5. Caracterización de RACK1 en <i>Cassiopea xamachana</i>	54
5.1. Amplificación de <i>RACK1</i> mediante PCR.....	54
5.2. Amplificaciones para análisis de PCR punto final	58
6. Análisis de secuencias	59
6.1. <i>RACK1</i> en <i>C. xamachana</i>	59
7. Estructura tridimensional de CxRACK1	61
8. Identidad de la secuencia de RACK1 de <i>C. xamachana</i> con otros organismos.....	62
9. Análisis filogenético de RACK1	64
10. Hibridación <i>in situ</i> con una sonda para detectar la expresión del transcrito de CxRACK1 ..	65
10.1. Detección del transcrito de CxRACK1 en <i>C. xamachana</i>	65
11. Identificación de la expresión del transcrito antisentido de CxRACK1.....	69
11.1 Amplificación del transcrito antisentido de CxRACK1	72
12. Western blot con anticuerpos anti-RACK1 humano	73
13. Inmunolocalización de CxRACK1	74
14. Expresión heteróloga de CxRACK1.....	74

14.1. Identificación y purificación de CxRACK1	75
14.2. Secuenciación de la proteína CxRACK1 recombinante	78
15. Caracterización de PKC en <i>Cassiopea xamachana</i>	80
15.1. Amplificaciones para obtener secuencias de <i>PKC</i> de <i>C. xamachana</i>	80
15.2. Secuencia parcial de <i>PKC</i> en <i>C. xamachana</i>	82
16. Identidad de la secuencia de CxPKC con otros organismos	84
17.- Análisis filogenético de <i>PKC</i>	85
18.- Detección de CxPKC mediante hibridación <i>in situ</i>	86
19. Western blot con anticuerpos anti-PKC de humano	88
19.1 Identificación de CxPKC en fracciones microsomales	89
19.2 Identificación de CxPKC en electroforesis de doble dimensión	90
20.- Inmunolocalización de CxPKC	93
21. Factor de elongación FE1 alfa en <i>C. xamachana</i>	94
21.1 Amplificación mediante PCR	94
22. Interacciones entre CxRACK1 y CxPKC	95
22.1 Replegamiento de CxRACK1	95
22.2 Ensayo pull-down	96
22.3 Doble híbrido de levadura para ensayar la interacción entre RACK1 y el dominio C2 de PKC	98
DISCUSIÓN	102
1. Posibilidad de contaminación de las muestras de <i>C. xamachana</i> con <i>Symbiodinium</i>	102
2. Inducción de la estrobilación	102
3. Receptor de la Cinasa C Activada en <i>Cassiopea xamachana</i>	105
4. Proteína cinasa C en <i>Cassiopea xamachana</i>	108
5. Interacciones entre CxRACK1 y CxPKC	110
CONCLUSIONES	112
PERSPECTIVAS	113
LITERATURA CITADA	114
ANEXO 1	131
1. Expresión punto final de CxRACK1 y CxPKC	131

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La medusa invertida <i>Cassiopea xamachana</i>	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Cassiopea xamachana</i>	10
Figura 3. Proteínas blanco fosforiladas por PKC.	18
Figura 4. Estadios de desarrollo de <i>Cassiopea xamachana</i> en laboratorio.	49
Figura 5. Extracción de ADN genómico de <i>C. xamachana</i>	50
Figura 6. Identificación de simbionte en sobrenadante y pastilla de tentáculos homogenizados de <i>C. xamachana</i>	51
Figura 7. Porcentaje de estrobilación en diferentes concentraciones de indometacina.	52
Figura 8. Inducción de la estrobilación en <i>C. xamachana</i>	53
Figura 9. Tratamientos de inducción de la estrobilación.	54
Figura 10. Amplificación de <i>RACK1</i> con oligonucleótidos <i>RACK1</i> (1)F y <i>RACK1</i> (3)R y ADN _g de <i>Cassiopea xamachana</i>	55
Figura 11. Amplificación de la región 3' de <i>CxRACK1</i>	56
Figura 12 Amplificación de <i>CxRACK1</i> con oligonucleótidos <i>RACK1</i> -3'-2F y dT.	56
Figura 13. Amplificación de <i>CxRACK1</i> con los oligonucleótidos ATG-CX y STOP-CX.	57
Figura 14. Amplificaciones de los genes que codifican a <i>CxPKC</i> , <i>CxRACK1</i> y <i>CxFE1α</i> para PCR punto final	58
Figura 15 Secuencia nucleotídica-aminoácídica de <i>CxRACK1</i>	61
Figura 16. Estructura tridimensional de la proteína <i>CxRACK1</i>	61
Figura 17. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>CxRACK1</i>	63
Figura 18. Filogenia de <i>RACK1</i>	65
Figura 19. Expresión de <i>CxRACK1</i> en larvas plánulas.	67
Figura 20. Expresión de <i>CxRACK1</i> en pólipos de <i>Cassiopea xamachana</i>	67
Figura 21. Identificación de transcrito de <i>CxRACK1</i> en estróbilos de <i>Cassiopea xamachana</i>	68
Figura 22. Vista subumbrelar de éfiras de <i>Cassiopea xamachana</i> con la sonda <i>CxRACK1</i>	69
Figura 23. Estrategia de identificación del transcrito antisensido de <i>CxRACK1</i>	71
Figura 24. Amplificación de la secuencia de <i>CxRACK1</i> antisentido.	72
Figura 25. Western blot con anticuerpos anti- <i>RACK1</i> de humano policlonal y monoclonal.	73
Figura 26. Inmunolocalización de <i>CxRACK1</i> en distintas etapas fisiológicas de <i>Cassiopea xamachana</i>	74
Figura 27. Construcciones de clonación y expresión de <i>CxRACK1</i>	75
Figura 28. Cinética de la expresión de la proteína heteróloga <i>CxRACK1</i> en células Rosetta.	76
Figura 29. Purificación de <i>CxRACK1</i> heteróloga por cromatografía de afinidad.	77
Figura 30. Identificación por western blot de <i>CxRACK1</i> recombinante con diferentes anticuerpos.	78
Figura 31. Amplificación de la secuencia de <i>PKC</i> (360 pb) de <i>Cassiopea xamachana</i>	81
Figura 32. Amplificación de <i>CxPKC</i>	81
Figura 33. Construcción de clona de <i>CxPKC</i>	82
Figura 34. Secuencia nucleotídica-aminoácídica de <i>PKC</i>	83

Figura 35. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de CxPKC con las de otros organismos.	85
Figura 36. Árbol filogenético de PKC.	85
Figura 37. Identificación de CxPKC en plánulas.	86
Figura 38. Localización del transcrito de CxPKC en pólipos de <i>C. xamachana</i>	87
Figura 39. Detección del transcrito de CxPKC en estróbilos.	87
Figura 40. Hibridación in situ de CxPKC en éfiras.	88
Figura 41. Patrón de proteólisis de CxPKC analizado por western blot con anticuerpos anti-PKC	89
Figura 42. CxPKC en fracciones microsomales analizada por western blot con anticuerpos anti- PKC.	90
Figura 43. Isoelectroenfoque de proteínas en <i>C. xamachana</i>	91
Figura 44. Western blot de PKC en IEF seguido de SDS-PAGE de proteínas de <i>C. xamachana</i>	92
Figura 45. Inmunolocalización de CxPKC en <i>C. xamachana</i>	93
Figura 46. Control negativo del ensayo de inmunolocalización.	93
Figura 47. Amplificación de CxFE1 α	94
Figura 48. Purificación y re conformación de CxRACK1.	96
Figura 49. Ensayo pull-down en larvas aposimbióticas y su análisis por western blot con anti- PKC.	97
Figura 50. Ensayo pull-down en medusa adulta y su análisis por western blot.	98
Figura 51. Construcciones 2YH-PKC-Presa y 2YH-RACK1-Carnada.	99
Figura 52. Expresión de CxRACK1 en <i>S. cerevisiae</i> analizada por western blot.	100
Figura 53. Transformantes obtenidas en el ensayo de doble híbrido de levadura.	101
Figura 54. Niveles de expresión de RACK1 en los diferentes estadios de desarrollo en <i>C. xamachana</i>	149
Figura 55. Niveles de expresión de PKC en los diferentes estadios de desarrollo en <i>C. xamachana</i>	150

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Proteínas de unión a RACK1	14
Cuadro 2. Secuencias obtenidas para diseño de oligonucleótidos de RACK1	26
Cuadro 3. Secuencias de organismos correspondientes al Factor de elongación 1 alfa.....	26
Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo	27
Cuadro 5. Oligonucleótidos y condiciones de PCR para las distintas amplificaciones	29
Cuadro 6. Construcciones desarrolladas en el presenta trabajo	32
Cuadro 7. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo	40
Cuadro 8. Compuestos químicos y concentraciones empleados para inducir la metamorfosis en <i>C. xamachana</i>	47
Cuadro 9. Concentraciones de ARN obtenido para el ensayo de PCR punto final.....	50
Cuadro 10. Identidad de secuencias amplificadas con oligonucleótidos diseñados para <i>RACK1</i> ..	57
Cuadro 11. Identidad de la secuencia de de <i>CxRACK1</i> antisentido con otros organismos.....	73
Cuadro 12. Péptidos obtenidos de la proteína <i>CxRACK1</i> expresada.	79
Cuadro 13. Secuencias amplificadas que mostraron identidad con <i>PKC</i>	82
Cuadro 14. Identidad de secuencias amplificadas con los oligonucleótidos <i>FE1αCx-229-255F</i> y <i>Fe1αCx-1277-1302R</i>	95

ABREVIATURAS

Ade	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
xg	veces la Gravedad
g	Gramos
Gb	Gigabases
h	hora
His	Histidina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
Leu	Leucina
LB	Luria-Bertani
Mb	Mega bases
min	minuto
mg	miligramos
ml	mililitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
NBT	cloruro de nitroblue tetrazolium
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína Cinasa C

PPAR γ	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
RACK1	Receptor de la Cinasa C Activada
SD	Medio definido sintético
SDS	Dodecilsulfato sódico
Src	Cinasa de la familia Sarcoma
Trp	Triptófano
μg	microgramos
μl	microlitros
μM	micromolar

RESUMEN

Cassiopea xamachana presenta durante su ciclo de vida diferentes estadios (larva, pólipo, estróbilo, éfira y medusa adulta); la diferenciación en cada uno de estos estadios requiere de una compleja y orquestada red de interacciones moleculares para su correcto desarrollo. El Receptor de la Cinasa C Activada (RACK) se une a diferentes ligandos entre ellos la Proteína Cinasa C (PKC), que fosforila residuos de serina y treonina en diferentes proteínas blanco promoviendo diversos procesos celulares como: proliferación, apoptosis, crecimiento, transcripción entre otros. El objetivo de este trabajo fue caracterizar a nivel molecular ambas proteínas en la medusa *Cassiopea xamachana* y evaluar su expresión en los diferentes estadios de desarrollo así como su interacción en las etapas pre y post simbióticas. Sin embargo, para lograr estos objetivos fue necesario implementar un método para inducir la estrobilación en condiciones de laboratorio reproducibles y confiables. Los inductores químicos con resultados favorables fueron: 5-metoxi 2-metil indol, indometacina y 9-cis retinol, los cuales promovieron la estrobilación en los pólipos de *C. xamachana*. Mediante hibridación *in situ* e inmunolocalización en las larvas, la señal de *RACK1* se observó en el área del endodermo, mientras que la de *PKC* se localizó en la zona basal; en los pólipos ambos transcritos/proteínas se detectaron en el hipostoma y los tentáculos. Por otro lado, en los estróbilos y éfiras se observó una clara señal de *RACK1* y de *PKC* en los brazos orales. Cabe destacar que la sonda sentido de *RACK1* genera una señal en los ensayos de hibridación *in situ*, sugiriendo que *RACK1* podría funcionar como un regulador transcripcional. *RACK1* y *PKC* interactúan en la medusa adulta en estado simbiótico y no en larvas aposimbióticas. Mediante ensayos de doble híbrido de levadura con el dominio C2 de *PKC* no se detectó interacción con *RACK1*. Dichos resultados muestran que la interacción entre Cx*RACK1* y Cx*PKC* no se lleva a cabo en el dominio C2 y abre la posibilidad de indagar su interacción en el dominio V5.

Palabras clave: *C. xamachana*, *RACK1*, *PKC*, estrobilación.

ABSTRACT

Cassiopea xamachana displays five distinct physiological stages during its life cycle: *i.e.*, larva, polyp, strobila, ephyra and adult jellyfish. Differentiation from and to each stage requires complex and orchestrated interactions through its molecular network for accurate development. The Receptor of Activated C Kinase (RACK1) binds to different protein ligands like Protein Kinase C (PKC) to phosphorylate serine and threonine on target proteins which modulate cellular processes such as: proliferation, apoptosis, growth and transcription. The aim of this study was the molecular characterization of both proteins in the jellyfish *Cassiopea xamachana*, and to evaluate their expression during different developmental stages, as well as their interaction during the pre- and post-symbiotic phases. However, to achieve those objectives it was necessary to implement a method for strobilation induction under reliable and reproducible laboratory conditions. The chemical inducers that yielded the expected results were: 5-methoxy 2-methyl indole, indomethacin and 9-cis retinoic acid, which promoted strobilation on *C. xamachana* polyps. *In situ* hybridization and immunolocalization of RACK1 was observed in larvae at the endoderm layer, whereas PKC was localized at the basal zone. In polyps, both the transcript and the protein were detected at the hypostome and tentacles, while in strobilae and ephyrae, clear signals were observed at the oral arms. Interestingly, the *RACK1* probe generated a signal when the sense probe was used in the *in situ* hybridization assay, suggesting a possible role as a transcriptional regulator. A RACK1 and PKC interaction was identified in jellyfish during symbiosis but not in aposymbiotic larvae. However, a yeast two-hybrid assay with the C2 domain of PKC did not reveal interaction with RACK1. These results suggest that the interaction between CxRACK1 and CxPKC does not occur through the C2 domain and opens the possibility to search for this interaction on the V5 domain.

Keywords: *C. xamachana*, RACK1, PKC, Strobilation.

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo está enfocado en determinar los niveles de expresión e interacciones de la proteína de andamiaje RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) y uno de sus ligandos, la cinasa PKC (Protein Kinase C), en diferentes etapas fisiológicas del ciclo de vida de la medusa *Cassiopea xamachana*. Dicha medusa posee microalgas simbiotas del género *Symbiodinium* que se establecen durante etapas tempranas de su ciclo de vida. Después de la fecundación sexual, se producen larvas sexuales las cuales se fijan a un sustrato y de ahí se diferencian a pólipos (también llamados escifistomas); que pueden gemar y producir nuevas plánulas y de esta manera el ciclo asexual se repite indefinidamente. Posteriormente mediante cambios de temperatura, inducción química y/o la infección con *Symbiodinium*, se dispara un proceso de metamorfosis a través de mecanismos aún desconocidos que derivan en la diferenciación de los pólipos a una segmentación y movimientos de estrobilación. El segmento estrobilante se separa para convertirse en una éfira o medusa temprana que desarrollará tentáculos y se convertirá en una medusa adulta.

Este estudio propone demostrar que RACK1 y/o PKC participan e interactúan de manera diferencial y regulada en la ruta de señalización durante las etapas pre y post simbióticas; esto es, en las larvas sexuales aposimbióticas y en la medusa adulta.

RACK1 es una proteína de andamiaje que participa en múltiples vías de transducción de señales, altamente conservada en eucariontes, y pertenece a la familia de proteínas con dominios WD40. RACK1 contiene siete de estos dominios WD40, los cuales forman una estructura característica llamada de β -propela y que funciona como plataforma para la interacción con otras proteínas. Una de dichas interacciones es la que le permite llevar a la cinasa PKC a sitios claves para fosforilar proteínas corriente abajo de las cascadas de transducción de señales. RACK1 es una proteína que puede unirse a varios ligandos y ponerlos en contacto con PKC para que estos sean fosforilados y actuar como efectores en la transducción de la señal que da lugar a respuestas celulares específicas. Para este trabajo utilizamos larvas sexuales obtenidas de las medusas hembras para la primera etapa. Adicionalmente, utilizamos medusas adultas para los análisis de la última etapa fisiológica. Individuos de cada etapa fueron utilizados para: a) ensayar los patrones de expresión de *RACK1* y *PKC*; b) determinar cambios en dichos patrones de expresión de *RACK1* y *PKC* en función de cada etapa fisiológica; c) llevar a cabo ensayos para determinar la

posible asociación e identificación de ligandos de RACK1 aparte de la PKC que pudieran asociarse o disociarse de manera diferencial en función de cada etapa fisiológica.

Estos análisis contribuyeron a identificar los cambios en la expresión de *RACK1* y *PKC* como respuesta a la inducción a la metamorfosis, y a determinar si estos cambios prevalecen o vuelven a cambiar en la etapa adulta del hospedero. Adicionalmente, se detectaron proteínas que pudieran ser ligandos de RACK1. La identificación de dichas proteínas como ligandos de asociación a RACK1 proporcionará elementos importantes sobre las vías de transducción de señales en las que participa.

Debido a la inducción controlada de su metamorfosis, *Cassiopea xamachana* es un modelo idóneo para el estudio de procesos de transducción de señales bajo condiciones controladas en laboratorio. Esto permitió realizar este trabajo que contribuye a ahondar en el conocimiento de las vías fundamentales de señalización que subyacen a las asociaciones simbióticas entre dinoflagelados y cnidarios, que son tan importantes debido a que forman parte de ecosistemas complejos y ricos en biodiversidad como lo son los arrecifes coralinos.

ANTECEDENTES

La composición de la microflora y la microfauna de un ecosistema está regulada por las interacciones de los microorganismos de una comunidad entre sí y de estos con el medio abiótico, lo cual da como resultado un equilibrio dinámico (Hegyí et al., 2012), en donde una de las interacciones más comunes e importantes es sin duda la simbiosis.

Este tipo de interacciones simbióticas se han descrito en diferentes organismos y en el arrecife coralino estas relaciones, que ocurren entre cnidarios y algas zooxanthellas del género *Symbiodinium*, son fundamentales para su equilibrio y biodiversidad (Berkelmans y Van Oppen, 2006). Entre los cnidarios del arrecife coralino, el coral es el que más contribuye al sustento del arrecife, gracias al sustrato que forma debido a su aporte de esqueletos de carbonato de calcio. Sin embargo, su manipulación para estudios específicamente relacionados con la simbiosis bajo condiciones controladas de laboratorio es difícil y por ello su utilización como sistema modelo es limitada. Por otro lado, la medusa *Cassiopea xamachana* tiene un ciclo de vida que presenta condiciones idóneas para este tipo de estudios y más aún, su diferenciación a medusa puede ser inducida a través de la adquisición del simbiote (Hoffman et al., 1999) o bien mediante el suplemento de inductores químicos.

1.1 Generalidades del filo Cnidaria

El filo Cnidaria contiene más de 7,000 especies, que como característica general cuentan con la presencia de una amplia gama de sustancias neurotóxicas, citolíticas y enzimáticas las cuales son almacenadas en los nematocistos (cnidocito); un orgánulo subcelular punzante (Jankowski et al., 2008). El estudio de los organismos pertenecientes a este filo se ha enfocado desde el punto de vista evolutivo, en su capacidad de regeneración celular, el desarrollo de ojos y nematocistos, la transición al estado meduzoide, así como la optimización de técnicas de manipulación genética y la simbiosis alga-cnidario (Technau y Steele, 2011).

Este filo está dividido en cinco clases: Anthozoa, Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa y Staurozoa. A la fecha el genoma completo de algunos miembros pertenecientes a este grupo se encuentra disponible: *Nematostella vectensis*, *Hydra magnipapillata*, *Acropora millepora*, *Aiptasia pallida* y *Clytia hemisphaerica* (Steele et al., 2011) Estos genomas cuentan con las siguientes

características: el genoma de *H. magnipapillata* consta de 1.5 Gb, es rico en A-T (71%), y contiene un porcentaje de aproximadamente 57% de elementos transponibles (Chapman et al., 2010). Por otro lado, el ensamblaje total del genoma de *N. vectensis* predice un tamaño de aproximadamente 450 Mb con 18,000 genes que codifican para proteínas, y más del 25% del genoma está compuesto de transposones y LTR's (Long Terminal Repeats) (Putnam et al., 2007). El genoma de *Acropora millepora* se calcula en 420 Mb en tamaño, 39% de GC con 23,668 loci codificadores de proteínas (Shinzato et al., 2014), en tanto el genoma de *Aiptasia* es de aproximadamente 260 Mb (Baumgarten et al., 2015). Además de los genomas, distintos transcriptomas han sido liberados; entre ellos los correspondientes a: *Nematostella vectensis* (Tulin et al., 2013), *Acropora palmata* (Polato et al., 2011), *Acropora millepora* (Moya et al., 2012), *Anthopleura elegantissima*, *Fungia scutaria*, *Seriatopora hystrix*, *Madracis auretenria*, *Montastraea cavernosa* (Kitchen et al., 2015), *Platgyra daedalea*, *Pseudodiploria strigosa* (<http://people.oregonstate.edu/~meyere/data.html>) *Aurelia aurita* (Fuchs et al., 2014) *Exaiptasia pallida* (Sunagawa et al., 2009), *Edwarsiella lineata* (Stefanik et al., 2015), *Pocillopora damicornis* (Traylor-Knowles et al., 2011), *Hydractinia equinata* (Soza-Ried et al., 2009), *Hydractinia symbiolongicarpus* (Sanders et al., 2014), y *Nanomia bijuga* (Siebert et al., 2011); y aunque en algunos de ellos las secuencias no están completamente anotadas, son una herramienta útil para la búsqueda de transcritos específicos.

1.1.1 Generalidades de las medusas

Las medusas tienen un alto contenido de agua; aproximadamente un 96%, siendo la campana el tejido con mayor porcentaje comparado con los tentáculos y las gónadas (Lowndes, 1942).

Larson (1986) menciona que el alto contenido en agua provee algunas ventajas a las medusas tales como un rápido crecimiento y bajo contenido nutricional para los depredadores y parásitos; adicionalmente, éstas tienen un mayor tamaño que su presa, una tasa metabólica relativamente baja, un amplio espectro de captura de presas, flotabilidad y elevada capacidad de escape a los depredadores debido a la transparencia. Son consideradas los mayores predadores pelágicos que inclusive llegan a formar afloramientos masivos con altas densidades y biomasa (Richardson et al., 2009). Aunque este comportamiento aún no está comprendido completamente se cree que diversos factores pueden estar involucrados; entre ellos: variaciones naturales, eutrofización, introducción de especies foráneas, cambio climático y sobrepesca (Klevjer et al., 2009).

Su alimentación es de tipo carnívora, consumiendo principalmente larvas de invertebrados, peces, crustáceos, moluscos, anélidos, diatomeas, dinoflagelados y medusas (Zamponi, 1996).

Las medusas tienen importancia principalmente a nivel ecológico, ya que son responsables de mantener un balance en el ecosistema (Lebrato y Jones, 2011); además son empleadas en la industria farmacéutica y biotecnológica donde por ejemplo, el gen de la proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria* es usado ampliamente como gen reportero en la transfección de células (Milán y Becu-Villalobos, 2009; Ortiz-Matamoros et al., 2015), e inclusive se emplean en el sector alimenticio donde han resultado ser negocio muy lucrativo en el continente Asiático (Hsieh et al., 2001).

1.2 Generalidades de *Cassiopea xamachana*

Cassiopea spp. pertenece a la clase Escifozoo, orden Rhizostomeae, Familia Cassiopeidaie; también es conocida como medusa de mangle o invertida; este último término fue dado debido a su característico comportamiento el cual la hace diferente a las demás medusas, ya que se muestra descansando con la campana sobre el sustrato y los tentáculos proyectados hacia la superficie. Gracias a esta posición, la medusa obtiene la luz necesaria para que las algas simbióticas lleven a cabo la fotosíntesis (Mortillaro et al., 2009) (Figura 1a-b). Esta especie se encuentra distribuida en aguas del oeste de la India, Florida, Golfo de México y el Caribe (Holland et al., 2004). Anteriormente, *C. xamachana* se confundía con *Cassiopea andromeda* y/o *frondosa* hasta que en 1900 Bigelow la describió detalladamente y la clasificó como una especie *de novo* (Bigelow, 1900). Una característica morfológica útil para la diferenciación entre *C. xamachana* y *C. frondosa* en campo, reside en la campana ya que *C. xamachana* presenta una ligera curvatura cóncava, esta particularidad única le permite adherirse a superficies planas como una ventosa (Goldsborough, 1910).

En promedio un organismo adulto tiene un diámetro de campana de 15 a 30 centímetros (Snyderman y Wiseman, 1996), la campana presenta bordes redondeados, carece de tentáculos umbelíferos, en general presenta 8 brazos orales carnosos muy ramificados con prolongaciones festoneadas semejantes a racimos de uvas los cuales contienen las algas simbióticas (Lira et al., 1989). La larva de *C. xamachana* mide entre 120 a 220 μm de longitud y entre 85 a 100 μm de ancho, con cilios distribuidos uniformemente (Martin y Shia, 1982).

El contacto con esta medusa puede causar un dolor moderado, el cual ocasionalmente en un lapso de una hora puede provocar vómitos, hinchazón, edema facial y urticaria generalizada. Diferentes experimentos con glóbulos rojos de humano y oveja demuestran la actividad hemolítica de su toxina (Torres et al., 2001).

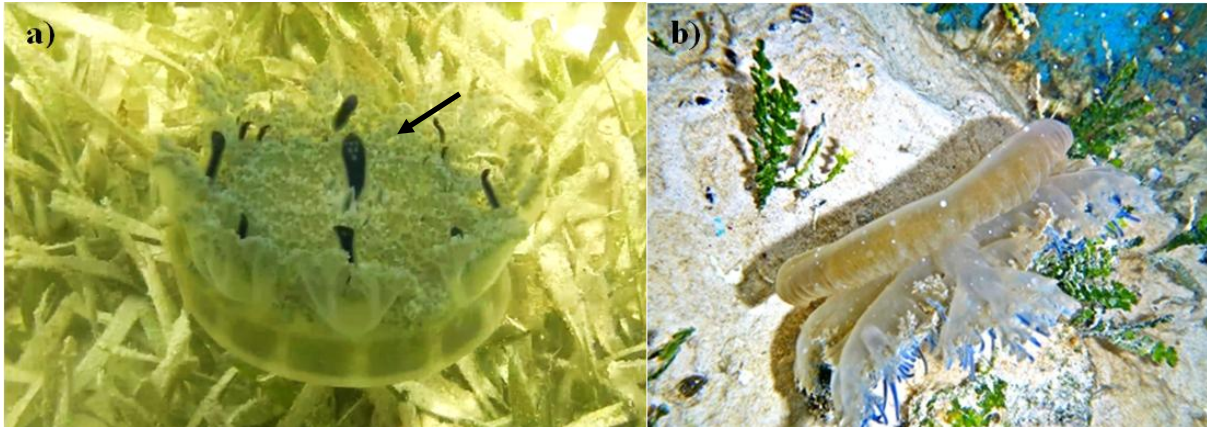


Figura 1. La medusa invertida *Cassiopea xamachana*. a) Postura típica de la medusa en el medio ambiente postrada sobre pasto marino, se identifican los apéndices en tonalidades azules (flecha) y los brazos orales orientados hacia la superficie. b) medusa desplazándose en aguas someras. Imagen: PCA.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de la medusa inicia con la fecundación, la cual se produce tras la expulsión de los gametos por parte del macho ya que la mayoría de las especies de medusas son dioicas; sin embargo se han reportado algunas especies hermafroditas (Carre y Carre, 2000). La primera fase independiente y de vida libre se desarrolla a partir del óvulo fecundado, del cual se forma una larva ciliada, la cual se adhiere al sustrato e inicia una diferenciación hasta desarrollar un pólipo sésil también denominados escifostoma. Cada escifostoma tiene la capacidad de producir larvas asexuales (plánula), mediante gemación. El asentamiento de las plánulas en laboratorio no se lleva a cabo sobre superficies limpias y es difícil su sobrevivencia cuando se mantienen en agua de mar tratada con antibióticos; ya que el asentamiento es promovido por biofilms bacterianos compuestos principalmente por bacterias del género *Vibrio* sp. (Hoffman et al., 1978). En la naturaleza los pólipos son encontrados con frecuencia en hojas de mangle degradadas, las cuales son el sustrato de preferencia para la fijación del pólipo (Fleck y Fitt, 1999); en condiciones de laboratorio los pólipos pueden ser mantenidos por largos periodos (hasta por 7 años), obteniendo grandes cantidades debido a la reproducción asexual (Ojimi et al., 2009).

Se ha reportado que los pólipos maduran solo después de que establecen la asociación dinoflagelado-cnidario (Paracer y Ahmadjian, 2000). La infección con el simbiote puede ser transmitida de manera vertical o horizontal. En el primer caso; la larva sexual liberada de la madre adquiere la infección del alga (*Symbiodinium*) o por otro lado en el medio ambiente cuando ya se ha desarrollado la boca o hasta el estadio de pólipo sésil (transmisión horizontal). Además los pólipos asexuales pueden reproducirse por gemación y transmitir a los pólipos descendientes la infección del alga, a este proceso de transmisión directa se le denomina transmisión vertical (Thornhill et al., 2006, Sachs y Wilcox, 2006). Esta interacción *Symbiodinium*-hospedero es altamente específica ya que, aunque el pólipo de *C. xamachana* puede fagocitar diferentes clados del alga, regularmente un tipo sobrevive y forma la simbiosis (Trench et al., 1993; Verde y McCloskey, 1998), las algas no específicas para la simbiosis son digeridas por el hospedero.

Una vez que se ha establecido la simbiosis, se dispara una metamorfosis conocida como estrobilación, donde el pólipo dará lugar a una medusa juvenil denominada éfira. Los principales cambios morfológicos que distinguen esta metamorfosis son: la contracción de los tentáculos del pólipo y el aplanamiento del cáliz así como movimientos pulsantes. Una vez formada la éfira esta es liberada del extremo oral del pólipo y adquiere vida libre formando parte del zooplancton en la columna de agua, donde crece hasta la adultez. Un pólipo puede tardar meses o incluso años para que lleve a cabo la metamorfosis y este proceso varía dependiendo de la especie y las condiciones medio ambientales (Daly et al., 2007) (Figura 2).

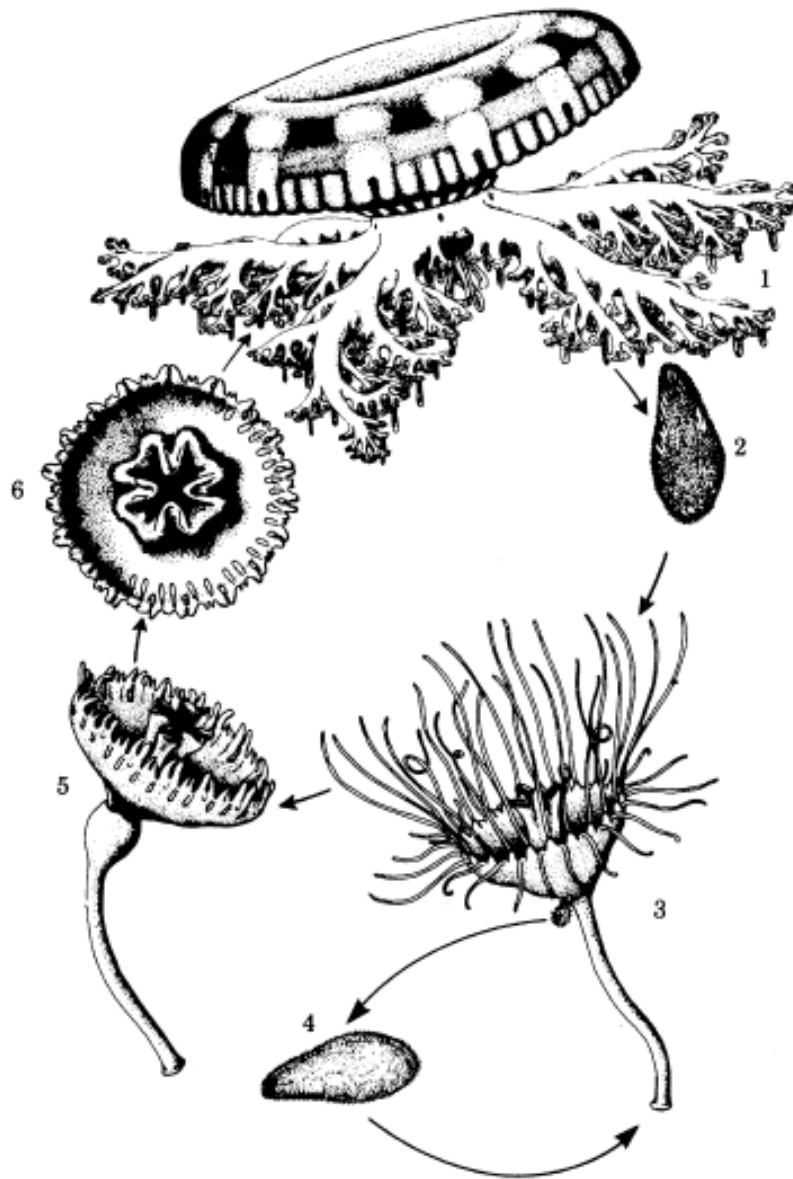


Figura 2. Ciclo de vida de *Cassiopea xamachana*. En el ciclo se muestra la alternancia de generaciones, a través de la reproducción de tipo sexual, así como asexual. Donde las medusas adultas liberan los gametos (1) y una vez que se lleva a cabo la fecundación comienza el desarrollo que da lugar a una larva ciliada de vida libre (2), esta larva se asentará para comenzar la formación del pólipo (3), el pólipo a su vez tiene la capacidad de producir gemas (4) las cuales crecen y son liberadas del pólipo dando lugar a una larva independiente (reproducción asexual), por otro lado el pólipo lleva a cabo una metamorfosis denominada estrobilación (5), teniendo como resultado final la formación y expulsión de medusas juveniles denominadas éfiras (6) las cuales se desarrollarán hasta su madurez (1) y de esta forma el ciclo sexual podrá continuar. Imagen tomada de Colley y Trench (1983).

1.4 El género *Symbiodinium*

El género *Symbiodinium* está clasificado dentro de la familia Symbiodinaceae, orden Suessiales, clase Dinophyceae; son organismos unicelulares fotosintéticos, los cuales son encontrados en simbiosis con un amplio rango de hospederos invertebrados o protistas, o bien habitando el medio ambiente marino de forma libre (Bayer et al., 2012). También son llamados zooxanthellas, y son relativamente abundantes en aguas marinas (aproximadamente $>10^9$ células por metro cuadrado); debido a su pequeño tamaño (10 μm de diámetro) su biomasa total en los arrecifes es baja (Baker et al., 2004). Estas algas unicelulares residen en el endodermo de cnidarios tropicales como: corales, anémonas, medusas; también han sido identificadas en gastrópodos, moluscos, bivalvos y esponjas (Stimson et al., 2002).

Freudenthal (1962) introdujo el género y especie *Symbiodinium microadriaticum* aislado de *C. xamachana* y mediante microscopía los describió como células en forma de cocos, parecidos a una esfera rugosa. Su reproducción en el hospedero es mediante fisión binaria; en cultivo se pueden producir cuatro células hijas. A la fecha no se ha observado reproducción sexual en el género *Symbiodinium*.

Diferentes caracteres han sido empleados para la clasificación de *Symbiodinium*, entre ellos se incluye su morfología, número de cromosomas, tamaño de la célula, etc. Sin embargo, mediante el uso del gen ribosomal 18S, se ha podido dividir a *Symbiodinium* en varios clados desde el A hasta el I (Pochon y Gates, 2010; Loh et al., 2001).

Las comunidades de *Symbiodinium* pueden cambiar dependiendo de la etapa de desarrollo de un organismo, o bien por diferentes factores abióticos tales como: profundidad, temperatura, luz, turbidez (Oliver y Palumbi, 2009; Reich et al., 2017). En general con algunas excepciones, el clado C es el más ampliamente distribuido ya que cuenta con una amplia tolerancia a las altas temperaturas y salinidad, dominando el área tropical; por otro lado, algunos filotipos del clado B están adaptados a poca luz, mares fríos y medio ambientes con altitudes elevadas (Stambler, 2011).

1.5 Simbiosis dinoflagelado-cnidario

Seis fases se han destacado durante el proceso de simbiosis entre ellas: el contacto inicial alga-cnidario, fagocitosis, clasificación del simbiote, proliferación dentro del hospedero, estabilidad de la simbiosis así como su rompimiento (Davy et al., 2012). Aún no se han elucidado completamente las rutas moleculares en cada uno de los procesos mencionados anteriormente, pero se han propuesto diferentes moléculas involucradas.

Durante el mecanismo de especificidad se han sugerido dos posibilidades, la primera que la especificidad es mediada a través de una interacción ligando-receptor en la superficie de la célula hospedera y el alga; y la segunda menciona que la especificidad es el resultado de una serie de interacciones entre el alga y la célula hospedera, culminando en la persistencia de un tipo particular de alga, siendo este proceso no específico (Colley y Trench, 1983). Se ha evidenciado que proteínas tales como lectinas y glicanos (Wood-Charlson et al., 2006), así como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), están involucrados en el reconocimiento entre la asociación simbiote-hospedero (Ocampo y Cadavid, 2014).

La simbiosis dinoflagelado-cnidario requiere de una compleja red de interacciones bioquímicas entre el hospedero y el simbiote, donde el hospedero deberá reconocer al dinoflagelado compatible para establecer la simbiosis y a su vez, el simbiote debe responder a las señales emitidas por el huésped para encontrarlo y establecerse en él mediante vesículas especializadas denominadas simbiosomas (Wakefield y Kempf, 2001). Durante el mantenimiento de la simbiosis, Weis y Levine (1996) identificaron que la enzima anhidrasa carbónica se sobreexpresa en estado simbiótico comparado con organismos aposimbióticos en *Anthopleura elegantissima*; este trabajo sugiere que la enzima anhidrasa carbónica está involucrada en el transporte de carbono inorgánico del hospedero al simbiote. Otra proteína que ha sido reportada como involucrada en la regulación y mantenimiento de la simbiosis es sym32 (Reynolds et al., 2000).

La pérdida de la simbiosis en el sistema coralino cnidario-alga tiene como consecuencia el fenómeno denominado como blanqueamiento; que potencialmente deriva en la muerte del coral (Hoegh-Guldberg et al., 2007). Weis (2008) y Banaszak y Trench (1995) mencionan diferentes tipos de estresores los cuales pueden intervenir para que se rompa la simbiosis; entre ellos,

cambios en la salinidad, radiación UV, altas tasas de sedimentación, contaminantes y metales pesados. Análisis de la expresión de genes en *Acropora palmata* bajo estrés térmico mostraron una pérdida de simbionte entre 50 y 70%, y una expresión diferencial de proteínas (DeSalvo et al., 2010). Del mismo modo, estrés térmico aplicado a la anémona *Anthopleura elegantissima* mostró diferencias en la expresión de genes comparado con el control sin estrés; entre éstos, se destacan los que codifican para proteínas del citoesqueleto, proteínas catalíticas y reguladoras de procesos biológicos y de biosíntesis (Richier et al., 2008).

1.6 Proteína RACK1

RACK1 (Receptor de la Cinasa C Activada) fue inicialmente identificado como un receptor para la Cinasa C Activada (PKC) en células de mamíferos; sin embargo, actualmente es vista como una proteína multifuncional que juega diversos papeles reguladores en diferentes rutas de transducción de señales (Guo et al., 2009; Islas-Flores et al., 2015). RACK1 no muestra actividad enzimática; sin embargo, se conoce ampliamente su papel como proteína de andamiaje (Usacheva et al., 2003). La proteína RACK1 se ha detectado únicamente en eucariotas y tiene un alto grado de conservación a nivel aminoácido (Patiño-González et al., 2014); pertenece a la familia de proteínas WD40 y posee un peso aproximado de 36 kDa. Su estructura tridimensional se compone de siete láminas β las cuales forman una β -hélice o propela; gracias a esta conformación se facilita su unión a diferentes proteínas (Li y Roberts, 2001). Se ha evidenciado que la proteína cinasa Src potencialmente fosforila a RACK1 en los residuos Y228 y Y246 en el dominio WD-6 (Chang et al., 2001); y la cinasa c-Abl fosforila el residuo Y52. La falta de esta modificación puede inhibir la unión de las proteínas que se le asocian (Kiely et al., 2009).

1.7 RACK1 y sus ligandos

RACK1 se ha catalogado como un receptor en diversas rutas de señalización, ya que es capaz de unirse a diferentes ligandos (Cuadro 1). En mamíferos, RACK1 regula varios procesos tales como: propagación celular, contacto célula-célula, síntesis de proteínas, migración celular, coordinación de la señalización, transcripción, apoptosis, estimulación de la traducción y estrés celular (Nilson et al., 2004).

