



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

**“CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE UNA
PROTEÍNA TIPO HSP70 DE *SYMBIODINIUM* SP. KB8 A
DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ Y TEMPERATURA”**

T E S I S

que para optar por el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. en C. Raúl Eduardo Castillo Medina

DIRECTOR DE TESIS:

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

COMITÉ TUTOR:

Dra. Patricia Elena Thomé Ortiz
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dr. Edgar Zenteno Galindo
Facultad de Medicina, UNAM

Puerto Morelos, Quintana Roo, Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**“CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE UNA
PROTEÍNA TIPO HSP70 DE *SYMBIODINIUM* SP. KB8 A
DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ Y TEMPERATURA”**

T E S I S

que para obtener el grado académico de
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Raúl Eduardo Castillo Medina

DIRECTOR DE TESIS:

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

JURADO DE EXÁMEN:

Presidente: **Dr. Edgar Zenteno Galindo**
Facultad de Medicina, UNAM

Secretario: **Dr. Marco A. Villanueva Méndez**
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Vocal: **Dr. Javier Ambrosio Hernandez**
Facultad de Medicina, UNAM

Suplente: **Dra. Patricia Elena Thomé Ortiz**
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Suplente: **Dr. Eugenio Carpizo Ituarte**
Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC

Puerto Morelos, Quintana Roo, Noviembre, 2020

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al proyecto PAPIIT IN-203718 de la DGAPA-UNAM por el financiamiento de este trabajo de investigación; a CONACyT, por el apoyo de beca económica 285802, de tesis de doctorado otorgado durante cuatro años; al programa de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por darme la oportunidad de estudiar y hacer realidad el grado de Doctor en Ciencias; a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) por el apoyo de vivienda e infraestructura; y a la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de Cuernavaca, UNAM, a cargo del Dr. Cesar Batista, por el apoyo en el secuenciamiento de proteínas.

Especialmente, agradezco al Dr. Marco Villanueva Méndez por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo de tesis de Doctorado en su laboratorio de Biología Molecular y Celular de la UASA, por su dirección, tanto en el diseño de cada experimento y el análisis de los resultados obtenidos, y así llevarlo a buen término. Agradecerle también, su infinita paciencia, su tiempo, dedicación y por brindarme su confianza. Más que todo por que siempre sentí su aprecio y amistad, muchas gracias Marco.

Agradezco a los miembros de mi comité, a la Dra. Patricia E. Thomé y los Dres. Edgar Zenteno Galindo, Eugenio Carpizo Ituarte y Javier Ambrosio Hernández, por su tutoría en esta tesis, por corregir, dirigir y evaluar en cada tutorial el desarrollo de la misma, e igualmente agradecerles por su apoyo en las correcciones de este escrito. Adicionalmente, agradezco a la Dra. Thomé, por permitirme el uso de algunos equipos y reactivos de su laboratorio, pero más que eso por su amistad brindada durante mi estancia en la UASA.

Agradezco a la Dra. Tania Islas Flores por el apoyo técnico en el laboratorio, a MI Miguel Ángel Gómez Reali por el apoyo técnico en electrónica y mantenimiento de equipos, y al MTIA Gustavo Villareal Brito por apoyo técnico en programación y cómputo. Adicionalmente quiero extender mi sincero agradecimiento a Dra. Tania por sus buenos comentarios y sugerencias durante cada resultado obtenido en el desarrollo de la tesis, por sus buenos consejos y su apoyo moral, cuando te necesitaba allí estabas. Gracias Tan.

Agradezco a todos los que sin saberlo sumaron grandemente en lo anímico, y por su cálida amistad a: Esmeralda e Inti, por ser de mis mejores amigos, por apoyarme en

todo momento, por su convivencia familiar, por hacerme sentir el cobijo de un hogar en Puerto Morelos, mi infinito agradecimiento para ustedes; a Paty Cabrales, “yyytia”, gracias por tu grata compañía cuando que estuvimos trabajando hombro a hombro en el lab, por tus sabios consejos, mas que todo por tu amistad, la cual también me brindó Alex, gracias a los dos. A Parmenio por sus enriquecedores consejos al proyecto, por la sana convivencia, siempre contagiandome de su positivismo, muchas gracias por tu amistad parcero. A Juan Pablo Huchim, ausente físicamente, pero presente en todo momento con su apoyo moral y sus sabios consejos, por que siempre me alientas a seguir adelante, gracias hermano. A Roman, por apoyarme con las mediciones y calibración de las lamparas, por la paciencia y estar siempre dispuesto a ayudarme. A Omar Guzman, gracias por enseñarme cual es el camino correcto y Verdadero, gracias amigo. Agradezco especialmente a Antonia Colom por que su amor sincero y apoyo incondicional que me hiciste sentir, fue muy importante para mí, sin duda la mejor etapa que he vivido hasta ahora, gracias por ello Antonelosis. Además, mi agradecimiento se extiende a toda la comunidad de la UASA por la sana y amena convivencia del día a día muchas gracias.

A mis padres Carlos Manuel Castillo y María Eugenia Medina, y a mis hermanos, Carlos Antonio, Laydi Fabiola y Geny Leticia, siempre les estaré inmensamente agradecido por su apoyo incondicional y por la confianza que siempre me han tenido, pero sobre todo, por su cariño y amor. A mis sobrinos Samuel, Sofi, Enoc y Natalia, por que me motivan para ser mejor cada día y ser un buen ejemplo para ellos.

Carátula.....	I
Portadilla.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice General.....	V
Índice de Figuras.....	IX
Abreviaturas.....	XI

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES.....	6
A. Generalidades de los dinoflagelados fotosintéticos del género <i>Symbiodinium</i>	6
B. Características distintivas del aparato fotosintético de los dinoflagelados del género <i>Symbiodinium</i>	9
C. La luz como un factor abiótico de estrés y los mecanismos biológicos y bioquímicos para contender con el estrés lumínico	11
D. Características de la proteína de 75 kDa en <i>Symbiodinium</i> spp. que responde a estímulos de luz.....	15
E. La familia de las proteínas HSP70 y sus funciones como respuesta a estrés abiótico	15
F. Mecanismo clásico de regulación de las proteínas HSP	16
G. Procesos celulares que son regulados mediante fosforilación de HSP70	17
a. Regulación de la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación de HSP70.....	19
b. Regulación de la dimerización de HSP70 por fosforilación	20
c. Regulación del control de calidad de clientes de HSP70 por fosforilación.....	20
V. HIPÓTESIS.....	22

VI. OBJETIVOS	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
A. Material biológico.....	23
B. Extracción de proteínas totales	23
C. Extracción de DNA genómico de <i>Symbiodinium</i> KB8	23
D. Extracción de RNA total de <i>Symbiodinium</i> KB8 y síntesis de cDNA.....	24
E. Técnicas bioquímicas y moleculares generales para el análisis de proteínas y material genómico.....	25
a. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	25
b. Electroforesis de proteínas en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
c. Electroforesis de proteínas en geles de doble dimensión (2D).....	26
d. Western blot.....	27
e. Cuantificación de proteínas	28
f. Precipitación de proteínas con acetona-ácido tricloroacético.....	28
g. Tinción de geles de poliacrilamida.....	28
F. Anticuerpos primarios y secundarios	28
G. Aislamiento de SmicHSP75 a partir de geles 2D	29
H. Secuenciación de aminoácidos de SmicHSP75 por LC-MS.....	30
I. Tratamientos a diferentes intensidades lumínicas	31
J. Tratamientos bajo diferentes espectros de luz en células adaptadas a oscuridad.....	32
K. Análisis del efecto de la temperatura sobre la desfosforilación inducida por luz.....	33
L. Análisis de complejos proteicos de SmicHSP75 por cromatografía de exclusión molecular en Sefacril S-300-HR	33
M. Preparación de anticuerpos específicos contra SmicHSP75	34
a. Selección de una secuencia específica de SmicHSP75 para el desarrollo de anticuerpos policlonales.....	35
b. Amplificación por PCR, inserción en el vector pGEM T-easy y propagación en bacterias de <i>E. coli</i> del fragmento <i>c-term-SmicHSP75</i>	35