Cuadro 1. Proteínas de unión a RACK1

Proteína	Abreviatura	Método de identificación del ligando	de	Función	Sitio de unión	Referencia
Proteína Cinasa C	PKC	Western blot, IM		Movilidad, organización celular, apoptosis.	aa 107-113 y aa 234-241	Ron et al., 1994; Stebbins y Mochly-Rosen, 2001.
Proteína asociada a membrana inhibida por TGF- β	TIMAP	GST-pull-down/ IM		Señalización celular.	WD 1-4	Boratko et al., 2013.
Receptor andrógeno	de AR	Sistema híbrido	de doble	Proliferación y diferenciación celular.	aa 559-918	Rigas et al., 2003.
Cinasa Adhesión Focal	de FAK	IM		Migración celular	WD1-3	Kiely et al., 2009.
Proteína heterotrimérica (β - γ)	G $G\beta\gamma$	Sistema híbrido	doble	Señalización celular	aa 1-207	Dell et al., 2002.
Fosfatidilesterasa tipo 4 subfamilia D isoforma 5	PDE4D5	IM		Organización celular y movilidad	aa 35-48 y 99-108	Bird et al., 2010.
Receptor proteína morfogenética hueso tipo II	de BMPRII	Sistema híbrido, pull-down e IM	doble	Proliferación y diferenciación celular	aa 156-301	Zakrzewicz et al., 2007.
Src	Src	Sistema	doble	Señalización	aa 222-	Chang et

			híbrido, IM		celular, adhesión celular, transporte y regulación del ciclo celular	270	al., 2002.
Integrina $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$	ITG $\beta 1$		Sistema híbrido, IM	doble	Organización celular	WD 5-7	Liliental y Chang, 1998. Lee et al., 2002
Inhibidor de la proteína activada STAT2	PIAS2		Sistema híbrido, IM, IF	doble	Regulación y organización celular	WD 5-7	Zheng et al., 2012
Proteína tirosina fosfatasa	PTP μ		Sistema híbrido, IM	doble	Adhesión celular	N.D.	Mourton et al., 2001.
Proteína complejo amplio	BR-C		Sistema híbrido, down, IM	doble pull-	Metamorfosis , diferenciación celular	N.D.	Cheng et al., 2014.
Transportador de Dopamina	DAT		Sistema híbrido, down	doble pull-	Regulador de la proteína cinasa C, transporte celular	N.D	Lee et al., 2004.
Más de 80 ligandos			pull-down, sistema híbrido, 9.0.	IM, doble String	Regulación del ciclo celular, señalización, movilidad celular, traducción.	WD 1-7	Gandin et al., 2013. Schechtman y Mochly- Rosen, 2001.

N.D.- No determinado; IF.-Inmunofluorescencia; IM.- Inmunolocalización.

Diversas investigaciones han elucidado experimentalmente algunas funciones de la proteína RACK1; por ejemplo, Kardmas y colaboradores (2007), sugirieron que RACK1 está implicada en la producción de gametos en *Drosophila*; en el modelo simbiótico *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*, el silenciamiento de *PvRACK1* afectó el proceso de nodulación, alterando el número y morfología de los nódulos y más aún, a nivel subcelular, se observaron efectos negativos en el simbiosoma, la organización bacteriana y la matriz citoplasmática, lo cual demostró que *PvRACK1* es esencial en la formación del simbiosoma (Islas-Flores et al., 2011). En *Hydra vulgaris* (*HvRACK1*) se detectó el transcrito principalmente en áreas de alta división celular como los brotes, concluyendo que su función está directamente relacionada con la proliferación celular donde su expresión es abundante. (Hornberger y Hassel, 1997).

1.8 Proteína Cinasa C

La actividad de la proteína cinasa C (PKC) se descubrió en 1977 por el grupo de Nishizuka (Kresge et al., 2010), como una proteína cinasa capaz de fosforilar histonas; posteriormente, se encontró que era activada mediante segundos mensajeros como diacilglicerol y calcio (Kikkawa y Nishizuka, 1986). Desde entonces se han descrito doce isoformas diferentes, cada una denotada con una letra griega y en el caso de la isoforma Beta, ésta es seguida por un número I y II (Stockoe, 2000). La isoforma Beta deriva de un mismo gen y debido a que un splicing alternativo da lugar a 2 transcritos que difieren en 216 nucleótidos extra en la región carboxilo terminal de la isoforma β II comparado con la isoforma β I; por otro lado, la expresión de β II es 8 veces mayor que su contraparte β I (Ono et al., 1986).

La Proteína Cinasa C se ha implicado como un elemento clave en diversos procesos de transducción de señales (Davis et al., 1989). Se define como una familia de enzimas que fosforila residuos de serina y treonina, que se expresan ubicuamente y por ende, están implicadas en múltiples funciones celulares (Amadio et al., 2006). Algunas de las proteínas blanco de PKC se enlistan en la Figura 3. Algunas isoformas se expresan de forma tejido y compartimento específico; por ejemplo, PKC γ se expresa solo en cerebro y espina dorsal (Nishizuka, 1998; Newton, 2005).

En general, se sabe que las células expresan más de una isoforma de PKC. Las diversas isoformas se dividen en tres categorías, con base en su estructura primaria y el cofactor que requieren para

su activación (Newton, 1995). Las isoformas llamadas clásicas (α , β I, β II, γ) requieren fosfatidilserina (PS), calcio (Ca^{2+}), diacilglicerol (DAG) o ésteres de forbol (PMA) como activadores, y para su completa activación requieren la fosforilación en el residuo T497 en la isoforma α o T500 en el caso de la β ; en tanto, las novedosas (δ , ϵ , η , θ , σ) emplean para su activación solo DAG y PS. Finalmente, las atípicas (ζ , ι , λ) requieren únicamente PS (Steinberg, 2008).

La secuencia de PKC muestra cuatro dominios altamente conservados (C1-C4) intercalados por cinco regiones variables (V1-V5). Los dominios C3 y C4 contienen secuencias conservadas en todas las PKC's (Pears, 1995); los dominios C1 y C2 conforman la región reguladora donde se da la interacción con el activador. Los dominios C3-C4 forman la región catalítica, la cual es responsable de la actividad cinasa y la unión al sustrato (Ron y Kazanietz, 1999). Parte de los dominios C2 (aa 175-289) y V5 (aa 622-673) evidencian el sitio de unión a la proteína RACK1 (Stebbins y Mochly-Rosen, 2001).

La PKC normalmente se encuentra inactiva; la activación bioquímica de PKC se regula por tres eventos: maduración, activación catalítica y elección del sitio blanco (Shirai y Saito, 2002).

Esta cinasa participa en procesos celulares tales como: flujo de iones, liberación de neurotransmisores, proliferación y diferenciación celular, expresión génica, metabolismo, apoptosis y sobrevivencia entre otros (Black y Black, 2013; Kawakami et al., 2002; Talman et al., 2016).

En *H. vulgaris*, se han caracterizado dos isoformas de PKC pertenecientes a la clasificación de clásicas; estas muestran una identidad del 50 al 70% a nivel aminoacídico comparado con PKC de vertebrados. Se observó mediante hibridación *in situ* que el transcrito de *PKC* tiene una alta expresión durante las etapas tempranas en la morfogénesis de cabeza y tallo en el desarrollo de *H. vulgaris* (Hassel et al., 1998).

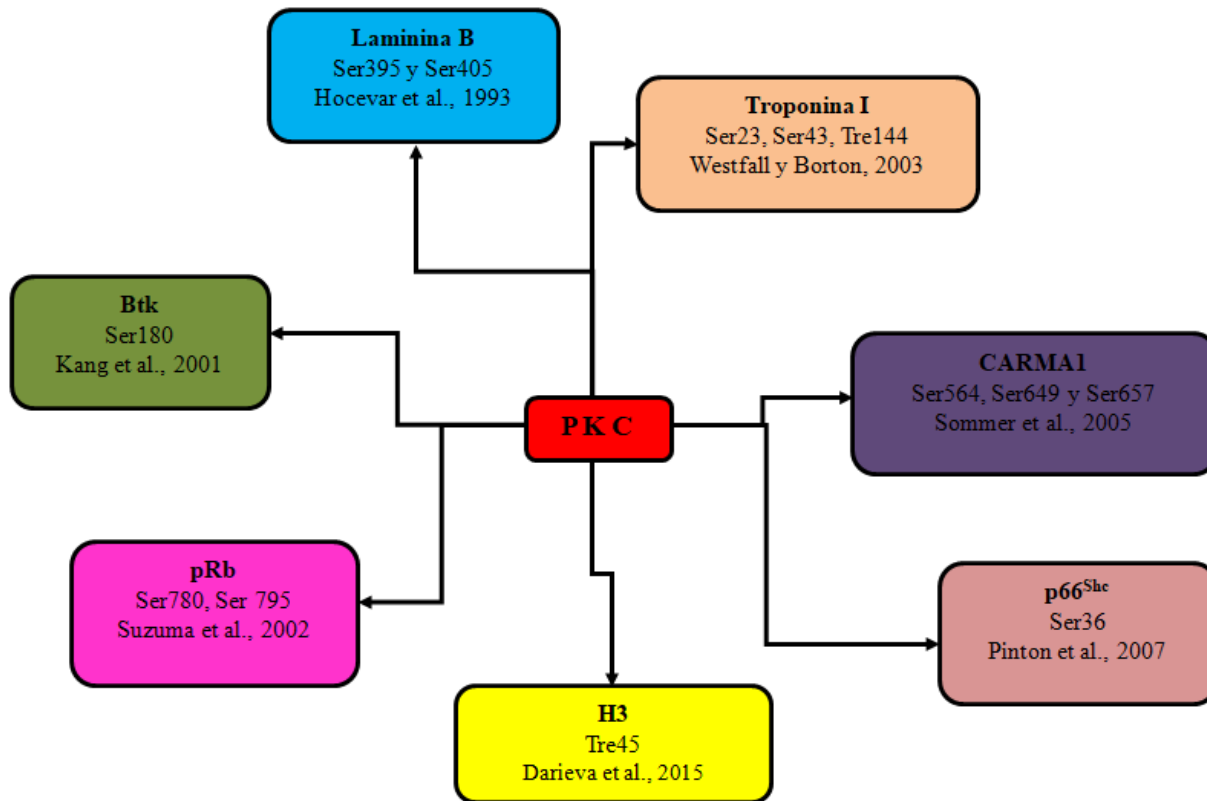


Figura 3. Proteínas blanco fosforiladas por PKC. Se muestran algunas de las proteínas comprobadas experimentalmente como blanco de PKC así como los residuos fosforilados. Abreviaturas.- Btk.- tirosina cinasa de Bruton; pRb.- Proteína de Retinoblastoma; H3.- Histona 3; p66^{Shc}.-proteína de 66 kDa que contiene dominios de homología a Src; CARMA.- Proteína asociada a membrana conteniendo dominios de reclutamiento de caspasas.

1.9 Las interacciones entre RACK1 y PKC son fundamentales para señalización celular

La interacción entre RACK1 y PKC es un común denominador en cascadas de señalización subyacentes a procesos celulares clave. Por ejemplo, la unión de RACK1 en la región citoplasmática de la integrina $\beta 2$ promueve el reclutamiento de PKC, la cual fosforila los residuos T758-T760 y S745 de la integrina promoviendo las adhesiones celulares y la propagación celular (Liliental y Cheng, 1998; Fagerholm et al., 2002). Por otro lado, en el desarrollo embrionario de pollo RACK1 y PKC son factores indispensables para la formación de las alas ya que la inhibición de PKC produce fenotipos de alas truncadas, y ambas proteínas se encuentran colocalizadas (Lu et al., 2001). En otros modelos, RACK1 moviliza a PKC para que ésta fosforile a la cinasa JNK en el residuo S129, disparando una cascada de señalización desatada por estímulos de estrés tales como radiación UV (López-Bergamini et al., 2005). Finalmente, en

células de gusano de seda (BmN4) la activación del complejo de amplio espectro (BR-C) es dependiente de la fosforilación por PKC en los residuos S373 y T406, donde PKC es reclutada por RACK1. Esta intercomunicación dispara la cascada de señalización para la producción de la hormona juvenil y ecdisona, las cuales son clave para el desarrollo y crecimiento de insectos (Cheng et al., 2014). Como se puede observar, existen numerosas evidencias que indican que la asociación RACK1-PKC es fundamental para procesos de señalización y es altamente probable que también participe en las cascadas de transducción de señales que ocurren en los procesos celulares de *C. xamachana*, tanto a nivel fisiológico, como en su transición a holobionte.

JUSTIFICACIÓN

La simbiosis es una relación fundamental en el ciclo de vida de los cnidarios, entre ellos la medusa *Cassiopea xamachana* representa un modelo ideal para estudios de transducción de señales pues presenta varias etapas pre y post simbióticas. Además se puede inducir la metamorfosis de pólipo a medusa mediante la adquisición del simbionte o el tratamiento con inductores químicos.

Se ha visto en otros sistemas que RACK1 es fundamental para la integridad del simbiosoma.

A pesar de ser claves en mecanismos de señalización, la caracterización bioquímica y funcional de RACK1 y PKC, que son proteínas centrales en múltiples vías de transducción de señales, no se ha llevado a cabo en ningún organismo que participe de la endosimbiosis dinoflagelado-cnidario.

HIPÓTESIS

RACK1 es una proteína central en las vías de señalización ya que se une a diversos ligandos que incluyen a la PKC, lo cual permite fosforilarlos dependiendo del estímulo celular. Adicionalmente, se ha demostrado que RACK1 es crítica para la estabilidad del simbiosoma en otros sistemas. Dado lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis:

RACK1 deberá participar activamente expresándose de manera distinta y/o uniéndose de manera diferencial a PKC para que ésta fosforile ligandos relevantes dentro de distintas vías de transducción de señales antes, durante y después del establecimiento de la simbiosis en *Cassiopea xamachana*.

OBJETIVO GENERAL

Identificación y caracterización de RACK1, PKC y su expresión en la medusa *Cassiopea xamachana*, así como su asociación diferencial en función de la simbiosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer de manera reproducible los parámetros para inducir el cambio de estadio de pólipo a éfira (medusa) mediante estímulos químicos.
- Identificación molecular de RACK1 y PKC.
- Determinar la expresión de *RACK1* y *PKC* en el hospedero.
- Determinar la existencia de asociaciones diferenciales de RACK1 con PKC en función de las etapas pre y post simbiótica en *Cassiopea xamachana*.
- Proponer un modelo del papel de RACK1 y PKC dentro de las vías de transducción de señales que subyacen a los cambios morfológicos durante la diferenciación de *Cassiopea xamachana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material biológico

Medusas adultas se colectaron en dos zonas de manglar; inicialmente en la laguna Nichupté a la altura de Punta Nizuc, Cancún, Quintana Roo (21°01'53.40N–86°48'06.76'O) y posteriormente en Punta Allen, Quintana Roo (19°47'59N-87°28'35'O). La captura fue realizada con el apoyo de una red de rastreo acuática. Otros especímenes adultos fueron donados por el Parque Xcaret. Las medusas colectadas fueron transportadas en hieleras con agua de mar y mantenidas en un estanque con circulación constante de agua. Posterior a la colecta se identificó el sexo de las medusas de manera visual. De las medusas hembra se obtuvieron larvas sexuales, mediante su aspiración de la parte central de la medusa adulta con el empleo de pipetas Pasteur. Las larvas sexuales se colocaron en tubos Falcon de 50 ml con agua de mar artificial Instant Ocean® para enjuagarse con el objetivo de remover el moco y simbionte adherido, luego fueron centrifugadas a 500 *xg* por 5 min en 3 ocasiones, el agua fue eliminada y las larvas fueron congeladas a -70°C hasta su utilización.

Algunos pólipos fueron donaciones del Acuario de Veracruz A.C. y el Parque Xcaret, los cuales fueron mantenidos en placas de Petri de 90 x 15 mm con agua de mar artificial bajo condiciones de obscuridad a una temperatura de 26°C y alimentados con nauplios de *Artemia salina* al menos dos veces a la semana y un día posterior a la alimentación las placas fueron limpiadas mediante el recambio de agua y la eliminación de los nauplios que no fueron consumidos.

2.- Extracción de ácidos nucleicos

2.1. Extracción de ADN genómico

Se llevó a cabo mediante el protocolo de Hroudova et al. (2012). Dos tentáculos de medusa se lavaron 3 veces con 100 ml de agua de mar artificial filtrada, los cuales se homogenizaron en un homogenizador Dounce (cat. 7727-15); la muestra se centrifugó a 2,600 *xg* durante 5 min a 4°C. Una alícuota de la pastilla y el sobrenadante se analizaron en el microscopio bajo luz blanca y el filtro para Texas Red con el objetivo de identificar la autofluorescencia del simbionte. El sobrenadante de los tentáculos se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml con 5 ml de Buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1 % y Proteinasa K 1.25

mg/ml). La mezcla se homogenizó en el Buffer de extracción mediante inversión e incubó a 55°C durante toda la noche.

Posteriormente, se adicionó NaCl a una concentración final de 1.7 M, dicha mezcla se homogenizó mediante una agitación en vórtex por 2 min a velocidad máxima, luego se realizó una centrifugación por 10 min a 14,000 *xg*, el sobrenadante fue tomado y el ADN se precipitó con un volumen de isopropanol durante 4 h a -20°C. La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 80 % y finalmente se resuspendió en 50 µl de Buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM). El ADN genómico se visualizó mediante geles de agarosa a una concentración del 1%.

2.2.- Extracción de ADN plasmídico

Las clonas transformantes se crecieron en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) a 37°C durante 12 h con agitación constante. Al medio de cultivo se le adicionó el antibiótico específico de acuerdo al vector empleado tales como: ampicilina 100 µg/ml con las clonas con el vector pGEM T-Easy y pGADT7, cloranfenicol 34 µg/ml con el uso del vector PCRT7-NT y kanamicina 50 µg/ml con el vector pGBKT7. El ADNp fue extraído con el uso del kit GeneJET plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.3.- Extracción de ARN

Se realizó teniendo como base el protocolo de Fenol caliente publicado por Pawlowski et al. (1994) iniciando con 4 g de campana de medusa. Todo el material empleado se trató con DEPC 0.1%. El tejido se homogenizó en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se depositó en un tubo de 50 ml al cual se le añadieron 4 ml de la mezcla 1:1 fenol y buffer de extracción de RNA (LiCl 100 mM, SDS 1 %, Tris-HCl 100 mM pH. 9 y EDTA 10 mM previamente calentado a 95°C). Dicha mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 2 min y se centrifugó a 14,000 *xg* durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante se le adicionó un volumen de cloroformo, seguido de una agitación mediante vórtex y dicha mezcla se centrifugó por 5 min a 14,000 *xg* a 4°C. La fase acuosa se tomó y precipitó mediante la adición de LiCl 8 M hasta tener una concentración final de 2 M, y posteriormente se dejó toda la noche a -20 °C. Se continuó el procedimiento con una centrifugación a 14,000 *xg* por 20 min a 4 °C, la pastilla se lavó con etanol absoluto y después se centrifugó a 14,000 *xg*, la pastilla obtenida se suspendió en 500 µl de 0.3 M acetato de sodio pH 5.8. El sobrenadante fue tomado y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante 2 h

a 4°C. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación por 10 min a 14,000 xg y la extracción se finalizó con la resuspensión del sedimento en 10 μl de agua miliQ tratada con DEPC. Al finalizar, la muestra fue cuantificada en el espectrofotómetro Eppendorf a través de la relación de absorbancia A260/A280 y las muestras fueron visualizadas en gel de agarosa al 1 %.

La extracción del ARN para el ensayo de PCR punto final se llevó a cabo con el protocolo anteriormente descrito, para este propósito se emplearon larvas sexuales, pólipos, estróbilos, éfiras, tejido de campana y tejido del tentáculo.

Las larvas sexuales se tomaron de las medusas adultas, y posteriormente se les dio una centrifugación a 500 xg por 5 min con el objetivo de bajar las larvas al fondo del tubo (ya que una vez liberadas de la madre, las larvas comienzan a nadar). El agua fue eliminada rápidamente y las larvas se enjuagaron en 3 ocasiones con agua de mar artificial filtrada para eliminar el simbionte adherido a las larvas. La pastilla final con las larvas fue pesada. Para los estadios de pólipos y estróbilos se emplearon 200 organismos por cada extracción. En el caso de las éfiras se usaron 300 individuos. Los tejidos de la campana y los tentáculos se cortaron con tijeras y se enjuagaron con agua miliQ. En promedio se usaron 4 g de tentáculo y 3 g de campana para cada extracción. Una vez finalizada la extracción del ARN, el ADN genómico se eliminó mediante un tratamiento con el kit DNase max (Qiagen). Después el ARN fue reextraído con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), la fase acuosa se retuvo y el ARN se precipitó con etanol absoluto durante 2 h a -20°C. Finalmente se llevó a cabo una centrifugación a 14,000 xg y la pastilla fue resuspendida en 10 μl de agua miliQ y cuantificada en un espectrofotómetro Eppendorf bajo la relación de absorbancia A260/A280.

2.4 Síntesis de cADN

Una vez comprobada la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificación, se efectuó la síntesis de cADN. A partir de el ARN total obtenido (varía en la concentración dependiendo del estadio) se le añadieron 0.5 μg de oligonucleótido específico al objetivo del experimento. El empleo de los oligonucleótidos dTT, UAP se utilizó para la síntesis de cADN con énfasis en la región 3'; o bien el oligonucleótido Rack1-3'-2F para llevar a cabo la amplificación del transcrito antisentido. Cuando fue necesario se agregó a la mezcla agua miliQ estéril tratada con DEPC para completar un volumen final de 12 μl . Esta mezcla se incubó

durante 5 min a una temperatura de 65°C. Posteriormente se continuó con la adición de 4 µl de Buffer de Reacción RevertAid Reverse Transcriptase (5X), 0.5 µl de RiboLockRNase (inhibidor de RNAsas), 2 µl de dNTPS (10 mM cada uno) y 200 unidades de enzima (RevertAid Reverse Transcriptase); dicha mezcla se agitó mediante vórtex. El producto resultante se incubó a una temperatura de 42°C durante 60 min seguido de un ciclo final de 70°C por 10 min con el objetivo de inactivar la enzima. El cADN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

3. Diseño de oligonucleótidos

A partir de diferentes bases de datos las secuencias de *RACK1* así como del Factor de elongación 1 alfa (*FE1α*) correspondientes a cnidarios y/o especies relacionadas (Cuadro 2 y 3), se realizó un alineamiento múltiple con el programa UGENE v.1.12.3.

En el caso de *PKC*, el borrador del transcriptoma de *Cassiopea* fue facilitado por el laboratorio de la Dra. Mónica Medina de la Universidad de Pennsylvania y de este transcrito se identificó la secuencia hipotética correspondiente a *PKC* Beta y se generó un conjunto de oligonucleótidos descritos en el Cuadro 4.

Cuadro 2. Secuencias obtenidas para diseño de oligonucleótidos de RACK1

Organismo	No. de acceso
<i>Hydra vulgaris</i>	X97800.1
<i>Hydra magnipapillata</i>	NM_001287799.1
<i>Nematostella vectensis</i>	XM_001631734.1
<i>Acropora digitifera</i>	EZ012110
<i>Dario renio</i>	AF025330.1
<i>Aurelia aurita</i>	No liberada

Cuadro 3. Secuencias de organismos correspondientes al Factor de elongación 1 alfa

Organismo	No. de acceso
<i>Cladonema radiatum</i>	AY542532.1
<i>Podocoryne carnea</i>	AJ549292.1
<i>Malo kingi</i>	EU878256.1
<i>Aurelia aurita</i>	KC341734.1
<i>Chironex fleckeri</i>	FJ460241.1

A los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del marco de lectura abierto de *CxRACK1* (ATG-CX y STOP-CX) se les añadió el sitio de reconocimiento de las enzimas *Bam*H1(verde) al oligonucleótido ATG-CX y *Eco*R1 (rojo) en el oligonucleótido STOP-CX, con el objetivo de facilitar la subclonación en el vector de expresión. Los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo se encuentran detallados en el Cuadro 4.

Para el ensayo de hibridación *in situ* se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de *CxRACK1* de 688 pb. A dichos oligonucleótidos se les añadió en los extremos, las secuencias de reconocimiento de las ARN polimerasas T7 en el oligonucleótido sentido y SP6 al antisentido (ver Cuadro 4 donde los sitios de reconocimiento de las polimerasas se muestran subrayados). Se generó la sonda antisentido (complementaria al ARN mensajero) así como la sentido (control negativo). En el caso de *PKC* a partir de la construcción clon-*CxPKC-C2* se amplificó el fragmento de la sonda con el empleo de los oligonucleótidos SP6 y T7; los cuales flanquean los extremos del vector donde se encuentra el inserto de *PKC* (ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo

<i>RACK1</i> (1)F	5' GTG GAA CAC TAA AAG GCC ATA ATG G 3'
<i>RACK1</i> (3) R	5' CCA GAA AGT GCA AAC TGA CCA TC 3'
ATG-CX	5' <u>GGA TCC</u> ATG GGC GAA CAA ATG ACA TTG AAAG 3' 5' <u>GAA TTC</u> TTA TGC TTT CTT GTA CTT GCC AAA C 3'
STOP-CX	En azul se señala el sitio de corte de la endonucleasa <i>Eco</i> RI
<i>Rack1</i> -3'-1F	5' CTC GTG ACA AAA CAT TGA TCC TCT GGG 3'
<i>Rack1</i> -3'-2F	5' GGT ACC CCA AAA AAG TGC TTC AAG GG 3'
<i>Rack1</i> -5'-1R	5' CAA GAG AGA ATT TGG TCT GGC GTT TGC 3'
<i>ASRack1</i> -184-R	5'GGT CCA GTA GCA GCA CAC AAC CAA TAT CTG 3'
UAP	5' GGCCACGCGTCG ACT AGT ACT TTT TTTTTTTTTTTT 3'
dT	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
PF- <i>RACK1</i> -Fwd	5' TGT TGG TCA CAC AAA GGA TGT TCT CAG T 3'
PF- <i>RACK1</i> -Rev	5' AGA CAC AGT GAC AGT ATT CAG GTA GCCA 3'
2YH- <i>RACK1</i> -F	5' G <u>GA ATC</u> CGT ATG GGC GAA CAA ATG AC 3'

2YH-RACK1-R	5' <u>GTC GAC</u> TTA TGC ATT TCT TGT AAC TTG CC 3'
T7RACK1-Fwd	5' <u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGCAAACGCCAGACCAAATTCT 3'
SP6RACK1-Rev	5' <u>ATTTAGGTGACACTATAG</u> TTG GTC CAG TAG CAG CAC AC 3'
FE1 α Cx-229-255F	5'GTT GTC ATT GGT CAC GTC GAC TCT G 3'
FE1 α Cx-1277-1302R	5' CAC CGG GAT GGT TCA AGA TGA TGA C 3'
PF-FE α 1-Fwd	5' CCT CCA TAC TCT GAA CCA AGG TTT AAT G 3'
PF-FE α 1-Rev	5' CCA ATT CCA CCA ATC TTG TAT ACA TCC TG 3'
PF-PKC-Fwd	5' GTG ATC ATT GTG GGT CTC TAC TGT ATG G 3'
PF-PKC-Rev	5' TCT CTT TCT CAG GAT CAG GCT TCA GCT 3'
ATG-PKC	5' ATG AGT GAT TCA AAG AGT ATA AC 3'
PKC-684-Fwd	5' CTA AGC TAT GTG GCG CAG ATC ACA CC 3'
PKC-1114-Rev	5' ATT CGC CGT TGC TCT GTC CCA GTC 3'
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
Rubisco II-Fwd	5' TTC TCC GCC AAC ATA AC(t/c) GC 3'
Rubisco II-Rev	5' AG(a/g) TTC TCG AAG AAG GC (c/t) GC 3'

En verde se señala el sitio de reconocimiento de la enzima *Bam*HI, en rojo el sitio de corte de la enzima *Eco*RI y en azul el sitio de reconocimiento de le endonucleasa *Sal*I.

4.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.1.- Amplificaciones mediante PCR

Las diferentes amplificaciones se realizaron en general con los siguientes reactivos y concentraciones: como templado se utilizaron 100 ng de ADN genómico y/o cADN, a los cuales se les agregó la siguiente mezcla de reacción: 3 μ l de Buffer 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.8, KCl 500 mM), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 160 μ M, oligonucleótidos sentido y reversa 160 μ M de cada uno y *Taq* ADN Polimerasa 1 U (Thermo Scientific), dicha mezcla se llevó a un volumen final de 30 μ l mediante la adición de agua miliQ. Las condiciones de PCR para cada juego de oligonucleótidos se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Oligonucleótidos y condiciones de PCR para las distintas amplificaciones

Oligonucleótidos empleados	Condiciones de PCR
<i>RACK1</i> (1)F y <i>RACK1</i> (3) R	Un ciclo inicial de 94°C durante 3 min 40 ciclos: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 40 s y una extensión final de 72°C por 10 min.
<i>RACK1</i> -3'-1F y UAP/dT	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min 40 ciclos: 95°C por 45 s, 55°C por 50 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.
<i>RACK1</i> -3'-2F y UAP/dT	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 1 min, 51.6°C hasta 61.5°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.
<i>RACK1</i> -3'-1F y <i>RACK1</i> -5'-1R	Un ciclo de 95°C durante 3 min, 39 ciclos: 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min.
<i>RACK1</i> -3'-2F y <i>RACK1</i> -5'-1R	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 39 ciclos: 95°C por 30 s, gradiente 51.6°C por 50 s, 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min.
ATG-CX y STOP-CX; 2YH- <i>RACK1</i> -F y 2YH- <i>RACK1</i> -R	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 40 s, gradiente 50 a 61.6°C por 50 s, 72°C por 1 min, una extensión final de 72°C por 10 min.
T7 <i>RACK1</i> -Fwd y SP6 <i>RACK1</i> -Rev	Un ciclo de 95°C por 3 min; 40 ciclos de 95°C por 40 s, 60°C por 45 s, 72°C por 1 min; un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min.
<i>FE1α</i> Cx-229-255F y <i>FE1α</i> Cx-1277-1302R	Un ciclo de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 41 min, 53°C, 55°C y/o 57°C por 1 min, 72°C por 1:30 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min
PF- <i>FE1α</i> -Fwd y PF- <i>FE1α</i> -Rev	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 30 s, 60°C por 30 min, 72°C por 30 s y

	una extensión final de 72°C por 5 min.
PF- <i>RACK1</i> -Fwd y PF- <i>RACK1</i> -Rev	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 72°C por 5 min.
PF- <i>PKC</i> -Fwd y PF- <i>PKC</i> -Rev	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 72°C por 5 min.
<i>PKC</i> -684-Fwd y <i>PKC</i> -1114-Rev	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, 40 ciclos: 95°C por 50 s, 52°C por 1 min, 72°C por 45 s y una extensión final de 72°C por 5 min
ATG- <i>PKC</i> y <i>PKC</i> -1114-Rev (Oligonucleótidos que amplifican el Dominio C2 de <i>PKC</i>)	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min 40 ciclos de 95°C por 1min, 50°C por 1 min, 72°C por 1min y una extensión final de 72°C por 10 min.
SP6 y T7	Un ciclo inicial de 95°C durante 3 min 40 ciclos de 95°C por 1min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.
<i>Rubisco II</i> -Fwd <i>Rubisco II</i> -Rev	Un ciclo de 94°C por 3 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 8 min (Rowan et al., 1996)

4.2. Purificación de los fragmentos amplificados

Las amplificaciones mediante PCR y los productos de las digestiones enzimáticas se separaron en un gel de agarosa al 1% y la banda de interés se cortó y purificó mediante el uso del kit Wizard SV Clean Up de Promega®.

5. Digestiones enzimáticas

El ADN plasmídico se sometió a diferentes digestiones con las enzimas *EcoRI* (Fermentas), *BamHI* (Promega) y *SalI* (Jena Scientific). Una reacción típica de digestión consistió de 100 ng de ADN plasmídico, 2 µl de Buffer, 10 unidades de enzima y agua miliQ hasta obtener un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó durante toda la noche a 37°C.

Los vectores PCRT7-NT y pGADT7, así como las construcciones clon-Cx*RACK1* y clon-Cx*PKC-C2* se cortaron con la endonucleasa *EcoRI*; por otro lado, el vector pGBKT7 y la construcción Clon-Cx*RACK1* fueron digeridos con las enzimas *BamHI* y *SalI*.

6. Electroforesis en gel de agarosa

Las extracciones de ADN, ARN, las restricciones enzimáticas y las amplificaciones mediante PCR, se visualizaron en geles de agarosa al 1 % y 2 % según el tamaño de amplificación esperado, en un buffer de corrida TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM), y 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilene cyanol 0.25%, glicerol 30% en el colorante fotoreactivo Biotium®). Como referencia se emplearon los marcadores de peso molecular 1 Kb DNA Ladder y Generuler 100 pb (Fermentas®). Los ácidos nucleicos fueron visualizados en geles de agarosa, en el cual se cargaron 5 µl de los productos de PCR, 3 µl de ADN genómico, 2 µl de ARN y 10 µl de las reacciones de digestión. La electroforesis se corrió a 80 V durante 40 min, para posteriormente visualizarse en un transiluminador.

7. Ligación de las amplificaciones y/o digestiones

Las amplificaciones de *RACK1* y/o *PKC* se ligaron a diferentes vectores entre ellos el vector de clonación pGEM® T-Easy (Promega), el vector de expresión pCRT7-NT (Invitrogen), el vector pGBKT7 y/o pGADT7 (Clontech), según el propósito de cada experimento (ver Cuadro 6). Para dichas reacciones se emplearon 5 µl de Buffer de ligación 10X, 50 ng de vector, la cantidad de inserto necesaria para mantener una relación molar 3:1, y 3 unidades de T4 ligasa (Promega®), hasta un volumen final de 10 µl. La reacción de ligación se mantuvo durante toda la noche a 4°C y posteriormente se siguió con el ensayo de transformación.

Cuadro 6. Construcciones desarrolladas en el presenta trabajo

Vector	Inserto	Nombre de la quimera	Función
pGEM T-Easy	ORF- <i>RACK1</i>	clon-Cx <i>RACK1</i>	Mantenimiento y replicación del marco de lectura de <i>CxRACK1</i> .
pGEM T-Easy	Dominio C2 de <i>PKC</i>	clon-Cx <i>PKC</i> -C2	Mantenimiento y replicación del inserto. Generación de sonda para ensayo de hibridación <i>in situ</i> .
PCRT7-NT	ORF- <i>RACK1</i>	Exp-Cx <i>RACK1</i>	Expresión de la proteína <i>RACK1</i> en <i>E. coli</i>
pGADT7	Dominio C2 de <i>PKC</i>	2YH- <i>PKC</i> -Presa	Expresión del fragmento C2 de <i>PKC</i> en <i>S. cerevisiae</i> para el ensayo de doble híbrido de levadura.
pGBKT7	ORF- <i>RACK1</i>	2YH- <i>RACK1</i> -Carnada	Expresión de <i>CxRACK1</i> en <i>S. cerevisiae</i> para el ensayo de doble híbrido de levadura.

7.1 Transformación en *E. coli*

El producto de la ligación se transformó en células químico competentes de *E. coli* Top10 y/o DH5 α o bien en el caso de expresión, se emplearon células Rosetta o BL21 (DE3) pLysS. Dicha transformación se llevó a cabo mediante un choque térmico a 42°C durante 1 min, las células se incubaron a 37°C durante 1 h en agitación de 250 rpm y posteriormente fueron distribuidas en placas de agar LB adicionado con el antibiótico necesario. En el caso de las placas donde se crecieron las células transformadas con el vector pGEM T-Easy se añadieron además del antibiótico, los reactivos X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) e IPTG, con el objetivo de facilitar la búsqueda de colonias blancas-azules. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La selección de las clonas transformantes se hizo mediante un diagnóstico de PCR en colonia y digestión enzimática.

8.- Secuenciación

8.1 Ácidos nucleicos

Las clonas con los insertos de *RACK1*, *PKC* y *FE1 α* se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología y/o Fisiología Celular-UNAM, con los oligonucleótidos universales M13 para las construcciones de clonación y T7 para las construcciones de expresión y doble híbrido de levadura.

8.2 Proteínas

La proteína expresada en las células Rosetta con el plásmido Exp-Cx*RACK1* de aproximadamente 36 kDa, así como el punto del ensayo del isoelectroenfoco de aproximadamente 40 kDa fueron extraídos del gel de SDS-PAGE y enviados al Departamento de Proteómica en el Instituto de Biotecnología-UNAM, para su análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución.

9.- Hibridación *in situ*

Todos los ensayos de la técnica de hibridación *in situ* se basaron siguiendo el protocolo de Wolensky et al. (2013).

9.1 Generación de la sonda

El ARN se sintetizó con los kits MEGAscript® SP6 transcription kit y MEGAscript® T7 transcription kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La sonda generada se cuantificó mediante el uso de nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). Las sondas se almacenaron a -20°C a una concentración de 100 ng/μl en buffer de hibridación (BH) (formamida 50%, SSC 5X pH. 4.5, heparina 50 μg/ml, Tween 20, 50 μg/ml, SDS 1% y 100 μg/ml de esperma de salmón previamente desnaturalizado durante 5 min a 95°C).

9.2 Fijación del material biológico

Los estadios de pólipo, estróbilo y éfira fueron anestesiados en agua de mar artificial con MgCl₂ al 10% durante 10 min a temperatura ambiente, en las larvas no fue necesario el paso de anestesia. Posteriormente el agua de mar fue eliminada y los organismos se incubaron en solución de fijación I (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0.3% en PTw (Tween 20 0.001%, PBS 1X la solución fue previamente tratada con DEPC 0.1%) durante 15 min en agitación a temperatura ambiente; después la solución fue removida y reemplazada por la solución de fijación II (paraformaldehído 4% en PTw) durante 1 h a 4°C en agitación; una vez transcurrido el periodo de incubación se eliminó la solución y se continuó con 5 lavados en buffer PTw por 5 min bajo agitación. Después de los lavados el material fijado fue preservado en metanol y almacenado a -20°C hasta su empleo.

9.3 Pretratamiento

Los ejemplares fijados se rehidrataron mediante lavados donde la concentración de metanol se disminuyó. Se inició con un lavado inicial de metanol al 60% y PTw al 30% durante 5 min seguido de metanol 30% y PTw 70%. Se prosiguió con 4 lavados en Ptw; dos rápidos mediante la inversión del tubo y dos lentos por 5 min en agitación. Posteriormente se realizó una digestión con Proteinasa K grado RNA (Invitrogen) 0.05 mg/ml para pólipos, éfiras y estróbilos durante 20 min y 0.01 mg/ml para larvas por 15 min sin agitación. La Proteinasa K se retiró y la digestión fue detenida mediante de 2 lavados con glicina (2 mg/ml en PTw), por 5 min.

Continuando con el protocolo se realizaron 2 lavados con PTw y trietanolamina 1%, 1 lavado con PTw con trietanolamina 1% y acético anhidro 0.003%, seguido de 1 lavado con PTw con

trietanolamina 1% y acético anhidro 0.006%; el pre-tratamiento se finalizó con la eliminación de la trietanolamina mediante 2 lavados en PTw.

9.4 Post-fijado

Una vez terminado el pretratamiento, el PTw se retiró y los organismos se fijaron nuevamente en paraformaldehído al 4% en PTw por 1 h a temperatura ambiente en agitación. El paraformaldehído se eliminó por medio de 5 lavados en PTw. Después, al material biológico se le agregó el BH precalentado a 60°C y se mantuvo por 10 min en agitación; el buffer fue renovado y las muestras se dejaron en este buffer toda la noche a 60°C. Transcurridas las 12 h de incubación, el BH se retiró y la sonda sintetizada previamente (ver apartado generación de sonda) se diluyó a una concentración de 1 ng/μl en el BH. La sonda se desnaturalizó por 10 min a 95°C y fue agregada a los ejemplares a 60°C por 48 h.

Concluido el periodo de incubación, la sonda fue retirada y almacenada a -20°C para posteriores usos. El proceso se continuó mediante un lavado con BH sin esperma de salmón (BH-No-ES) (formamida 50%, SSC 5X pH. 7.0, heparina 50 μg/ml, Tween 20 a una concentración de 50 μg/ml y SDS 1%). El protocolo se siguió con 4 lavados con diferentes proporciones de BH-No-ES y SSC 2X. Iniciando con la relación BH-No-ES (75%) y SSC 2X (25%), seguido de BH-No-ES (50%) y SSC 2X (50%); posteriormente BH-No-ES (25%) con SSC 2X (75%) y se finalizó con un lavado de SSC 2X. Cada uno de los lavados se llevó a cabo por 30 min a 60°C. Se continuó con 2 lavados con SSC 0.02X pH 7.0 por 20 min a 60°C y uno más a temperatura ambiente en agitación.

Se prosiguió con lavados iniciando con SSC 0.02X (75%) y PTw (25%); luego SSC 0.02X (50%) y PTw (50%); SSC 0.02X (25%) y PTw (75%); los lavados se finalizaron con 1 lavado en PTw cada lavado se llevó a cabo durante 10 min en agitación a temperatura ambiente.

9.5. Bloqueo e incubación con anticuerpo

El Buffer de bloqueo (BB) se preparó mediante la disolución de 10 g de Blocking reagent (Roche) en 500 ml de ácido maleico pH 7.5. Los diferentes estadios fueron incubados con BB durante toda la noche a 4°C en agitación. Posterior a las 12 h de bloqueo, el BB se retiró y se

añadió el anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) diluido en BB a una concentración de 1:5000 durante toda la noche a 4°C en agitación.

9.6. Revelado

El anticuerpo anti-DIG-AP se descartó y los organismos fueron lavados 5 veces durante 5 min en PTw bajo agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 2 enjuagues en el Buffer de Fosfatasa Alcalina y magnesio (BFA+Mg²⁺) (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris pH 9.5 100 mM y Tween 0.5%) y 2 lavados con BFA sin Mg²⁺. Finalizados los lavados, se preparó la solución de revelado donde se mezclaron 10 ml de BFA+Mg²⁺ mas 32 µl de NBT y 16 µl de BCIP. Dicha solución se puso en contacto con el material biológico en agitación, hasta observar una tinción púrpura. La reacción de revelado fue detenida a través de la adición de PTw y finalmente los organismos se preservaron en glicerol al 80% y registrados en fotografías.

10. Inmunolocalización

10.1 Inmunolocalización de RACK1

Las larvas, pólipos, estróbilos y éfiras de *Cassiopea* se fijaron de acuerdo a la sección previamente descrita (ver Fijación del material biológico).

A los organismos fijados se les retiró el metanol y se enjuagaron en PBS-T por 5 min en 5 ocasiones con el propósito de eliminar los residuos de metanol. Después al material biológico se le agregó buffer de bloqueo (BSA 2% disuelto en PBS-T) y se mantuvo a 4°C durante toda la noche en agitación constante. Posteriormente, el buffer de bloqueo se retiró y el anticuerpo primario (anti RACK1 policlonal, y/o anti PKC Beta) se adicionó a una concentración de 1:200 en PBS-T y se incubó por 5 h a temperatura ambiente en agitación. Inmediatamente el anticuerpo primario se eliminó y las muestras se enjuagaron en 5 ocasiones durante 10 min con PBS-T bajo agitación.

Se continuó el protocolo con la adición del anticuerpo secundario anti conejo-AP (Sigma) (1:200) en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, los organismos se lavaron 5 veces en PBS-T y 2 veces con buffer de fosfatasa alcalina (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris 100 mM, pH 9.5 y Tween-20 0.5%). Finalmente, la

muestra se reveló con el uso de NBT y BCIP (Promega®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La tinción del revelado se monitoreó mediante la utilización del estereoscopio hasta que se observó la tinción púrpura en el tejido. La reacción se detuvo mediante 5 lavados con PBS-T. La muestra se preservó en glicerol al 80% para su fotodocumentación.

11. Expresión de CxRACK1 en *E. coli*

El vector EXP-CxRACK1 se integró en células BL21 (DE3) pLysS o Rosetta de *E. coli*, (ver transformación en *E. coli*), las células se crecieron en medio LB líquido suplementado con ampicilina a 100 µg/ml y Cloranfenicol 34 µg/ml hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Una vez alcanzada dicha densidad se adicionó al cultivo 1 mM de IPTG como inductor de la expresión. A partir del momento se tomó una alícuota del cultivo cada h para observar el tiempo en el cual se evidencia una sobreexpresión de la proteína de interés. El análisis de la expresión de CxRACK1 se realizó mediante geles de SDS-PAGE y Western blot.

12. Purificación de la proteína recombinante (CxRACK1)

Empleando como herramienta la etiqueta de seis histidinas que el vector EXP-CxRACK1 contiene en su región promotora, la proteína recombinante se purificó mediante el uso de la matriz HIS-select® Nickel affinity gel o HIS-select Cobalt affinity gel (Sigma). Un cultivo de 1 L de células de *E. coli*, que expresan CxRACK1 fueron centrifugadas a 2,600 *xg* a 4°C. La pastilla fue suspendida en 10 ml de buffer de equilibrio frío (Urea 8 M, Fosfato de sodio 50 mM, NaCl 0.3 M a pH. 8 adicionado con coctel inhibidor de proteasas (Roche); posteriormente, las células fueron lisadas en prensa francesa a 20,000 psi. El lisado celular fue centrifugado a 14,000 *xg* a 4°C durante 20 min [una alícuota de 75 µl fue tomada y hervida con Buffer de Laemmli para su análisis etiquetado como “extracto antes”] y el resto del sobrenadante fue congelado a -80°C hasta su uso. Por otro lado, se tomó 1 ml de resina de Níquel o Cobalto y se depósito en una columna de polipropileno de 10 ml. Una vez que el volumen de etanol fue eliminado de la resina, esta fue lavada con 5 volúmenes de agua miliQ y luego equilibrada con 10 volúmenes de buffer de equilibrio. Una vez que se eluyó el buffer de equilibrio, se añadió el lisado de *E. coli* a la resina; [una alícuota de 75 µl del eluido se hirvió con Buffer Laemmli y se etiquetó como “extracto después”]. Ya que todo el sobrenadante pasó por la resina, ésta se lavó con 30 volúmenes de buffer de equilibrio [tomando una alícuota de 75 µl etiquetado como “lavado”].

Posteriormente, diferentes lavados se llevaron a cabo con 10 volúmenes de buffer de equilibrio disminuyendo las concentraciones de urea (6, 4, 2, 1 y 0.5 M). Después la resina fue lavada en 2 ocasiones con el buffer de equilibrio sin urea. La muestra se eluyó en buffer de elución (Fosfato de Sodio 50 mM, Cloruro de Sodio 0.3 M, Imidazol 1 M, pH 8) y una alícuota fue tomada para su análisis (etiquetada como “elución”). Finalmente, se analizó una muestra de las perlas de resina hervidas en Laemmli para observar residuos de CxRACK1 unidos a la matriz.

13.- Identificación de la proteína RACK1 en *C. xamachana* mediante western blot

13.1 Preparación de las muestras para SDS-PAGE

Empleando como fuente de proteínas los tejidos de campana y tentáculos de *C. xamachana*, los cuales se procesaron en un homogenizador Dounce. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 14,000 $\times g$ durante 20 min a 4°C, con el objetivo de eliminar el simbionte de la muestra. Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el ensayo de Bradford (1976). A las proteínas totales se le agregó Buffer Laemmli 4X (SDS 2%, glicerol 10%, β -Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.02% y Tris-HCl 0.75 mM a un pH final de 6.8) hasta dejar la muestra a una concentración de 1X de buffer Laemmli. Posteriormente, la muestra se incubó a 95°C durante 10 min, lo cual permitió la desnaturalización de las proteínas. Transcurrido el periodo de desnaturalización, los lisados fueron mantenidos en hielo por 5 min, la muestra se cargó en el gel de SDS-PAGE.

La preparación de las fracciones microsomales fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Islas-Flores et al. (2009).

13.2 Preparación de gel de SDS-PAGE

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida. Estos constan de dos fases: una inferior conocida como fase de corrida, que en este caso se usó a una concentración de 12% y una fase superior al 4% denominada de apilamiento. Dichas fases fueron preparadas de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). El gel polimerizado se colocó en la cámara de electroforesis Mini PROTEAN 3 Cell de BioRad®, la cual se llenó con buffer de corrida (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M y SDS 0.1 %). En cada carril del gel se cargó la muestra y un carril se seleccionó para colocar 1 μ l del marcador de referencia Page Ruler Prestained Protein Ladder

(Life Technologies). La fase de apilamiento se corrió a 70 V y la fase de corrida a 100 V. Una vez que la banda de referencia del marcador correspondiente a 10 kDa se evidenciaba al final del gel, se detuvo la corrida y se procedió a la transferencia a membrana de nitrocelulosa y/o tinción con azul de Coomassie.

13.3 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Una extensión de 6x8 cm de membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P[®]) se cortó y humedeció en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1% e Isopropanol 100 ml; (Villanueva, 2008)) en conjunto con las esponjas y los filtros. En el cassette de transferencia, éstos se colocaron bajo el siguiente orden: una esponja, dos filtros y el gel de SDS-PAGE, después la membrana (teniendo cuidado de eliminar cualquier burbuja entre el gel y la membrana), seguido de dos filtros y finalmente la esponja. El cassette fue cerrado y colocado en la cámara de Transferencia Mini PROTEAN 3 Cell de BioRad[®]. La corrida se realizó a 400 mA durante 1 h.

13.4 Visualización de proteínas transferidas a membrana y bloqueo de membrana

Una vez que finalizó la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante dos min en agitación para verificar que la transferencia se realizó de manera exitosa. Luego se siguió con el enjuague de la tinción con agua destilada. La membrana se bloqueó con 10 ml de Suero de Albúmina Bovina (BSA) al 3 % disuelto en PBS-T durante 1 h, a una temperatura de 50°C bajo agitación constante.

13.5 Incubación con anticuerpos

La membrana se incubó con el anticuerpo primario de selección (ver Cuadro 7), disuelto en PBS-T (fosfato monobásico (NaH₂PO₄) 2.74 mM, fosfato dibásico (Na₂HPO₄) 7.197 mM, NaCl 136.9 mM, y TX-100 0.01 % a un pH final de 7.5), a una concentración final de 1:1000. La membrana se mantuvo con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, el anticuerpo se retiró y la membrana se enjuagó 5 veces con PBS-T por un periodo de 5 min. Se siguió el protocolo con la adición del anticuerpo secundario anti-ratón (Zymed[®]) o anti-conejo (Sigma[®]) a una concentración de 1:2500 el cual se incubó durante 2 h a una temperatura

ambiente en agitación. El anticuerpo fue eliminado y la membrana se enjuagó 5 veces por 5 min en PBS-T.

Cuadro 7. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo

Nombre	Proveedor	Secuencia de reconocimiento
RACK1 humano monoclonal	Santa Cruz Biotechnology Catálogo: sc-17754	LWNTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPN SSNPIIVSCGWDKLVKVVWNLANCKLKTNHI GHTGYLNTVTVSPDGSLCASGGKDGQAML WDLNEGKHLYTLDGGDIINALCFSPNRYW LCAATGPSIKIWDLEGKIIVDELKQEVISTSS KAEPPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVR VWQVTIGTR
RACK1 humano policlonal	Santa Cruz Biotechnology Catálogo: sc-10775	LWNTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPN SSNPIIVSCGWDKLVKVVWNLANCKLKTNHI GHTGYLNTVTVSPDGSLCASGGKDGQAML WDLNEGKHLYTLDGGDIINALCFSPNRYW LCAATGPSIKIWDLEGKIIVDELKQEVISTSS KAEPPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVR VWQVTIGTR
Anti-6X His tag Monoclonal	Thermo Scientific Catálogo: MA1-21315	HHHHHH
Anti-18	Bio-synthesis, Inc.	SPDGSLCASGGKDGV

policlonal

Anti-19
policlonal

Bio-synthesis, Inc.

SPDGSLCASGGKDGV

PKC Beta
policlonal

MyBioSource
Catálogo: MBS2524544

MADPAAGPPPSEGEESTVRFARKGALRQK
NVHEVKNHKFTARFFKQPTFCSHCTDFIWG
FGKQGFQCQVCCFVVHKRCHEFVTFSCPG
ADKGPASDDPRSCHKFKIHTYSSPTFCDHC
GSLLYGLIHQGMKCDTCMMNVHKRCVMN
VPSLCGTDHTERRGRIYIQAHIDRDVLIVLV
RDAKNLVPMDPNGLSDPYVKLKLIPDPKSE
SKQKTKTIKCSLNPEWNETFRFQLKESDKD
RRLSVEIWDWDLTSRNDFMGSLSFGESELQ
KASVDGWFKLLSQEEGEYFNVPVPEGSEA
NEELRQKFERAKISQGTKVPEEKTTNTVSK
FDNNGNRDRMKLTDNFNLMVLGKGSFGK
VMSERKGTDELYAVKILKKDVVIQDDDV
ECTMVEKRVLALPGKPPFLTQLHSCFQTM
DRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRFKEP
HAVFYAAEIAIGLFFLQSKGIIYRDLKLDNV
MLDSEGHKIADFGMCKENIWDGVTTKTFC
GTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDWWAFGVLLY
EMLAGQAPFEGEDEDELFSIMEHNVAYP
KSMSKEAVAICKGLMTKHPGKRLGCGPEG
ERDIKEHAFFRYIDWEKLERKEIQPPYKPKA
RDKRDTSNFDKEFTRQPVELTPTDKLFIMN
LDQNEFAGFSYTNPEFVINV

13.6 Revelado de membrana

La membrana inicialmente se enjuagó con buffer de fosfatos alcalino (BFA) (Tris-HCl 100 mM, pH 9), NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM) durante 5 min. La solución de revelado se preparó (5 ml de BFA adicionado con 16 µl de Azul de Nitrotetrazolio (NBT) y 8 µl de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), y se añadió a la membrana en agitación. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético.

13.7 Tinción de gel de SDS-PAGE

El gel se desmontó de los vidrios y se colocó en un recipiente con solución de azul de Coomassie (etanol 30%, ácido acético 10%, azul de Coomassie 0.05%). La tinción se realizó en agitación constante (100 rpm) por un periodo de 12 h a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó a través de enjuagues con la solución de desteñido (etanol 30%, ácido acético 10% y agua destilada 60%). Los geles fueron documentados mediante fotografías.

14. Doble dimensión de proteínas

14.1. Preparación de la muestra

Inicialmente una medusa de 5 g se homogenizó en 5 ml de PBS 1X, pH 7.5 e inhibidor de proteasas de serina (PMSF 0.1 mM). Después el homogenado se centrifugó a 2,600 *xg* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se precipitó con 8 volúmenes de acetona y un volumen de ácido tricloroacético (TCA) ≥ 99.0% durante 2 h a -20°C.

Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 2,600 *xg* y la pastilla obtenida se lavó 3 veces con 5 ml de acetona fría, con el objetivo de eliminar los restos de TCA. La pastilla se purificó con el kit Ready Prep 2D cleanup kit (BioRad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y el producto final se resuspendió en 2 ml de buffer de amortiguación 2D Started Kit de BioRad (urea 8M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfolitos pH 3-10 0.2% (Biolyte[®]) y azul de bromofenol). La resuspensión fue alicuotada en 125 µl y se almacenó a -80°C hasta su uso.

14.2 Isoelectroenfoque

Para la separación de proteínas en base a su punto isoeléctrico se usó el kit Ready Prep 2-D Starter Kit (BioRad) y las tiras Readystrip IPG (pH 4-7 lineal de 17 cm). La muestra de proteína

se distribuyó en la bandeja de isoelectroenfoco y la tira se colocó sobre la muestra, con la precaución de evitar burbujas entre la muestra y la tira.

La tira fue hidratada durante 1 h a temperatura ambiente, una vez transcurrido este período se adicionaron 2 ml de aceite mineral a la tira (para evitar la evaporación de la muestra), y se mantuvo por 12 h a 18°C. Después, el exceso de glicerol se eliminó de la tira con la ayuda de toallas kimwipes. La tira se instaló en el equipo Protean IEF de BioRad con el programa de corrida de gradiente preestablecido en el aparato. Este consta de cuatro ciclos bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 250 V durante 15 min, un ciclo de 4,000 V graduales, un ciclo rápido de 4,000 V y un ciclo final de 500 V. Cuando el isoelectroenfoco finalizó, la tira se incubó con Buffer de equilibrio 1 de BioRad (urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20%, DTT 2%) por 15 min a temperatura ambiente en agitación. Transcurrida la incubación, el buffer se eliminó y se reemplazó por Buffer de equilibrio 2 de BioRad (urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20%, DTT 2%) por 15 min a temperatura ambiente en agitación. El Buffer se eliminó y la tira se enjuagó con el Buffer de corrida SDS-PAGE 1X. La tira se cortó en dos partes por la mitad con tijeras y cada parte se instaló en el gel de poliacrilamida para su separación por peso molecular. Este procedimiento fue necesario ya que no se contaba con una cámara de corrida para el tamaño de la tira (17 cm), y la división de la tira permitió llevar a cabo la separación por peso molecular en una cámara de proteínas estándar.

15. Identificación de interacciones RACK1-PKC en *C. xamachana*

15.1. Ensayo pull-down

Debido a la dificultad de separar la proteína CxRACK1 de la columna de Níquel y/o Cobalto, el ensayo pull down se llevó a cabo en dicha resina. Inicialmente, 5 g de tejido de medusa se homogenizaron en 5 ml de PBS adicionado con TX-100 (0.05%) y PMSF 0.1 mM (Sigma) como inhibidor de proteasas de serina. Dicha mezcla se centrifugó a 2,600 \times g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se etiquetó como “proteínas totales” (PT) y se transfirió a un nuevo tubo. El sobrenadante se incubó con 200 μ l de resina con la proteína CxRACK1 previamente acoplada por 1 h a 4°C en agitación (250 rpm). Finalizado el tiempo de incubación, se realizó una centrifugación durante 5 min a 500 \times g y el sobrenadante se almacenó y etiquetó como proteínas no unidas a CxRACK1 (PnuR).

La resina se lavó en 5 ocasiones con 15 ml de PBS. De cada lavado se obtuvieron alícuotas para su posterior análisis. Los complejos de proteínas unidos a CxRACK1 se despegaron con buffer de elución (PBS, TX-100 a una concentración final de 0.1 %, Imidazol 500 mM, pH 8). Una alícuota de la resina se hirvió directamente el buffer de Laemmli. Cada una de las alícuotas se analizó mediante geles de SDS-PAGE y western blot con el anticuerpo anti-PKC.

15.2 Ensayo de doble híbrido de levadura

15.2.1 Ensayo de auto-activación

Se verificó que la proteína CxRACK1 no active los genes reporteros en *S. cerevisiae* mediante la transformación con las cepas AH109 y Y187 con el vector 2YH-RACK1-Carnada mediante el protocolo de acetato de litio de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Yeastmaker yeast transformation, Clontech).

15.2.2 Preparación de células competentes

Todo el protocolo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Una colonia de *S. cerevisiae* con un diámetro de 2 a 3 mm se inoculó en medio YPDA e incubó a 30°C por 12 h bajo condiciones de agitación (250 rpm). De este cultivo se tomó una alícuota de 3 µl y se reinoculó en 50 ml de medio YPDA. Cuando el cultivo alcanzó OD₆₀₀ de 0.3, se centrifugó a 1,000 xg por 5 min y la pastilla celular fue resuspendida en 100 ml de medio YPDA donde se creció hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.5. Las células se centrifugaron por 5 min a 1,000 xg y la pastilla fue lavada con 30 ml de agua miliQ estéril y centrifugada por 5 min a 1,000 xg. Finalmente las células se resuspendieron en 1.5 ml de Buffer TE-acetato de litio (Tris 10 mM, EDTA 1mM, LiAc 100 mM) las células competentes se mantuvieron en hielo para su inmediata transformación.

15.2.3 Co-transformación en *S. cerevisiae*

Las cepas Y187 y AH109 se co-transformaron de manera independiente con los vectores 2YH-RACK1-Carnada y 2YH-PKC-Presa. Como controles de la co-transformación se emplearon los vectores pGBKT7-p53 y pGADT7-T como control positivo y pGBKT7-Lam y pGADT7-T como control negativo. En un tubo Eppendorf se agregó la combinación de vectores mencionados anteriormente (200 ng de cada uno), ADN acarreador (5 µg) previamente desnaturizado por 5 min a 95°C, 100 µl de las células competentes de levadura y 500 µl de buffer PEG/LiAC (PEG

3350 40%, LiAc 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1mM). Dicha mezcla se incubó por 30 min a 30°C. Transcurrido este periodo, se adicionaron 20 µl de DMSO y el tubo se transfirió a baño de agua por 20 min a 42°C. Las células se centrifugaron por 1 min a 14,000 *xg* y la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio YPD plus e incubaron por 1 h en agitación a 30°C. Luego las células se centrifugaron 1 min a 14,000 *xg* y a la pastilla se le adicionaron 500 µl de NaCl 0.9%. Las levaduras transformantes se distribuyeron en diluciones de 1:10 y 1:100 en medio SD/-W, SD/-L, SD/-W/-L y SD/-A/-H/-W/-L con X- α -Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido) y se dejaron a 30°C por 3 a 5 días, monitoreando la aparición de las colonias.

16. Análisis bioinformático

16.1 Análisis de secuencias nucleotídicas

Los electroferogramas obtenidos se analizaron en el programa UGENE v. 1.12.3, y mediante BlastN (NCBI) se confirmó la identidad de las secuencias amplificadas. La obtención del marco de lectura abierto se realizó mediante el ensamblaje de cada una de las secuencias amplificadas con el programa CodonCode Aligner V 5.1.3.

La traducción a proteína de las secuencias nucleotídicas se realizó en la página de internet: www.expasy.org en la opción de translate tool. La búsqueda de los dominios WD se facilitó mediante la base de datos de proteínas WD: <http://wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp/>.

16.2 Elaboración de la estructura tridimensional de CxRACK1

Una vez comprobada la identidad de CxRACK1 y CxPKC la secuencia a nivel aminoácido se ingresó en el sitio web I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), donde mediante el empleo de diversos algoritmos se facilita la predicción de la estructura de las proteínas (Yang et al., 2015; Roy et al., 2010; Zhang, 2008).

16.3 Construcción de árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético de RACK1 las secuencias correspondientes a *Fungia scutaria*, *Montastraea cavernosa*, *Platygyra daedalea*, *Pseudodiploria strigosa*, *Seriatopora hystrix*, y *Madracis aurenterna* se obtuvieron de la base de datos del Laboratorio de Biología Integrativa de la Universidad de Oregón (<http://people.oregonstate.edu/~meyere/data.html>). Otras

secuencias fueron descargadas de la base de datos del NCBI; entre ellas: *Hydra vulgaris* (NM_001287799.1), *Callorhinchus milii* (XM_007901366.1), *Eupryma scolopes* (AF124742.1), *Latimeria chalumnae* (XM_005989331.1), *Ostrea edulis* (JN184767.1), *Paramisgurnus dabryanus* (GQ452296.1), *Microtus ochrogaste* (XM_005350198.1), *Xenopus laevis* (NM_001086664.1), *Nematostella vectensis* (XM_001631734.1), *Toxoplasma gondii* (AY547291.1), *Blattella germanica* (DQ885470.1), *Symbiodinium microadriaticum* (KJ755867.1), *Danio rerio* (AF025330.1), *Homo sapiens* (NM_006098.4), *Drosophila melanogaster* (NM_001298794.1), *Oryza sativa* (Q6L4F8.1), *Glycine max* (NP_001235369.1), *Aurelia aurita* (No liberada), *Aiptasia pallida* (XP_020893873.1) y *Cassiopea xamachana* (este trabajo).

Para la construcción del árbol filogenético de PKC se emplearon las secuencias correspondientes a *Saccoglossus kowalevskii* (XP_002731384.1), *Oryctolagus cuniculus* (NP_001095195.1), *Macaca nemestrina* (XP_011745493.1), *Rattus norvegicus* (NP_001165776.1), *Xenopus tropicalis*, *Aurelia aurita* (No liberada), *Hydra vulgaris* (NP_001296610.1), *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021354770.1), *Acropora digitifera* (XP_015762531.1), *Crassostrea gigas* (XP_011437039.2), *Crassostrea virginica* (XP_022317284.1), *Orbicella faveolata* (XP_020601819.1), *Salmo salar* (XP_013986844.1), *Stylophora pistillata* (XP_022794886.1), *Montastrea faveolata* (<http://people.oregonstate.edu/~meyere/data.html>), *Cassiopea xamachana* (este trabajo).

Con las secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el programa UGENE 6 v. 1.12.3 a nivel aminoácido. La construcción del árbol filogenético se realizó con el método de Máxima Probabilidad con el modelo de distancia LG+G con 1000 replicaciones en bootstrap en el programa MEGA 7.

17. Inducción de la estrobilación en *C. xamachana*

Pólipos de *C. xamachana* fueron puestos en placas de cultivos celulares de 6 pozos, aclimatados durante 2 d antes de los experimentos a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bajo un régimen de 12/12 h oscuridad/luz con una intensidad de $160\text{-}180 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los inductores probados fueron: indometacina, retinol, 9-cis ácido retinoico, tiroxina y 5-metoxi 2-metil indol (Sigma). La elección de estos inductores se determinó en base a su empleo en

trabajos previos con la medusa *A. aurita* (Fuchs et al., 2014; Kuniyoshi et al., 2012). Se utilizó agua de mar y DMSO como controles negativos de la inducción. Los inductores y concentraciones se resumen en el Cuadro 8. Los pólipos fueron revisados diariamente y su evolución fue registrada.

Cuadro 8. Compuestos químicos y concentraciones empleados para inducir la metamorfosis en *C. xamachana*

Inductor	Concentraciones empleadas		
Retinol	0.5 μ M	1 μ M	5 μ M
9-cis-ácido retinoico	1 μ M		
Indometacina	10 μ M	25 μ M	50 μ M
Tiroxina	1 μ M	10 μ M	20 μ M
5-Metoxi 2-metil indol	25 μ M		

18. Análisis estadísticos

Los datos de la inducción fueron analizados con el programa R y/o SPSS mediante una prueba de ANOVA y un análisis de Student-Newman-Kleus.

RESULTADOS

1. Muestreo y mantenimiento de material biológico

Se colectaron medusas adultas con un diámetro de campana entre 8 y 30 cm que fueron mantenidas en un estanque; adicionalmente, en el disco central de algunas medusas se identificaron agrupaciones de estructuras de color blanco y forma redondeada, y a través de su observación bajo el estereoscopio se evidenciaron paquetes de larvas sexuales (Figura 4). Durante el mantenimiento de los pólipos bajo condiciones de laboratorio se observó su reproducción asexual, destacándose la producción y liberación de gemas, su asentamiento, así como su desarrollo a escifistoma (Figura 4).

Eventualmente, por cambios en la temperatura ambiente algunos escifistomas estrobilaron y en dichos organismos se observó la proliferación del simbiote y la liberación de éfiras saludables (Figura 4).

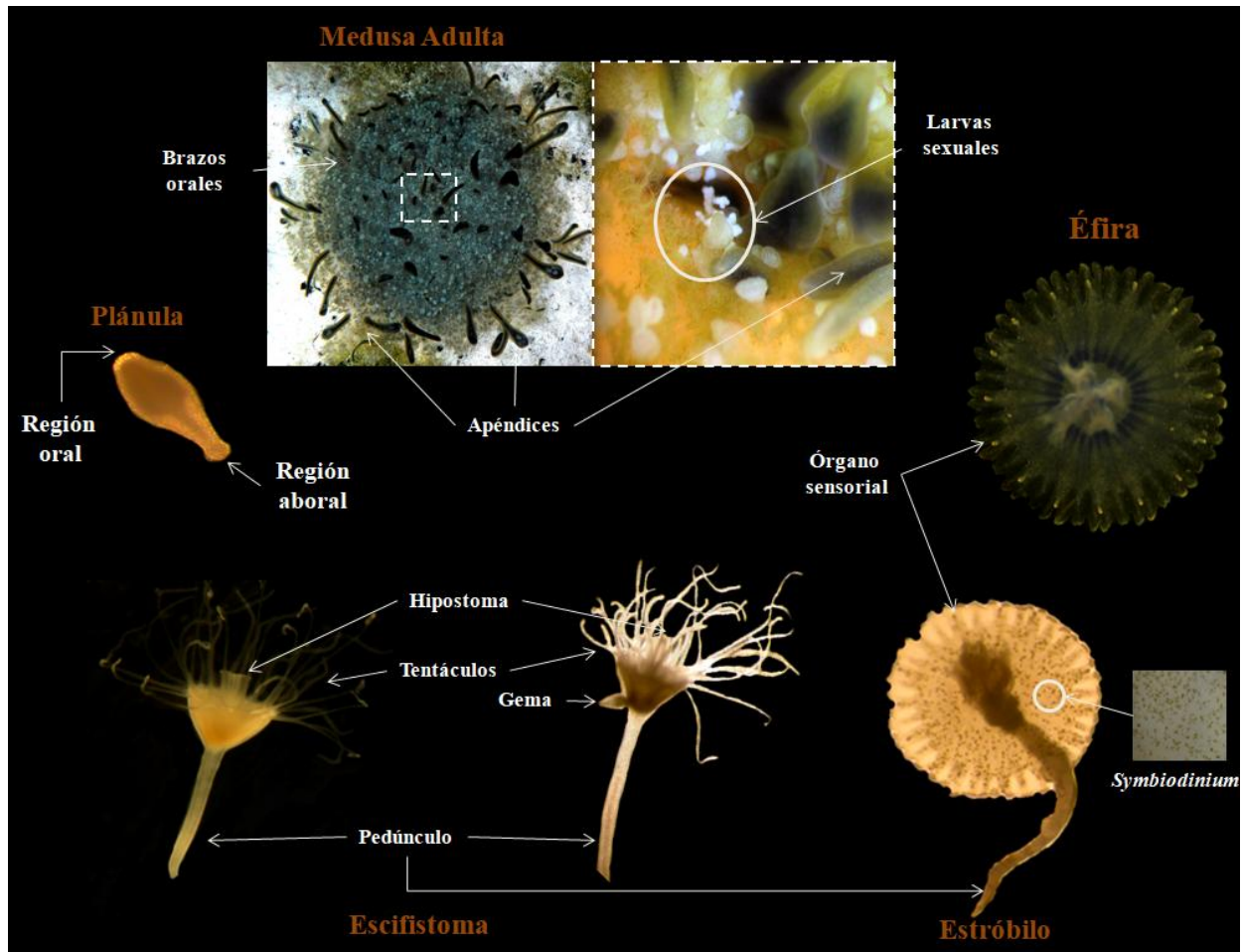


Figura 4. Estadios de desarrollo de *Cassiopea xamachana* en laboratorio. En las medusas colectadas en campo, se observó en la región del disco central (recuadro blanco punteado) la identificación de paquetes de larvas sexuales (circulo blanco). Por otro lado, en laboratorio los diferentes estadios de desarrollo: larvas, pólipos, estróbilos y éfiras fueron obtenidos. Se destacó la producción de larvas plánulas (provenientes de un proceso de gemación). El tiempo a partir de que la larva se liberó hasta que se desarrolló completamente a un pequeño pólipo varió entre 7 y 15 días.

2. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ADN genómico se emplearon diferentes protocolos entre los que destacan el de Ojimi et al. (2010), Dellacorte (1994), así como un kit comercial Quick-gDNA Miniprep de Zymo Research®. En ninguno de los casos se obtuvo un resultado satisfactorio; sin embargo, encontramos un procedimiento desarrollado por Hroudova et al. 2012 (Figura 5), con el que se obtuvieron excelentes resultados.



Figura 5. Extracción de ADN genómico de *C. xamachana*. Electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % donde se visualiza el ADN genómico extraído mediante los diferentes protocolos. En todos los protocolos se empleó tejido de la campana de medusa para su estandarización.

Para la extracción de ARN se probaron diferentes protocolos, entre ellos el del uso del reactivo TRI reagent (Sigma®), el de tiocianato de guanidina publicado por Chomczynski y Sacchi en 1987, así como el kit Quick-RNA Mini Prep de ZymoResearch®. Considerando que en algún punto de estos protocolos el ARN se degrada, se empleó el protocolo de fenol caliente publicado por Pawlowski et al. (1994), y el kit RNA/DNA/protein purification de Norgen®. Con estos últimos se logró un resultado favorable.

Las concentraciones obtenidas en la extracción de ARN para el análisis de cuantificación en punto final se encuentran descritas en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentraciones de ARN obtenido para el ensayo de PCR punto final

Muestra	Cantidad/peso	Concentración
Larva 1	2 g	452.8 ng/μl
Larva 2	1.5 g	110 ng/μl
Larva 3	2 g	344 ng/μl
Pólipo 1	200 individuos	84 ng/μl
Pólipo 2	200 individuos	108.7 ng/μl
Pólipo 3	200 organismos	198.8 ng/μl
Estróbilo 1	200 organismos	140 ng/μl
Estróbilo 2	200 organismos	128 ng/μl
Estróbilo 3	200 organismos	142 ng/μl
Éfira 1	300 organismos	143.6 ng/μl
Éfira 2	300 organismos	88.9 ng/μl
Éfira 3	300 organismos	102 ng/μl

Tentáculo 1	4 g	264.4 ng/ μ l
Tentáculo 2	4.1 g	87.6 ng/ μ l
Tentáculo 3	4 g	153.2 ng/ μ l
Campana 1	3 g	72.9 ng/ μ l
Campana 2	3.3 g	54.5 ng/ μ l
Campana 3	3 g	52.7 ng/ μ l

3. Extracción de proteínas

Por otro lado, la preparación de la muestra biológica molida en nitrógeno líquido puede acarrear contaminación de ADN proveniente del simbiote, en comparación con el tejido extraído con el homogenizador Dounce. En el sobrenadante de éste último, posterior a la centrifugación, no se observaron células del alga ya sea bajo luz blanca o bien por excitación con luz UV que revelará la autofluorescencia del simbiote (Figura 6a-b), comparado con la pastilla celular. En ésta, las células del simbiote estuvieron agrupadas y su estructura no se mostró fragmentada; más aún, fueron muy notorias bajo el filtro para Texas Red (Figura 6c-d).

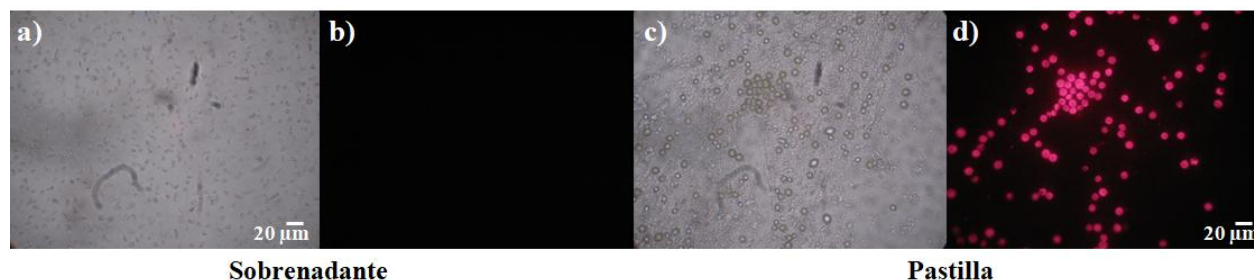


Figura 6. Identificación de simbiote en sobrenadante y pastilla de tentáculos homogenizados de *C. xamachana*. En el homogenado de la fracción del sobrenadante no se observó fluorescencia del simbiote bajo el filtro para Texas Red (b), mientras que las células de la medusa se lograron identificar bajo luz blanca (a). Por otro lado, en la porción correspondiente a la pastilla se observaron las células redondas de color pardo-verdosas del simbiote bajo luz blanca (c) y bajo luz UV con el filtro para Texas Red se distinguió la autofluorescencia del simbiote (d). La barra de tamaño equivale a 20 μ m.

4. Inducción de la estrobilación en *C. xamachana*

Diferentes compuestos químicos se utilizaron como inductores de la estrobilación. En el caso de la tiroxina y retinol no se obtuvo ningún efecto de metamorfosis en los pólipos tratados. La mayor concentración de retinol utilizado (5 μ M) fue letal para los pólipos. Los inductores con los cuales se logró la inducción de la metamorfosis fueron: indometacina y 5-metoxi 2-metil indol y

9-cis ácido retinoico, a un rango de concentraciones de 0.5 hasta 50 μM con la indometacina (Figura 7-8), 50 μM con el 5-metoxi 2-metil indol y 1 μM con el 9-cis ácido retinoico, respectivamente. Dosis de indometacina a partir de 100 μM provocaron la muerte de los pólipos al día posterior al tratamiento.

Tratamientos comparativos entre los inductores demostraron que 5-metoxi 2-metil indol fue el compuesto que indujo el proceso de estrobilación en menor tiempo, seguido de indometacina y posteriormente por el 9-cis ácido retinoico (Figura 9). Cabe destacar que todos los pólipos empleados para los ensayos estaban infectados con *Symbiodinium* (a pesar de que estos estuvieran bajo condiciones de obscuridad). Aunque algunos pólipos estrobilaron en las muestras control quizá debido al cambio de temperatura y luz, estos individuos no mostraron una relevancia estadística en comparación con los diferentes tratamientos.

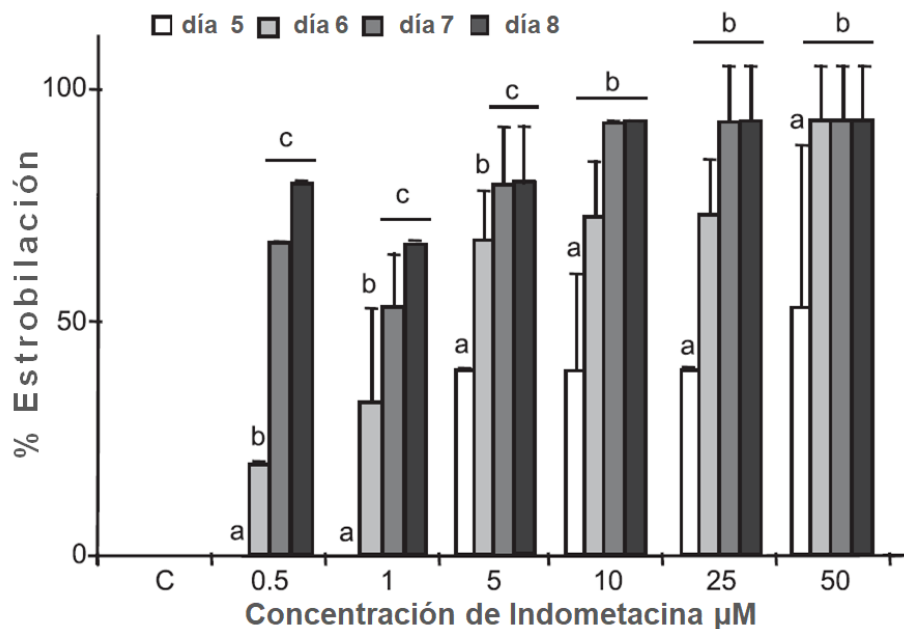


Figura 7. Porcentaje de estrobilación en diferentes concentraciones de indometacina. Concentraciones de 0.5 a 50 μM fueron probadas en pólipos de *C. xamachana*, donde 0.5 μM produjo efectos en la metamorfosis en el día 5 post-tratamiento. La concentración estándar empleada para los experimentos posteriores fue de 50 μM . n= 5 organismos por tratamiento por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

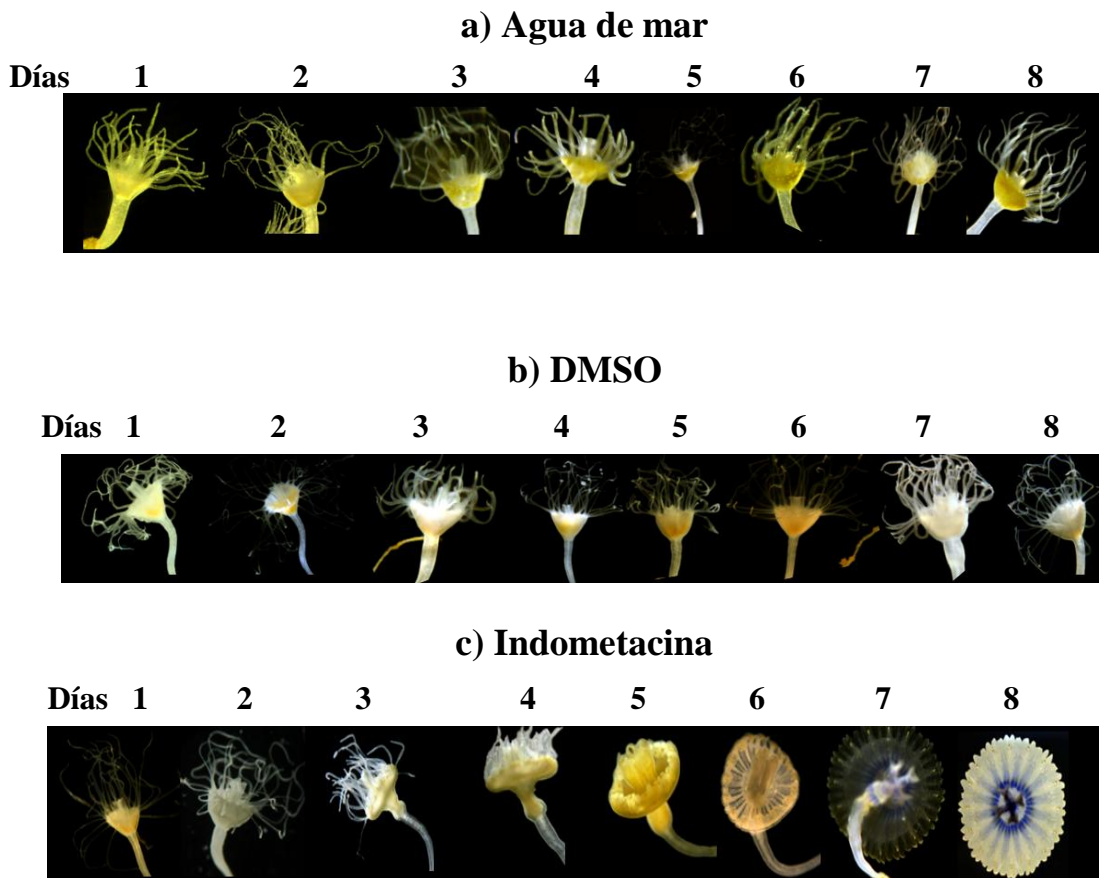


Figura 8. Inducción de la estrobilación en *C. xamachana*. Los pólipos fueron tratados con indometacina (50 μ M), así como sus respectivos controles con agua de mar y DMSO (solvente de la indometacina). Cada día los pólipos fueron monitoreados mediante fotografía y su evolución fue evaluada.