c.	Transferencia del fragmento <i>c-term-SmicHSP75</i> del plásmido pGEM®T-easy al plásmido de expresión pCRT7/NT	36
d.	Ensayo de expresión de <i>c-term-SmicHSP75</i> -pCRT/NT en bacterias BL21-D3	37
e.	Ensayo en columna de níquel para purificación de <i>c-term-SmicHSP75</i> -His	38
f.	Obtención de una fracción de proteínas de la mucosa del duodeno de bovino que contiene la enteroquinasa	39
g.	Ensayo de cinética de digestión de <i>c-term-SmicHSP75</i> -His para la remoción de la secuencia de hexahistidina	40
h.	Purificación del péptido <i>c-term-SmicHSP75</i>	40
i.	Inmunizaciones con el péptido <i>c-term-SmicHSP75</i> a un conejo, y colectas y evaluación de los sueros obtenidos	41
j.	Purificación de inmunoglobulinas G del suero de conejo por afinidad en una columna de proteína G acoplada a sefarosa	42
N.	Tratamientos con los inhibidores de síntesis de proteínas	42
VIII.	RESULTADOS	44
A.	<i>SmicHSP75</i> es una proteína de la familia HSP70 y presenta al menos dos isoformas fosforiladas en <i>S. KB8</i>	44
B.	El análisis por exclusión molecular sugiere que <i>SmicHSP75</i> bajo condiciones de luz interacciona con otra(s) proteína(s)	46
C.	La respuesta de desfosforilación de <i>SmicHSP75</i> es sensible a bajas intensidades de luz	50
D.	La desfosforilación de <i>SmicHSP75</i> ocurre bajo todos los espectros de luz ensayados.....	50
E.	La temperatura también promueve cambios en la fosforilación de <i>SmicHSP75</i>	51
F.	Preparación de anticuerpos específicos contra <i>SmicHSP75</i>	54
a.	Selección, amplificación y clonación, expresión, y purificación del fragmento <i>c-term-SmicHSP75</i> para la preparación de anticuerpos específicos.....	54

b.	Digestión del péptido c-term-SmicHSP75-His con una fracción enriquecida de enteroquinasa.....	58
c.	Los anticuerpos levantados contra el péptido c-term-SmicHSP75 inmunodetectan específicamente a SmicHSP75	59
G.	Los anticuerpos anti-1017 demostraron que los cambios en la intensidad de las bandas de SmicHSP75 provocados por el estímulo de luz son debidos a su estado de fosforilación.....	61
H.	Tratamientos con cloranfenicol o cicloheximida de células de <i>Symbiodinium</i> bajo condiciones de luz sugieren una relación de la fosforilación de SmicHSP75 con la síntesis de proteínas.....	62
IX.	DISCUSIÓN	65
X.	CONCLUSIÓN	73
XI.	REFERENCIAS	75
XII.	ANEXO DE PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y esquema del ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i>	8
Figura 2. Modelos de regulación de la proteína de choque térmico HSP70.....	18
Figura 3. Ubicación y aislamiento de pp75 de <i>S. KB8</i> en geles de doble dimensión IEF + SDS-PAGE (2D) para secuenciación.....	455
Figura 4. SmicHSP75 es homólogo a una proteína tipo BiP perteneciente a la familia HSP70.....	477
Figura 5. Curva de calibración de la columna de sefacril S-300-HR.....	488
Figura 6. Western blot con anti-pThr de las fracciones eluidas de la columna de sefacril S-300-HR y separadas en un gel de 10 % de poliacrilamida SDS-PAGE.....	499
Figura 7. Efecto de la intensidad luminosa en el comportamiento de fosforilación sobre SmicHSP75.....	511
Figura 8. Comportamiento de la fosforilación de SmicHSP75 bajo diferentes espectros lumínicos.....	53
Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la repuesta de desfosforilación de SmicHSP75...	54
Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de SmicHSP75 con otras cinco secuencias de la base de datos de <i>S. microadriaticum</i>	56
Figura 11. Amplificación por PCR y secuencia de nucleótidos del fragmento específico de SmicHSP75.....	57
Figura 12. Resultado del análisis de expresión del fragmento recombinante específico de SmicHSP75 (c-term-SmicHSP75-His) y su purificación en una columna de níquel.....	58
Figura 13. Resultado del análisis de la digestión del péptido recombinante c-term-SmicHSP75-His con la enteroquinasa.....	60

Figura 14. Resultado del análisis de la especificidad de los anticuerpos de los sueros de conejo contra extractos de proteínas de tres especies de <i>Symbiodinium</i>	62
Figura 15. Análisis comparativo de la inmunodetección por western blot de SmicHSP75 y sus homólogos en <i>S. KB8</i> (A), <i>S. MF11</i> (B) y <i>S. kawagutii</i> (C), con los anticuerpos anti-pThr y anti-1017 en la respuesta a estímulos de luz.....	63
Figura 16. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas por cloranfenicol o cicloheximida en la fosforilación de SmicHSP75.....	64
Figura 17. Modulación de la fosforilación de SmicHSP75 bajo condiciones de luz, oscuridad y temperatura.....	74

ABREVIATURAS

Pi-aminoácido=fosfo-aminoácido

pSer=fosfoserina

pThr=fosfotreonina

pTyr=fosfotirosina

PKA= Protein Kinase A (proteína cinasa A)

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

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

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

HSP70= Heat Shock Protein 70.

pI= punto isoelectrico

ANOVA= Análisis de Varianza.

I. RESUMEN

Symbiodinium es un género de dinoflagelados simbióticos que establece una endosimbiosis mutualista con invertebrados marinos como los corales constructores de arrecifes. Debido a su habilidad fotosintética, estos dinoflagelados son sensibles a las condiciones cambiantes de luz de su entorno. Previamente se identificó que en *Symbiodinium* la luz modula el nivel de fosforilación en residuos de treonina de una proteína con peso molecular de ~75 kDa. Aquí demostramos a través de secuenciación parcial de aminoácidos que la identidad de esta proteína de *Symbiodinium microadriaticum* es la de un homólogo de las proteínas BiP (*Binding Protein*, por sus siglas en inglés), que pertenecen a la familia HSP70 de retículo endoplásmico; por ello, la denominamos SmicHSP75. Nos planteamos determinar si el nivel de fosforilación de esta proteína es dependiente de las propiedades de la luz con la que se provoca el estímulo. Por ello, se realizó un análisis del perfil de fosforilación de SmicHSP75 y se encontró que la mínima intensidad de 1 $\mu\text{mol fotón/cm}^2\text{s}$, y todos los tipos de espectros de luz ensayados afectaron su nivel de fosforilación. Adicionalmente, se desarrollaron anticuerpos policlonales contra una región C-terminal de la proteína endógena, que nos permitieron demostrar que SmicHSP75 presenta al menos cuatro isoformas fosforiladas en treonina. Por otro lado, se observó que la modificación de SmicHSP75 por fosforilación se suprimió en condiciones que requieren la actividad de esta chaperona, tales como el estímulo de luz o con un tratamiento de temperatura. Por el contrario, un alto nivel de fosforilación se observó en condiciones de oscuridad, y un nivel similar observado con inhibidores de la síntesis de proteínas inclusive bajo condiciones de luz, sugirieron un vínculo entre esta, y su estado inactivo. Por lo tanto, nuestros datos permiten proponer un modelo en el cual SmicHSP75 existe en dos formas diferentes que se pueden interconvertir a una proteína inactiva fosforilada y una forma desfosforilada activa, las cuales estarían relacionadas con algún mecanismo de la síntesis de proteínas.