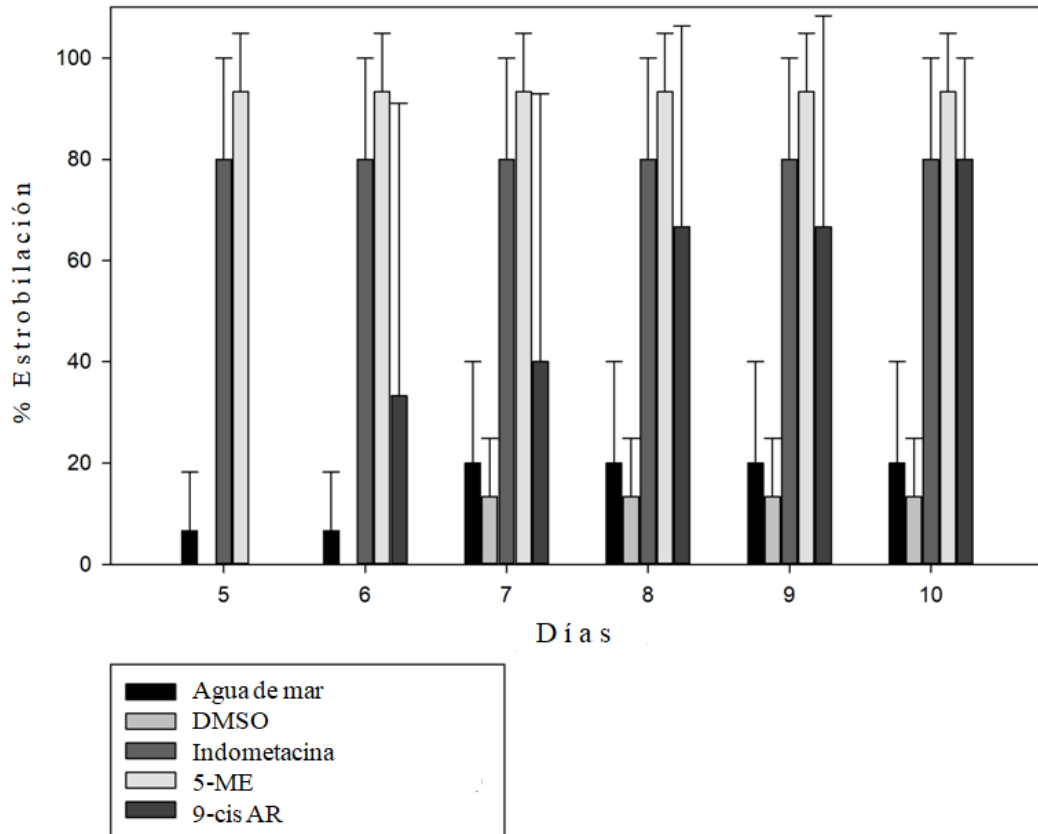


Figura 9. Tratamientos de inducción de la estrobilación. Los compuestos empleados como inductores de la estrobilación y su porcentaje de estrobilación en días. El compuesto 5 metoxi 2-metil indol (5-ME) promovió en menor tiempo la estrobilación en *C. xamachana*. Algunos pólipos en los ensayos control estrobilaron probablemente debido al cambio en las condiciones mediambientales. 9-cis AR: 9-cis ácido retinoico. n= 5 organismos por tratamiento por triplicado. Las barras representan la desviación estandar.

5. Caracterización de RACK1 en *Cassiopea xamachana*

5.1. Amplificación de RACK1 mediante PCR

Una de las características de los sistemas eucariontes es la presencia de intrones; por lo tanto, para evitar amplificaciones inespecíficas debidas al alto contenido de ADN no codificante en los organismos del filo Cnidaria, se decidió realizar todas las amplificaciones con ADN complementario. Sin embargo, sí se recurrió al uso de ADN genómico para la estandarización de las temperaturas de alineamiento de algunos oligonucleótidos. A partir de un alineamiento múltiple se identificaron regiones conservadas para diseñar oligonucleótidos específicos. El producto inicial con identidad a *CxRACK1* se obtuvo con ADN genómico y los oligonucleótidos *RACK1* (1)F y *RACK1* (3)R. La amplificación con estos oligonucleótidos se logró a través de un

gradiente de temperaturas de alineamiento la cual comenzó a 50°C y se aumentó hasta 58°C. A la temperatura de 55°C se detectó una banda de aproximadamente 250 pb en base al marcador de tamaño, posteriormente mediante la secuenciación del amplicon se determinó el tamaño exacto de la amplificación correspondiente a 220 pb (Figura 10, flecha).

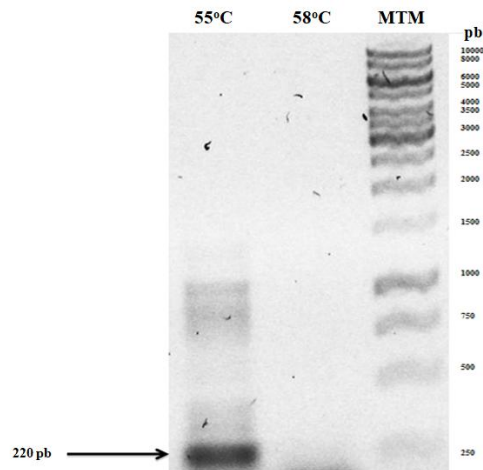


Figura 10. Amplificación de *RACK1* con oligonucleótidos *RACK1* (1)F y *RACK1* (3)R y ADNg de *Cassiopea xamachana*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde una banda de un tamaño en base al marcador de referencia entre 250 pb (flecha) fue evidente a una temperatura de alineamiento de 55°C; por otro lado, a 58°C no se distinguió ningún producto de amplificación. MTM, marcador de tamaño molecular.

Por otra parte, para la amplificación de la región 3' de *CxRACK1* se empleó ADN complementario y los oligonucleótidos *RACK1*-3'-1F y dTT. En dicha reacción de amplificación se observó una banda de un tamaño aproximado a 750 pb en las diferentes temperaturas probadas (Figura 11). En la amplificación mediante PCR en gradiente con los oligonucleótidos *RACK1*-3'-2F y el oligonucleótido dTT se detectó un doblete de bandas las cuales se analizaron en un gel preparativo con el objetivo de lograr una completa separación de los amplicones. Las dos bandas de amplificación fueron denominadas como: "superior" e "inferior" identificadas mediante flecha en la Figura 12. Ambas amplificaciones fueron específicas, ya que de manera independiente al aumento en la temperatura de alineamiento, se continuó observando el mismo patrón de amplificación. Sin embargo, los resultados de la secuenciación de la clona correspondiente al amplicón "superior", presentaron irregularidades con altos porcentajes de ambigüedad (N, R, M, W) y en consecuencia fue complicado determinar la identidad de la secuencia. En el caso del análisis de la secuencia "inferior", ésta mostró un tamaño de amplificación de 610 pb y una alta identidad hacia proteínas *RACK1* de otros organismos; estos datos fueron resultado de un análisis de la secuencia contra las disponibles en la base de datos del NCBI (Cuadro 9).

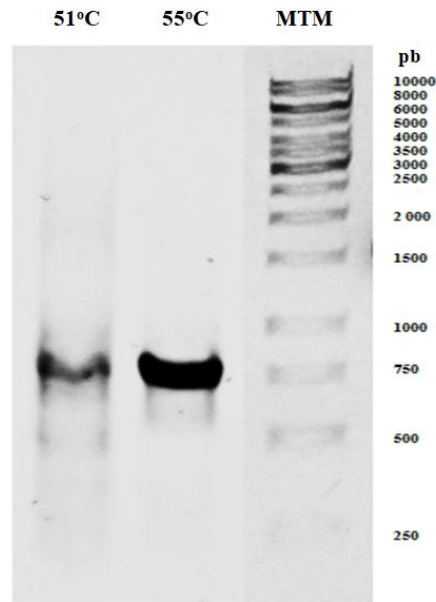


Figura 11. Amplificación de la región 3' de CxRACK1. Análisis en gel de agarosa al 0.8%, que muestra el producto de PCR obtenido con la mezcla de oligonucleótidos *RACK1-3'-1F* y dT. Se observó que la temperatura de 55°C fue la ideal para este conjunto de oligonucleótidos. MTM, marcador de tamaño molecular.

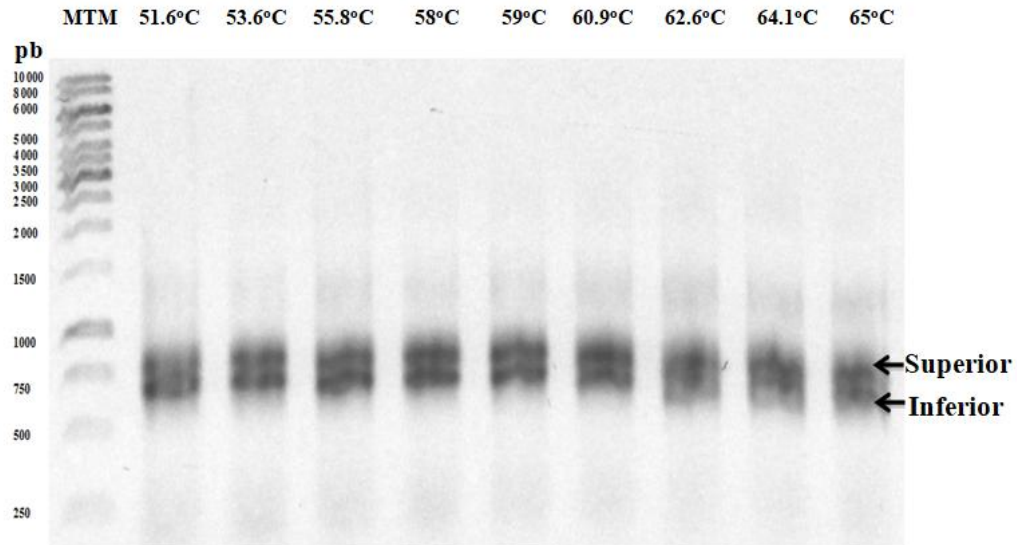


Figura 12 Amplificación de CxRACK1 con oligonucleótidos *RACK1-3'-2F* y dT. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento (51.6°C - 65°C) con el juego de oligonucleótidos *RACK1-3'-2F* y dT. Se observó un doblete de bandas denominadas “superior” (flecha superior) e “inferior” (flecha inferior) bajo todas las temperaturas de alineamiento ensayadas. MTM, marcador de tamaño molecular.

La amplificación con los oligonucleótidos ATG-CX y STOP-CX se obtuvo mediante una PCR en gradiente, donde la temperatura de alineamiento menor correspondió a 50°C y la mayor a 61.6°C. En la Figura 13 se muestra la amplificación de una banda única de aproximadamente 1000 pb, la cual correspondió al tamaño esperado. Cada una de las amplificaciones generadas con los diferentes juegos de oligonucleótidos diseñados para *CxRACK1* se analizaron mediante BlastN y las identidades obtenidas se encuentran resumidas en el Cuadro 9. Dichas secuencias mostraron identidad principalmente contra organismos del filo Cnidaria y hacia la proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), similar al polipéptido beta 2 (*GNB2L1*), que es el nombre del gen que codifica a la proteína RACK1 en las bases de datos del NCBI.

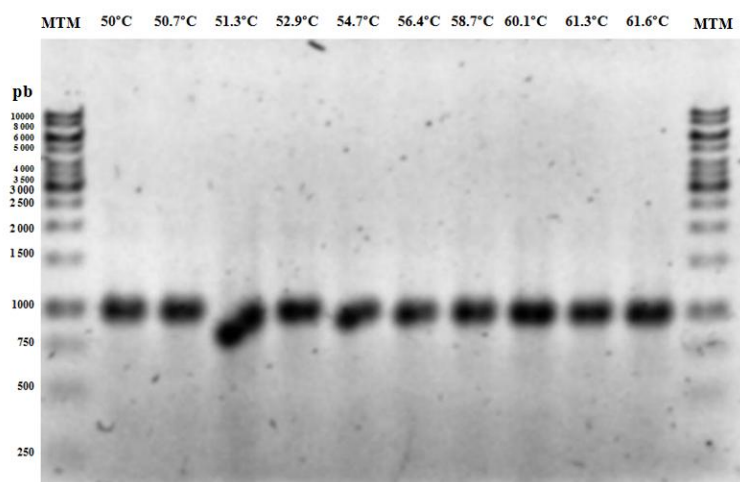


Figura 13. Amplificación de *CxRACK1* con los oligonucleótidos ATG-CX y STOP-CX. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se muestra una banda única de amplificación de un tamaño aproximado a 1000 pb, el tamaño es similar al de las secuencias completas correspondientes que codifican a *RACK1* en otros organismos. MTM, marcador de tamaño molecular.

Cuadro 10. Identidad de secuencias amplificadas con oligonucleótidos diseñados para *RACK1*

Descripción	% Identidad	Número de acceso
<i>Hydra vulgaris</i> (<i>GNB2L1</i>)	74%	NM_001287799.1
<i>Exaiptasia pallida</i> (<i>GNB2L1</i>)	74%	XM_021038214.1
<i>Orbicella faveolata</i> : Receptor de la Cinasa C Activada	74%	XM_020755098.1
<i>Latimeria chalumnae</i> (<i>GNB2L1</i>)	73%	XM_005989331.2
<i>Callorhinchus milii</i> (<i>GNB2L1</i>)	73%	XM_007901366.1
<i>Rhincodon typus</i> : Receptor de la cinasa C activada	73%	XM_020525730.1

5.2. Amplificaciones para análisis de PCR punto final

La estandarización de las condiciones de PCR para el análisis de la expresión de *CxFE1 α* , *CxRACK1* y *CxPKC*, se consideró que todos los oligonucleótidos funcionen bajo las mismas condiciones y además, que estos oligonucleótidos no generen algún producto teniendo como templado cADN proveniente de *Symbiodinium*. Las amplificaciones de los 3 genes de interés arriba mencionados mostraron un tamaño de 300 pb y una alta especificidad hacia el hospedero (flecha). Ninguno de los juegos de oligonucleótidos evaluados amplificó alguna banda empleando como templado el cADN del simbiote (Figura 14a).

La integridad del cADN del simbiote se verificó a través de una PCR con oligonucleótidos específicos para el gen que codifica a Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa forma II (*Rubisco II*), los cuales amplificaron un producto esperado de 466 pb (Figura 14b, *Rub*) de acuerdo a lo reportado por Suescún-Bolivar et al. (2012). De la misma manera, la integridad del cADN de la medusa se verificó con un PCR para amplificar una secuencia que codifica a citocromo oxidasa I (*COI*) (Figura 14b).

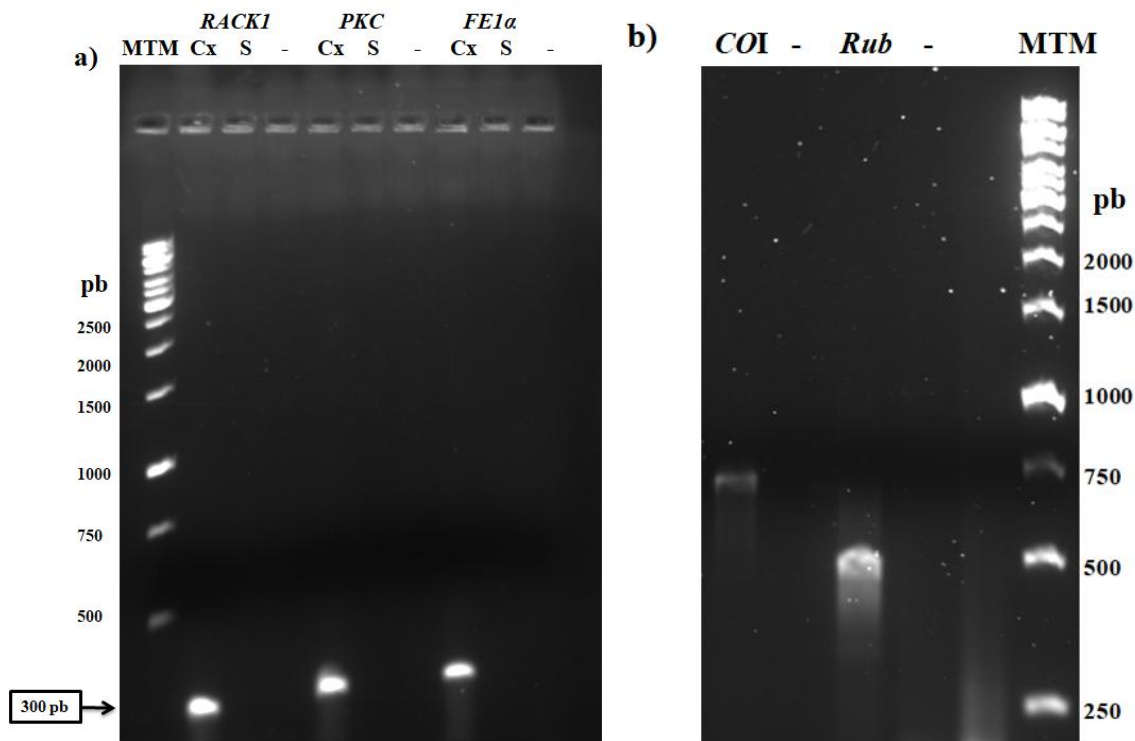


Figura 14. Amplificaciones de los genes que codifican a *CxPKC*, *CxRACK1* y *CxFE1 α* para PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de PCR punto final. En (a) Se evaluaron los 3 genes de interés *CxPKC*, *CxRACK1* y *CxFE1 α* para PCR punto final. En (b) Se verificó la integridad del cADN del simbiote y de la medusa.

Cx*FE1a* bajo las mismas condiciones de PCR. Los oligonucleótidos mostraron una alta especificidad con el cADN de *Cassiopea xamachana* (Cx) y una nula amplificación con el cADN de *Symbiodinium microadriaticum* (S), así como en los controles negativos sin ADN templado (-). En (b) se muestra la comprobación de la satisfactoria síntesis a cADN en *C. xamachana* a través del marcador molecular Citocromo oxidasa I (*COI*) y en el caso de *Symbiodinium* se utilizó el gen *Rubisco II* (*Rub*). MTM, marcador de tamaño molecular.

6. Análisis de secuencias

6.1. *RACK1* en *C. xamachana*

La secuencia codificante de la proteína RACK1 en *C. xamachana* consta de 954 pb a partir del codón de inicio (ATG) hasta el codón de término (TAA). A nivel aminoácido, la secuencia muestra los 7 dominios WD40. Los dominios se encuentran ordenados de la siguiente forma: WD1 (T6-G53), WD2 (T54-V96), WD3 (T97-C138), WD4 (K139-K183), WD5 (L184-D223), WD6 (G224-P271) y WD7 (E272-Q311) con base en el predictor de proteínas WD40. En la Figura 15 se muestran cada uno de los dominios WD delimitados con un color distinto; también en la secuencia se identifican los sitios de unión a PKC (líneas negras); las huellas GH (líneas púrpura), el sitio de unión al ribosoma (línea rosada), los sitios de fosforilación por Src (estrella), y el sitio clave de asociación con la PP2A y la integrina $\beta 1$ (línea amarilla).

atgggcgaacaaatgacattgaaaggaacactaaagggtcatactggctgggtaactcaa
M G E Q M T L K G T L K G H T G W V T Q

attgccacttcaccgcaaacgccagaccaaattctctcttgcctcctcgtgacaaaaacattg
I A T S P Q T P D Q I L S C S R D K T L

atcctctgggagttaaacacgtgatgataatagttatggtaaccccaaaaaagtgettcaag
I L W E L T R D D N S Y G T P K K C F K

ggacacaatcattttgtctctgatgttgatgtctctctgatggacagtttgcctctgct
G H N H F V S D V V M S S D G Q F A L S

ggctcttgggataaaaactctgagactttgggacctgaatgcagggtgaacaacaagacgt
G S W D K T L R L W D L N A G V T T R R

tttgttggtcacacaaggatgttctcagtgtagcttttcagcagataacaggcaaatt
F V G H T K D V L S V A F S A D N R Q I

gtttctggctcaagggacaaaaccatcaaattgtggaacactcttggagctctgcaatac
V S G S R D K T I K L W N T L G V C K Y

acaattacagaagattctcatactgaatgggtatctgctgtagattttcaccaaacacg
T I T E D S H T E W V S A V R F S P N T

gcagaccecaattattgtatcagcaggatgggacaaaagttgtcaaagtaacggaacctcacc
A D P I I V S A G W D K V V K V R N L T

aactgcaagcttaggaccaatcactttggtcacaatggctacctgaatactgtcactgtg
N C K L R T N H F G H N G Y L N T V T V

tctccagatggttcactctgtgectcaggagggaagatggattagcaatgttgtgggat
S P D G S L C A S G G K D G L A M L W D

ttgaatgatggaaaacatttgtacactttggatgggggggatattattgaagcattgtgc
L N D G K H L Y T L D G G D I I E A L C



ttcagcccaaacagatattgggtgtgctgctactggaccaatcatcaaaatttgggat
 F S P N R Y W L C A A T G P I I K I W D



ttggagtcaaagtc aattgtggatgaagtgaecgccagagttaattagcatgagcaccage
 L E S K S I V D E V T P E L I S M S T S

aaagacaaaaatecccaactgtatttctcttgc atggteagetgatggtcagacactgttc
 K D K N P N C I S L A W S A D G Q T L F

gcaggttacacagacaatg ttattagagtttggcaagttacaagaaatgcataa
 A G Y T D N V I R V W Q V T R N A *

Figura 15. Secuencia nucleotídica-aminoácídica de CxRACK1. La secuencia de CxRACK1 contiene los siete dominios WD característicos de la familia de proteínas WD40. Cada uno de los dominios se ha resaltado mediante un color diferente. La secuencia muestra los sitios de unión a PKC los cuales se han delimitado mediante líneas oscuras; además, se observa la secuencia de unión la ribosoma (delimitada mediante una línea rosada) y el sitio de interacción de las integrinas y PP2A (línea amarilla); también se destaca la conservación de los residuos de fosforilación por Src (estrella).

7. Estructura tridimensional de CxRACK1

La estructura terciaria de la proteína CxRACK1 mostró una conformación de β -propela, además que se observan las cuatro láminas beta antiparelas en cada uno de los siete dominios WD (Figura 16).

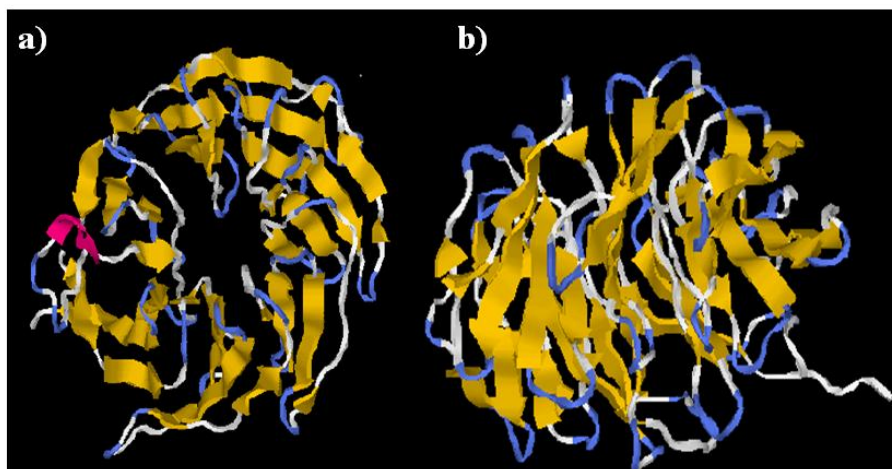
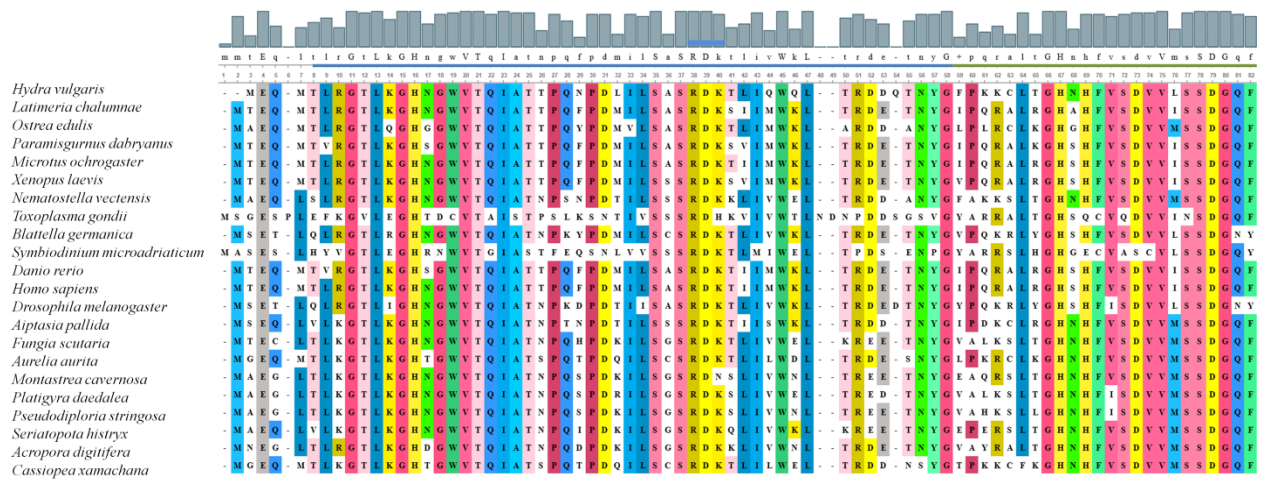


Figura 16. Estructura tridimensional de la proteína CxRACK1. Se muestran dos orientaciones distintas de la proteína enseñando la típica morfología de β -propela con sus láminas β (a); y (b), vista lateral de la proteína CxRACK1. Estructura obtenida con el programa I-TASSER (Zhang, 2008).

8. Identidad de la secuencia de RACK1 de *C. xamachana* con otros organismos

El análisis de identidad de la secuencia de RACK1 en *C. xamachana* a nivel aminoácido con otros organismos, mostró la mayor identidad con: *Saccoglossus kowalevskii*, 82% (XP_002735015.1); *Hydra vulgaris* 82% (NP_001274728.1); y *Xenopus tropicalis* 81% (NP_001004946.1). En la figura 17 se muestra un alineamiento múltiple con secuencias de diferentes grupos de organismos; entre ellos: cnidarios, plantas, mamíferos, insectos, invertebrados, apicomplexas y hongos. Se destaca el nivel de conservación de la proteína entre los organismos en sitios clave como lo son: la unión al ribosoma (R38DK40), línea azul; a PKC (D239-F246) y (S260-D265), líneas naranjas; y a PP2A e integrinas (F305-Y308), línea verde. También se resaltan los sitios de fosforilación por Src (estrella) (Y233, Y251), así como los siete dominios WD que se han delimitado en base al artículo de Adams et al. (2011) (líneas en distintos colores en la parte superior del alineamiento).



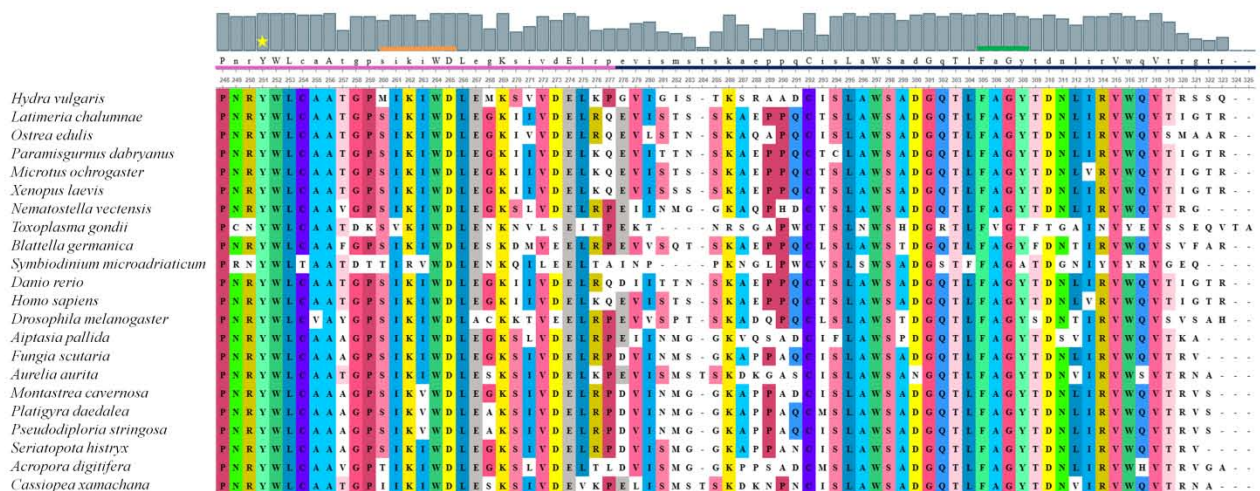
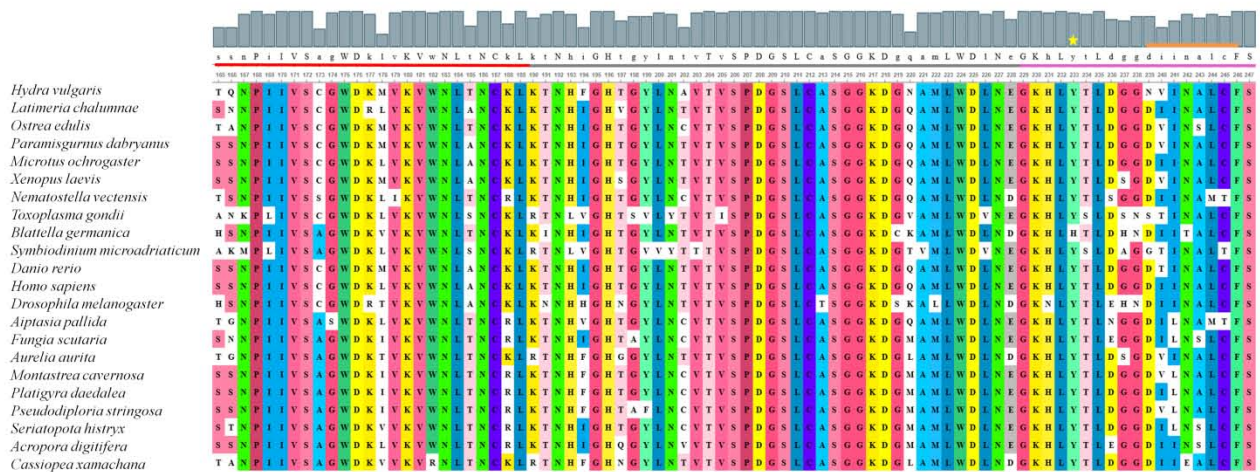
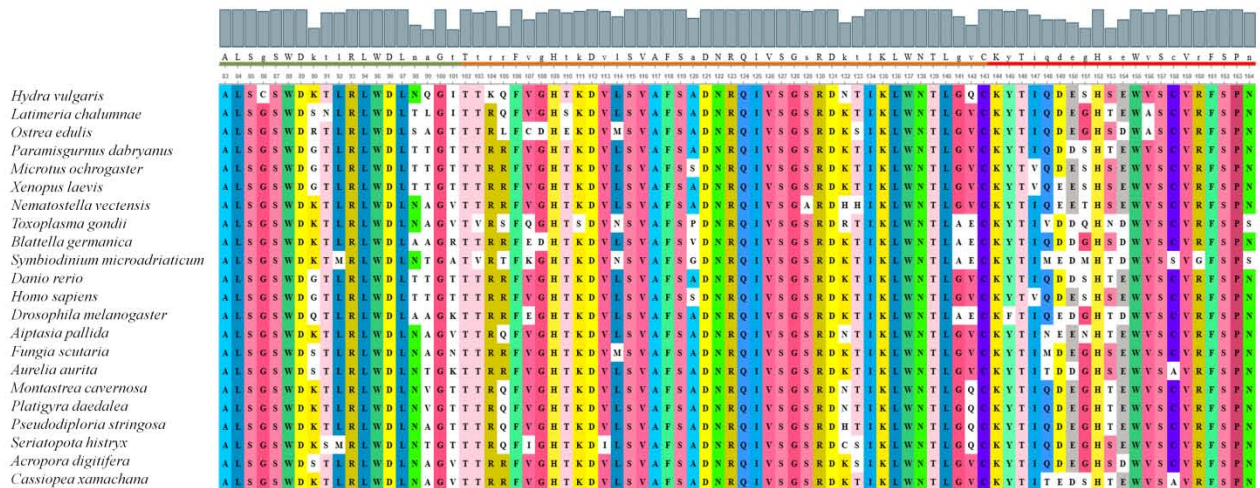


Figura 17. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína CxRACK1. El alineamiento muestra los siete dominios WD con líneas segmentadas, así como las secuencias conservadas de RACK1 (señaladas mediante líneas continuas).

9. Análisis filogenético de RACK1

En el árbol filogenético de la proteína RACK1 se muestra un subgrupo externo a las plantas *Oryza sativa* y *Glycine max*, enmarcadas en un círculo verde. En general, se observó la evolución de RACK1 como parafilética, en la cual se encuentran los hongos (*Bifiguratus adelaidae* y *Armillaria gallica* en triángulo gris), así como los organismos protistas como *Toxoplasma gondii* y *Symbiodinium microadriaticum* (rombo amarillo), y los insectos *Blattella germanica* y *Drosophila melanogaster* como subgrupos.

Específicamente, en el filo Cnidaria, dentro de los organismos de la clase Antozoa se observa un grupo monofilético en los corales pertenecientes al orden Escleractinia y una separación parafilética con el orden Actinaria como *Nematostella vectensis* y *Aiptasia pallida* (círculos café). Las medusas *A. aurita* y *C. xamachana* (círculo rojo), quienes pertenecen a la clase Escifozoa, se muestran como un grupo hermano de los Hidrozoo (*Hydra vulgaris*; círculo rosa).

En el análisis se incluyó la secuencia de RACK1 de *Symbiodinium* como control para identificar si la secuencia amplificada podía provenir del simbiote. En efecto, en el árbol filogenético fue evidente que la secuencia de *Cassiopea* spp, se ubicó dentro de los organismos cnidarios, mientras que el dinoflagelado *Symbiodinium* estuvo más relacionado con el parásito *Toxoplasma gondii* (rombo amarillo), ambos organismos pertenecientes al grupo SAR (Stramenopiles, Alveolados y Rhizaria) (Figura 18).

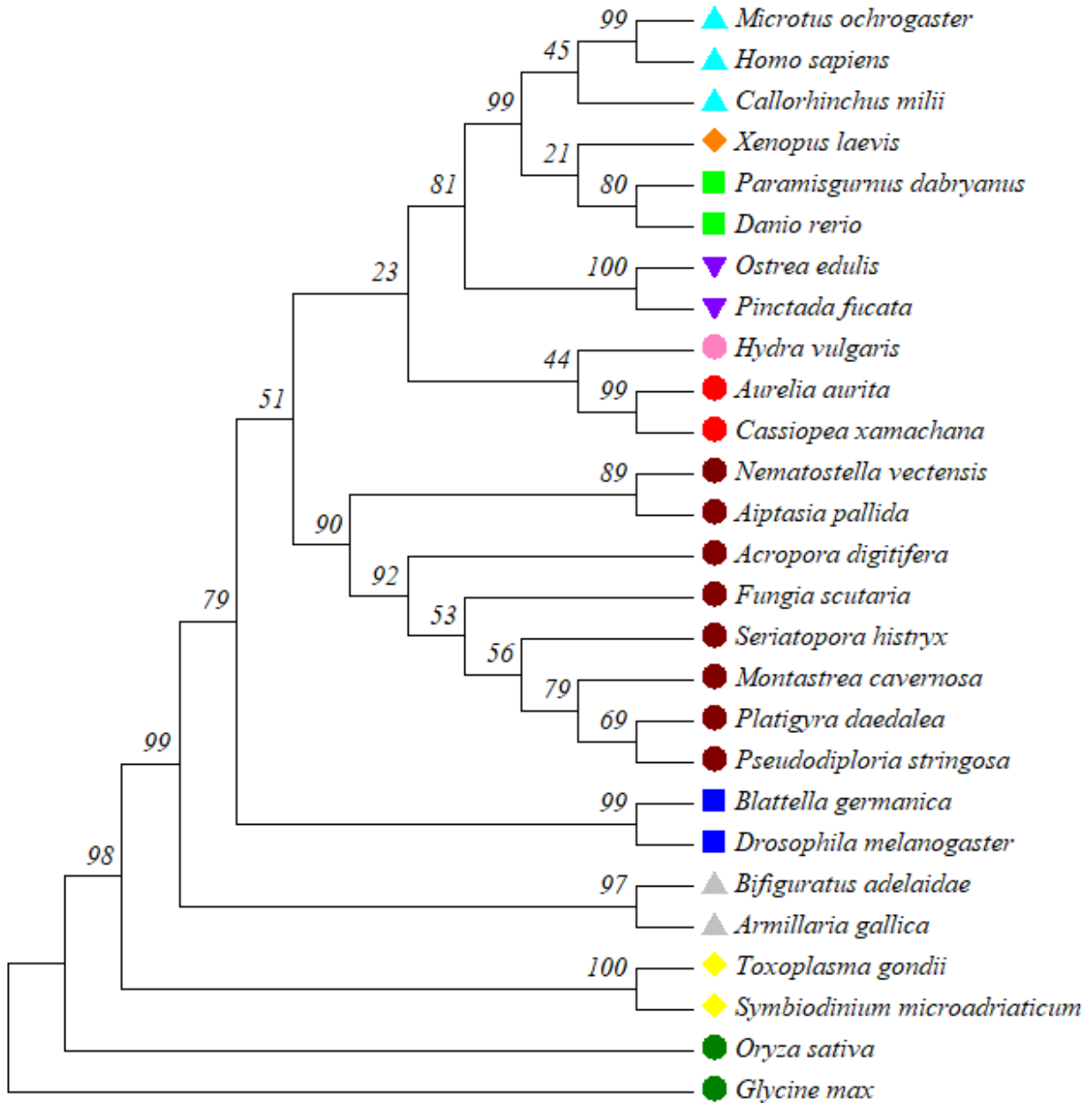


Figura 18. Filogenia de RACK1. Análisis filogenético de la proteína RACK1; la secuencia de *Cassiopea* se agrupó junto al grupo de los cnidarios (círculo rojo); y por otro lado, *Symbiodinium microadriaticum* que es el simbiote de *Cassiopea xamachana*, se separó y se ubicó dentro del grupo SAR junto con *Toxoplasma gondii* (rombo amarillo).

10. Hibridación *in situ* con una sonda para detectar la expresión del transcrito de *CxRACK1*

10.1. Detección del transcrito de *CxRACK1* en *C. xamachana*

La técnica de hibridación *in situ* permite identificar con una alta sensibilidad la expresión de un transcrito en un tejido y organismo a través del marcaje de una sonda, la cual es complementaria

al ARN mensajero (Wilcox, 1993). La detección del transcrito de *CxRACK1*, se llevó a cabo mediante un análisis colorimétrico basado en anticuerpos conjugados a una enzima que detectan una molécula conjugada a la sonda (usualmente digoxigenina), donde una tinción púrpura en el tejido derivada de la conversión de un sustrato por la enzima conjugada al anticuerpo, y que señala el sitio de localización del transcrito. Uno de los controles más utilizados en la técnica de hibridación *in situ* es la síntesis de la sonda sentido la cual es una copia del ARN mensajero. Durante el ensayo, la sonda sentido que no tiene una secuencia complementaria para hibridar, es eliminada del tejido a través de los múltiples lavados durante el ensayo y por lo tanto, no genera ninguna coloración. En este ensayo, la expresión de *CxRACK1* y *CxPKC* se evaluó en los estadios de larva plánula, pólipo, estróbilo y éfira.

Diferentes experimentos de manera independiente mostraron que las pruebas donde se utilizaron las sondas de *CxRACK1* tanto sentido (control negativo) como antisentido (complementaria al ARNm), mostraron una señal de detección del transcrito. Este resultado inicialmente nos planteó la idea de una probable contaminación de la sonda sentido (negativa) con la sonda antisentido. Para resolver este posible problema, ambas sondas fueron sintetizadas nuevamente tomando las precauciones necesarias tanto en el manejo de reactivos como en el pipeteo, con el objetivo de evitar cualquier contaminación cruzada. Una vez hecho esto, el experimento fue repetido con las sondas sintetizadas *de novo*.

Sorprendentemente, a pesar del uso de las sondas resintetizadas se obtuvo un resultado igual al generado anteriormente en los estadios de pólipos, estróbilo y éfira. En las plánulas, la sonda antisentido mostró un patrón de expresión en el área central que delimita el tejido del endodermo y ectodermo (señalado mediante una flecha); pero no se observó ninguna señal en la región aboral. Por otro lado, con la sonda sentido fue detectada una señal tenue en la parte del polo basal de la plánula (Figura 19).

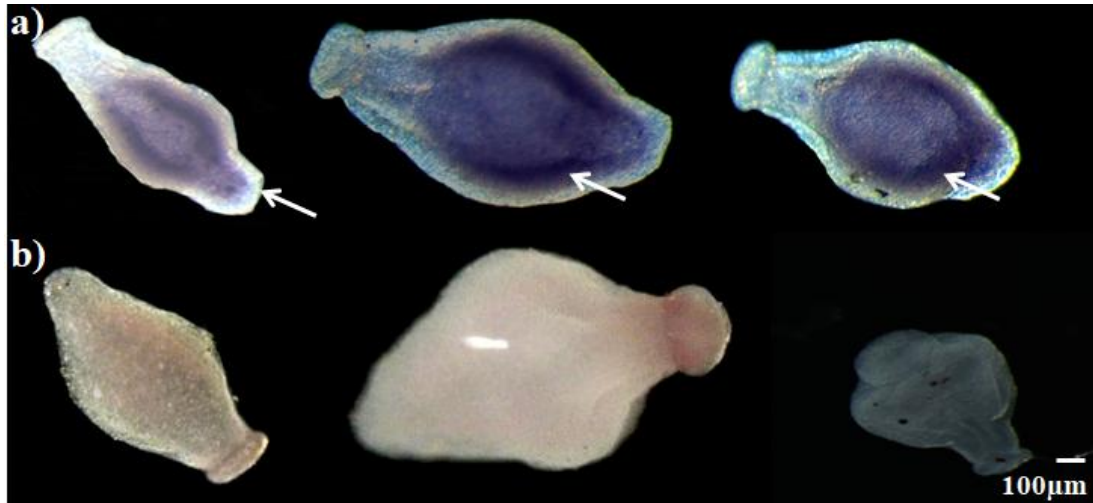


Figura 19. Expresión de CxRACK1 en larvas plánulas. En experimentos independientes, el transcrito de CxRACK1 se detectó consistentemente entre las capas ectodérmica y endodérmica con la sonda antisentido (flecha) (a). Por otro lado, con la sonda sentido, CxRACK1 se detectó en la zona aboral de la larva plánula como un anillo en la región del polo basal (flecha) (b). La barra de tamaño equivale a 100 μm .