II. ABSTRACT

Symbiodinium is a genus of symbiotic dinoflagellates that establishes a mutualistic endosymbiosis with marine invertebrates including the reef-building corals. Due to their photosynthetic ability, these dinoflagellates are sensitive to the changing light conditions of their environment. It was previously identified that, in *Symbiodinium*, light modulates the level of phosphorylation in threonine residues of a protein with a molecular weight of ~ 75 kDa. Here, we demonstrate through partial amino acid sequencing, that the identity of this protein from *Symbiodinium microadriaticum* is that of a BiP (*Binding Protein*) homolog, which belongs to the HSP70 family of endoplasmic reticulum; thus, we designated this protein as SmicHSP75. We set out to determine if the level of phosphorylation of this protein is dependent on the properties of the light with which the stimulus is caused. Analysis of the SmicHSP75 phosphorylation profile was performed and it was found that the minimum intensity of 1 $\mu\text{mol photon/cm}^2\text{s}$, and all types of tested light spectra affected its phosphorylation level. Additionally, polyclonal antibodies were developed against a C-terminal region of the endogenous protein, which allowed us to demonstrate that SmicHSP75 consists of at least four threonine-phosphorylated isoforms. On the other hand, it was observed that the modification of SmicHSP75 by phosphorylation was suppressed under conditions that require the activity of this chaperone, such as light stimulation or with temperature treatment. Conversely, a high level of phosphorylation was observed under dark conditions, and also in the presence of protein synthesis inhibitors despite being under light conditions. These data suggested a link between high phosphorylation levels and its inactive state. Therefore, our data allows to propose a model in which SmicHSP75 exists in two different forms that can be interconverted between an inactive phosphorylated protein and an active dephosphorylated one, both of which probably involved in protein synthesis events.

III. INTRODUCCIÓN

Symbiodinium es un género de dinoflagelados simbióticos cuya importancia ecológica destacable es la de establecer una endosimbiosis mutualista con invertebrados marinos del filo Cnidaria (Trench 1979; Pawlowski et al. 2001); en particular con los corales que construyen arrecifes. Los arrecifes de coral son ecosistemas que proveen el soporte a una amplia variedad de formas de vida en su medio ambiente al crear un importante sustrato para el asentamiento y como nicho de otros organismos. En esta asociación mutualista, *Symbiodinium* aporta mediante sus productos de la fotosíntesis alrededor de un 95% de la energía que requiere el huésped para llevar a cabo sus procesos metabólicos, crecimiento y desarrollo en su hábitat; por otro lado, el dinoflagelado se beneficia del acceso a nutrientes que, en las aguas de mar oligotróficas en las que habita, se encuentran en baja concentración. En esta compleja relación, es evidente que los dinoflagelados simbióticos son fundamentales para el sostén de las abundantes formas de vida en los arrecifes.

La estabilidad de la asociación coral-alga es susceptible a cambios en las características físicas y químicas del medio ambiente, las cuales pueden conducir a la degradación de la simbiosis con la subsecuente ruptura de la asociación (Hoegh-Guldberg 1999; Hoegh-Guldberg et al. 2007; Lesser 2007). El aumento de la temperatura superficial del mar debido al cambio climático provoca la ruptura de la simbiosis *Symbiodinium*-coral, lo que resulta en la pérdida de dichas células de *Symbiodinium* del hospedero (proceso conocido como el blanqueamiento de los corales). Esto tiene como consecuencia, la disminución drástica de la salud y la cobertura de los corales en todo el mundo, así como también una pérdida considerable en el nacimiento de nuevas larvas (Hoegh-Guldberg 1999; Hoegh-Guldberg et al. 2007; Hughes et al. 2019). Los modelos de impacto del cambio climático predicen que muchos arrecifes de coral sufrirán daños irreversibles en cuestión de décadas (Carpenter et al. 2008; Pandolfi et al. 2011; Heron et al. 2017). Si bien aún no se ha descubierto el papel mecanístico exacto que desempeña *Symbiodinium* en el blanqueamiento de coral, sin embargo, el aumento de la producción de ROS, como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, por las células de *Symbiodinium* en respuesta al estrés por calor se considera un factor clave (Suggett et al. 2008; McGinty et al. 2012).

En un trabajo previo se encontró en *Symbiodinium* una proteína con peso molecular de ~75 kDa cuyo nivel de fosforilación en residuos de treonina es modulado en función de estímulos de luz (Castillo-Medina 2013). En dicho trabajo se le identificó como una proteína homóloga a una HSP90. Sin embargo, mediante análisis más profundos determinamos que en *S. microadriaticum*, la identidad inequívoca es la de un homólogo de las proteínas BiP (*Binding Protein*, por sus siglas en inglés), que pertenecen a la familia HSP70 de retículo endoplásmico. Debido a que la proteína que identificamos se obtuvo a partir de extractos de *S. microadriaticum* y que ésta pertenece a la superfamilia HSP, decidimos nombrarla aquí como SmicHSP75.

Las proteínas de choque térmico o HSP, juegan un papel relevante en la respuesta de las células a una amplia variedad de condiciones ambientales y son importantes para la recuperación y supervivencia de los organismos (Lindquist 1986). Las HSP representan una clase de chaperonas moleculares que son bien conocidas por sus respuestas rápidas al estrés ambiental (Sørensen et al. 2003). Por ejemplo, ante condiciones de estrés, la síntesis de proteínas es afectada dando lugar a proteínas mal plegadas o con una conformación inadecuada, teniendo como consecuencia la formación de agregados proteicos no funcionales que comprometen la viabilidad de la célula. Además, estas proteínas juegan papeles importantes en otros procesos celulares distintos de la protección contra el estrés, tales como en la diferenciación celular y la morfogénesis (Gunter y Degnan 2007), y en la apoptosis y señalización celular (Arya et al. 2007; Beissinger y Buchner 1998; Li y Srivastava 2004). En general, las HSP actúan como un sistema buffer de las variaciones ambientales y son por lo tanto importantes para mantener la homeostasis en los organismos. Dentro de la familia de las HSP de peso molecular mayor se encuentran principalmente HSP de pesos moleculares de 70 y 90 kDa llamadas por ello HSP70 y HSP90, respectivamente. A pesar de la abundante información sobre la respuesta de inducción de las HSP70 ante eventos de estrés, pocos reportes existen sobre fosforilación como mecanismo de su regulación y menos aún, alguna información relacionada y reportada para ésta proteína en *Symbiodinium*.

La fosforilación de HSP70 puede regular procesos celulares importantes como la apoptosis, la degradación de proteínas, y la progresión del ciclo celular, entre otros (Nitika y Truman 2017). En *Symbiodinium*, el ciclo celular es modulado por fotoperíodos de luz-

oscuridad más que por un ciclo circadiano endógeno (Wang et al. 2008). En él se requiere de la señal de luz entrante para crecimiento y síntesis de DNA; por otro lado, la entrada a fase oscura es necesaria para la división celular que generalmente se completa al amanecer o al comienzo del fotoperíodo de luz (Fitt 2000).

Debido a su naturaleza fotosintética, *Symbiodinium* debe contar con mecanismos sensores finos para responder a las condiciones cambiantes de luz de su entorno. Más aún, cuando este recurso generalmente le llega de manera limitada debido a las profundidades variables a las que dichos hospederos viven en el arrecife, el ángulo con relación al sol, la morfología del esqueleto y la densidad de simbioses que pueden generar efecto de sombra a células más internas. Los ciclos de fosforilación/desfosforilación de la proteína SmicHSP75 constituyen un mecanismo para modular cambios externos como la luz y temperatura. En este trabajo se realizó un análisis del perfil de fosforilación de SmicHSP75 y se determinaron las intensidades y tipos de luz que afectan su desfosforilación. Finalmente, en función de los datos obtenidos se sugieren las posibles vías de señalización en las que puede estar involucrada.