En el estadio de pólipo se detectó al transcrito en la zona a partir del cáliz y los tentáculos (señalado a través de una flecha), así como en menor grado, en el área del pedúnculo (Figura 20b); en el caso de la sonda sentido, ésta detectó al transcrito en la región de la boca y los tentáculos, pero no hubo señal en la región del cáliz. La flecha en la Figura 20b señala los tentáculos y el área del hipostoma.

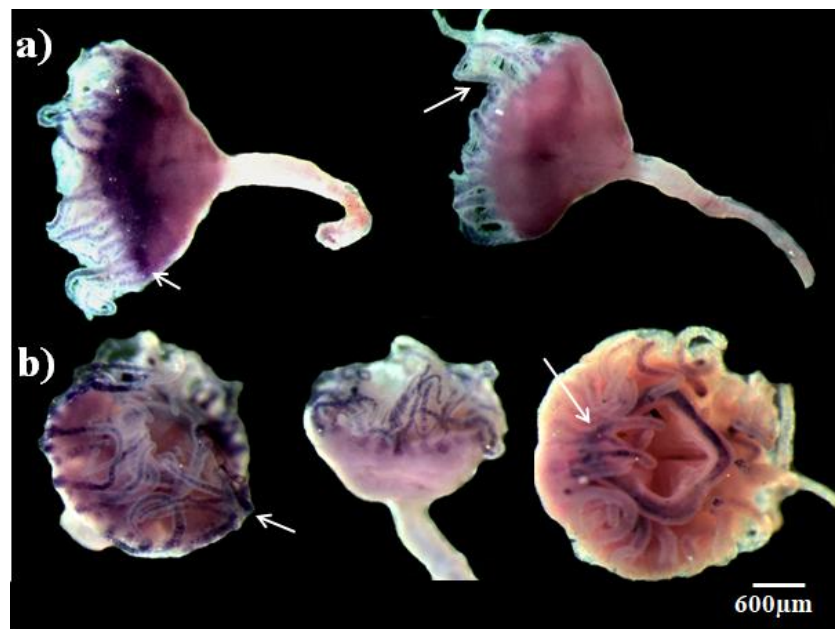


Figura 20. Expresión de CxRACK1 en pólipos de *Cassiopea xamachana*. Mediante hibridación *in situ* con la sonda de CxRACK1 antisentido se logró detectar al transcrito de CxRACK1 principalmente en las áreas de tentáculos

y cáliz (flecha); por otro lado, en el pedúnculo se observó poca señal de detección de la sonda (a). La sonda sentido hibrida principalmente en el área de los tentáculos y la boca (flecha) (b). La barra de tamaño equivale a 600 μm .

En los estróbilos fue notable la detección del transcrito con la sonda *CxRACK1* antisentido en los brazos orales los cuales se encuentran en proceso de formación, y en los bordes que delimitan la campana (Figura 21a); este patrón de expresión fue similar al resultado del ensayo realizado con la sonda sentido (Figura 21b). Las flechas en la Figura 21 señalan los brazos orales de los estróbilos donde la señal fue detectada.

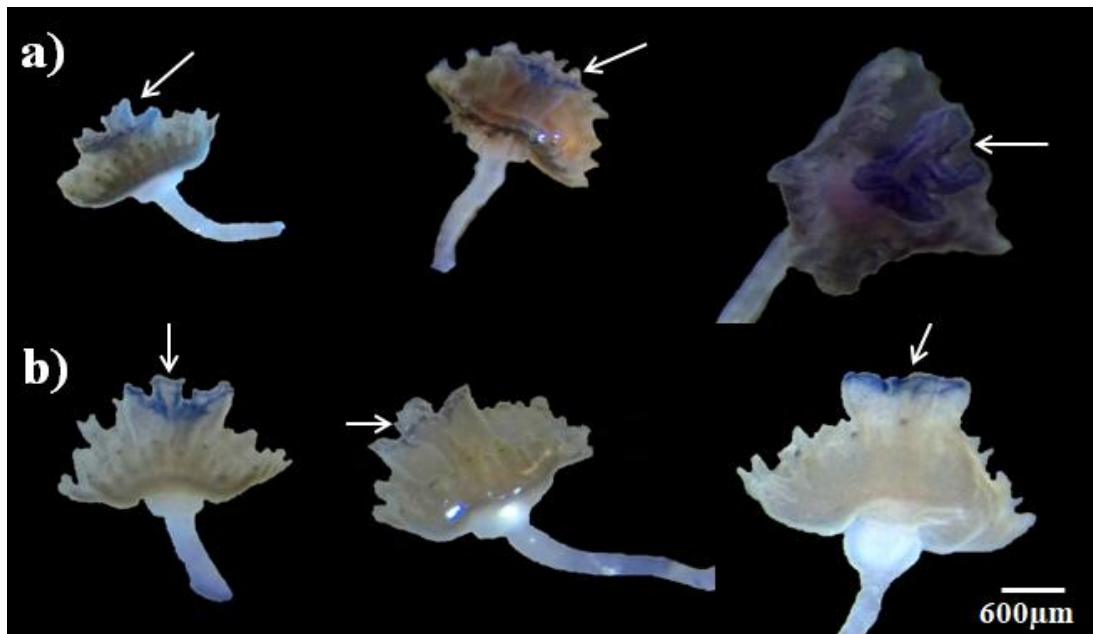


Figura 21. Identificación de transcrito de *CxRACK1* en estróbilos de *Cassiopea xamachana*. El transcrito detectado con la sonda de *CxRACK1* antisentido se localizó en la región que da lugar a los brazos orales (flechas) así como en el borde de la campana (a), la señal de la distribución de la sonda sentido es idéntica a la obtenida con la sonda antisentido (b). La barra de tamaño equivale a 600 μm .

En las medusas juveniles (éfiras), el transcrito se detectó principalmente en los brazos orales con la sonda antisentido de *CxRACK1* (Figura 22a). Por otro lado, en la hibridación con la sonda sentido se distinguió una señal en los brazos orales y la campana (Figura 22b). Las flechas en las imágenes de la Figura 22 señalan los brazos orales de la éfiras. Cabe destacar que con un acercamiento en el área de la campana en las éfiras, se distinguieron puntos púrpura en los ensayos con ambas sondas.



Figura 22. Vista subumbrelar de éfiras de *Cassiopea xamachana* con la sonda *CxRACK1*. En ambos tratamientos de hibridación *in situ* con las sondas sentido (a) y antisentido (b), se detectó el transcrito principalmente en el área de los brazos orales (flecha), así como en el área de la campana. La barra de tamaño equivale a 600 μm .

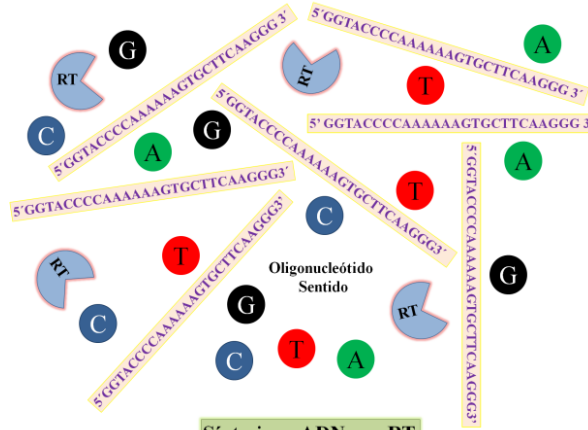
11. Identificación de la expresión del transcrito antisentido de *CxRACK1*

Los resultados obtenidos mediante la hibridación *in situ* nos plantearon la pregunta de si el transcrito de *CxRACK1* podría expresarse en ambos sentidos. El primero podría cubrir el papel de ARN mensajero, y el segundo como un transcrito natural antisentido (NATs). Para profundizar en esta idea, se diseñó una estrategia para amplificar la hebra complementaria de *CxRACK1*. Inicialmente, se realizó la extracción de ARN total y se llevó a cabo la síntesis de cADN con un oligonucleótido sentido específico. En la Figura 23 se muestra un esquema de una amplificación hipotética de la hebra antisentido y los resultados que se esperarían mediante el empleo del oligonucleótido *RACK1* 3'2F para dicha amplificación.

Por un lado, en el ARN mensajero (hebra sentido) la secuencia del oligonucleótido *RACK1* 3'2F (secuencia púrpura) no tiene una cadena complementaria para hibridar y en consecuencia, la enzima reversa transcriptasa (RT) no sintetiza ningún producto (Figura 23a). Por otro lado,

cuando existe la expresión de un transcrito antisentido, el empleo del oligonucleótido sentido es de gran ayuda para su identificación de forma específica. Este oligonucleótido tiene la oportunidad de hibridar con la hebra complementaria y de esta forma la enzima reversa transcriptasa (RT) puede sintetizar de manera específica el transcrito antisentido (Figura 23b).

a) 5' GGTACCCCAAAAAAGTGCTTCAAGGGACACAATCATTTTGTCTCTGATGTTGTCATGTCTTCTGATGGA 3' Cadena Plus mARN



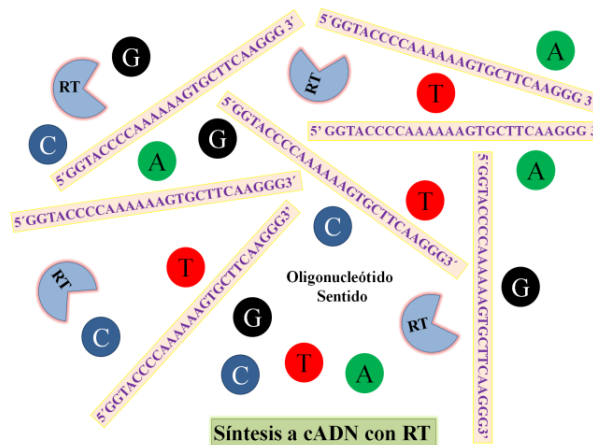
Síntesis a cADN con RT

No hay molde para que el oligonucleótido sentido hibride



No hay síntesis de cADN

b) 3' CCATGGGGTTTTTTCACGAAGTTCCTGTGTTAGTAAACAGAGACTACAACAGTACAGAAGACTACCT 5' Cadena antisentido y/o complementaria



Síntesis a cADN con RT

3' CCATGGGGTTTTTTCACGAAGTTCCTGTGTTAGTAAACAGAGACTACAACAGTACAGAAGACTACCT 5'

5' GGTACCCCAAAAAAGTGCTTCAAGGG 3' RT

El oligonucleótido hibrida en la hebra y se lleva a cabo la síntesis a cADN

Figura 23. Estrategia de identificación del transcrito antisentido de *CxRACK1*. La síntesis del ADN complementario se realizó con el oligonucleótido sentido *RACK1* 3'2F para iniciar la síntesis a cADN. En la cadena sentido no se lleva a cabo la elongación con el empleo del oligonucleótido sentido (a), ya que la secuencia es idéntica a la de la cadena; y por otro lado, este oligonucleótido sentido sólo puede hibridar con la hebra complementaria y de ahí se obtiene el transcrito antisentido (b). RT, transcriptasa reversa; A, adenina; T, timina; G, guanina, C, citosina.

11.1 Amplificación del transcrito antisentido de *CxRACK1*

Una vez obtenido el cADN de la cadena antisentido se llevó a cabo una amplificación mediante PCR con los oligonucleótidos *RACK1* 3'2F y AS*Rack1*-184R. Este juego de oligonucleótidos puede amplificar en el ADN como molde; por lo tanto, para verificar que el ARN empleado para la síntesis de cADN no contenía residuos de ADN genómico después del tratamiento con DNAsa I, una alícuota del ARN se usó como molde en la reacción control de PCR (ARN). La reacción de PCR mostró una amplificación con el cADN antisentido. La construcción Clon-*CxRACK1* se utilizó como templado para control positivo (+) y para el control negativo de la reacción solo se adicionó agua miliQ sin templado de ADN (-) (Figura 24). La secuencia de los productos amplificados fue analizada por BlastN y mostró identidad con *RACK1* de otros organismos (Cuadro 10).

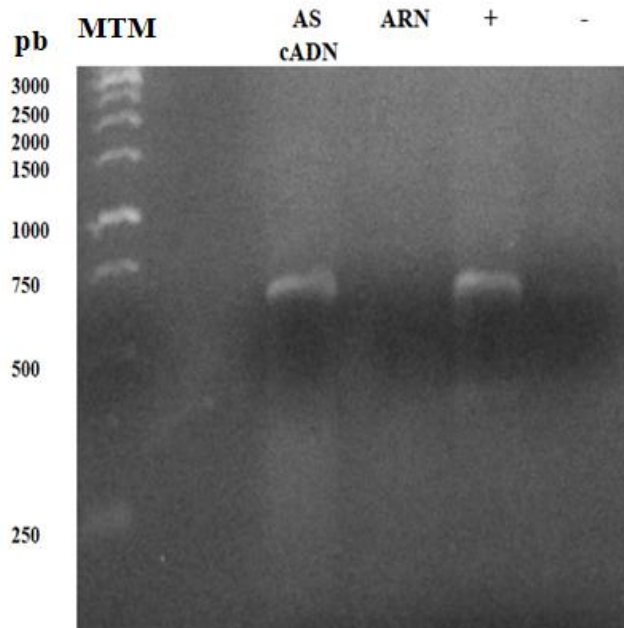


Figura 24. Amplificación de la secuencia de *CxRACK1* antisentido. Productos de PCR analizados en un gel de agarosa al 1%. Se usaron los oligonucleótidos *RACK1* 3'2F y AS*Rack1*-184R ya sea con cADN antisentido (AS cADN), ARN, la construcción Clon-*CxRACK1* (+), o agua miliQ (-) como templados para dicha amplificación. Una banda menor a 750 pb es evidente en las muestras correspondientes al cADN antisentido y el control positivo. MTM, marcador de tamaño molecular.

Cuadro 11. Identidad de la secuencia de de CxRACK1 antisentido con otros organismos

Descripción	Identidad	No. de acceso
<i>Euprymna scolopes</i> (<i>GNB2L1</i>)	78%	AF124742.1
<i>Acromegalomma interruptum</i> (aislado G beta M Contig15 ORF1)	78%	MF145125.1
<i>Ostrea edulis</i> (<i>RACK1</i>)	77%	JN184767.1
<i>Scyliorhinus canicula</i> (<i>GNB2L1</i>)	77%	AY130395.1
<i>Latimeria chalumnae</i> (<i>GNB2L1</i>)	77%	XM_005989331.2

12. Western blot con anticuerpos anti-RACK1 humano

Los análisis mediante western blot con el uso de los anticuerpos que reconocen a RACK1 en humano, ya sea policlonaes o monoclonales, detectaron una banda de un tamaño aproximado a 36 kDa, además de una banda de aproximadamente 70 kDa correspondientes al dímero de CxRACK1 señalada mediante una flecha en la Figura 25a. Como control positivo de la reacción se utilizaron extractos proteicos de hígado de ratón (H), así como extractos de proteína de tentáculo de medusa (Cx) (Figura 25a-b). Mediante un análisis tipo BlastP, el epítipo que inmunodetectan los anticuerpos tiene una identidad de 80% respecto a la secuencia correspondiente en *Cassiopea xamachana*.

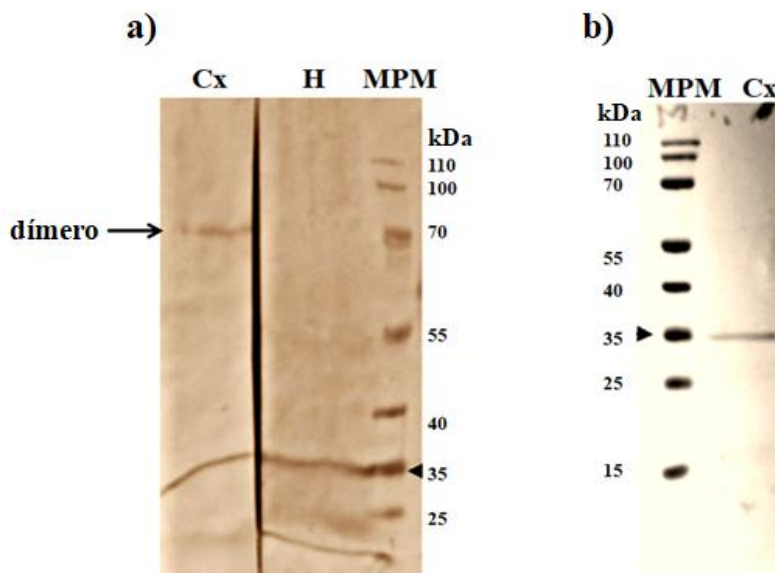


Figura 25. Western blot con anticuerpos anti-RACK1 de humano policlonal y monoclonal. En (a) se muestra la inmunodetección con el anticuerpo policlonal que reconoció una banda correspondiente a 70 kDa correspondiente al dímero de CxRACK1 (flecha) y la banda esperada de 35 kDa en el extracto total de medusa (Cx), así como la de 35 kDa en el control positivo de los lisados de hígado de ratón (H). Con el anticuerpo monoclonal (b) se detectó una señal de un peso aproximado a 35 kDa. MPM, marcador de peso molecular.

13. Inmunolocalización de CxRACK1

El objetivo de llevar a cabo una inmunolocalización fue para poder comparar la localización del transcrito (ver hibridación *in situ*) con la de la proteína. Tanto en el estadio de larva sexual como en el de plánula (larva asexual), la proteína CxRACK1 se identificó en gran parte del tejido. Sin embargo, la proteína se localizó de manera más pronunciada en el límite entre los tejidos endodérmico y ectodérmico, señalado con una flecha. Por otro lado, en el estadio de pólipo la localización de CxRACK1 se distribuyó en el área correspondiente a los tentáculos (flecha), así como en los bordes del cáliz y en el tallo. En los estróbilos se observó que el anticuerpo se unió a epítopes en los límites de los tentáculos (flecha) en metamorfosis y en los márgenes de la estructura que dará lugar a la campana. Acorde con el resultado obtenido con el estadio de estróbilo, en la éfira se detectó el mismo patrón de localización en las papilas de los brazos orales (flecha) y en los bordes de la campana completamente formada (Figura 26).

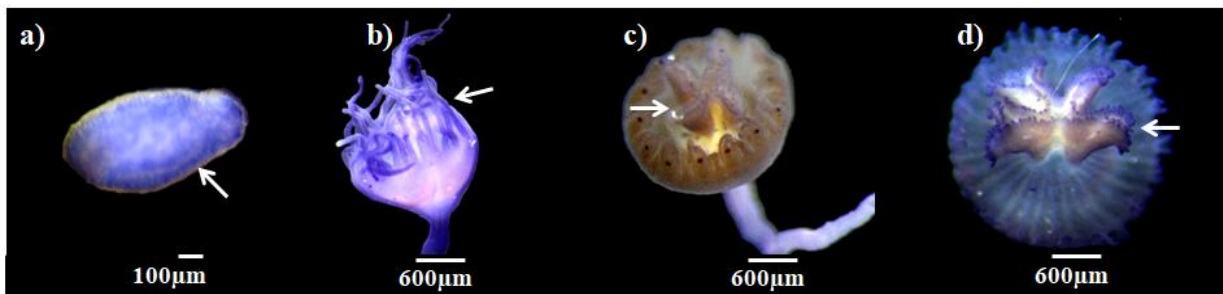


Figura 26. Inmunolocalización de CxRACK1 en distintas etapas fisiológicas de *Cassiopea xamachana*. La proteína CxRACK1 se detectó en todos los estadios de desarrollo. En larvas CxRACK1 se distribuye entre las capas del ectodermo y endodermo (flecha). En los pólipos, estróbilos y éfiras, ésta se detectó principalmente en los tentáculos desarrollados como es el caso de los pólipo (flecha) o bien, en los brazos orales en proceso de desarrollo y/o diferenciación (flecha) en los estróbilos y las éfiras. La barra de tamaño en larvas equivale a 100 μm ; en pólipos, estróbilos y éfiras la barra equivale a 600 μm .

14. Expresión heteróloga de CxRACK1

Inicialmente, se obtuvo la clonación del marco de lectura abierto de *CxRACK1* en el vector pGEM T-Easy; este plásmido cuenta con residuos de timina en sus extremos 3' y esta ventaja permite la inserción del producto de PCR mediante la complementariedad hacia los residuos de adenina que incorpora la Taq ADN polimerasa. La quimera obtenida se denominó Clon-*CxRACK1* (Figura 27a).

A partir de la construcción Clon-CxRACK1, el inserto se liberó mediante digestión enzimática y posteriormente se ligó al vector de expresión PCR T7-NT, dando como resultado el vector de expresión EXP-CxRACK1 (Figura 27b).

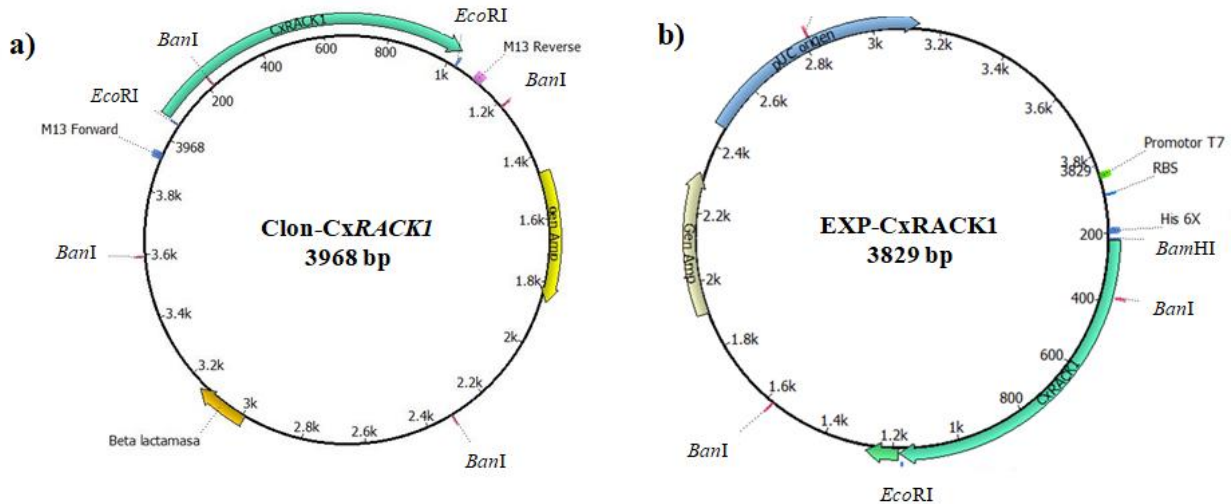


Figura 27. Construcciones de clonación y expresión de CxRACK1. a) Vector Clon-CxRACK1, con el cual se propagó el inserto correspondiente CxRACK1; y b) Construcción de expresión EXP-CxRACK1, la cual está bajo el control del promotor T7 y la secuencia de seis histidinas consecutivas, para facilitar el reconocimiento y/o purificación de la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad.

14.1. Identificación y purificación de CxRACK1

Inicialmente, los extractos de *E. coli* transformados con el vector EXP-CxRACK1 fueron visualizados en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie. Como control negativo se utilizaron extractos de bacterias transformadas con el vector PCR-T7 NT autoligado.

Con el objetivo de contrastar el perfil de proteínas de las células transformadas con el vector EXP-CxRACK1 y el vector PCR-T7 NT, así como para determinar la h de mayor inducción de la expresión heteróloga, una alícuota de los cultivos con el inductor químico de la expresión y otra de los cultivos sin éste, se tomaron cada h. En el cultivo de las células transformadas con el vector EXP-CxRACK1 se distinguió una banda de mayor abundancia entre los pesos de 35 a 40 kDa a partir de la h 1 y hasta la 5 con el inductor (Figura 28a, IPTG). Sin embargo, se observó que la proteína heteróloga se expresó aún sin el inductor (Figura 28a, SIN IPTG), aunque fue evidente que éste potenció la expresión y acertó significativamente su inicio. En los cultivos

transformados con el control negativo (vector vacío), no se detectó ninguna proteína sobreexpresada en la región del gel correspondiente a los tamaños esperados, ya sea con o sin inductor (Figura 28b).

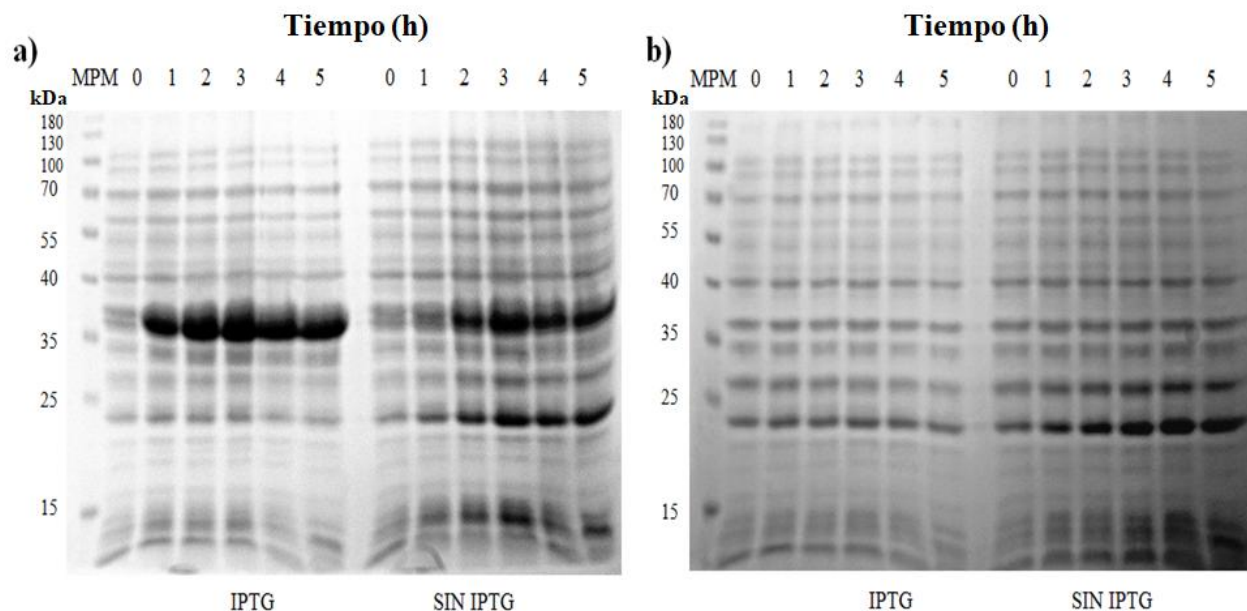


Figura 28. Cinética de la expresión de la proteína heteróloga CxRACK1 en células Rosetta. Gel de SDS-PAGE con lisados de células Rosetta con la construcción EXP-CxRACK1 (a) y el vector PCRT7-NT vacío (b). Se detectó la expresión de una proteína a partir de la h 1 en los cultivos de las células transformadas con el vector EXP-CxRACK1 inducidos con IPTG, que migró entre los tamaños de 35 a 40 kDa. En extractos transformados con el vector vacío no se identificó ningún producto expresado en el área de migración del tamaño esperado. MPM, marcador de peso molecular.

Las células BL21(DE3) pLysS y Rosetta sobre-expresaron a CxRACK1; sin embargo, sólo la proteína expresada en las células Rosetta mostró unión a la columna de afinidad cargada con cobalto o níquel en condiciones desnaturizantes. Por otro lado, bajo condiciones nativas no se detectó unión a la columna de afinidad; este resultado sugiere que la proteína CxRACK1 se expresa en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli*. Durante el ensayo de purificación de la proteína heteróloga CxRACK1 por afinidad, fue evidente que la proteína expresada en las células BL21(DE3) pLysS no se unió a la columna de iones metálicos (Co, Ni), ya que en la alícuota tomada después de ser incubada con la matriz no se observó una disminución en la abundancia de la proteína expresada. La falta de unión de CxRACK1 a la resina se comprobó en la muestra correspondiente a las perlas hervidas donde sólo se distinguió una banda ligera (Figura 29a, Perlas). Por otro lado, cuando se analizó la expresión en las células Rosetta, se observó mediante

tinción con coomasie a una banda abundante en la fracción correspondiente a las perlas hervidas, correspondiente al peso molecular de CxRACK1 (Figura 29b, flecha en carril “Perlas”).

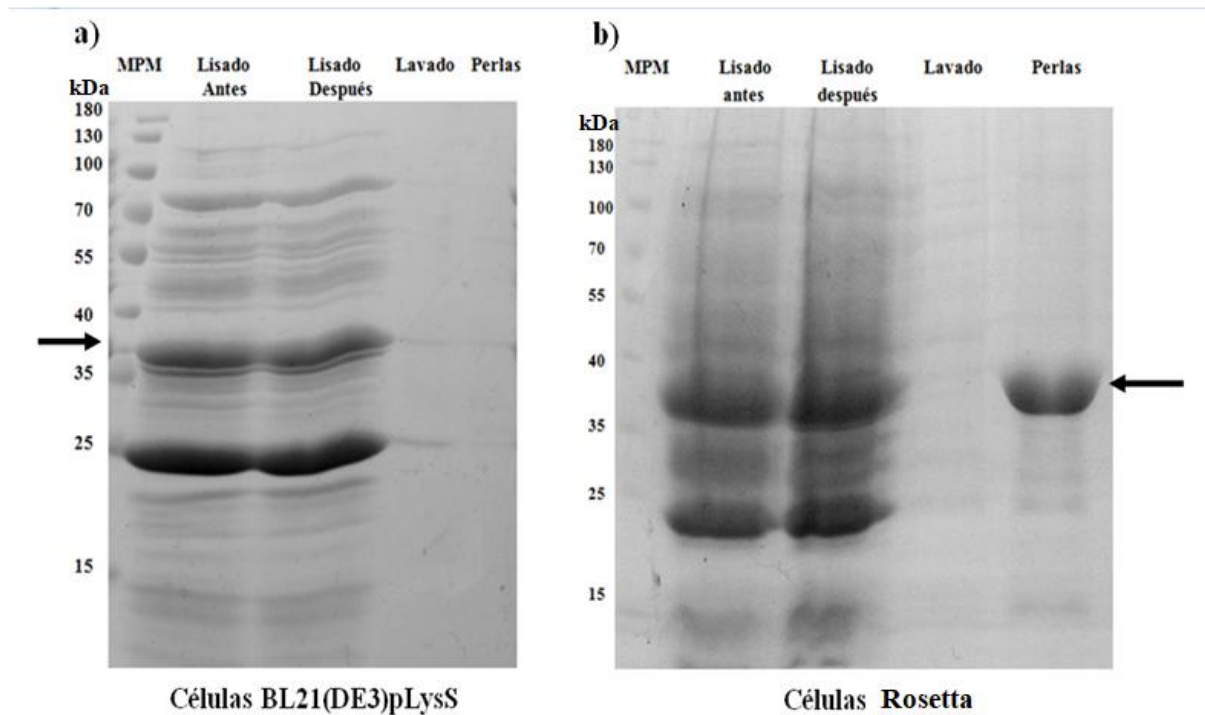


Figura 29. Purificación de CxRACK1 heteróloga por cromatografía de afinidad. (a) En el análisis de la expresión de CxRACK1 en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, la proteína heteróloga no se unió a la columna; por otro lado, en las perlas de la resina provenientes del análisis de la expresión en células Rosetta la proteína heteróloga sí se unió a la resina (flecha) (b). MPM, marcador de peso molecular.

La verificación de la identidad de la proteína CxRACK1 expresada, se determinó mediante análisis de western blot con el uso de los anticuerpos mencionados en el Cuadro 7. Los anticuerpos con mayor inmunodetección y menor unión inespecífica fueron: el anticuerpo anti-HIS, RACK1 monoclonal y/o policlonal (en el caso de este último anticuerpo, se observó una banda de aproximadamente 70 kDa la cual correspondió al dímero de la proteína como se detectó previamente; ver Figura 24). Es importante recalcar que todos los anticuerpos empleados detectaron a la proteína CxRACK1 (flechas en la Figura 30).

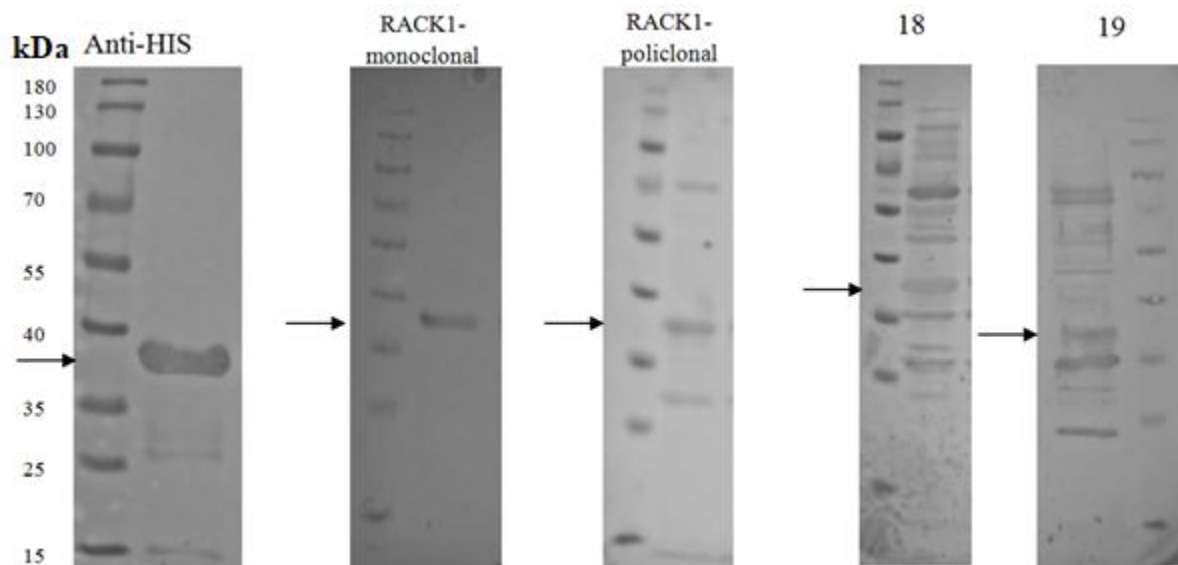


Figura 30. Identificación por western blot de CxRACK1 recombinante con diferentes anticuerpos. Los distintos anticuerpos ensayados fueron: anti-HIS, anti-histidina; RACK1-monoclonal, anti-RACK1 de humano monoclonal; RACK1-policlonal, anti-RACK1 de humano policlonal; 18 y 19, sueros anti-péptido conservado en RACK1 de dos conejos distintos. Los análisis por western blot detectaron a la proteína recombinante (flechas), con lo cual se comprobó la identidad correcta de la proteína expresada en *E. coli*.

14.2. Secuenciación de la proteína CxRACK1 recombinante

La banda purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel correspondiente a CxRACK1 recombinante (Figura 28b), fue cortada y enviada para su análisis mediante espectrometría de masas. Se identificaron 24 péptidos con una cobertura de 75.39 % (Cuadro 11); en conjunto, la muestra arrojó identidad con la Proteína Cinasa C Activada (RACK1). Algunos péptidos detectados mostraron aminoácidos correspondientes a los sitios de unión a PKC (Cuadro 12, letras resaltadas en amarillo).

Cuadro 12. Péptidos obtenidos de la proteína CxRACK1 expresada.

Numero de péptido	Secuencia
1.-	GHNHFVSDVVSSDGQFALSGSWDK
2.-	GTLKGHTGWVTQIATSPQTPDQILSSR
3.-	GHNHFVSDVVMSSDGQFALSGSWDK
4.-	GHTGWVTQIATSPQTPDQILSSR
5.-	TNHFGHNGYLNTVTVSPDGSLeASGGK
6.-	DKTLILWELTRDDNSYGTPK
7.-	SIVDEVKPELISMSTSK
8.-	YTITEDSHTEWVSAVR
9.-	HLYTLDGGDIIEALFSPNR
10.-	SIVDEVKPELISSTSK
11.-	DVLSVAFSADNR
12.-	YWLCAATGPIIK
13.-	DKTLILWELTR
14.-	LWDLNAGVTTR
15.-	TLILWELTR
16.-	LWNTLGVCK
17.-	DDNSYGTPK
18.-	DGLAMLWDLNDGK
19.-	IWDLESK
20.-	TLILWELTRDDNSYGTPK
21.-	QIVSGSR
22.-	VWQVTR
23.-	LWDLNAGVTTRR
24.-	RFVGHTK

Las letras en amarillo indican los sitios de unión a PKC

15. Caracterización de PKC en *Cassiopea xamachana*

15.1. Amplificaciones para obtener secuencias de PKC de *C. xamachana*

Se diseñó un juego de varios pares de oligonucleótidos dirigidos hacia PKC; sin embargo, solamente con 3 de estos se logró amplificar la secuencia esperada. Con algunos oligonucleótidos no se obtuvo ninguna amplificación mediante PCR, a pesar de variar diferentes parámetros como: los ácidos nucleicos molde (ADN, cADN), las concentraciones de Mg²⁺ (1.5 mM hasta 4 mM), las temperaturas de alineamiento, y la adición de potenciadores como DMSO 5% (Frackman et al., 1998). Por otro lado, con otros oligonucleótidos se obtuvieron amplificaciones, pero las secuencias no correspondieron a PKC ni a otras secuencias de *C. xamachana*, ya que mostraron identidad con bacterias endosimbióticas tales como: *Candidatus portiera* y *Arsenophonus*.

La amplificación que sí correspondió a PKC se obtuvo con los oligonucleótidos PKC-684-Fwd y PKC-1114-Rev, que generaron un producto de 360 pb (Figura 31). Mediante la utilización de los oligonucleótidos ATG-PKC y PKC-1114-Rev, se observó una banda única de aproximadamente 750 pb. Esta amplificación correspondió a los dominios C1 y C2 de PKC (Figura 32 flecha). La secuencias amplificadas mostraron una identidad con la PKC (Cuadro 12). Más aún, la mayor identidad correspondió a organismos pertenecientes al filo Cnidaria, lo cual muestra que la amplificación efectivamente generó un producto proveniente de *C. xamachana* y no de otras especies como en amplificaciones previas.

La secuencia amplificada fue clonada en el vector pGEM-T Easy, la cual generó la construcción clon-Cx-PKC-C2, el vector pGEM-T Easy contiene los sitios de reconocimiento para las polimerasas T7 y SP6 en los extremos del sitio múltiple de clonación; por tal razón, dicha construcción se utilizó para la síntesis de las sondas empleadas en el ensayo de hibridación *in situ*. (Figura 33)

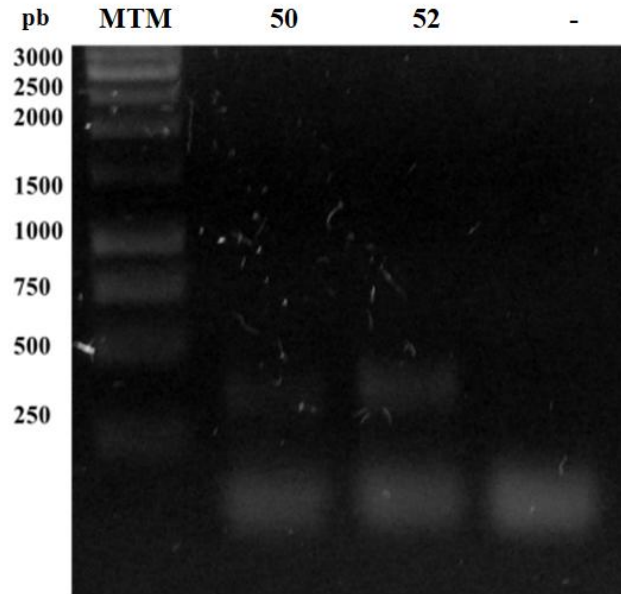


Figura 31. Amplificación de la secuencia de PKC (360 pb) de *Cassiopea xamachana*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *PKC-684-Fwd* y *PKC-1114-Rev*, que mostró que a las temperaturas de 50°C y 52°C se generó una banda después de la amplificación. MTM, marcador de tamaño molecular.

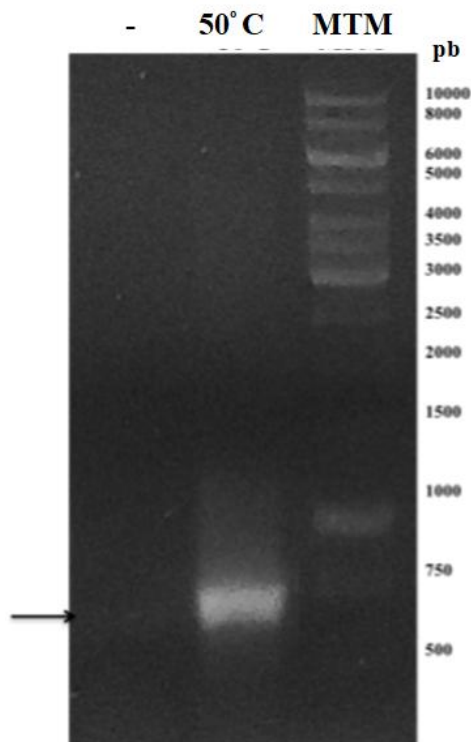


Figura 32. Amplificación de CxPKC. Gel de agarosa al 1% con el producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos *ATG-PKC* y *PKC-1114-Rev* donde se obtuvo un amplicón de aproximadamente 750 pb. En el control negativo (sin ADN molde) no se detectó ninguna amplificación. MTM, marcador de tamaño molecular.