IV. ANTECEDENTES

A. Generalidades de los dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium*

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* establecen una relación endosimbiótica mutualista con muchos invertebrados de arrecifes, en particular los corales pétreos, que son fundamentales para la existencia de ecosistemas de arrecifes de coral tropicales y subtropicales en todo el mundo. Debido al cambio global causado por efectos antropogénicos, estas comunidades marinas han sufrido una degradación considerable y, de continuar esta tendencia, se proyecta su colapso inminente. Sin embargo, queda claro a partir del registro fósil que algunos corales formadores de arrecifes, y por lo tanto sus simbiosis obligatorias, han sido resistentes a los cambios más importantes en el clima (Kiessling 2009). Las identidades específicas del *Symbiodinium* residente influyen en la susceptibilidad de sus hospederos a las temperaturas oceánicas frías y calientes, lo que contribuye a las grandes disparidades en la tolerancia térmica entre las colonias individuales y las especies hospederas (LaJeunesse et al. 2010). Debido a que los dinoflagelados simbióticos son virtualmente idénticos en su morfología, la clasificación taxonómica a un nivel de especie ha sido muy cambiante. Antes de los recientes avances en la tecnología molecular, todas las microalgas simbióticas de corales eran erróneamente incluidos en una sola especie, *Symbiodinium microadriaticum*, independientemente de la especie del hospedero. Después, reconstrucciones filogenéticas revelaron que el género *Symbiodinium* está compuesto de muchos linajes divergentes evolutivamente (Rowan y Powers 1992) referidas como clados, a los que arbitrariamente se les clasificaba con letras (Rowan y Knowlton 1995); de este modo, en su momento se asignaron nueve clados del A al I. A su vez, cada clado contiene “sub-clados”, “tipos”, “cepas”, que complican la clasificación taxonómica, y que en la literatura algunas veces eran designados como equivalentes a especies (LaJeunesse et al. 2012). Recientemente, LaJeunesse y colaboradores (2018), desarrollaron una re-clasificación sistemática para el grupo de *Symbiodinium*, en la cual proponen a los clados como equivalentes a géneros dentro de la familia Symbiodiniaceae, y proporcionaron descripciones formales de siete: *Symbiodinium sensu stricto* (clado A), *Breviolum* (clado B), *Cladocopium* (clado C), *Durusdinium* (clado

D), *Effrenium* (clado E), *Fugacium* (clado F), y *Gerakladium* (clado G). El presente trabajo de investigación se desarrolló en la primera especie formal descrita, *Symbiodinium microadriaticum* (filotipo A1), que en la reciente clasificación pertenece al género *Symbiodinium* propiamente. Para efectos prácticos de esta tesis se seguirá manejando el género *Symbiodinium* en general para todas las especies.

Symbiodinium vive dentro de las células de al menos cinco fila que incluyen Cnidaria (corales, medusas y anémonas), Mollusca (caracoles), Platyhelminthes (gusanos planos), Porifera (esponjas), y Foraminifera (foraminíferos) (Pawlowski et al. 2003). En la mayoría de los casos, *Symbiodinium* está localizado en unas vacuolas especializadas (denominadas simbiosomas) dentro de las células endodérmicas de la cavidad gastrovascular y tentáculos del huésped. La endosimbiosis cnidario-*Symbiodinium* es una simbiosis tipo mutualista que se centra en un intercambio de nutrientes. Por un lado, los simbiosomas dinoflagelados translocan el 95% de su carbono fijado fotosintéticamente al huésped (Falkowski et al., 1984), principalmente como glicerol (Muscatine 1967), pero también en forma de péptidos, aminoácidos, azúcares y carbohidratos complejos (Hoegh-Guldberg et al. 2004). Por otro lado, el simbiosoma recibe nutrientes inorgánicos de desechos metabólicos del hospedero que incluyen amonio y fosfatos.

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

La forma cocoide de *Symbiodinium* puede seguir una de varias rutas dentro de su ciclo de vida. Una es la reproducción asexual, en la cual se producen dos o tres células hijas en cultivo. Alternativamente, *Symbiodinium* en forma cocoide también puede formar zoosporas móviles con la adición de platos tecales y un par de flagelos, uno longitudinal y otro transverso. Esta zoospora móvil es activa bajo iluminación y la movilidad está regulada en un ciclo circadiano entre períodos de luz y oscuridad (Yacobovitch et al. 2003). El desarrollo de gametos se ha propuesto, pero no se ha demostrado la reproducción sexual ni se ha identificado la formación de tales gametos (Freudenthal 1962; Trench 1997). Sin embargo, la evidencia molecular indica que los dinoflagelados del género *Symbiodinium*, al menos en su forma cocoide, son haploides (Santos et al. 2003). Los cromosomas de los dinoflagelados carecen de histonas y permanecen condensados a lo largo de su ciclo celular (Roy y Morse 2013).

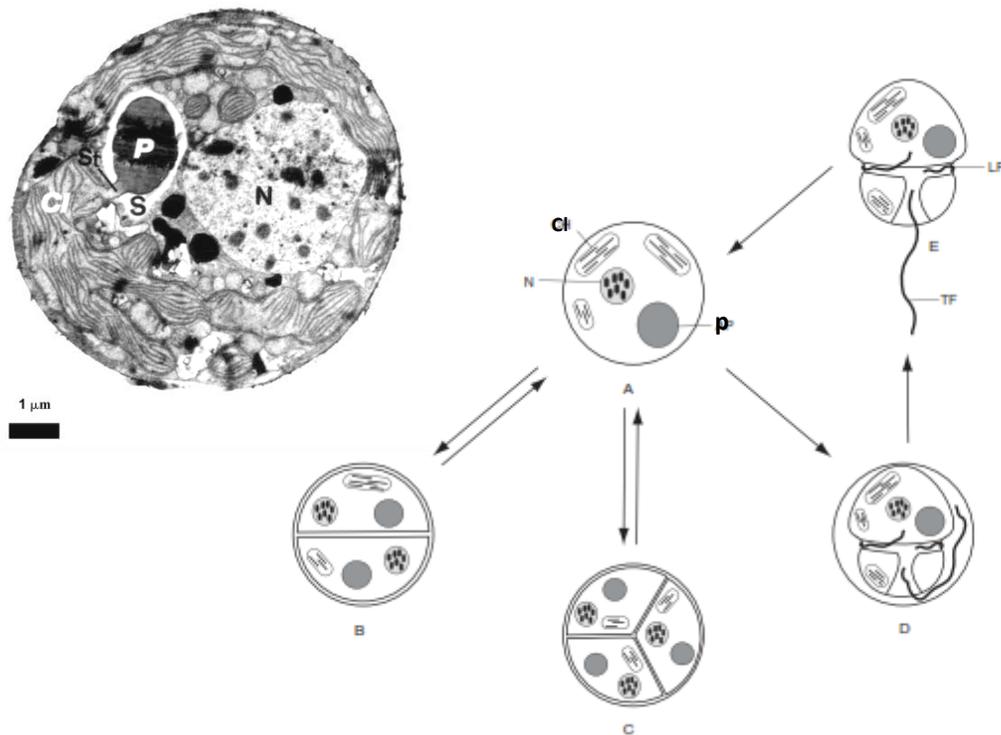


Figura 1. Morfología y esquema del ciclo de vida de *Symbiodinium*. A, quiste vegetativo, B, división

B. Características distintivas del aparato fotosintético de los dinoflagelados del género *Symbiodinium*

Los dinoflagelados fotosintéticos presentan ciertas características en común en su aparato fotosintético (Steidinger 1983). Los principales pigmentos que contiene dicho aparato son la clorofila *a* y *c2* (Chl *a* y Chl *c2*, respectivamente), el carotenoide β -caroteno, y un grupo de xantofilas que parecen ser únicas en los dinoflagelados, típicamente la peridinina, dinoxantina, y diadinoxantina. Es por estas últimas que los dinoflagelados lucen un color café-ocre.