Cuadro 13. Secuencias amplificadas que mostraron identidad con *PKC*

Descripción	% Identidad	Número de acceso
<i>Hydra vulgaris</i> proteína cinasa C tipo beta	74%	NM_001309681.1
<i>Lytechinus pictus</i> proteína cinasa C	74%	U02967.1
<i>Hydra vulgaris</i> proteína cinasa C 1b	72%	Y12857.1
<i>Priapulius caudatus</i> proteína cinasa C tipo alfa	73%	XM_014816143.1
<i>Acyrtosiphon pisum</i> proteína cinasa C	72%	XM_008183973.2

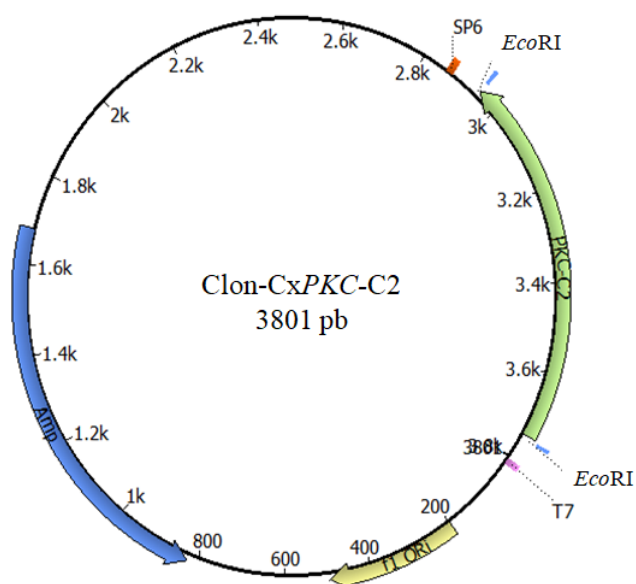


Figura 33. Construcción de clona de CxPKC. El inserto de los dominios C1-C2 CxPKC está flanqueado por los sitios de reconocimiento de las ARN polimerasas T7 y SP6, lo cual facilitó la síntesis de las sondas.

15.2. Secuencia parcial de *PKC* en *C. xamachana*

La secuencia parcial obtenida de CxPKC constó de 777 pb y abarcó el dominio C1 en tándem remarcado en amarillo, y el dominio C2 señalado en verde. Dentro de este dominio se identificó el sitio de unión a RACK1 (MDPTGLSDPYVKV), según lo reportado por Steebins y Mochly-Rosen (2011)(Figura 34, subrayado en negro).

atgagtgattcaaagaagagtataacttctagtgaaagtaagccaaaaggcttcaataga
 M S D S K K S I T S S E S K P K G F N R

cgtggtgcaatcagagagaaaaatgtctacgaagttaaggatcacaagtttgtgccgaag
 R G A I R E K N V Y E V K D H K **F V P K**

tttttccggcagcctaccttctgtgctcattgcaaaagatttcattctggggttttgtagca
F F R Q P T F C A H C K D F I W G F V A

actcaaggctatcaatgcaaagtatgcagctttgtcgttcataagcgatgtcatgaatat
T Q G Y Q C K V C S F V V H K R C H E Y

gtctcgtttcaatgccccggcgccgacatacaaaaagattctgacgccccacagtcgccg
V S F Q C P G A D I Q K D S D A P Q S P

catcgatttaaagttcacacgtacactagtgccaacattttgtgatcattgtgggtctcta
H R F K V H T Y T S P T F C D H C G S L

ctgtatggcctgctacatcaaggcttgaaatgccaaagcatgtgaaatgaacgtccataaa
L Y G L L H Q G L K C Q A C E M N V H K

aggtgtgagaagtcagggtgtattcctaaactatgtggcgcagatcacaccgaaagacga
R C E K S G C I P K L C G A D H T E R R

ggaagaatccacttgaagatcaaatttacgggaaaagcagaaagcgatggaaatctggaa
 G R I H L K I K F T G K A E S D **G N L E**

attgaagtgagagaagctaagaatcttatcccaatggatccaactggcctttcggatcct
I E V R E A K N L I P M D P T G L S D P

tatgtaaaagtaaagctgaagcctgatcctgagaaagagacgaaaaagaaaacgaacatc
Y V K V K L K P D P E K E T K K K T N I

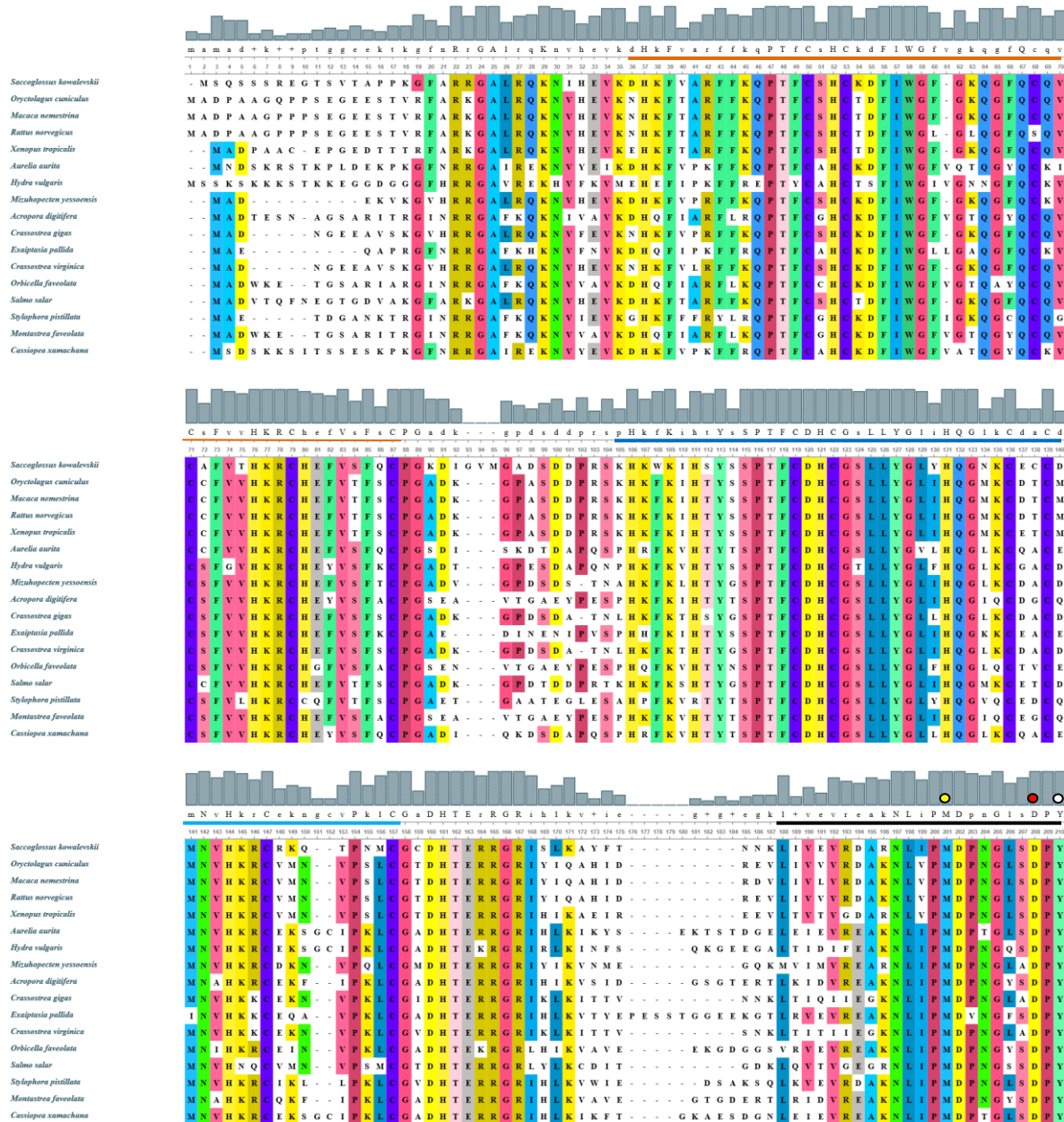
tcaagaagtgccttgaatcctgtctggaatcagaagttttgttcaaaatctcaaaacag
S K K C L N P V W N Q K F L F K I S K Q

gattttgatcgtcgattgagtattgaagctctgggactgggacagagcaacggcgaat
D F D R R L S I E V W D W D R A T A N

Figura 34. Secuencia nucleotídica-aminoácídica de PKC. La secuencia obtenida de PKC incluyó a los dominios C1 y C2; en éste último se encuentra el sitio de unión a RACK1 (subrayado en negro).

16. Identidad de la secuencia de CxPKC con otros organismos

En un alineamiento múltiple con secuencias correspondientes a los dominios C1 y C2 de PKC en distintos organismos se observó la conservación de los sitios de unión a Ca^{2+} dentro del dominio C2 (M201 y D208) en círculos amarillo y rojo, y el sitio de fosforilación Y210 (círculo blanco). Además, se delimitan los dominios C1 donde se lleva a cabo la unión a diacilglicerol y/o ésteres de forbol (línea naranja y azul) y el dominio C2 (línea negra) (Figura 35).



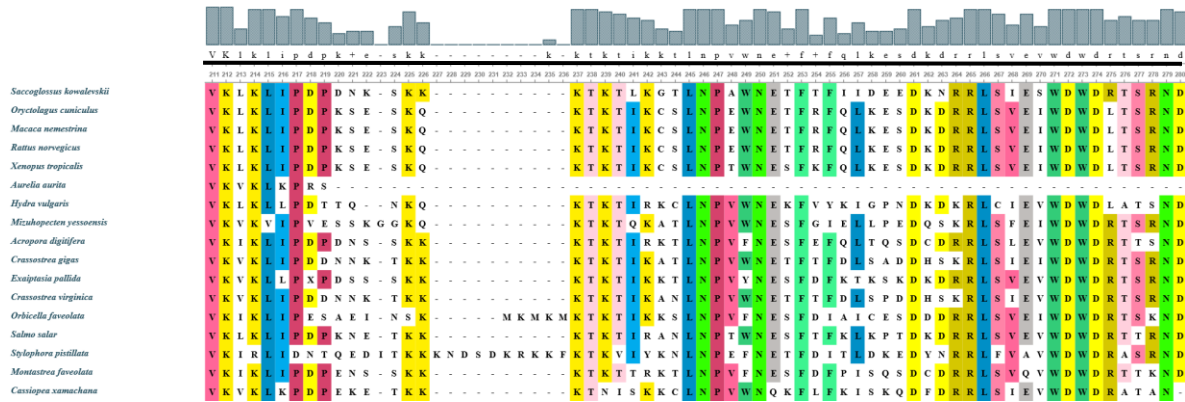


Figura 35. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de CxPKC con las de otros organismos. Secuencia aminoácídica de PKC donde se delimitan los dominios C1 (línea naranja y azul) y C2 (línea negra).

17.- Análisis filogenético de PKC

En el análisis filogenético de PKC se observó que el grupo perteneciente a los cnidarios deriva de un mismo linaje (círculos púrpuras), lo que es considerado como un grupo monofilético; como grupo hermano se distingue a los moluscos (cuadrado verde). Otros organismos como gusanos (triángulo azul invertido), peces (rombo amarillo), anfibios (rombo gris), roedores (triángulo rojo) y primates (círculo celeste), se muestran como politomía filogenética (Figura 36).

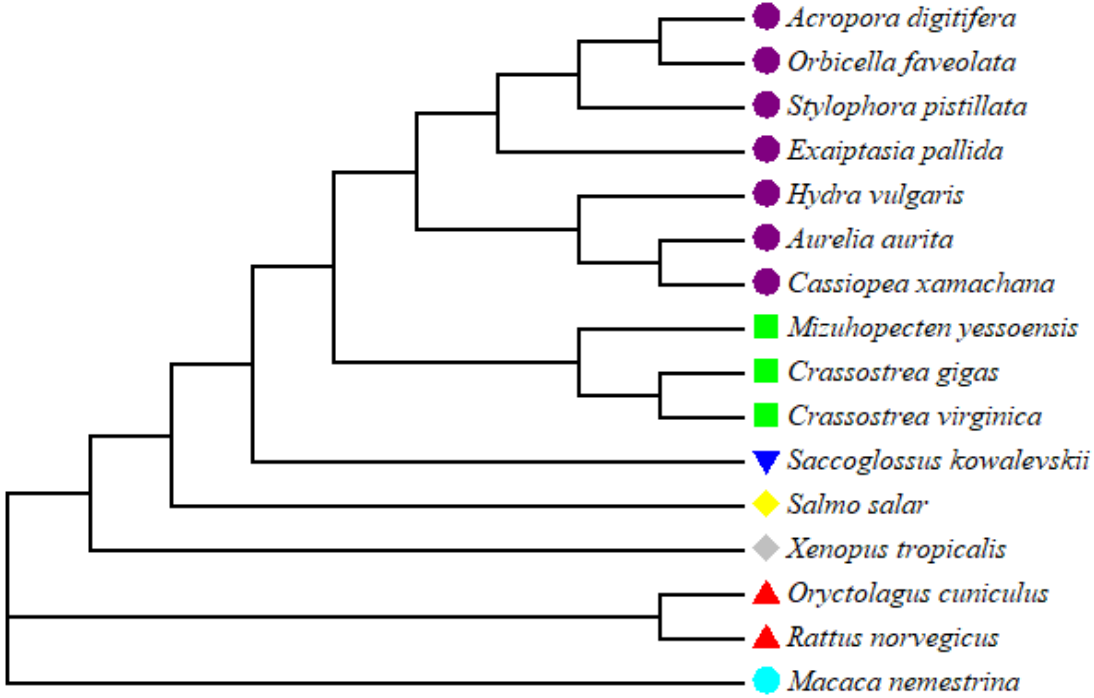


Figura 36. Árbol filogenético de PKC. Los organismos pertenecientes al Phylum Cnidaria se agrupan como monofiléticos (círculos púrpura), compartiendo un ancestro común con otros invertebrados.

18.- Detección de *CxPKC* mediante hibridación *in situ*

De manera contraria a los experimentos donde se utilizó la sonda de *CxRACK1* sentido como control negativo, la sonda generada como sentido con el transcrito de *CxPKC* no mostró ningún tipo de señal de fondo. En las larvas plánulas la sonda antisentido de *CxPKC* generó una señal principalmente en la zona aboral (Figura 37a). Como control negativo se empleó la sonda sentido la cual no mostró ningún tipo de señal (Figura 37b).

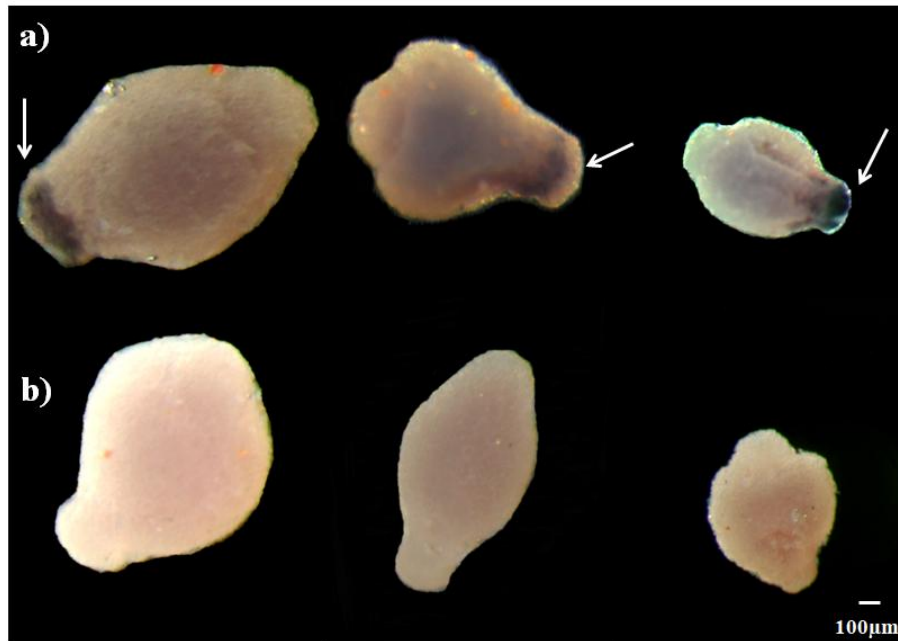


Figura 37. Identificación de *CxPKC* en plánulas. Hibridación *in situ* con sonda sentido (b); en los organismos tratados con esta sonda no se detectó ninguna señal de reconocimiento. Por otro lado, en las larvas incubadas con la sonda antisentido, el transcrito se observó principalmente en la región aboral de la larva (flecha) (a). La barra de tamaño equivale a 100 μm .

En el estadio de pólipo, los organismos incubados con la sonda antisentido indicaron expresión de *CxPKC* tanto en el área del hipostoma como en los tentáculos; además, un acercamiento en el área del cáliz mostró la ocurrencia de puntos púrpura, y también se observó señal a lo largo del pedúnculo (Figura 38a flecha). Con la sonda sentido no se detectó ninguna señal de hibridación (Figura 38b).

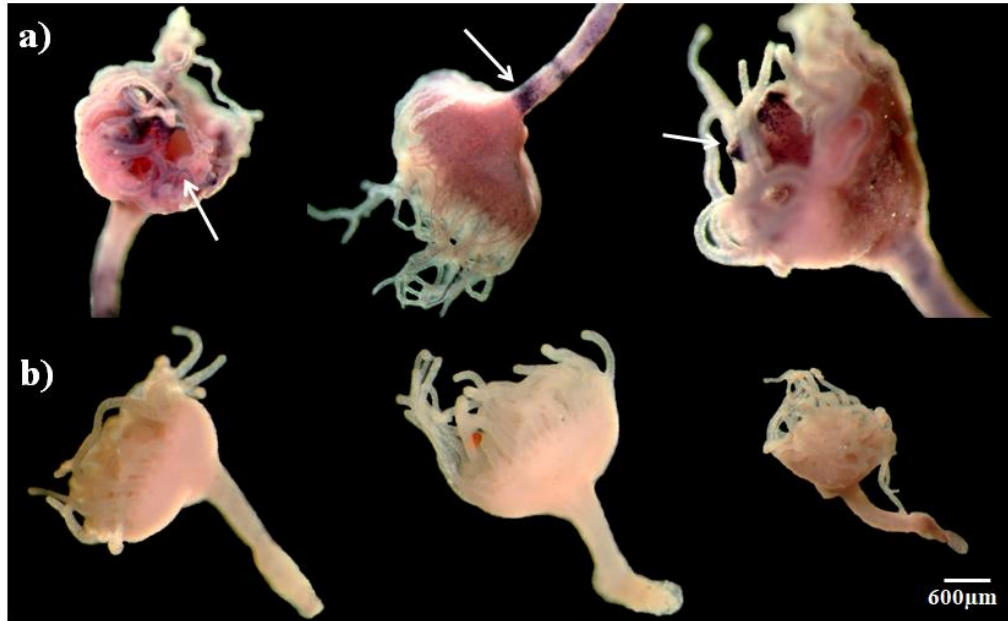


Figura 38. Localización del transcrito de CxPKC en pólipos de *C. xamachana*. Con el empleo de la sonda antisentido, se identificó una distribución del ARN mensajero principalmente en los tentáculos, el cáliz y la boca (a, flecha). En el control negativo (sonda sentido) no detectó ninguna señal (b). La barra de tamaño equivale a 600 μm .

Con los diferentes ensayos en los estadios de estróbilo, se detectó la señal de CxPKC en los brazos orales en desarrollo (Figura 39a); esta distribución se conservó hasta el estadio de éfira (Figura 40a). La sonda sentido en los estadios de estróbilo y éfira no generó ninguna señal (Figuras 39b y 40b).



Figura 39. Detección del transcrito de CxPKC en estróbilos. En el estadio de estróbilo, el tallo mostró tinción púrpura, además de puntos en los tentáculos así como en los apéndices que darán lugar a los brazos orales (a); por el contrario, en los estróbilos incubados con la sonda sentido (control negativo), no se observó ningún tipo de señal (b). La barra de tamaño equivale a 600 μm .

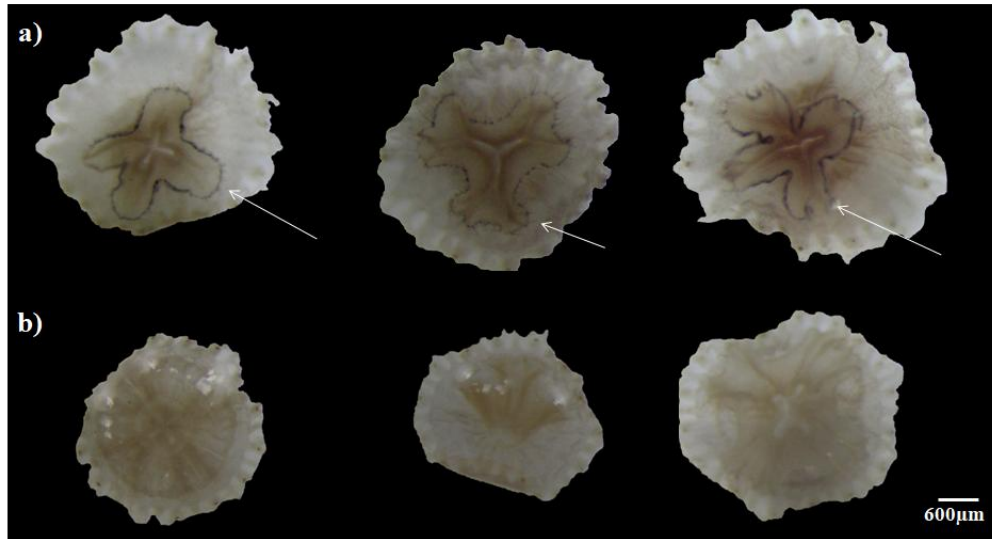


Figura 40. Hibridación *in situ* de CxPKC en éfiras. La localización del transcrito de CxPKC en las éfiras se observó en los brazos orales en todos los organismos que fueron ensayados con la sonda antisentido (a, las flechas señalan los brazos orales de las éfiras). En el control negativo (sonda sentido), no se observó ningún tipo de marca de fondo (b). La barra de tamaño equivale a 600 µm.

19. Western blot con anticuerpos anti-PKC de humano

En los ensayos de western blot con los extractos de medusa donde el tejido fue molido directamente en nitrógeno líquido e incubados con el anticuerpo que inmunodetecta la proteína PKC beta de humano, se observó una banda entre los 55 y 70 kDa y otra de aproximadamente 40 kDa (Figura 41, carril 1). Por otro lado, en el tejido macerado con el homogeneizador Dounce se observó una banda de alrededor de 40 kDa (Figura 41, carril 2). El peso molecular de la PKC en humano consta de 671 aminoácidos y tiene un peso molecular de 76.8 kDa con un pI de 6.5. Al respecto, cuando el tejido se procesó para los ensayos tales como: isoelectroenfoque, centrifugación para la eliminación del simbiote, o bien para el análisis en fracciones microsomales, el anticuerpo inmunodetectó una banda de menor peso entre las bandas de referencia de 40 a 55 kDa (Figura 41).

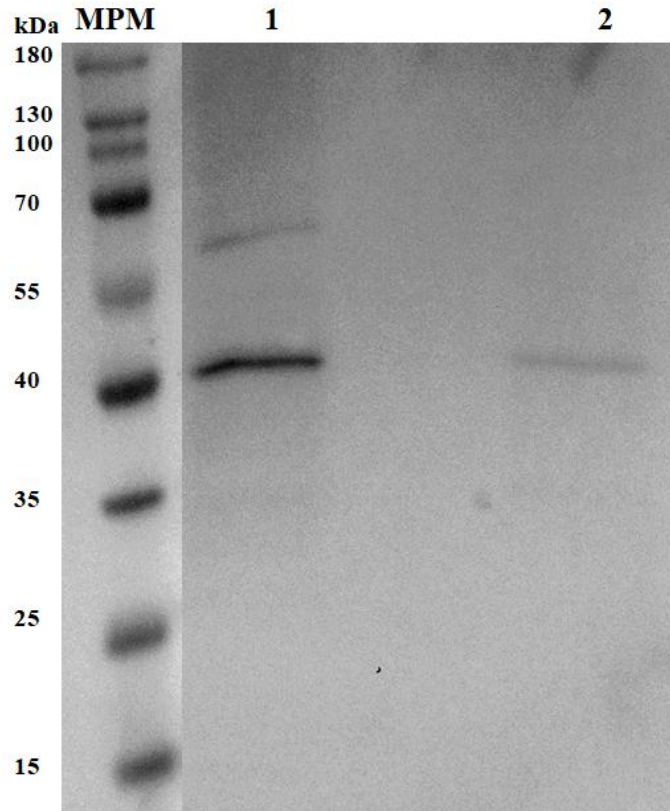


Figura 41. Patrón de proteólisis de CxPKC analizado por western blot con anticuerpos anti-PKC. La proteína CxPKC fue degradada proteolíticamente cuando fue sometida a procesos de separación, centrifugación y precipitación. Cuando los extractos fueron manipulados rápidamente se alcanzó a detectar la proteína completa de aproximadamente 70 kDa y una porción de la proteína en vía de ser degradada, de 40 kDa (carril 1). En el carril 2 se identificó a la proteína completamente cortada después de varias manipulaciones de los extractos. MPM, marcador de peso molecular.

19.1 Identificación de CxPKC en fracciones microsomales

En los lisados totales de *C. xamachana* analizados por western blot, se observó una banda de entre 55 a 40 kDa reconocida por el anticuerpo anti-PKC. Posteriormente, se analizaron por western blot fracciones del extracto después de un fraccionado sub-celular por centrifugación. Después de la centrifugación, se colectó la fracción microsomal total (P1) y la fracción correspondiente a la parte soluble denotada como SN1. En el sobrenadante 2 (S2), donde se encuentran las proteínas liberadas iónicamente, no se detectó a PKC, mientras que en la pastilla 2 (P2) sí se detectó su presencia. En el sobrenadante 3 (S3), que es la fracción rica en detergente después de extraer a P2, se condensan las proteínas altamente hidrofóbicas que podrían corresponder a proteínas unidas intrínsecamente a membrana, mientras que en el sobrenadante 4 (S4), que es la fracción soluble de la extracción de P3 con Na_2CO_3 , se liberan proteínas unidas

intrínsecamente a membranas luminales y plegadas de acuerdo a Islas-Flores et al. (2009). Finalmente, en el sobrenadante de la pastilla P3 hervida directamente en buffer de Laemmli, se encuentran las proteínas que no fueron liberadas en los tratamientos previos y muy fuertemente asociadas a membranas y/o matriz celular. En esta última fracción es donde fue detectada PKC y por lo tanto, estos resultados fuertemente sugieren que PKC se encuentra principalmente en las fracciones membranales más resistentes a la extracción (Figura 42).

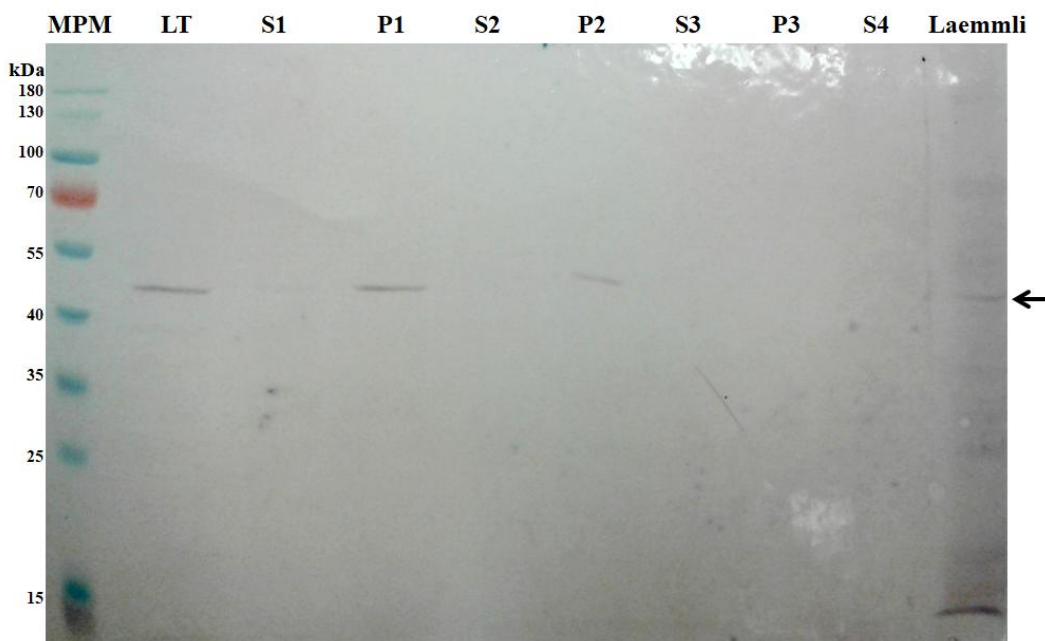


Figura 42. CxPKC en fracciones microsomaes analizada por western blot con anticuerpos anti-PKC. CxPKC se detectó principalmente en las fracciones membranales, correspondiente a las pastillas de la muestra durante el desarrollo del protocolo. PKC fue identificada en las fracciones LT, S1, P1, P2 y Laemmli. LT (lisado total), S1 (sobrenadante 1), P1 (pastilla1), S2 (sobrenadante 2), P2 (pastilla 2), S3 (sobrenadante 3), P3 (pastilla 3), S4 (sobrenadante 4). MPM, marcador de peso molecular.

19.2 Identificación de CxPKC en electroforesis de doble dimensión

Con el objetivo de determinar la confiabilidad de la inmunodetección del anticuerpo anti PKC se realizó la separación de los extractos totales de *C. xamachana* por punto isoeléctrico y posteriormente por peso molecular. El patrón de proteínas separadas por punto isoeléctrico de los extractos se muestra en la Figura 43.

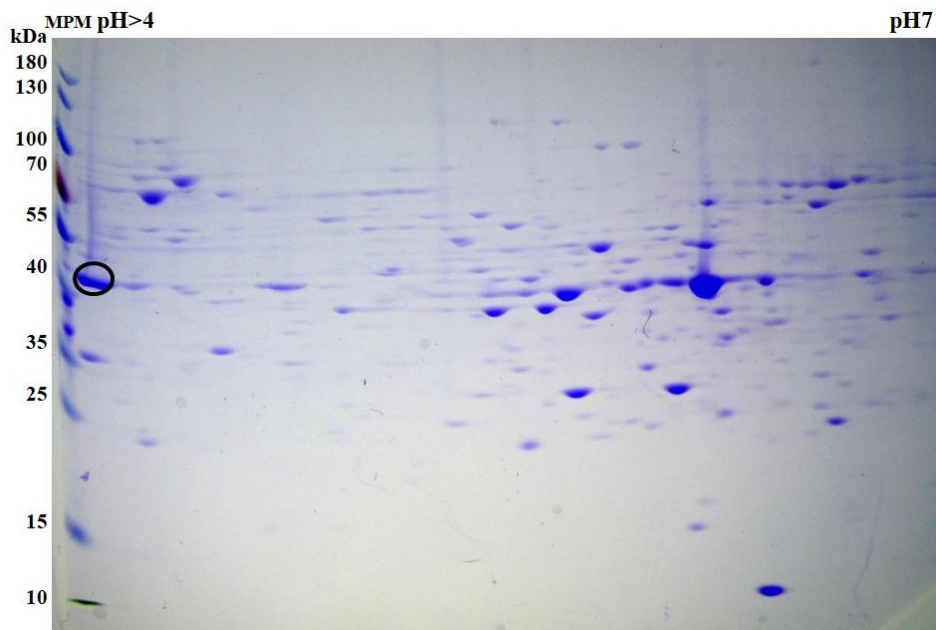


Figura 43. Isoelectroenfoque de proteínas de *C. xamachana*. El mosaico de proteínas de *C. xamachana* separado en tiras de isoelectroenfoque con un rango de pH de 4 a 7. La tira de 17 cm del isoelectroenfoque fue cortada por la mitad y montada en geles de 12.5X6.5 cm (pH>7) para seguir con la corrida SDS-PAGE. MPM, marcador de peso molecular.

Una vez obtenida la adecuada separación de las proteínas, se realizó un western blot para identificar el punto correspondiente a CxPKC. Como se esperaba, la reacción identificó un punto entre las bandas de 40 a 55 kDa correspondiente a CxPKC correspondiente a la proteína degradada proteolíticamente (Figura 44a, círculo negro). Este punto se reconoció en los geles teñidos con Coomassie (Figura 43, círculo negro). A partir de este punto se llevó a cabo un segundo western blot para verificar su reconocimiento por el anticuerpo.

En el gel de SDS-PAGE se seleccionaron diferentes puntos al azar identificados como 1 a 7 en el western blot (Figura 44b) y el punto hipotético correspondiente a CxPKC. Después de analizar cada uno, únicamente se observó reacción cruzada con el anticuerpo sobre el punto previamente seleccionado como CxPKC y en los extractos totales de *C. xamachana* denotados como “extractos positivos”. Con la certeza de que el punto señalado en la Figura 44 es específico en cuanto al reconocimiento por el anticuerpo, éste se disectó del gel y fue enviado para ser secuenciado.



Figura 44. Western blot de PKC en IEF seguido de SDS-PAGE de proteínas de *C. xamachana* (a), y de los puntos disectados y analizados de nuevo (b) con anticuerpos anti-PKC. El anticuerpo anti-PKC detectó un punto dentro de la muestra isoelectroenfocada. (a). El punto fue sometido a un segundo western blot para verificar su identidad, corroborando su coincidencia (b). MPM, marcador de peso molecular.

20.- Inmunolocalización de CxPKC

Con el anticuerpo anti-PKC beta en los ensayos de inmunolocalización, se observó que en las larvas plánulas la proteína se encontró exclusivamente en la región aboral (Figura 45a); por otro lado, en los pólipos, las estructuras reconocidas por el anticuerpo fueron principalmente las de la zona correspondiente a los tentáculos (Figura 45a). En los estróbilos, ya sea en el proceso de estrobilación temprano o tardío, la señal se detectó primordialmente en el espacio que posteriormente dará lugar a los brazos orales (Figura 45a). La localización de CxPKC en las éfiras enseñó el mismo patrón respecto al estadio de estróbilo (Figura 45a), ya que también se localizó en la zona de los brazos orales. Como controles negativos de los ensayos de inmunolocalización para ambas proteínas (CxRACK1 y CxPKC), se utilizaron organismos de cada estadio incubados sólo con el anticuerpo secundario (Figura 45b). Para este efecto, en ninguno de los estadios analizados se observó una reacción colorimétrica como fondo del anticuerpo secundario, sugiriendo la alta especificidad del anticuerpo en la inmunolocalización de CxPKC.

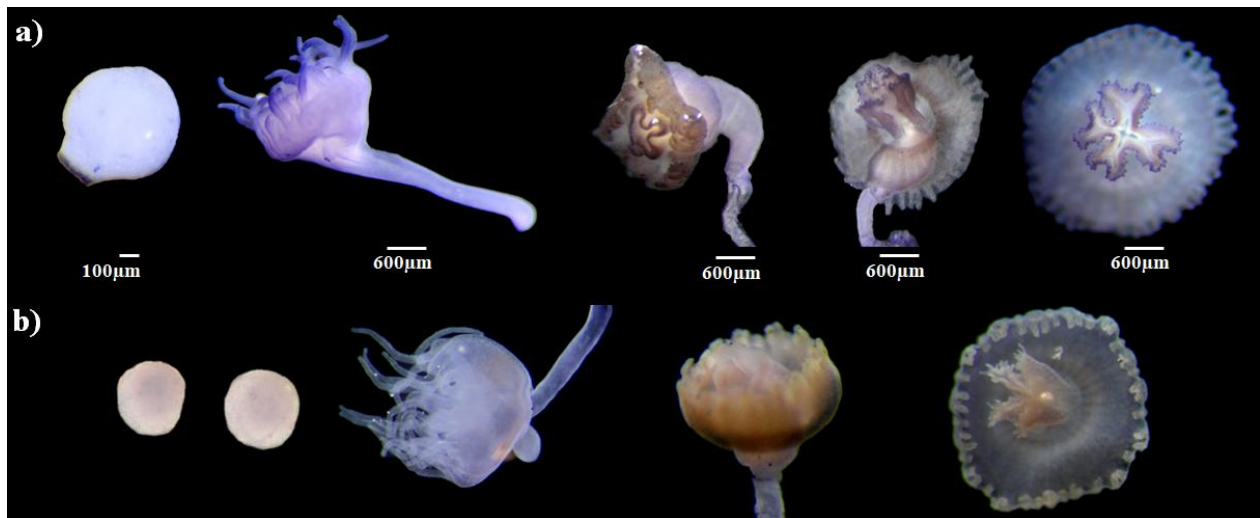


Figura 45. Inmunolocalización de CxPKC en *C. xamachana*. a) La distribución de la proteína CxPKC en los diferentes estadios de desarrollo de *C. xamachana* se detectó en la zona aboral en larva; en tanto en los demás estadios (pólipo, estróbilo y éfira), se observó en los tentáculos y/o estructuras que darán lugar a los brazos orales. La barra de tamaño equivale a 100 μm en larva y 600 μm en pólipos, estróbilos y éfiras. b) Los diferentes estadios de *C. xamachana* (larva, pólipo, estróbilo y éfira) fueron incubados únicamente con el anticuerpo secundario anti-conejo para identificar el fondo colorimétrico generado. En ninguno de los estadios se observó reacción significativamente mayor a cuando se incluyó el anticuerpo secundario. La barra de tamaño equivale a 100 μm en larva y 600 μm en pólipos, estróbilos y éfiras.

21. Factor de elongación FE1 alfa en *C. xamachana*

21.1 Amplificación mediante PCR

La finalidad de obtener la secuencia correspondiente al *FE1 α* fue para usarlo como gen de referencia para los ensayos de PCR punto final, ya que se ha reportado su estabilidad comparado con otros genes de referencia (Nicot et al., 2005), y su uso exitoso en ensayos de qRT-PCR (Islas-Flores et al., 2005; Suescún-Bolívar et al., 2016). Con el uso de los oligonucleótidos *FE1 α Cx-229-255F* y *FE1 α Cx-1277-1302R*, se obtuvo un producto de amplificación de 1069 pb (Figura 46 flecha), dicho producto mostró identidad con secuencias correspondientes al Factor de Elongación 1 alfa (*FE1 α*); y los organismos que arrojaron una mayor identidad correspondieron a esponjas, bivalvos y cnidarios (Cuadro 13).

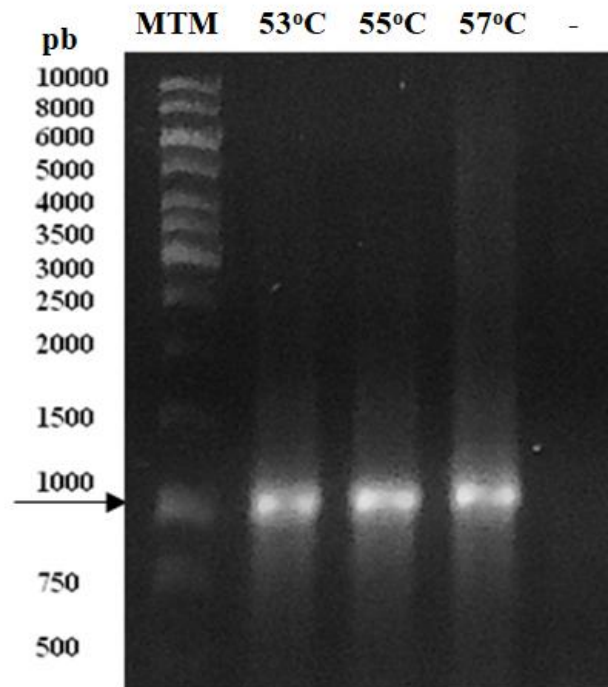


Figura 46. Amplificación de CxFE1 α . Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los oligonucleótidos *FE1 α Cx-229-255F* y *FE1 α Cx-1277-1302R* a diferentes temperaturas de alineamiento (53°C, 55°C y 57°C). En las reacciones a las 3 temperaturas probadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado. En el control negativo (-) sin ADN molde no se detecta ningún producto. MTM, marcador de tamaño molecular.

Cuadro 14. Identidad de secuencias amplificadas con los oligonucleótidos *FE1αCx-229-255F* y *FE1αCx-1277-1302R*

Descripción	% Identidad	Número de acceso
<i>Microciona porifera</i> factor de elongación 1 alfa	78%	DQ087476.1
<i>Haliotis tuberculata</i> mRNA para factor de elongación 1 alfa	78%	FN566842.1
<i>Haliotis rufescens</i> factor de elongación 1 alfa	78%	DQ087488.1
<i>Lissodendoryx colombiensis</i> <i>EF1</i> alfa	77%	JQ606693.1
<i>Lingula anatina</i> factor de elongación 1 alfa mRNA	77%	XM_013550345.1

22. Interacciones entre CxRACK1 y CxPKC

22.1 Replegamiento de CxRACK1

Una vez que la proteína CxRACK1 se purificó mediante cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalizantes, se llevaron a cabo diversos lavados disminuyendo la concentración de urea, para favorecer que la proteína CxRACK1 se reconfigurara lo más cercanamente posible a su estructura nativa. En la Figura 47 se muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie con los extractos totales (ET) de *E. coli*, los extractos no unidos a la columna de afinidad iónica (ED), los lavados con el buffer de equilibrio, las fracciones a diferentes concentraciones de urea (8M, 6M, 4M, 2M, 1M, 0,5M), el lavado con el buffer de equilibrio (BE), y las fracciones correspondientes a la elución (El) y las perlas de resina de la columna (Pe). Se distinguió a la proteína purificada como una banda única con un peso molecular entre 35 a 40 kDa en la elución y en las perlas de la resina.