Algunas de las principales funciones de los pigmentos fotosintéticos son la captura de fotones, transferir la energía de excitación a los centros de reacción donde la fotoquímica primaria toma lugar, y en otros casos proveer fotoprotección. Los pigmentos colectores de luz en los dinoflagelados son la Chl *a*, Chl *c2* y la peridinina que optimizan la función de fotosíntesis. El carotenoide peridinina es capaz de transferir la energía de excitación a Chl *a* con una eficiencia de casi el 100% (Govindjee et al. 1979). Los pigmentos fotosintéticamente funcionales están unidos no covalentemente a proteínas específicas formando los complejos Chl-proteína. La principal función de la parte proteica es orientar y espaciar los receptores colectores de luz y así asegurar que la energía de excitación sea transferida eficientemente a los centros de reacción. Los complejos Chl-proteína están divididos funcionalmente en: a) el complejo captador de luz o antena, el cual es el responsable de la captura de fotones y la transferencia de energía de excitación, y b) los centros de reacción donde la fotoquímica primaria se lleva a cabo.

Las antenas colectoras de luz se pueden clasificar en tres grupos en función de los pigmentos asociados a las proteínas que los contienen: a) el grupo asociado a clorofilas *a/b*; b) el de las clorofilas *a/c*; y c) el grupo unido a clorofila *a*/ficobilinas (Green y Durnford 1996). El grupo asociado a clorofila *a/c* se puede subdividir a su vez en los complejos fucoxantina-clorofilas *a/c*, y peridinina-clorofila *a/c*, de los cuales, éste último se encuentra en los dinoflagelados (PCP; Maruyama et al. 2015). Particularmente, el dinoflagelado del género *Symbiodinium* presenta dos tipos de antenas, el complejo hidrosoluble PCP y un sistema transmembranal conocido como acpPC (Chl *a*-Chl *c2*-peridinina Protein Complex; Iglesias-Prieto et al. 1991). La PCP fue uno de los primeros complejos colectores de luz en ser aislado y es uno de los mejor caracterizados, que incluye una estructura detallada

basada en su cristalografía por rayos X (Hofmann et al. 1996). La PCP nativa posee una masa molecular aparente de entre 35 a 39 kDa. Análisis de la apoproteína indican que puede estar presente tanto como homodímeros de 31 y 35 kDa, o como monómeros de 15.5 kDa (Iglesias-Prieto et al. 1991). La estructura cuaternaria de PCP de algunas especies de *Symbiodinium* contienen solamente la forma monomérica o dimérica, mientras que en otros están presentes en ambas formas (Iglesias-Prieto et al. 1991). Un análisis de los cromóforos de PCP indicó que la Chl-peridina guardan una relación estequiométrica de entre 2:8 a 2:12 (Iglesias-Prieto 1996). Por otro lado, la gran mayoría de los pigmentos fotosintéticos accesorios de los dinoflagelados se encuentran presentes en el complejo acpPC, lo cual sugiere que es el principal colector de luz (Iglesias-Prieto et al. 1993). Este complejo tiene una relación molar Chl *a*:Chl *c*2:peridina de 7:4:12, y además contiene a la mayoría de las xantofilas involucradas en fotoprotección. El contenido de estas xantofilas es variable dependiendo de las condiciones de la luz (Iglesias-Prieto y Trench 1997).

Los sitios donde se llevan a cabo las reacciones fotoquímicas en los fotosistemas I (PSI) y II (PSII), aún no están bien caracterizados para *Symbiodinium*. Por un lado, el complejo del PSI tiene una composición de apoproteínas única, diferente a las encontradas en plantas y cianobacterias; la mayoría de los polipéptidos asociados tienen pesos moleculares de 14-25 kDa y en las plantas principalmente pesos de 60 kDa además de polipéptidos de 8-25 kDa. También presenta propiedades espectroscópicas y cinéticas similares al de las plantas, aunque con diferencias importantes; por ejemplo, en *Symbiodinium* el espectro de emisión de fluorescencia a baja temperatura muestra picos a 709 nm en lugar del pico característico de 730 nm en las plantas. Por otro lado, el PSII es un complejo multiproteico que mediante la energía lumínica cataliza la oxidación del agua y la reducción del conjunto de plastoquinonas. La D1 es uno de los componentes importantes del centro de reacción del PSII, ya que esta proteína es altamente susceptible a daño por exposición a altas temperaturas y de hecho es conocida como el “talón de Aquiles” donde comienza el daño del PSII que conlleva al blanqueamiento de los corales (Warner et al. 1999). Adicionalmente, en *Symbiodinium* se identificó a la proteína PsbO como otro componente extrínseco de PSII, con peso molecular de 28 kDa. (Castillo-Medina et al. 2013). Esta proteína es esencial para las velocidades máximas de producción de oxígeno en condiciones fisiológicas, ya que funciona como una plataforma que estabiliza la

región catalítica donde ocurre la oxidación del agua (Williamson 2008). Esta proteína está implicada en la regulación del recambio dependiente de luz de la proteína D1 (Lundin et al. 2007), por lo que se ha propuesto una probable participación en la tolerancia a daño de la proteína D1 durante el evento de blanqueamiento (Castillo-Medina et al. 2013).

C. La luz como un factor abiótico de estrés y los mecanismos biológicos y bioquímicos para contender con el estrés lumínico

Los organismos fotosintéticos, incluido *Symbiodinium*, tienden a perder su actividad fotosintética en condiciones en las que la cantidad de energía luminosa absorbida excede la capacidad de utilización de la luz por la fotosíntesis (Murata et al. 2007; Takahashi y Murata 2008). Por ejemplo, esto ocurre bajo una luz intensa, especialmente con otros factores de estrés ambiental (como calor o frío) que limitan la fijación de CO₂ fotosintético en el ciclo Calvin-Benson. Este fenómeno se conoce como fotoinhibición de la fotosíntesis (Aro et al. 1993). La fotoinhibición se atribuye al fotodaño del PSII y su acumulación, lo que conduce a una disminución en la actividad o en la eficiencia de dicho fotosistema. Para evitar la fotoinhibición del PSII, el PSII fotodañado se repara de manera eficiente y rápida a través del llamado ciclo de reparación del PSII (Aro et al. 1993). Por lo tanto, la fotoinhibición neta del PSII se produce en condiciones en las que la tasa de su fotodaño supera la de su reparación. En las células de *Symbiodinium* presentes dentro de los corales, la luz intensa conduce a una fotoinhibición severa del PSII, especialmente concurrente con el aumento de la temperatura del agua de mar (Warner et al. 1996; 1999).

Como la fotoinhibición del PSII ocurre en condiciones de luz excesiva, se supone que la energía de la luz absorbida en exceso por los pigmentos de la antena fotosintética causa fotodaño al PSII (Melis 1999). Sin embargo, en organismos fotosintéticos modelo como plantas superiores, algas verdes y cianobacterias, se ha demostrado que el fotodaño al PSII es directamente proporcional a la intensidad de la luz y está más asociado con la luz absorbida por el manganeso en el complejo que desprende oxígeno en el PSII, que con los pigmentos fotosintéticos (Hakala et al. 2005). Además, se ha demostrado que la energía luminosa absorbida en exceso acelera la fotoinhibición del PSII mediante la inhibición del mecanismo de su reparación, más que por el fotodaño mismo (Takahashi y Murata 2005;

2006). El principal de los actores que causan inhibición del mecanismo de reparación del PSII por exceso de luz, son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Nishiyama et al. 2006).

La sensibilidad del PSII a la fotoinhibición difiere entre los filotipos de *Symbiodinium*, tanto en cultivo como en estado endosimbiótico dentro de los corales en condiciones estresantes por exceso de luz y calor (Berkelmans y Oppen 2006; Fischer et al. 2012). Por lo tanto, albergar filotipos adecuados de *Symbiodinium* es importante para el crecimiento y la supervivencia de los corales hospederos (LaJeunesse et al. 2009; Kemp et al. 2014). La sensibilidad del PSII a la fotoinhibición en condiciones de estrés térmico se ha estudiado extensamente en *Symbiodinium* debido a su asociación con el blanqueamiento de corales. La fotoinhibición del PSII asociada con el estrés térmico se debe principalmente a la inhibición de su ciclo de reparación, y la sensibilidad del filotipo de *Symbiodinium* a la fotoinhibición del PSII en condiciones de estrés térmico está determinada por la sensibilidad térmica de dicho proceso de reparación (Takahashi et al. 2004, Takahashi et al. 2009b). Sin embargo, el mecanismo asociado con la sensibilidad a la luz intensa en los diferentes filotipos de *Symbiodinium* todavía no se entiende completamente.

Cuando los pigmentos fotosintéticos colectan la luz, la energía de excitación se transfiere a los centros de reacción donde la fotoquímica primaria toma lugar. En condiciones de baja luz, toda la luz que se absorbe es utilizada para la fotosíntesis, lo cual significa un estado de eficiencia cuántica máxima. Con incrementos en la intensidad de luz, la relación entre la luz absorbida y la utilizada para fotosíntesis pierde la proporcionalidad lineal y por ello, la eficiencia cuántica disminuye (Smith et al. 2005; Einbinder et al. 2016). Esta baja en la eficiencia cuántica de transporte de electrones se le puede atribuir a varios procesos (Baker et al. 2004). Por ejemplo, puede deberse a una consecuencia directa sobre un estado de reducción de los componentes transportadores de electrones, que conlleva a una disminución de la probabilidad de usar la energía de excitación para dicho transporte. En los incrementos iniciales de luz, el paso limitante en el transporte de electrones se encuentra en la oxidación de la plastoquinona por el complejo citocromo *b6f* (Genty y Harbinson 1996). La restricción del flujo de electrones a través del complejo citocromo *b6f* está bajo el control fisiológico de una disminución del pH del lumen tilacoidal inducido por la luz. Sin embargo, con incrementos adicionales de luz, la fotosíntesis se mueve hacia un estado de saturación por luz, y se hace cada vez más limitada por la capacidad metabólica

de consumir ATP y NADPH. Esto lleva a un incremento adicional en la proporción de transportadores de electrones en estado reducido y por tanto, la probabilidad de que ocurra la fotoquímica en PSII disminuye (Baker et al. 2004). Un segundo proceso que causa disminución en la cosecha cuántica también puede deberse a un incremento en la cantidad y proporción de la energía de excitación absorbida por la antena del PSII que se desvía directamente a calor a través de un mecanismo de disipación térmica. En *Symbiodinium* esta disipación térmica está asociada a la conversión de la xantofila diadinoxantina a diatoxantina (Falkowski y Raven 1997). Esta conversión disminuye la velocidad a la que se canalizan los fotones a los centros de reacción del PSII y, por lo tanto, ayuda a evitar la reducción de aceptores de quinona. Esto disminuye eficazmente la sección transversal para la absorción funcional en los centros de reacción del PSII.

Por otro lado, la tasa de aumento en la proporción de luz disipada térmicamente puede no ser suficiente para la protección completa del PSII a medida que la tasa fotosintética se aproxima a los valores de saturación por luz. En muchas microalgas, los aceptores de quinona rara vez se reducen completamente, excepto a intensidades de luz considerablemente mayores que las requeridas para la saturación de la fotosíntesis (Falkowski y Raven 1997). Es importante mantener los aceptores de quinona en un estado parcialmente oxidado para evitar la fotoinactivación y el fotodaño de los centros de reacción de PSII. Cuando PSII se excita, existe la probabilidad de dañar a la proteína D1 del centro de reacción. Esta probabilidad es baja cuando los niveles de excitación son bajos, pero se incrementa al aumentar la luz absorbida, que a su vez resulta en la disminución en la capacidad de realizar fotoquímica. En condiciones fisiológicas normales, la tasa de fotodaño no supera la capacidad de su reparación. Sin embargo, en condiciones en las que los aceptores de quinona de PSII son reducidos en gran medida, tales como a intensidades de luz considerablemente superiores a las requeridas para la saturación de la fotosíntesis, la tasa de daño puede exceder considerablemente la tasa de reparación. En consecuencia, hay una pérdida de centros de reacción PSII funcionales y la fotosíntesis declina.

Los sumideros alternativos para electrones, distintos a los de la asimilación de CO₂, pueden proporcionar mecanismos de protección adicionales para ayudar a evitar que los aceptores de quinona del PSII se reduzcan a altas intensidades de luz (Smith et al. 2005; Einbinder et al. 2016). La PSI puede reducir directamente el O₂ mediante la reacción de

Mehler (Mehler 1951) para producir radicales superóxidos que son convertidos rápidamente a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa. Posteriormente, la enzima ascorbato peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno a una molécula de agua, utilizando el ascorbato como donante de electrones que a su vez se oxida a monodehidroascorbato (Asada 1999). El flujo de electrones fotosintéticos, desde la disociación de una molécula de agua del PSII hacia el PSI, hasta producir otra molécula de agua por la reacción de ascorbato peroxidasa, es conocida como ciclo agua-agua o reacción de Mehler-peroxidasa. La producción de estas enzimas para reducir estas especies altamente reactivas de oxígeno son una característica también importante en los filotipos de *Symbiodinium* que son tolerantes al calor.

Symbiodinium posee también respuestas de aclimatación más lentas a los cambios de régimen de luz durante su desarrollo en estado simbiótico. Como respuesta al régimen de luz en función de la profundidad y a los incrementos lumínicos estacionales, *Symbiodinium* disminuye las concentraciones de pigmentos colectores de luz (es decir, disminuye el tamaño de las antenas), y/o el número de los centros de reacción del PSI y PSII (Iglesias-Prieto y Trench, 1994). Esto reduce la cantidad de luz que llega a los centros de reacción y limita el riesgo de posible daño a la proteína D1 del centro de reacción (Hill y Ralph 2006).

Además de luz visible (radiación fotosintéticamente activa, PAR), radiaciones de onda corta (290-400 nm) tal como la radiación ultravioleta (UVR), afectan fuertemente la fisiología de plantas marinas y animales (Jokiel 1980). Entre los efectos de la UVR sobre el alga simbiótica en cultivo, se han observado disminuciones en las tasas de crecimiento, la concentración de clorofila *a*, el coeficiente carbón:nitrógeno, la evolución de oxígeno y la actividad de la enzima Rubisco (Banaszak y Trench 1995). Los dinoflagelados simbióticos poseen mecanismos adicionales de protección que contrarrestan directa o indirectamente las afectaciones por UVR, mediante la producción de aminoácidos tipo micosporina (Rosic y Dove 2011). La ruta química para la síntesis de MAA (la ruta del shikimato) no está presente en animales, y en el escenario de la endosimbiosis el hospedero puede obtener esta protección a través de su simbiote. Varios clados (si no es que todos) son capaces de producir estos pigmentos protectores, aunque los costos energéticos para su producción son

bastante elevados; se estima que casi el 19% de la energía total de la célula se destina para la producción de dichos pigmentos (Banaszak et al. 2006).