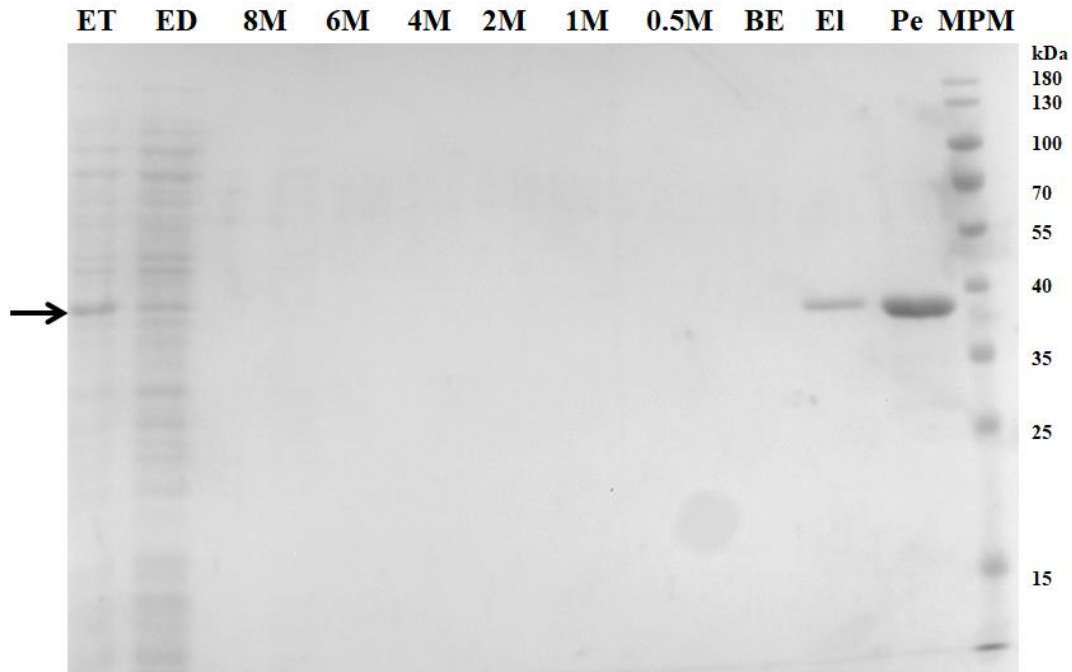


Figura 47. Purificación y re conformación de CxRACK1. La proteína CxRACK1 expresada heterológicamente en *E. coli*, fue lavada con urea a distintas concentraciones graduales hasta su completa eliminación. En las alícuotas de las fracciones finales se observó una banda del tamaño esperado (EI, Pe). En los diferentes lavados con urea de las concentraciones de 8 M hasta 0.5 M no se detecta CxRACK1. La flecha señala a CxRACK1 expresada en *E. coli* y su presencia en las fracciones correspondientes a los extractos totales (ET), extractos después (ED) elución (EI) y las perlas hervidas (Pe). MPM, marcador de peso molecular.

22.2 Ensayo pull-down

Para el ensayo de pull-down se emplearon 2 fuentes de proteínas: larvas aposimbióticas y medusa adulta. De ambos extractos se tomó una alícuota para detectar si la proteína estaba presente en el estadio correspondiente. En las larvas aposimbióticas se identificó por western blot a la proteína CxPKC en el extracto total (PT); posterior a una incubación de los extractos de larvas con CxRACK1, se continuó observando a PKC en la fracción de las proteínas no unidas (PnuR) a CxRACK1 (Figura 48 flecha). Esto sugirió que la interacción entre CxRACK1 y CxPKC en larvas no ocurre. Acorde con este resultado, en las fracciones correspondientes a la elución (E) y las perlas de la resina (P) tampoco fue posible identificar a CxPKC. La verificación de que CxRACK1 estuvo acoplada a las perlas de la resina se comprobó mediante western blot de las mismas hervidas en buffer de Laemmli e inmunodetectadas con anti-RACK1 (Figura 48).

Por otro lado, en los extractos de medusa (estado simbiótico) se obtuvo un resultado diferente. Primeramente, se detectó a CxPKC en las proteínas totales (PT), pero una vez que las proteínas

totales se incubaron con la resina acoplada con CxRACK1, ya no se detectó a CxPKC en los extractos no unidos a la resina (PnuR). De igual manera, en las fracciones correspondientes a los lavados tampoco se observaron residuos de CxPKC (Figura 49 carriles PT y Pnur). No obstante, en las fracciones pertenecientes a la elución (E) y las perlas de la resina (P) (Figura 49 carriles E y P, flecha), sí se detectó a CxPKC. Este resultado sugiere que sí existe una interacción entre CxRACK1 y CxPKC durante la simbiosis y/o estadio de medusa en *C. xamachana*.

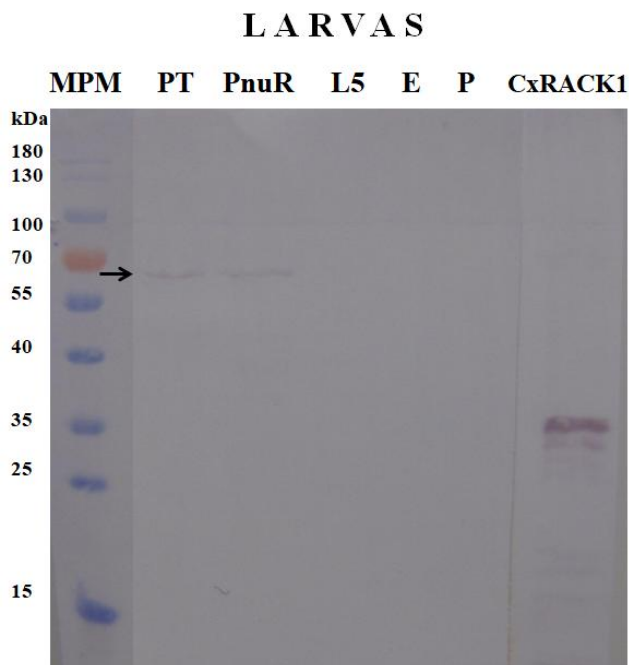


Figura 48. Ensayo pull-down en larvas aposimbióticas y su análisis por western blot con anti-PKC. Identificación de CxPKC en los extractos totales (PT) y los extractos después de ser incubados con CxRACK1 (PnuR) (flecha). En las fracciones de lavado (L5) elución (E) y perlas (P) donde el anticuerpo no inmunodetecta a la PKC. La verificación del acoplamiento de CxRACK1 a las perlas de cobalto fue mediante western blot con el anticuerpo anti-RACK1 (CxRACK1). MPM, marcador de peso molecular.

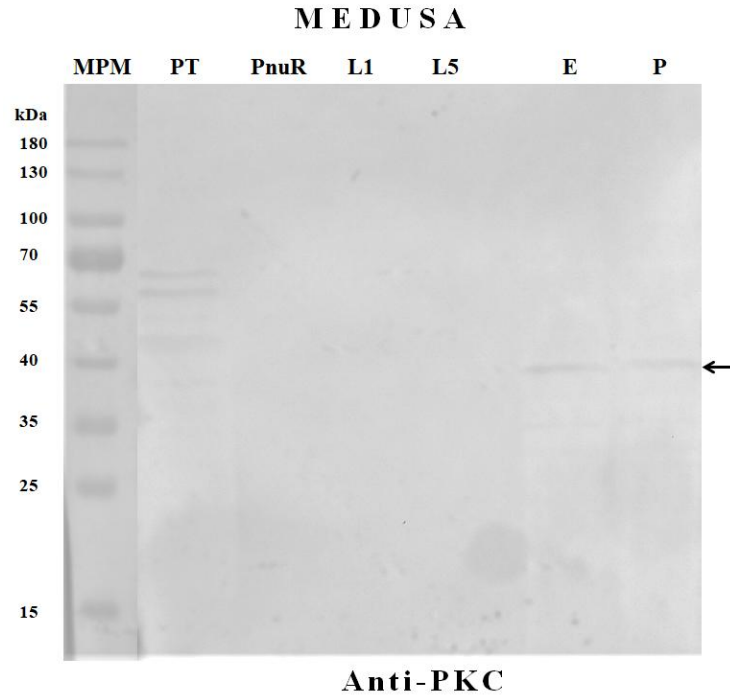


Figura 49. Ensayo pull-down en medusa adulta y su análisis por western blot. La probable interacción de CxPKC y CxRACK1 se detectó en la medusa adulta de *C. xamachana*. CxPKC es detectada en las proteínas totales (PT). Sin embargo, en la fracción de proteínas no unidas a CxRACK1 (PnuR) no se detectó. CxPKC se encontró en la parte correspondiente a la elución (E) y en las perlas de la resina (P) (flecha). MPM, marcador de peso molecular.

22.3 Doble híbrido de levadura para ensayar la interacción entre RACK1 y el dominio C2 de PKC

Para llevar a cabo el ensayo de doble híbrido de levadura con motivo de observar la posible interacción entre RACK1 y el dominio C2 de PKC, se construyeron las quimeras 2YH-*PKC*-Presa y 2YH-*RACK1*-Carnada (Figura 50a-b) (ver cuadro 6).

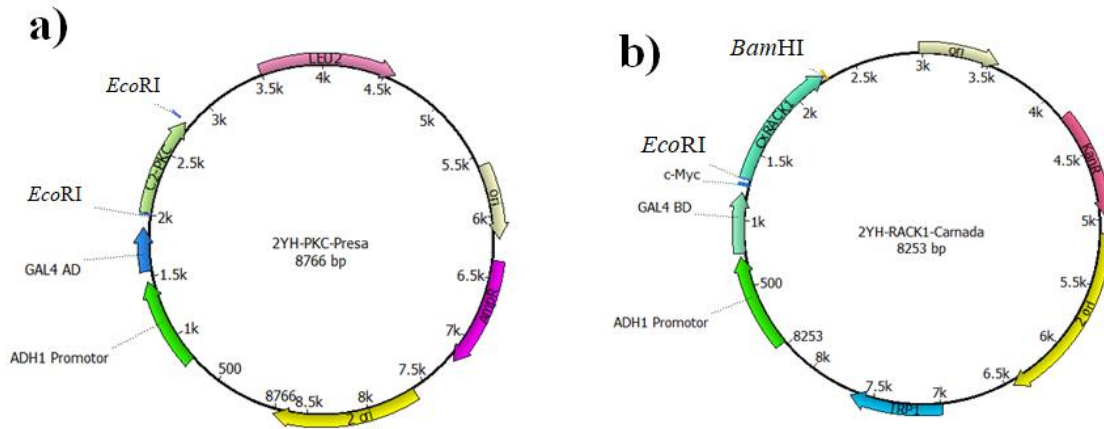


Figura 50. Construcciones 2YH-PKC-Presa y 2YH-RACK1-Carnada. La construcción 2YH-PKC-Presa confiere a las levaduras auxotrofia a leucina y resistencia a ampicilina en *E. coli* (a); en tanto, el plásmido 2YH-RACK1-Carnada brinda auxotrofia a triptófano en levaduras y resistencia a kanamicina en *E. coli* (b).

Inicialmente, se comprobó que el gen carnada (CxRACK1) no auto active a los genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1*) en levadura. Las cepas AH109 y Y187 transformadas con el vector 2YH-RACK1-Carnada no crecieron en medio SD/-H/-W y/o SD/-A/-W y las colonias incubadas en medio SD/-Trp/X- α -Gal fueron colonias blancas las cuales cambiaron su coloración a rosado con el transcurso de los días (fenotipo característico -Ade). Estos resultados indicaron que no se llevó a cabo una autoactivación (Figura no mostrada).

Por otro lado, la expresión de la proteína CxRACK1 en la cepa AH109 transformada con el vector 2YH-RACK1-Carnada se verificó mediante un análisis de tipo western blot con los extractos totales de las transformantes crecidas en medio SD/-W. El anticuerpo c-Myc reconoció en los extractos una banda menor a 70 kDa. La construcción 2YH-RACK1-Carnada expresó la secuencia correspondiente al dominio de unión a ADN el cual consta de un peso molecular de 16.9 kDa, la etiqueta c-Myc (1.2 kDa) y a CxRACK1 de aproximadamente 36 kDa. La suma de la secuencia del promotor T7 (19 pb), el sitio múltiple de clonación (53 pb) y la secuencia terminadora (48 pb) dan lugar a 120 pb ($120 \text{ pb}/3 = 40 \text{ aa}$).

Para determinar el tamaño esperado de estos 40 aa se tomó en cuenta el peso promedio de un aminoácido el cual es similar a 110 Da; por lo tanto, los 40 aa dan lugar a un peso de 4 400 Da (4.4 kDa). Por lo tanto, el producto esperado de la detección con el anticuerpo en las levaduras es alrededor de 61.2 kDa ($19.6 \text{ kDa} + 1.2 \text{ kDa} + 36 \text{ kDa} + 4.4 \text{ kDa} = 61.2 \text{ kDa}$) En los extractos de la levadura usados como control negativo no hubo inmunoreconocimiento por el anticuerpo anti-

cMyc. (Figura 51). En base a los resultados obtenidos mediante western blot se demuestra la correcta expresión de la proteína carnada en la levadura.

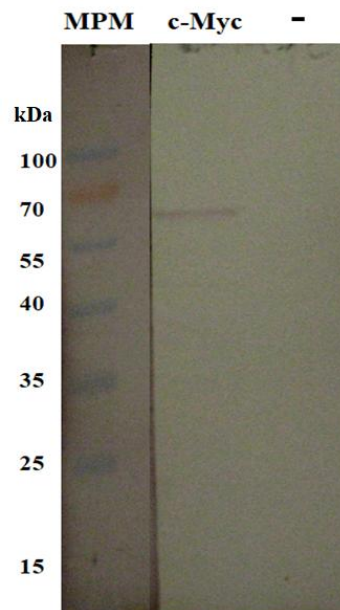


Figura 51. Expresión de CxRACK1 en *S. cerevisiae* analizada por western blot. La levadura AH109 expresa la proteína carnada CxRACK1. La inmunodetección se llevó a cabo con el anticuerpo anti-c-Myc (c-Myc), donde la etiqueta es expresada río arriba del inserto CxRACK1 en la construcción 2YH-RACK1-Carnada (Figura 50b). MPM, marcador de peso molecular. La levadura no transformada con el plásmido 2YH-RACK1-Carnada no evidencia señal de inmunoreconocimiento (-).

Posteriormente, se llevó a cabo la contransformación con los vectores (2YH-RACK1-Carnada y 2YH-PKC-Presa) en las dos cepas de *S. cerevisiae* empleadas (AH109 y Y187). En la Figura 52 se muestran las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivos. Se encontró que las levaduras transformadas con el plásmido 2YH-RACK1-Carnada tuvieron la capacidad de crecer en medio SD/-Trp; del mismo modo, las transformantes con el vector 2YH-PKC-Presa crecieron en medio SD/-Leu. Estos resultados corroboraron la adecuada transformación de las cepas de levadura. De igual forma, la cotransformación de las células con ambos vectores, proporcionó a la levadura la habilidad de proliferar en medio SD/-Trp/-Leu. Sin embargo, a pesar de la incubación de las placas de cultivo por 10 d, no fue posible detectar a *S. cerevisiae* en el medio de cultivo SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His. Dicho resultado indicó que no hubo interacción entre CxRACK1 y el dominio C2 de CxPKC.

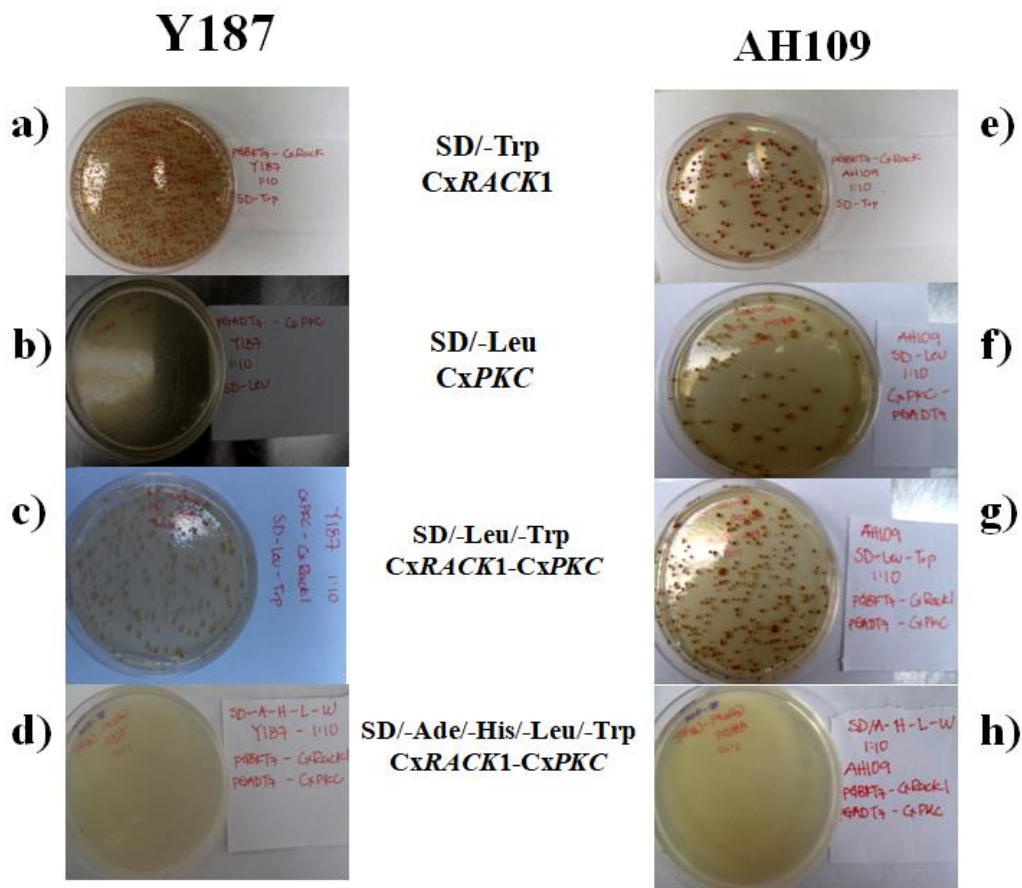


Figura 52. Transformantes obtenidas en el ensayo de doble híbrido de levadura. Se muestran las cepas de levadura AH109 y Y187 transformadas con el plásmido 2YH-*RACK1*-Carnada distribuida en el medios de selección SD/-Trp (a, e); y las cepas de levadura AH109 y Y187 transformadas con el plásmido 2YH-*PKC*-Presa, crecida en el medio SD/-Leu (b, f). La cotransformación con los plásmidos 2YH-*RACK1*-Carnada y, 2YH-*PKC*-Presa en las cepas AH109 y Y187 se distribuyó en placas con medio SD/-Trp/-Leu (c, g) y SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His. No se encontró crecimiento de colonias en el medio sin los 4 aminoácidos (d, h).

DISCUSIÓN

1. Posibilidad de contaminación de las muestras de *C. xamachana* con *Symbiodinium*

Para preparar los extractos de proteínas usados para los análisis proteómicos se emplea un homogenizador Dounce, en el cual la separación de los componentes del utensilio es de 0.15 mm (150 μm). El tamaño promedio de las células de *Symbiodinium* oscila entre 6.7 a 11 μm (Biquand et al., 2017); debido a esto, el homogenizador no tiene el alcance para promover una fractura celular en el huésped. Más aún, en diferentes metodologías donde se lleva a cabo la separación de células gastrodémicas en simbiosis y/o simbiosomas, y donde se emplean homogenizadores con un intervalo de separación de alrededor de 25 a 76 μm , no se detectó una ruptura de la pared celular del simbiote (Peng et al., 2010). Adicionalmente, la ruptura de las células simbiotes daría una coloración verde-anaranjado al lisado, debido a los pigmentos fotosintéticos, lo que no se observó después del homogeneizado.

Por otro lado, en el protocolo de extracción de ARN se requiere la utilización de nitrógeno líquido para pulverizar el tejido y por lo tanto, sí existe la posibilidad de que esta muestra contenga trazas de ARN del simbiote. Sin embargo, los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de RACK1 de *C. xamachana* mediante PCR, no generaron ningún producto cuando se utilizó cADN del simbiote como templado. Esto indicó claramente la existencia de especificidad de dichos oligonucleótidos hacia la medusa. Por otro lado, a la fecha no se han identificado secuencias de PKC en estos simbiotes aún después de búsquedas exhaustivas en las bases de datos reportadas para los genomas de diferentes clados de *Symbiodinium* secuenciados (Shiguchi et al., 2013; smic.reefgenomics.org). Consistente con lo anterior, PKC tampoco ha sido detectada en otros organismos parásitos filogenéticamente relacionados a *Symbiodinium* tales como *Toxoplasma gondii* (Nagamune y Sibley, 2006; Morán et al., 2007) y *Plasmodium falciparum* (Sartorello et al., 2009).

2. Inducción de la estrobilación

La transición de pólipo a medusa representa uno de los fenómenos biológicos más importantes dentro del ciclo de vida de los organismos medusoides. Diferentes estímulos pueden disparar este proceso entre los que se destacan: la temperatura y el suplemento de comida (Wang et al., 2015), la intensidad lumínica (Ishi y Shioi, 2003), el pH y la salinidad (Purcell et al., 2009), e inclusive

la alopatria de la especie (Pascual et al., 2015). Específicamente, en *Cassiopea* spp, se considera que el alga dinoflagelada simbiote es quien desemboca la metamorfosis cuando ésta ha alcanzado una densidad umbral de aproximadamente 10,000 a 50,000 células de simbiote por pólipo (Thornhill et al., 2006). Sin embargo, se ha reportado que se pudo promover la metamorfosis en pólipos aposimbióticos de *Cassiopea* mediante un aumento en la temperatura (Rahat y Adar, 1980).

Por otro lado, los compuestos indólicos tales como: indometacina, 5-metoxi-2-metil-3-ácido indol acético, 5-metoxindol-2-ácido carboxílico, 2-metil indol y 5-metoxi-2-metil indol han demostrado su efecto como inductores de la estrobilación en diversas especies de medusas (Yamamori et al., 2017; Fuchs et al., 2014; Helm y Dunn, 2017). El indol se ha clasificado como una molécula de señalización en bacterias y su acumulación extracelular es afectada principalmente por factores medioambientales tales como temperatura y pH (Lee y Lee, 2010). El indol es sintetizado a partir del triptófano por la enzima triptofanasa (TnaA) en un gran número de bacterias (Li y Young., 2015), ya que los animales no tienen la capacidad de sintetizar triptófano y deben de obtener este aminoácido mediante la alimentación (Yin et al., 2011). Por lo tanto, compuestos de naturaleza indólica podrían ser suplementados por bacterias endosimbióticas, este podría ser el caso de *Aurelia aurita*, la cual mantiene una relación simbiótica con bacterias y donde estas bacterias podrían producir el indol requerido para que se active la señalización que induce la estrobilación (Weiland-Bräuer et al., 2015). En *C. xamachana*, estos compuestos también podrían ser provistos por *Symbiodinium* ya que se han identificado en el genoma algunos genes responsables para la biosíntesis de triptófano (Liu et al., 2017). Acorde con esto, el perfil metabolómico mostró evidencia de que ocurre la producción de indol en el holobionte del coral *Porites lutea*, así como en el alga simbiote de *Pocillopora verrucosa* (Ortega, 2016). Por otro lado, se ha observado una correlación de los afloramientos de medusas en zonas eutrofizadas donde se llevan a cabo descargas de aguas residuales (Purcell et al., 2007), que es también donde el compuesto 3-metil indol es comúnmente encontrado (Arora et al., 2015) y coincidiría con un aumento en el proceso de estrobilación.

De los inductores probados se sabe que la indometacina es un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), inhibidor de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual produce prostaglandinas a partir de ácido araquidónico; sin embargo, diferentes pruebas con otros

inhibidores de COX tales como aspirina e ibuprofeno no inducen la estrobilación (Kuniyoshi et al., 2012), lo que sugiere que la inhibición de COX no está involucrada en este cambio fisiológico. Además de COX, se han encontrado otros blancos para la indometacina que incluyen a: glioxalasa I (GLOI) (Sato et al., 2007), y el receptor activado proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ) (Lehmann et al., 1996). Otro de los componentes que disparan el proceso de estrobilación es el 9-cis-ácido retinoico (compuesto derivado del retinol), el cual se une al receptor nuclear RXR y que desata la inducción del mecanismo de estrobilación. De manera interesante 9-cis retinol y ciglitazona disminuyen la producción de COX2 e incrementan la actividad de PPAR γ el cual es capaz de heterodimerizarse con RXR (Yamazaki et al., 2007). Al respecto podríamos sugerir la participación de PPAR γ como mediador clave en la metamorfosis.

Más recientemente, Fuchs y colaboradores en 2014 identificaron un péptido (CL390) capaz de inducir la metamorfosis en *A. aurita*. Los autores sugirieron que los compuestos indoles podrían mimetizar los aminoácidos aromáticos de este péptido en su papel inductor. Adicionalmente, sugirieron que un posible blanco de acción podría ser el receptor RXR, que se sabe que en presencia de 9-cis ácido retinoico puede activar los genes que promueven la estrobilación (Yamazaki et al., 2007; Fuchs et al., 2014).

Por otro lado, debido a la amplia gama de factores que disparan el proceso de metamorfosis en cnidarios, se podría especular que en la fase de estrobilación están involucrados los receptores de potencial transitorio (TPR). Estas proteínas con seis dominios transmembranales responden a estímulos externos los cuales incluyen luz, pH, estrés metabólico osmolaridad, sonidos, compuestos químicos, feromonas, temperatura y tacto (Venkatachalam y Montell, 2007). Estas proteínas, al ser estimuladas, inician una cascada de señalización que desemboca en una respuesta fisiológica. La ruta de señalización celular de TPR es mediada por lípidos vía la fosfolipasa C (Minke y Cook, 2002), en la cual se ha observado la participación y/o unión de PKC (Adamski et al., 1998) y RACK1 (Yang et al., 2012). Estudios posteriores podrían ayudar a determinar si existe una participación de ambas proteínas en conjunto con los TRP homólogos en el proceso de metamorfosis de *C. xamachana* y otros cnidarios.

3. Receptor de la Cinasa C Activada en *Cassiopea xamachana*

Nuestro interés en caracterizar al Receptor de la Proteína Cinasa C Activada (RACK1) se derivó del antecedente del silenciamiento de *RACK1* en *Phaseolus vulgaris* (*PvRACK1*) mediante RNAi produjo efectos negativos en el simbiosoma que incluyeron incapacidad de integración del mismo, y desorganización de los bacteroides (Islas-Flores et al., 2011), consistente con su participación en múltiples vías de señalización celular. Dichas vías se sabe que están involucradas en también múltiples procesos fisiológicos tales como: desarrollo celular, movimiento y crecimiento celular, respuesta inmune, apoptosis entre otros (McCahill et al., 2002). Durante el ciclo de vida de *C. xamachana* muchos de estos procesos deben ocurrir a lo largo de los diferentes cambios morfológicos que sufre, entre ellos: el asentamiento de la larva y su diferenciación a pólipo, la reducción de los tentáculos, la formación de los lóbulos marginales y ropalia, la diferenciación gradual de la campana y la coordinación de movimientos pulsantes en el estróbilo. El ciclo termina finalmente cuando ocurre la liberación de la éfira y la posterior regeneración de los tentáculos y el cáliz del pedúnculo (Hoffman et al., 1978). Por lo anterior, es altamente probable que CxRACK1 participe activamente en toda una gama de interacciones moleculares que disparan cascadas de señalización para desencadenar procesos fisiológicos tales como: el reconocimiento y establecimiento de la interacción huésped-simbionte (Weis y Levine, 1996), el rompimiento de la simbiosis por distintos estresores tales como UV, temperatura (Richier et al., 2008; DeSalvo et al., 2010), compuestos químicos y/o metales, y evidentemente, la metamorfosis misma (Lucas, 2001).

Para entender mejor estos procesos, es necesario empezar por saber las características de las proteínas involucradas y sus posibles interacciones. Hemos aislado y caracterizado la secuencia codificante para la proteína RACK1 en la medusa *Cassiopea xamachana* (CxRACK1), lo cual aporta información importante ya que la caracterización de dicha proteína en otros organismos pertenecientes al filo Cnidaria es escasa. En efecto, únicamente las secuencias correspondientes a *Hydra vulgaris*, *Nematostella vectensis*, *Orbicella faveolata*, *Aiptasia pallida*, *Acropora digitifera* y *Stylophora pistilata*, están disponibles en la base de datos del GenBank. Algunas secuencias ortólogas se encontraron también mediante una búsqueda en los diferentes transcriptomas disponibles de otros cnidarios.

La secuencia de la proteína CxRACK1 consta de siete repeticiones WD40; dicha secuencia mostró los sitios característicos de unión a PKC beta (Steinberg, 2008), así como la huella característica de otras RACK del dipéptido GH (glicina-histidina) en su extremo amino y WD (triptófano-ácido aspártico) en el carboxilo terminal (Adams et al., 2011). La secuencia también mostró el sitio de unión al ribosoma (RDK), y los sitios conservados para la fosforilación por Src la cual es potenciada mediante la activación de PKC (Chang et al., 2001). La secuencia aminoacídica conserva los residuos C140 en *S. cerevisiae* (C138 en *C. xamachana*) y H147, los cuales son esenciales para que se lleve a cabo la homodimerización (Yatime et al., 2011). Adicionalmente, en ella se localizó el residuo Y248 (aa Y246 en *C. xamachana*) el cual juega un papel regulador en la interacción proteína-proteína, ya que su sustitución por fenilalanina inhibe la unión con algunos ligandos (Sabila et al., 2016; Kundu et al., 2013). Mediante el modelaje molecular de la secuencia se obtuvo la estructura tridimensional de β -propela (Ruiz Carrillo et al., 2012); cada uno de estos elementos en conjunto son característicos de RACK1 en otros organismos lo cual apoya la identidad correcta de la secuencia amplificada (CxRACK1).

La amplificación mediante PCR con el cADN de *C. xamachana* usando los oligonucleótidos ATG-CX y STOP-Cx mostraron una única banda de amplificación con un tamaño aproximado de 1000 pb, la cual fue secuenciada; dicha secuencia correspondió al transcrito que codifica para CxRACK1. El análisis por BlastN indicó que la secuencia de éste transcrito tuvo una alta identidad con otras secuencias pertenecientes a RACK1 de otros organismos; tal es el caso de *Hydra vulgaris* la cual consta de un marco de lectura abierto de 954 pb (Hornberger y Hassel, 1998), o el de *Mya arenaria* con un marco de lectura 957 pb (Siah et al., 2007).

La caracterización molecular de RACK1 del alga dinoflagelada simbiote de *Cassiopea* denominada *SmicRACK1*, no mostró intrones (Pérez-Cervantes et al., 2014; Islas-Flores et al., 2018); sin embargo, en otras secuencias codificantes de RACK1 de otras especies sí hay presencia de intrones. Algunos ejemplos incluyen a *GNB2L1* de humano el cual se reportó que está compuesto de 8 exones y 7 intrones (Gen ID: 10399) (Wang et al., 2003). Contrariamente, Mourtada-Maarabouni (2008) reportó que éste gen abarca 6.9 kb y la secuencia contiene 10 exones con un transcrito codificante de 951 pb. Otras secuencias genómicas con intrones son las correspondientes a RACK1 de porcino (Chou et al., 1999), *Xenopus laevis* (Gen ID: 379825) y *Salmo salar* (Gen ID: 106611941). El análisis del genoma de la anémona *Nematostella vectensis*

reveló que el gen de *RACK1* contiene regiones intragénicas en este organismo. En este trabajo no se llevó a cabo un análisis específico del gen; sin embargo; en base a los reportes previos de otros organismos y el análisis del borrador del genoma de *Cassiopea*, se han detectado secuencias que pueden ser correspondientes a intrones (Aki Odhera-Universidad de Pensilvania, comunicación personal).

Por otro lado, se ha reportado que el número de copias del gen *GNB2L1* (*RACK1*) es variable en los diferentes organismos; por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 3 copias (*RACK1A*, *RACK1B* y *RACK1C*) (Guo y Chen, 2008; Ulla et al., 2008); del mismo modo, en arroz dos copias han sido identificadas (Iwasaki et al., 1995); sin embargo, en otros organismos tales como porcino (Chou et al., 1999) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Schloss, 1990), únicamente una copia del gen ha sido identificada. También se han identificado pseudogenes de *RACK1* en diversos organismos tales como: *Homo sapiens* (NG_024708.2) *Papio anubis* (XR_002522916.1), *Ptilocolobus tephrosceles* (XR_002734203.1), *Pongo abelii* (XR_655843.2), y *Mus musculus* (NG_020992.1).

Los ensayos de hibridación *in situ* generaron una huella de detección con ambas sondas, sentido y antisentido; por esta razón, se sugiere que al menos una versión de Cx*RACK1* podría ser un pseudogen el cual es sintetizado como un transcrito natural antisentido (NAT). A la fecha, la función de estos transcritos no está del todo comprendida; sin embargo, se cree que han evolucionado para ser reguladores de la expresión génica (Werner y Swan, 2010). Este tipo de transcritos son comunes ya que se ha calculado que el 51.2% de los genes puede transcribirse en ambas direcciones (Yatayama et al., 2005).

En los ensayos de hibridación *in situ* e inmunolocalización, el transcrito/proteínas de Cx*RACK1* en larvas plánulas se localizó en el endodermo, el cual consiste de células de soporte y células intersticiales (Martin y Chia, 1982). En el endodermo, Cx*RACK1* podría estar involucrada en el proceso de diferenciación celular, ya que se ha reportado previamente que *RACK1* participa en la diferenciación de las células criptas del intestino epitelial (Cheng et al., 2018).

A través del empleo del neuropéptido RFamida se han detectado redes nerviosas en todos los estadios de desarrollo en *C. xamachana*. En los pólipos, estas redes se encuentran localizadas principalmente en los tentáculos y el hipostoma (Hoffman y Hellman, 1995; Sakaguchi et al., 1999). Este resultado concuerda con la participación de *RACK1* en la regulación del desarrollo neural (Kershner y Welshhans, 2017); por lo tanto, y en base a la distribución de Cx*RACK1* en

los pólipos se sugiere que ésta podría estar localizada en las células nerviosas, lo que se tendrá que corroborar con técnicas de mayor resolución como tinciones con anticuerpos anti-RACK1 acoplados a partículas de oro coloidal visualizados por microscopía electrónica. Los resultados obtenidos por Hornberg y Hassel, (1997) demostraron que *RACK1* en *Hydra* (*HvRACK1*) se encontró principalmente en células intersticiales (74%), células glandulares (34.3%), y en células digestivo epiteliales (17.2%), y no fue identificada en células nerviosas, lo cual difiere de lo observado en *C. xamachana*. Esto puede deberse a la diferencia entre especies a pesar de ser ambos organismos cnidarios. De manera similar, *RACK1* fue detectada en células glandulares de *Apis mellifera* (Feng et al., 2009). Las células glandulares funcionan como células productoras y secretoras de moco así como de enzimas. Sin embargo, las células glandulares también participan en la producción de sustancias tóxicas, como es el caso de la neurotoxina tipo 1 en *Nematostella*; éste resultado contradice el esquema de que los compuestos tóxicos se encuentran únicamente confinados a los nematocistos (Moran et al., 2012; Jouiaei et al., 2015).

Estos antecedentes y la identificación de *RACK1* en el transcriptoma del tentáculo de la medusa *Cyanea capitata* (Liu et al., 2015) abren la posibilidad de la intervención de *RACK1* en la producción de toxinas por las células glandulares endodérmicas y epidérmicas.

En los estadios de estróbilo y éfira se detectó la señal de *RACK1* en la zona de los brazos orales. Esto es consistente con previos experimentos en la medusa *A. aurita* los cuales reportaron que en esta área existe una alta tasa de recambio celular, detectada mediante tinciones con 5 etinil-2' deoxiuridina (EdU) y Sytox (Abrams et al., 2015). Estos resultados concuerdan con el hecho de que *RACK1* ha sido implicada en ambos procesos celulares (Adams et al., 2011).

4. Proteína cinasa C en *Cassiopea xamachana*

Inicialmente, *RACK1* fue identificada como un ligando de la Proteína Cinasa C en cerebro de rata en presencia de activadores (Ron et al., 1994); por esta razón y con el antecedente de que *RACK1* es un socio de PKC en otros sistemas, se cuestionó si esta interacción se conserva en *C. xamachana* y si esta asociación cambia en los estadios simbióticos. La proteína cinasa C está involucrada en diferentes rutas de señalización, la fosforilación mediada por PKC interviene en diversas funciones celulares tales como: desarrollo del sistema inmune, crecimiento y diferenciación celular, desarrollo neural, contracción muscular, apoptosis y envejecimiento

(Ramos-Martínez et al., 2012); adicionalmente, se ha identificado su activación mediante tensión mecánica (Han et al., 2001).

La secuencia de PKC obtenida muestra los dominios C1 y C2; sin embargo, no fue posible amplificar la región 3' a través de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos y el oligonucleótido dTTT. Dificultades similares también fueron reportadas por Hassel et al. (1998) para la secuencia de PKC de *H. vulgaris*.

Mediante los análisis por western blot con el anticuerpo anti-PKC beta se observó inicialmente a la proteína PKC con un peso molecular aproximado a 70 kDa; sin embargo, después de los pasos de centrifugación se detectó una banda de entre 55 y 40 kDa, lo que sugirió que ocurrió un corte proteolítico al que la PKC es vulnerable, posiblemente por la enzima calpaína actuando sobre la región V3 que genera dos fragmentos de 46 y 36 kDa, respectivamente (Kishimoto et al., 1989). Este resultado es consistente con estudios previos que reportan que la PKC es activada (denominada PKM), y tiene la habilidad de fosforilar histonas (Inoue et al., 1977; Chakravarthy et al., 1992). Por otro lado, los resultados del análisis de la proteína en fracciones microsomales donde la PKC se muestra principalmente en las fracciones particuladas sugieren que, bajo las condiciones de extracción la proteína se encuentra activa y unida a diferentes compartimentos membranales. Esto no es inusual ya que se ha reportado que una vez que la proteína es activada, ésta se transloca del citosol a su sitio de acción (principalmente en membranas) (Kraft et al., 1982, Parker et al., 1995; Greenaway et al., 2000). Por ejemplo, en el cangrejo *Cherax quadricarinatus*, PKC es translocada del citosol a la fracción particulada durante la vitelogénesis (Soroka et al., 2000); de igual manera, después de la estimulación de células T con lectinas (Con A, PHA), se promueve la translocación de PKC a membranas (Kvanta et al., 1991).

En los ensayos de hibridación *in situ* e inmunolocalización, se observó un patrón semejante en la distribución de PKC y RACK1 en todos los estadios excepto en las larvas. En el estadio larval se detecta a PKC exclusivamente en la región aboral, lo cual sugiere la participación de PKC en el proceso de asentamiento. Reportes previos como el de Fleck y Bischoff en 1992, con diferentes especies de *Cassiopea* y empleando activadores de PKC (PMA) se provocó el disparo del asentamiento larval haciendo que éste ocurriera al 100%; de manera análoga, en corales, PKC indujo la metamorfosis de larvas (Henning et al., 1996). En otras especies diferentes a cnidarios, como en el anélido *Capitella* spp. se demostró que PKC indujo el asentamiento de larvas

(Biggers y Laufer, 1999), y en percebes, PKC promovió la metamorfosis larval (Yamamoto et al., 1995; 1997).

En los pólipos se detectó el transcrito y la proteína en los tentáculos y en la región correspondiente al hipostoma. La ruta de señalización de PKC es reconocida como una pieza clave en la morfogénesis y la formación de patrones en el desarrollo. La localización de PKC en *C. xamachana* es similar a la obtenida en *H. vulgaris*, en donde PKC fue detectada específicamente en células epiteliales y en células glandulares en la región de tentáculos y cabeza (Hassel et al., 1998). Cabe destacar la observación de una clara señal en el hipostoma de los pólipos, esta región contiene células transdiferenciadas a partir de células intersticiales a células glandulares las cuales migran de la región gástrica hacia la región final del hipostoma (Siebert et al., 2008). En *Hydra*, dicho patrón de migración es similar al de los pólipos de *C. xamachana* donde la intervención de PKC durante los procesos de diferenciación celular podrían ser conservados en ambos organismos. Del mismo modo, se ha evidenciado la participación de PKC en la diferenciación y proliferación de células madre (Zhao et al., 2018; Kim et al., 2009); por lo tanto, PKC podría intervenir en el proceso de transdiferenciación de células intersticiales a un tipo celular específico.

La localización de PKC en el borde de la boca (brazos orales) del estróbilo y la éfira sugiere un papel en el desarrollo y crecimiento de los tentáculos, ya que esta región requiere de una alta tasa de proliferación celular; dicho evento fue reportado por Yuan y colaboradores en 2008 donde mediante la utilización de los anticuerpos anti-fosfohistona 3 (pH3) se pudo identificar a las células durante la fase de mitosis.

5. Interacciones entre CxRACK1 y CxPKC

Mediante el ensayo de doble híbrido de levadura no se identificó la interacción entre el dominio C2 de PKC y RACK1 como lo encontrado por Ron et al. (1995). La secuencia de unión a RACK1 es MDPNGLSDPYVK; sin embargo, la traducción *in silico* del fragmento C2 amplificado en *C. xamachana* da origen al péptido MDPTGLSDPYVK, donde existe un cambio aminoácido de asparagina (AAT y AAC) a treonina (ACT, ACA, ACC, ACG). Dicho cambio puede ser debido a una mutación mediante PCR en los tripletes AAT y AAC. O bien que la

secuencia nativa contenga este aminoácido. Se ha comprobado que la interacción entre RACK1 y PKC también ocurre en la región V5 (Stebbins y Mochly-Rosen, 2001).