D. Características de la proteína de 75 kDa en *Symbiodinium* spp. que responde a estímulos de luz

En una búsqueda de proteínas que fueran susceptibles a incorporar fosfatos, en al menos tres especies de *Symbiodinium*, se identificó a una proteína de masa molecular aproximada de 75 kDa como perteneciente a la superfamilia de las HSP (Castillo-Medina 2013). Esta proteína además de su peso molecular demostró otras características tales como: 1) Estar fosforilada en residuo(s) de Thr; 2) incrementar su grado de fosforilación en su fase logarítmica de crecimiento; y 3) disminuir su grado de fosforilación minutos después de la exposición del cultivo a la luz, lo cual sólo ocurre cuando las células están adaptadas a fotoperíodos de oscuridad (Castillo-Medina 2013). Lo último sugiere que esta proteína pudiera estar dentro de una vía corriente abajo de algún sensor de luz para la regulación de su respuesta a las nuevas condiciones lumínicas, como un mecanismo de protección a un posible estrés de luz. Alternativamente, pudiera tratarse de algún mecanismo de disparo de nuevas rutas metabólicas que marcan que la luz ya está presente en el entorno y la fotosíntesis ya puede ser iniciada.

E. La familia de las proteínas HSP70 y sus funciones como respuesta a estrés abiótico

Las proteínas de choque térmico (HSP) son proteínas de estrés que inicialmente se identificaron como sensibles al estrés por calor (Feder y Hofmann 1999). Las HSP sirven como chaperonas moleculares fundamentales al prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas y promover el plegamiento oportuno de proteínas en condiciones de estrés térmico (Mayer y Bukau 2005). De acuerdo con su peso molecular aproximado, las HSP se han clasificado en cinco familias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y pequeña (s) HSP (Saidi et al. 2009). Entre ellas, los miembros de la superfamilia HSP70 (también conocidos como DnaK) junto con sus proteínas co-chaperonas GrpE y HSP40 (como DnaJ) forman un sistema para el plegamiento de proteínas, la degradación y los procesos de transporte en toda la célula (Wang et al. 2004). También desempeñan funciones esenciales en la fotosíntesis, la transducción de señales, la activación transcripcional y las respuestas al

estrés abiótico (Nitika y Truman 2017). Estructuralmente, las HSP70 se caracterizan por tres dominios distintos: un dominio N-terminal de adenosina trifosfatasa (ATPasa), un dominio de unión al sustrato y un dominio C-terminal altamente variable.

Los eucariotas fotosintéticos poseen al menos cuatro tipos de HSP70, cada uno de los cuales se localiza en un compartimento celular diferente: citoplasma, mitocondria (MT), cloroplasto (CP) y retículo endoplásmico (ER) (Karlin y Brocchieri 1998). Las HSP70 dirigidas a un compartimento subcelular determinado comparten una historia evolutiva similar. Las HSP70 de ER y citoplasmáticas evolucionaron por duplicación de genes, mientras que las de CP y MT evolucionaron por transferencia de genes desde el endosimbionte al núcleo (Renner y Waters 2007). En *Arabidopsis*, se han identificado al menos 18 miembros de la superfamilia HSP70 y los genes muestran distintos perfiles de expresión durante diferentes etapas de desarrollo y en condiciones de estrés térmico (Lin et al. 2001). Además, se ha confirmado que las HSP70 en el maní (*Arachis hypogaea* L.) desempeñan un papel importante para conferir tolerancia a la sequía (Govind et al. 2009). La HSP70 del estroma también desempeñan un papel clave en la importación de proteínas de cloroplasto (Shi y Theg 2010).

F. Mecanismo clásico de regulación de las proteínas HSP

La proteína HSP70 es una chaperona molecular altamente conservada involucrada en el plegamiento de proteínas, la modulación de las interacciones proteína-proteína y la degradación de proteínas dañadas. Los niveles de expresión de HSP70 generalmente se incrementan por estrés y su incremento da como resultado la unión y el replegamiento de proteínas desnaturalizadas. Los cambios en la expresión de HSP70 en condiciones de estrés y la unión selectiva de moléculas auxiliares conocidas como co-chaperonas están estrechamente reguladas por un factor de transcripción maestro, HSF1.

La activación transcripcional de la respuesta al choque térmico es orquestada por el factor de choque térmico 1 (HSF1, Heat Shock Factor 1), el cual rápidamente se transloca a los genes *hsp* e induce su expresión (Anckar y Sistonen 2011). El HSF1 es expresado constitutivamente en muchos tejidos y tipos celulares, y parece estar regulado principalmente por mecanismos postraduccionales (Wu 1995). En ausencia de estrés, la actividad de unión a DNA y la capacidad de *trans*-activación de HSF1 está sujeta a

regulación negativa, y se presenta como una forma monomérica, distribuida en forma difusa en el núcleo. Cuando ocurre la transición a un estrés que daña las proteínas, el HSF1 se convierte rápidamente a su forma activa, la cual es canalizada a vía de múltiples etapas que implica una transición de monómero a trímero y un posterior aumento de la actividad de unión al ADN, localización nuclear, y modificaciones postraduccionales importantes (Anckar y Sistonen 2011). Las señales proteotóxicas que inician la activación de HSF1 pueden ser el resultado de varios estímulos; además de elevadas temperaturas o hipertermia, HSF1 es activado por estrés oxidativo, metales pesados, e infecciones viral y bacteriana. No se conoce con exactitud cómo el estímulo proteotóxico es detectado por la célula y transmitido a HSF1; sin embargo, se han propuesto diferentes mecanismos de activación para HSF1, y que no son mutuamente exclusivos. (a) En el modelo clásico, HSF1 se mantiene en un estado inactivo por su asociación directa con chaperonas, principalmente HSP90. En células sometidas a choque térmico u otras condiciones proteotóxicas, el incremento de proteínas mal plegadas libera a HSP90 de HSF1, permitiendo la trimerización de HSF1. (b) En el modelo RNA termómetro, la activación de HSF1 es mediada por un complejo entre la molécula de RNA detectora de calor (HRS-1, heat-sensing RNA) y el factor de elongación eEF1A; de este modo se conecta la activación de HSF1 y el apagado de procesos traduccionales durante el choque térmico. (c) En el modelo de respuesta intrínseca se sugiere que HSF1 tiene una capacidad incorporada para detectar estímulos proteotóxicos. En efecto, varios estudios *in vitro* que demostraron que la proteína HSF1 pura puede convertirse a su estado trimérico con choque de calor y otros tipos de estrés (Anckar y Sistonen 2011).

G. Procesos celulares que son regulados mediante fosforilación de HSP70

Si bien HSF1 aún se considera la principal forma de controlar la actividad de HSP70 en las células, la evidencia acumulada apunta hacia otra estrategia: la fosforilación de HSP70. Los patrones de fosforilación específicos de HSP70, conocidos como 'el código chaperón', pueden modular la función que desempeña HSP70 dentro de la célula (Fig. 2).

En años recientes, la identificación de los sitios de fosforilación se ha acelerado en gran medida mediante el uso de espectrometría de masas. La fosfoproteómica dirigida y global ha permitido descubrir 53 sitios de fosforilación en HSP70 (PhosphoSitePlus); sin

embargo, estos sitios de fosforilación no dicen nada de su papel en la regulación de la función de chaperona. Gracias a las técnicas de bioinformática actuales para priorizar estos sitios de fosforilación en términos de importancia funcional, Beltrao y colaboradores (2012) recopilaron cerca de 200000 sitios de fosforilación para una variedad de proteínas entre las cuales se incluían las proteínas HSP70. Ellos predijeron aquellos sitios con mayor probabilidad para mediar las interacciones proteína-proteína y la actividad enzimática. En total, identificaron 313 fosfositos en isoformas de HSP70 de 11 especies y su análisis de enriquecimiento destacó dos zonas importantes: una adyacente al dominio de unión a nucleótidos (zona 1) y la otra cerca del dominio de unión al sustrato (zona 2). En estos dos “hot spots” (zonas calientes o clave), se identificaron cinco sitios de fosforilación (T36 y T38 para la zona 1, y T492, S495 y T499 para la zona 2) como sitios presuntos de regulación de la chaperona HSP70.