La técnica de doble híbrido de levadura es empleada para detectar la interacción entre dos proteínas. Gran parte de los reportes donde se ha identificado a RACK1 a través del sistema de doble híbrido de levadura, se ha obtenido como proteína presa y no como carnada, como se utilizó en este trabajo (Henning et al., 2001; Hu et al., 2006; Cheng et al., 2014; Erbil et al., 2016, Zakrzewicz et al., 2007); en pocos reportes se ha empleado como carnada (Wang et al., 2014). Kundu y colaboradores (2013) no recomiendan el empleo de RACK1 como carnada en el sistema de doble híbrido de levadura y lo sustituyen por el sistema basado en división de ubiquitina (split-ubiquitin), debido a que RACK1 puede activar los genes reporteros funcionando como un factor de transcripción. Por esta razón, previo al ensayo se comprobó que las transformantes no crezcan en el medio selectivo SD/-Ade/-His y de tal manera verificar que CxRACK1 no active los genes reporteros.

Por otra parte, el hecho de que, en el ensayo de pull-down se observara una posible interacción entre CxRACK1 y CxPKC en el estadio de medusa, esto pudiera deberse a que CxPKC sufrió degradación proteolítica (PKM), lo cual podría facilitar su interacción con CxRACK1. Alternativamente, la interacción podría darse a través del dominio V5, el cual se encuentra en el dominio catalítico (Callender y Newton, 2017). Los datos anteriores contrastan con los obtenidos con el estadio larval (aposimbiótico), donde se observó que la PKC no fue degradada (estado inactivo), lo que explicaría la ausencia de interacción con RACK1. Estos resultados sugieren que la interacción de CxRACK1 y CxPKC es dependiente del proceso de activación de CxPKC.

Los resultados de la inmunolocalización en larvas no mostraron colocalización de ambas proteínas, lo que es consistente con los resultados de su poca o nula interacción. Sin embargo, los resultados de estos ensayos (pull-down) no son suficientes para determinar si existe asociación diferencial entre CxRACK1 y CxPKC.

CONCLUSIONES

- La inducción de la metamorfosis en pólipos de *C. xamachana* pudo ser manipulada mediante la utilización de compuestos químicos como: indometacina, 5-metoxi 2-metil indol y 9-cis ácido retinoico.
- La secuencia de CxRACK1 se muestra conservada entre los organismos eucariotes ya que cuenta con los siete dominios WD y su conformación de β -propela, también contiene los sitios de unión a PKC.
- La secuencia de CxPKC conserva las repeticiones en consecutivo del dominio conservado C1, los sitios de unión a calcio, y fosfolípidos, así como el sitio de asociación a RACK1 con un cambio aminoacídico de asparagina a treonina.
- La localización del transcrito y la proteína de CxRACK1 y CxPKC colocalizaron en los diferentes estadios de desarrollo. Se observó una expresión diferencial de los transcritos asociadas al estadio de desarrollo.
- El ensayo de doble híbrido de levadura no reveló interacción entre CxRACK1 y el dominio C2 de CxPKC. Sin embargo, en los ensayos de pull-down se observó una posible interacción entre ambas proteínas en medusa adulta que podría ocurrir a través del dominio V5 que funcionaría como región blanco de CxRACK1.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la participación de bacterias y algas simbiotes en el disparo de la metamorfosis.
- Identificar la intervención de la proteína PPAR γ como una de las moléculas clave dentro de las cascadas de señalización en los diferentes tratamientos de inducción probados. Por lo tanto, la utilización de un fármaco inductor y/o activador de PPAR γ en pólipos contribuirá a descartar o incorporar este elemento como parte de la ruta de señalización que dispara la metamorfosis en cnidarios medusoides.
- Realizar la caracterización de TPR sensibles cambios en la temperatura o compuestos químicos e identificar su relación con los procesos morfológicos que disparan la estrobilación en *C. xamachana*
- Determinar el papel que juegan los diferentes inductores de PKC en función del asentamiento en *C. xamachana*.
- Profundizar en el entendimiento de los transcritos antisentido en *C. xamachana*.
- Realizar experimentos de localización con diferentes antígenos blanco tales como: PCNA y Ki67, BrdU, pH3 (para proliferación celular), pTyr y FMRamida (para identificar células nerviosas), caspasa 3 (apoptosis) para determinar con certeza la función de CxRACK1 y CxPKC en los diferentes estadios de desarrollo.
- Analizar la interacción del dominio V5 de CxPKC o bien de la proteína completa con CxRACK1.

LITERATURA CITADA

Abrams M. et al., 2015. Self-repairing symmetry in jellyfish through mechanically driven reorganization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(26): E3365-E3373.

Adamaski FM. et al., 1998. Interaction of eye protein kinase C and INAD in *Drosophila*. localization of binding domains and electrophysiological characterization of a loss of association in transgenic flies. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 17713-17719.

Adams D. et al., 2011. RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. *Cell Communication and Signaling*. 9: 22.

Amadio M. et al., 2006. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacological Research*. 54: 317-321.

Arora P. et al., 2015. Microbial degradation of indole and its derivatives. *Journal of Chemistry*. ID129159: 1-13.

Baker A. et al., 2004. Coral reefs: corals' adaptive response to climate change. *Nature*. 430: 741.

Banaszak A. y Trench R., 1995. Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgae-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 194: 233-250.

Baumgarten S. et al., 2015. The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112: 11893-11898.

Bayer T. et al., 2012. *Symbiodinium* transcriptomes: Genome insights into the dinoflagellate symbionts of the reef-building corals. *PLoS ONE*. 7(4): 1-11.

Berkelmans R. y Van Oppen M., 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a nugget of hope for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Real Society*. 273(1599): 2305-2312.

Biggers W.J. y Laufer H., 1999. Settlement and metamorphosis of *Capitella* larvae induced by juvenile hormone-active compounds is mediated by protein kinase C and ion channels. *Biological Bulletin*. 196(2): 187-198.

Bigelow R., 1900. The anatomy and development of *Cassiopea xamachana*. *Boston Society of Natural History*. 5: 193-236.

Biquand E. et al., 2017. Acceptable symbiont cell size differs among cnidarian species and may limit symbiont diversity. *The ISME Journal* 11(7): 1702-1712.

Bird R. et al., 2010. Interaction with receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) sensitizes the phosphodiesterase PDE4D5 towards hydrolysis of cAMP and activation by protein kinase C. *Biochemical Journal*. 432(1): 207-216.

Black R. y Black J., 2013. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Frontiers in Immunology*. 3: 1-17.

Boratko A. et al., 2013. RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners. *Cell Communication and Signaling*. 11(1): 1-14.

Callender J. y Newton A., 2017. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signaling*. 1: NS20160005.

Carre D. y Carre C. 2000. Origin of germ cells, sex determination, and sex inversion in medusae of the genus *Clytia* (Hydrozoa, Leptomedusae): the influence of temperature. *Journal of Experimental Zoology*. 287(3): 233-242.

Chakravarthy B. et al., 1992. The activation of inactive membrane-associated protein kinase C is associated with DMSO-induced erythroleukemia cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*. 1136(1): 83-90.

Chapman J. et al., 2010. The dynamic genome of *Hydra*. *Nature*. 464(7288): 592-596.

Chang B. et al., 2001. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(23): 20346-20356.

Chang B. et al., 2002. RACK1 a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene*. 21(50): 7619-7629.

Cheng D. et al., 2014. Nuclear important of transcription factor BR-C is mediated by its interaction with RACK1. *PLoS ONE*. 9(10): e109111.

Cheng Z. et al., 2018. Rack1 function in intestinal epithelia: regulating crypt cell proliferation and regeneration and promoting differentiation and apoptosis. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 314(1): G1-G13.

Chomczynski P. y Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-159.

Chou Y. et al., 1999. Structure and genomic organization of porcine RACK1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Gene Structure and Expression*. 1489: 315-322.

Colley J. y Trench K., 1983. Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Proceedings of the Royal Society of London*. 219(1214): 61-82.

Daly M. et al., 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*. 1668: 127-182.

Darieva Z. et al., 2015. Protein kinase C coordinates histone H3 phosphorylation and acetylation. *eLIFE*. 4: e09886.

Davis P. et al., 1989. Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Letters*. 259(1): 61-63.

Davy S.K et al., 2012. Cell Biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(2): 229-261.

Dell E. et al., 2002. The $\beta\gamma$ subunit of heterotrimeric G proteins interacts with RACK1 and two other WD repeat proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(51): 49888-49895.

Dellacorte C., 1994. Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue and Cell*. 26(4): 613-619.

DeSalvo et al., 2010. Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*. 402: 97-113.

Erbil S. et al., 2016. RACK1 is an interaction partner of ATG5 and a novel regulator of autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*. 291(32): 16753-16765.

Fagerholm S. et al., 2002. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(3): 1728-1738.

Feng M. et al., 2009. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*. 10: 645.

Fleck J. y Bischoff A., 1992. Protein kinase C is possibly involved in chemical induction of metamorphosis in *Cassiopea spp.* (Cnidaria: Scyphozoa). *Proceedings 7th International Coral Reef Symposium*. 1: 456-462

Fleck J. y Fitt WK., 1999. Degrading mangrove leaves *Rhizophora mangle* Linne provide a natural cue for settlement and metamorphosis of the upside down *Cassiopea xamachana* Bigelow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234(1): 83-94.

Frackman S. et al., 1998. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. *Promega Notes*. 65: 27.

Freudenthal H., 1962. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: taxonomy, life cycles and morphology. *Journal of Protozoology*. 9(1): 45-52.

Fuchs B. et al., 2014. Regulation to polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Current Biology*. 24: 263-273.

Gandin V. et al., 2013. Rack1 function in the cell motility and protein synthesis. *Genes and Cancer*. 4: 369-377.

Goldsborough A., 1910. Medusae of the world. The Scyphomedusae. Institution of Washington. Ed. Camegie. Págs. 638-641.

Gou J. y Chen J., 2008. RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. 8: 108.

Greenaway E. et al., 2000. Differential localization of protein kinase C isotypes in equine eosinophils and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 68: 575-581.

Guo J. et al., 2009. RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 60(13): 3819-3833.

Han O. et al., 2001. Translocation of PKC isoforms in bovine aortic smooth muscle cells exposed to strain. *Journal of Cellular Biochemistry*. 80(3): 367-372.

Hassel M. et al., 1998. Upregulation of a *Hydra vulgaris* cPKC gene is tightly coupled to the differentiation of head structures. *Development Genes and Evolution*. 207(8): 489-501.

Hegyí G. et al., 2012. On the dynamic equilibrium in homeostasis. *Open Journal of Biophysics*. 2: 64-71.

Helm R. y Dunn C., 2017. Indoles induce metamorphosis in a broad diversity of jellyfish, but not in a crown jelly (Coronatae). *PLoS ONE*. 12(12): e0188601.

Henning G. et al., 1996. The phorbol ester TPA induces metamorphosis in Red Sea coral planulae (Cnidaria: Anthozoa). *Cellular and Molecular Life Sciences*. 52(7): 744-749.

Hennig E. et al., 2001. RACK1 protein interacts with *Helicobacter pylori* vacA cytotoxin: the yeast two-hybrid approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289(1): 103-110.

Hocevar B. et al., 1993. Identification of the protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human laminin B potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(10): 7545-7552.

Hoffman D. et al., 1978. Strobilation, budding and initiation of scyphistoma morphogenesis in the rhizostomae *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology*. 47(2): 161-176.

Hoffman D. y Hellmann M., 1995. Studies in the reef-dwelling Cnidarian *Cassiopea* spp.: RF-amide positive elements of the nervous system at different stages of development. *Beiträge Zur Paläontologie*. 20: 21-29.

Hoffman D. et al., 1999. Checkpoints in the life-cycle of *Cassiopea* spp.: control of metagenesis and metamorphosis in a tropical jellyfish. *The International Journal of Developmental Biology*. 40(1): 331-338.

Hoegh-Guldberg O. et al., 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*. 318: 1737-1742.

Holland B. et al., 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology*. 145(6): 1119-1128.

Hornberger M. y Hassel M., 1997. Expression of HvRACK1, a member of the RACK1 subfamily of regulatory WD40 proteins in *Hydra vulgaris*, is coordinated between epithelial and interstitial cells in a position-dependent manner. *Development Genes and Evolution*. 206: 435-446.

Hroudova M. et al., 2012. Diversity, phylogeny and expression patterns of pou and six homeo domain transcription factors in hydrozoan jellyfish *Craspeda custasowerbyi*. *PLoS ONE*. 7(4): 36420.

Hsieh H. et al., 2001. Jellyfish as food. *Hydrobiology*. 451: 11-17.

Hu L. et al., 2006. RACK1, a novel hPER1-interacting protein. *Journal of Molecular Neuroscience*. 29(1): 55-63.

Ishi I. y Shioi H., 2003. The effects of enviromental light condition on strobilation in *Aurelia aurita* polyps. *Sessile Organisms*. 20(2): 51-54.

Islas-Flores T. et al., 2009. Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 137(3): 264–280.

Islas-Flores T. et al., 2011. PvRACK1 loss of function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 24(7): 819-826.

Islas-Flores T. et al., 2018. Molecular Features and mRNA Expression of the Receptor for Activated C Kinase 1 from *Symbiodinium microadriaticum* ssp. *microadriaticum* During Growth and the Light/Dark cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, aceptado.

Inoue M. et al., 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 252(21): 7610-7616.

Iwasaki Y. et al., 1995. Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the trp-asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant and Cell Physiology*. 36(3): 505-510.

Jouiaei J. et al., 2015. Ancient venom systems: a review on cnidaria toxins. *Toxins*. 7(6): 2251-2271.

Jankowski T. et al., 2008. Global diversity of inland water cnidarians. *Hydrobiology*. 595: 35-37.

Kang S. et al., 2001. PKC β modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *The EMBO Journal*. 20(20): 5692-5702.

Kardmas JL. et al., 2007. Characterization of RACK1 functions in *Drosophila* development. *Developmental Dynamics*. 236: 2207-2215.

Katayama S. et al., 2005. Antisense Transcription in the mammalian transcriptome. *Science*. 309: 1564-1566.

Kawakami T. et al., 2002. Protein Kinase C β (PKC β): Normal functions and diseases. *Journal of Biochemical*. 132(5): 677-682.

Kraft AS. et al., 1982. Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 257(22): 13193-13196.

Kershner L y Welshhans K., 2017. RACK1 regulates neural development. *Neural Regeneration Research*. 12(7): 1036-1039.

Kiely P. et al., 2009. Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(30): 20263- 20274.

Kikkawa U. y Nishizuka Y., 1986. Protein Kinase C. *Enzymes*. 17: 167-189.

Kim M. et al., 2009. Linoleic acid induces mouse embryonic stem cell proliferation via Ca²⁺/PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 23: 53-64.

- Kitchen S. et al., 2015. De novo assembly and characterization of four anthozoan (Phylum Cnidaria) transcriptomes. *Genes, Genomes and Genetics*. 5: 2441-2452.
- Kishimoto A. et al., 1989. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *The Journal of Biological Chemistry*. 264(7): 4088-4092.
- Klevjer T. et al., 2009. *In situ* behavior and acoustic properties of the deep living jellyfish *Periphylla periphylla*. *Journal of Plankton Research*. 31: 793-803.
- Kresge N. et al., 2010. Yasutomi Nishizuka's discovery of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. 285: e15-e16.
- Kundu N. et al., 2013. *Arabidopsis* scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins. *Plant Signaling and Behavior*. 8(5): e24012.
- Kuniyoshi H. et al., 2012. Indomethacin induction of metamorphosis from the asexual stage to sexual stage in the moon jellyfish, *Aurelia aurita*. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*. 76(7): 1397-1400.
- Kvanta A. et al., 1991. Translocation of the alpha and beta isoforms of protein kinase C following activation of human T-lymphocytes. *FEBS Letters*. 283(2): 321-324.
- Larson R., 1986. Water content, organic content, and carbon and nitrogen composition of medusae from the northeast pacific. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 99(2): 107-120.
- Lebrato M. y Jones D., 2011. Jellyfish biomass in the biological pump: Expanding the oceanic carbon cycle. *The Biochemical Society*. 35: 35-40.
- Lee H. et al., 2002. Activation of Integrin-RACK1/PKC α signaling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10(11): 890-897.
- Lee H. et al., 2004. Syntaxin 1A and receptor for the activated C kinase interact with the N-terminal region of human dopamine transporter. *Neurochemical Research*. 29(7): 1405-1409.
- Lee J. H. y Lee J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(4): 426-444.
- Lehmann JM. et al., 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *The Journal of Biological Chemistry*. 270(22): 12953-12956.

- Li G. y Young D., 2015. A new suite of *tnaA* mutants suggests that *Escherichia coli* tryptophanase is regulated by intracellular sequestration and by occlusion of its active site. *BMC Microbiology*. 15(1): 1-14.
- Li D. y Roberts R., 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58(14): 2085-2097.
- Liliental J. y Chang D., 1998. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin β subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(4): 2379-2383.
- Lira E. et al., 1989. Guía ilustrada de animales marinos venenosos de México y el Caribe. México. Editorial Noriega. Págs. 55-60.
- Liu G. et al., 2015. Global transcriptome analysis of the tentacle of the jellyfish *Cyanea capillata* using deep sequencing and expressed sequence tags: insight into the toxin and degenerative disease related transcripts. *PLoS ONE*. 10(11): e0142680.
- Liu H. et al., 2017. *Symbiodinium* genomes reveal adaptive evolution of functions related to symbiosis. *BioRxiv*. 198762.
- Loh WK. et al., 2001. Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species *Seriatopora hystrix* and *Acropora longicyathus* in the Indo-West Pacific. *Marine Ecology Progress Series*. 222: 97-107.
- López-Bergami P. et al., 2005. Receptor for RACK1 mediates activation of JNK y protein kinase C. *Molecular Cell*. 19: 309-320.
- Lowndes G. 1942. Percentage of water in jelly-fish. *Nature*. 3799: 234-235.
- Lu H. et al., 2001. Evidence for a role of protein kinase C in FGF signal transduction in the developing chick limb bud. *Development*. 128: 2451-2460.
- Lucas C. 2001. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its environment. *Hydrobiology*. 451: 229-246.
- Martin J. y Chia F., 1982. Fine structure of a Scyphozoan planula, *Cassiopea xamachana*. *Biological Bulletin*. 163: 320-324.
- McCahill A. et al., 2002. The RACK1 scaffold protein: A dynamic cog in cell response mechanism. *Molecular Pharmacology*. 62(6): 1261-1273.
- Milán M. y Becu-Villalobos D., 2009. La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Medicina*. 69: 370-374.

- Minke B. y Cook B., 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews*. 82(2): 429–472.
- Morán J. et al., 2007. *Toxoplasma gondii* possesses a receptor for activated C kinase ortholog. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 363(3): 680-686.
- Moran Y. et al., 2012. Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones. *Proceedings of the Royal Society of London*. 279: 1351–1358.
- Mortillaro M. et al., 2009. Light intensity influences the production and translocation of fatty acids by zooxanthellae in the jellyfish *Cassiopea* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 378: 22-30.
- Mourton T. et al., 2001. The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(18): 14896-14901.
- Mourtada-Maarabouni M., 2008. GNB2L1 (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 12(2): 149-150.
- Moya A. et al., 2012. Whole transcriptomic analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO² driven acidification during the initiation of calcification. *Molecular Ecology*. 21(10): 2440-2454.
- Nagamune K. y Sibley L.D., 2006 Comparative genomic and phylogenetic analysis of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution*. 23(8): 1613-1627.
- Newton A., 1995. Protein Kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 70(48): 28496-28498.
- Nicot N. et al., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 56(421): 2907-2914.
- Nilson J. et al., 2004. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signaling molecules on the ribosome. *EMBO Reports*. 5(12): 1137-1141.
- Nishizuka Y. 1998. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 334: 661-663.
- Ocampo I. y Cadavid L., 2014. Mecanismos de respuesta inmune en cnidarios. *Acta Biológica Colombiana*. 20(2): 5-11.

Ojimi M. et al., 2009. Telomerase activity is not related to life history stage in the jellyfish *Cassiopea* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152(2): 240-244.

Oliver T. y Palumbi S., 2009. Distribution of stress resistant coral symbionts match environmental patterns at local but not regional scales. *Marine Ecology Progress Series*. 378: 93-103.

Ono Y. et al., 1986. Cloning of brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Letters*. 203(2): 111-114.

Ortega JA. et al., 2016. Metabolite Profiling of Red Sea Corals. Tesis Maestría en Ciencias Marinas. Universidad de Ciencia y Tecnología Rey Abdullah. Arabia Saudita.

Ortiz-Matamoros M. et al., 2015. Transient transformation of cultured photosynthetic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp) with plant-targeted vectors. *Ciencias Marinas*. 41(1): 21-32.

Paracer S. y Ahmadjian V., 2000. Symbiosis: An Introduction to biological associations. Second edition. *Photosynthetic Association of Protozoans and Invertebrates*. Editorial Oxford. 153-160.

Parker P. et al., 1995. Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: A model for down-regulation. *Biochemical Society Transactions*. 23(1): 153-155.

Patiño-González E. et al., 2014. Cristalización y predicción de la estructura tridimensional de la proteína homóloga del receptor activado para la quinasa c (lack) de *Leishmania*. *Revista Colombiana de Química*. 43(3): 17-23.

Pascual M. et al., 2015. Temperature effects on asexual reproduction of the scyphozoan *Aurelia aurita* s.l.: differences between exotic (Baltic and Red seas) and native (Mediterranean Sea) populations. *Marine Ecology*. 36(4): 994-1002.

Pawlowski K. et al., 1994. Isolation of total polyA and polysomal RNA from plant. En Gelvin SB., Schilperoort RA. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht. Págs. 231-243.

Pears C., 1995. Structure and function of the protein kinase C gene family. *Journal of Biosciences*. 20(3): 311-332.

Peng S. et al., 2010. Proteomic analysis of symbiosome membranes in cnidaria-dinoflagellate endosymbiosis. *Proteomics*. 10(5): 1002-1016.

Pérez-Cervantes E. et al., 2014. Caracterización del receptor de cinasa RACK1 en *Symbiodinium* spp. Tesis de Maestría. UNAM. México.

- Pinton P. et al., 2007. Protein Kinase C β and prolyl isomerase I regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66^{Shc}. *Science*. 315(5812): 659-663.
- Pochon X. y Gates D., 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawaii. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(1): 492-497.
- Polato N. et al., 2011. Gene discovery in the threatened elkhorn coral: 454 sequencing of the *Acropora palmata* transcriptome. *PLoS ONE*. 6 (12): e28634.
- Purcell J. et al., 2007. Anthropogenic causes of jellyfish and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series*. 350: 153-174.
- Purcell J. et al., 2009. Interannual variation of strobilation by the scyphozoa *Aurelia labiata* in relation to polyp density, temperature, salinity, and light conditions *in situ*. *Marine Ecology Progress Series*. 375: 139-149.
- Putnam N. et al., 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*. 317: 86-93.
- Rahat M. y Adar O., 1980. Effect of symbiotic zooxanthellae and temperature on budding and strobilation in *Cassiopeia andromeda* (Eschscholz). *Biological Bulletin*. 159: 394-401.
- Ramos-Martínez J. et al., 2011. Role of protein kinases C (PKC) in the relationship between the neuroendocrine and immune systems in marine mussels: The model of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck (1819). *Italian Journal of Zoology*. 79(2): 162-168.
- Reich HG. et al., 2017. Do the shuffle: changes in *Symbiodinium* consortia throughout juvenile coral development. *PLoS ONE*. 12(2): e0171768.
- Reynolds WS. et al., 2000. Symbiosis-enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 126(1): 33-44.
- Richardson A. et al., 2009. The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends in Ecology and Evolution*. 24(6): 312-322.
- Richier S. et al., 2008. Response of the symbiotic cnidaria *Antopleura elegantissima* transcriptome to temperature and UV increase. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D*. 3(4): 283-289.
- Rigas A. et al., 2003. The scaffolding protein RACK1 interacts with androgen receptor and promotes cross-talk through a protein kinase C signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(46): 46087-46093.

Ron D. et al., 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the β subunit of G proteins. *Biochemistry*. 91(3): 839-843.

Ron D. y Kazanietz M., 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *The FASEB Journal*. 13(13): 1658-1676.

Roy A. et al., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5: 725-730.

Rowan R. et al., 1996. Rubisco in marine symbiotic dinoflagellates: form II enzymes in eukaryotic oxygenic phototrophs encoded by a nuclear multigene family. *The Plant Cell*. 8(3): 539-553.

Ruiz Carrillo D. et al. 2012. Structure of human Rack1 protein at a resolution of 2.45Å. *Structural Biology and Crystallization Communications*. F68: 867-872.

Sabila M. et al., 2016. Tyrosine phosphorylation based homo-dimerization of *Arabidopsis* RACK1A proteins regulates oxidative stress signaling pathways in yeast. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-8.

Sachs L. y Wilcox P., 2006. A shift to parasitism in the jellyfish symbiont *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of Royal Society Boston*. 273(1585): 425-429.

Sambrook J. y Rusell D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3ra. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanders S. et al., 2014. Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* (Phylum Cnidaria). *BMC Genomics*. 15: 1-14.

Sakaguchi M. et al., 1999. The presence and distribution of RFamide-like immunoreactive nerve fibers in scyphistomae of *Aurelia aurita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte A. Molecular and Integrative Physiology*. 122(2): 261–266.

Sartorello R. et al., 2009. The plasmodium receptor for activated C kinase protein inhibits Ca^{2+} signaling in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 389(4): 586-592.

Schloss JA. 1990. A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein beta subunit-like polypeptide. *Molecular Genetics and Genomics*. 221(3):443-452.

Sato S. et al. 2007. Polyproline-rod approach to Isolating protein targets of bioactive small molecules: Isolation of a new target of Indomethacin. *Journal of the American Chemical Society*. 129(4): 873-880.

- Schechtman D. y Mochly-Rosen D., 2001. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene*. 20(44): 6339-6347.
- Shirai Y. y Saito N., 2002. Activation mechanism of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *Journal of Biochemical*. 132(5): 663-668.
- Siah A. et al., 2007. Receptor activated C kinase is down-regulated in the male gonad of the marine bivalve mollusc *Mya arenaria* exposed to tributyltin (TBT). *Aquatic Toxicology* 83(4): 295-305.
- Siebert S. et al., 2008. Cell type complexity in the basal metazoan *Hydra* is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. *Developmental Biology*. 313(1): 13-24.
- Shinzato C. et al., 2014. A genomic approach to coral-dinoflagellate symbiosis: studies of *Acropora digitifera* and *Symbiodinium minutum*. *Frontiers in Microbiology*. 5: 336-339.
- Siebert S. et al., 2011. Differential gene expression in the siphonophore *Nanomia bijuga* (cnidaria) assessed with multiple next-generation sequencing workflows. *PLoS ONE*. 6(7): e22953.
- Sommer K. et al., 2005. Phosphorylation of CARMA linker controls NF- κ B activation. *Immunity*. 23(6): 561-574.
- Soroka Y. et al., 2000. Changes in protein kinase C during vitellogenesis in the crayfish *Cherax quydricarinatus* possible activation by methyl farnesoate. *General and Comparative Endocrinology*. 118(2): 200-208.
- Soza-Ried J. et al., 2009. The transcriptome of the colonial marine hydroid *Hydractinia echinata*. *FEBS Journal*. 277(1): 197-209.
- Snyderman M. y Wiseman R., 1996. Phylum Cnidaria in: *Guide to Marine Life: Caribbean, Bahamas, Florida*. Págs. 58-59.
- Stambler N. 2011. Zooxanthellae: The yellow symbionts inside animals. *Coral reefs: An ecosystem in Transition*. Ed. Oxford University. Págs. 87-89.
- Steele R. et al., 2011. A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends in Genetics*. 27(1): 7-13.
- Stebbins E. y Mochly-Rosen D., 2001. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of β II protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(32): 29644-29650.

- Stefanik D. et al., 2015. Production of a reference transcriptome and transcriptomic database (EdwardsiellaBase) for the lined sea anemone, *Edwardsiella lineata* a parasitic cnidarian. BMC Genomics. 15(71): 1-19.
- Steinberg F., 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. Physiological Reviews. 88(4): 1341-1378.
- Stimson J. et al., 2002. Interspecific comparison of the symbiotic relationship in corals with high and low rates of bleaching-induces mortality. Coral Reefs. 21(4): 409-421.
- Stockoe D. 2000. Complexities of protein kinase C Regulation. Genome Biology. 1(1): 1-2.
- Suescún-Bolivar LP. et al., 2012. Glycerol outflow in *Symbiodinium* under osmotic and nitrogen stress. Marine Biology. 163:128.
- Suescún-Bolivar LP. et al., 2012. Induction of glycerol synthesis and release in cultured *Symbiodinium*. PLoS ONE. 7(10): e47182.
- Sunawaga S. et al., 2009. Generation and analysis of transcriptomic resources for a model system on the rise: sea anemone *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate endosymbiont. BMC Genomics. 10: 258.
- Suzuma K. et al., 2002. Characterization of protein kinase C β isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(2): 721-726.
- Technau U. y Steele R., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. Development. 138(8): 1447-1458.
- Thornhill J. et al., 2006. Natural infections of aposymbiotic *Cassiopea xamachana* scyphistomae from environmental pools of *Symbiodinium*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 338(1): 50-56.
- Torres M. et al., 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. Toxicon 39(9): 1297-1307.
- Traylor-Knowles N. et al., 2011. Production of a reference transcriptome and transcriptomic database (PocilloporaBase) for the cauliflower coral *Pocillopora damicornis*. BMC Genomics. 12(585): 1-10.
- Trench R. et al., 1993. Microalgal invertebrate symbioses: a review. Endocytobiosis and Cell Research. 9(2): 135-175.

Tulin S. et al., 2013. A quantitative reference transcriptome for *Nematostella vectensis* early embryonic development: a pipeline for the novo assembly in emerging model system. *EvoDevo*. 4: 1-16.

Vani K. et al., 1997. Isolation and cloning of a *Drosophila* homolog to the mammalian RACK1 gene, implicated in the PKC- mediated signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1: 69-71.

Verde A. y McCloskey R., 1998. Production, respiration, and photophysiology of the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana* symbiotic with zooxanthellae: effect of jellyfish size and season. *Marine Ecology Progress Series*. 168: 147-162.

Ullah H. et al., 2008. Structure of signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science*. 17: 1771-1780.

Usacheva A. et al., 2003. The WD motif containing protein RACK1 functions as a scaffold protein within the type I IFN receptor-signaling complex. *The Journal of Immunology*. 171(6): 2989-2994.

Venkatachalam K. y Montell C., 2007. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*. 76: 387-417.

Villanueva MA. 2008. Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly methanol-free transfer buffer. *Analytical Biochemistry*. 373(2): 377-379.

Wakefield T. y Kempf S., 2001. Development of host and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biological. Bulletin*. 200: 127-143.

Wang B. et al., 2014. Maize ZmRACK1 is involved in the plant response to fungal phytopathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(6): 9343-9359.

Wang S. et al., 2003. Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Molecular Biology Reports*. 30(1): 53-60.

Wang N. et al., 2015. Prey concentration and temperature effect on budding and strobilation of *Aurelia* sp 1 polyps. *Hydrobiologia*. 754(1): 125-134.

Weiland-Bräuer N. et al., 2015. Composition of bacterial communities associated with *Aurelia aurita* changes with compartment, life stage, and population. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(17): 6038-6052.

- Weis V. y Levine R., 1996. Differential protein profile reflect the difference lifestyle of symbiotic and aposymbiotic *Antopleura elegantissima*, a sea anemone from temperature waters. *The Journal of Experimental Biology*. 199: 883-892.
- Weis V. et al., 2008. Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Cell Press*. 23(7): 369-376.
- Werner A. y Swan D., 2010. What are natural antisense transcripts good for?. *Biochemical Society Transactions*. 38(4): 1144-1149.
- Westfall M. y Borton A., 2003. Role of troponin I phosphorylation in protein kinase C-mediated enhanced contractile performance of rat myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(36): 33694-33700.
- Wilcox J. 1993. Fundamental principles of *in situ* hybridization. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41(12): 1725-1733.
- Wolensky F. et al., 2013. Characterizing the spatiotemporal expression of RNAs and proteins in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Nature protocols*. 8(5): 900-915.
- Wood-Charlson E. et al., 2006. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cellular Microbiology*. 8(12): 1985-1993.
- Yamamori L. et al., 2017. Comparison of the inducing effect of indole compounds on medusa formation in different classes of Medusozoa. *Zoological Science*. 34(3): 173-178.
- Yamamoto H. et al., 1997. Methyl farnesoate induces larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite* via protein kinase C activation. *Journal of Experimental Zoology*. 278(6): 349-355.
- Yamamoto H. et al., 1995. Protein kinase C (PKC) signal transduction system involved in larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Zoological Science*. 12(4): 391-396.
- Yamazaki K. et al., 2007. Synergistic effects of RXR α and PPAR γ ligands to inhibit growth in human colon cancer cells-phosphorylated RXR α is a critical target for colon cancer management. *Gut*. 56(11): 1557-1563.
- Yang J. et al., 2012. Receptor for activated c kinase 1 (RACK1) inhibits function of transient receptor potential (trp)-type channel pkd211 through physical interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(9): 6551-6561.
- Yang J. et al., 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 12: 7-8.

Yatime L. et al., 2011. Structure of the RACK1 dimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*. 411(2): 486-98.

Yuan D. et al., 2008. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa). *Development Genes and Evolution*. 218(10): 525-539.

Zakrzewicz A. et al., 2007. Receptor for Activated C-kinase, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 115(23): 2957-2968.

Zamponi M. O., 1991. Los cnidarios de la República Argentina. En Castellanos Z. Fauna de agua dulce de la República de Argentina. Buenos Aires: PROFADU, pág.51.

Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9: 40.

Zhao H. et al., 2018. FLI1 and PKC co-activation promote highly efficient differentiation of human embryonic stem cells into endothelial-like cells. *Cell Death and Disease*. 9(2): 131.

Zheng Y. et al., 2012. Interaction of protein inhibitor of activated STAT2 (PIAS2) with receptor of activated C kinase 1, RACK1. *FEBS Letters*. 586(2): 122-126.

ANEXO 1

1. Expresión punto final de *CxRACK1* y *CxPKC*

La cuantificación relativa de los transcritos de interés (*CxRACK1*-*CxPKC*) se normalizó con los transcritos de *CxFEI* alfa como gen de referencia tomando los valores de densitometría obtenidos con el programa Image Analysis de UVP. Las mediciones fueron comparadas mediante un análisis estadístico con una prueba de Tukey con un alfa de 05.

Como se observa en la Figura 53, la abundancia del transcrito de *CxRACK1* es mayor en los estadios de pólipo, estróbilo y éfira. Los estadios con una cantidad menor de copias corresponden a larva y campana.

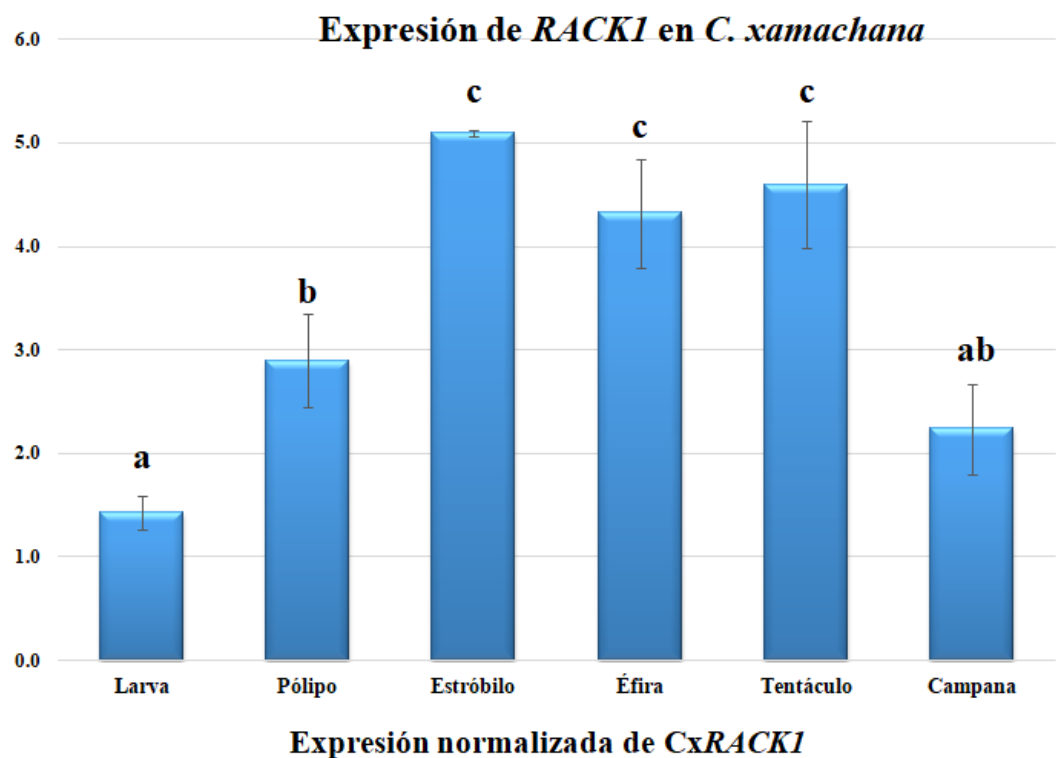


Figura 53. Niveles de expresión de *RACK1* en los diferentes estadios de desarrollo en *C. xamachana*. Los niveles de *RACK1* se normalizaron con el transcrito de *FEI* alfa. Se observó que los estadios con mayor abundancia fueron los representados por los estróbilos, éfiras así como el tejido correspondiente al tentáculo. Cada línea en las barras representa la desviación estándar.

A comparación de *CxRACK1*, la mayor abundancia del transcrito de *CxPKC* se observó en el estadio de pólipo. En el análisis estadístico se observó diferencia significativa en su regulación hacia arriba comparado con los estadios de larva, estróbilo, éfira, tentáculo y campana. Entre éstos últimos no se observó una diferencia estadística (Figura 54). Estos resultados son comparables con los de hibridación *in situ*, donde se observó una señal importante del transcrito de *CxPKC* en los estadios de pólipo.

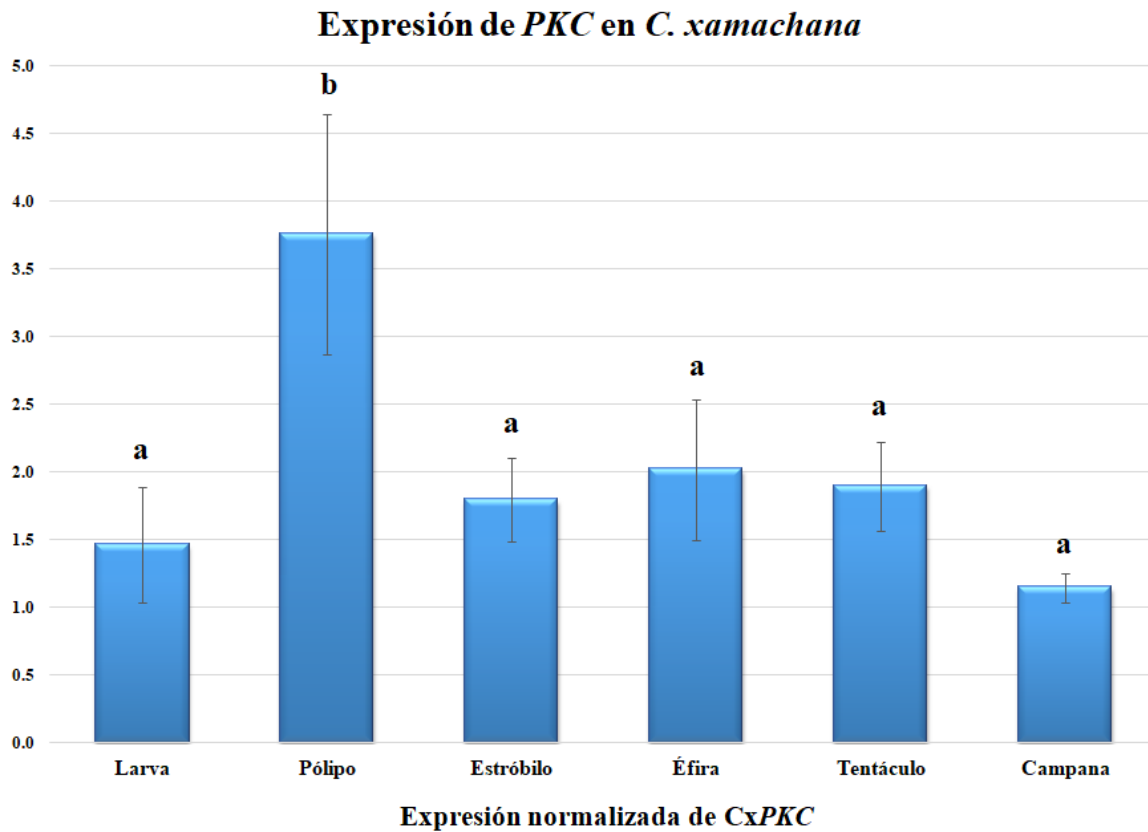


Figura 54. Niveles de expresión de *PKC* en los diferentes estadios de desarrollo en *C. xamachana*. La expresión de *CxPKC* no mostró cambios significativos en los diferentes estadios de desarrollo a excepción de los pólipos donde se observó una abundancia superior en los transcritos. Las líneas en las barras representan la desviación estándar.