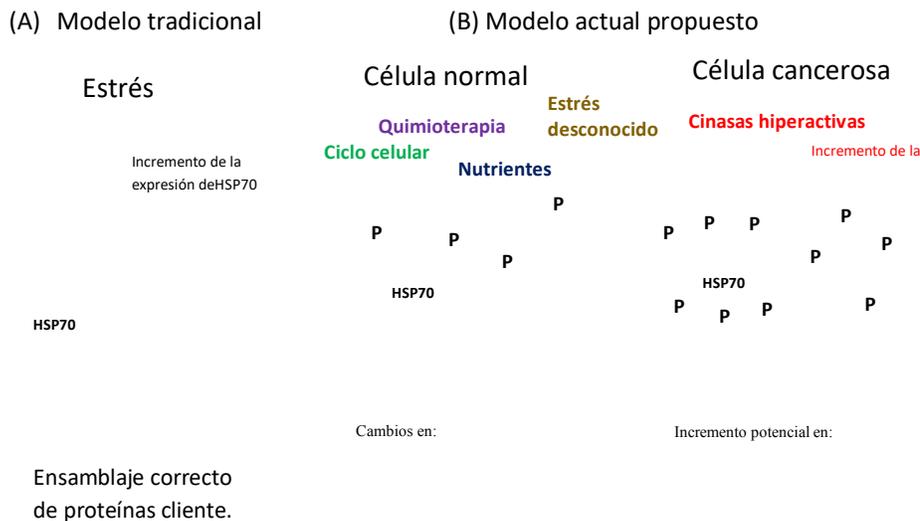


Figura 2. Modelos de regulación de la proteína de choque térmico HSP70. (A) Regulación de HSP70 a

ensamblar correctamente y/o degradar las proteínas cliente (Nitika y Truman 2017).

a. Regulación de la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación de HSP70

Entre las muchas funciones conocidas de HSP70, se ha descrito que juega un papel complejo en la progresión del ciclo celular. En levadura, la HSP70 se une a ciclina G1 (Cln3) para marcarla y así regular su degradación. La Cln3 contiene un dominio tipo J que compite con la co-chaperona Ydj1 para unirse a HSP70. Durante la transición G1-S, la Ydj1 desplaza la unión de Cln3 con HSP70, lo que permite que Cln3 transite hacia el núcleo, donde promueve la progresión del ciclo celular. Este interruptor molecular se controla directamente mediante la fosforilación de HSP70 en el sitio T36. En condiciones de escasez de nutrientes, la cinasa dependiente de ciclina Pho85 (CDK) fosforila la T36 de la HSP70, lo que provoca la disociación del complejo HSP70-Ydj1, y permite la formación del complejo HSP70-Cln3, y la etiqueta para su degradación. Esto detiene a las células en G1 hasta que los nutrientes estén disponibles nuevamente. En un mecanismo conservado en mamíferos, la fosforilación de HSP70 de mamíferos en el residuo equivalente (T38) conduce a la degradación de la ciclina D1 (homólogo a Cln3) y la represión de la señalización controlada por el ciclo celular (Truman et al. 2012).

La cinasa tipo polo (Polo-like kinase 1; Plk1) es una importante cinasa mitótica que también puede fosforilar HSP70. El tratamiento de células HeLa S3 con trióxido de arsénico (ATO) produjo una rápida fosforilación de HSP70 mediada por Plk1 en cinco residuos: T13, S362, T226, S631 y S633. Las células mutantes que expresan HSP70-S631A/S633A fueron significativamente más propensas al arresto mitótico inducido por ATO que las células de tipo silvestre, lo que sugiere que la fosforilación en los sitios serina 631 y/o 633 de HSP70 cumple una función protectora contra la muerte celular por apoptosis. Plk1 fue colocalizada con HSP70 fosforilada en S631 y/o S633 en el centrosoma. Esta asociación condujo a un aumento de la estabilidad de los microtúbulos y la elongación de los husos mitóticos (Chen et al. 2014).

La Plk1 no es la única cinasa que fosforila a HSP70 para asegurar la función correcta del huso mitótico. También la cinasa Nek6 fosforila a HSP70 en T66, lo que permite su localización en los husos mitóticos y ayuda en la agregación de los cromosomas dando estabilidad a las fibras del cinetócoro mediante el reclutamiento de las proteínas ch-TOG y TACC3. La mutante HSP70T66A no es capaz de reclutarse en los polos del huso, lo que da

como resultado una desestabilización de la fibra del cinetócoro y una progresión mitótica anormal (O'Regan et al. 2015).

b. Regulación de la dimerización de HSP70 por fosforilación

Las HSP70 son principalmente monoméricas. Sin embargo, análisis combinado de espectrometría de masas estructural y el modelado de estructuras determinó que la fosforilación de HSP70 de mamífero en el residuo de treonina 504 (T504) es fundamental para su dimerización, y por otro lado, promueve la formación del complejo que comprende HSP90, HSP70 y HSP40 para la asistencia de proteínas cliente. Este complejo es notablemente estable y puede actuar como un "refugio" para las proteínas cliente mientras se están plegando (Morgner et al. 2015).

c. Regulación del control de calidad de clientes de HSP70 por fosforilación

Las proteínas cliente durante su vida útil suelen pasar por varias rondas de plegamiento mediado por chaperonas. Si HSP70 se une a una proteína cliente desnaturalizada, esta será canalizada para su degradación a través del proteasoma. Si bien CHIP (una co-chaperona asociada al C-terminal) es importante para este proceso, lo que determina si la HSP70 debe ensamblar a la proteína cliente o etiquetarla para la degradación aún no está claro.

La fosforilación de los dominios de unión a la proteína cliente localizados en el C-terminal de HSP70 y HSP90 regula el proceso de control de calidad del cliente. La fosforilación en los dominios C-terminal de HSP70 y HSP90 (T636 en HSP70) incrementa la afinidad de asociación con la co-chaperona HOP y la estabilidad de la proteína cliente. La desfosforilación en dicho residuo desfavorece la unión con HOP y favorece la unión con CHIP, lo que resulta en la degradación del cliente. Dado que la fosforilación de T636 parece ser especialmente prevalente en las células cancerosas en proliferación, esto podría ser un determinante principal de la estabilidad de las oncoproteínas, lo que promueve el crecimiento de las células cancerosas (Müller et al. 2013). A pesar de que la fosforilación en el sitio T636 impacta de manera importante en las interacciones con HOP y CHIP, estudios recientes demostraron que esta tuvo poco efecto en la unión de otras co-

chaperonas, como DnaJC7, FKBP51 y FKBP52, las cuales también interaccionan con HSP70 aproximadamente en la misma ubicación (Assimon et al. 2015). La regulación de la selectividad en la unión de las co-chaperonas a clientes permanece poco clara, pero es una faceta que será importante estudiar para conocer más del control de calidad ejercido por la chaperona.

V. HIPÓTESIS

En *Symbiodinium microadriaticum* existen proteínas que son modificadas en respuesta a estímulos de luz. SmicHSP75 es una proteína fosforilada en treonina en la fase oscura del fotoperiodo, y dicho nivel de fosforilación disminuye cuando el dinoflagelado es expuesto a la luz. Por lo tanto, el nivel de fosforilación de SmicHSP75 depende de la intensidad y/o longitud de onda de la luz con la que se provoca el estímulo, y su modificación por fosforilación/desfosforilación implica la modulación de algún evento celular, así como la interacción con otras cinasas y fosfatasas y/u otras proteínas.

VI. OBJETIVOS

Desarrollar una caracterización de SmicHSP75 en *Symbiodinium microadriaticum*, para obtener información acerca de cuál es el papel que desempeñan los cambios de su nivel de fosforilación en respuesta a la luz.

Específicos:

- Confirmar la identidad de la proteína SmicHSP75.
- Determinar si la desfosforilación es dependiente de la intensidad de luz y/o de algún espectro lumínico particular.
- Determinar si la temperatura afecta el estado de fosforilación de la proteína.
- Analizar la posible formación de complejos proteicos con SmicHSP75.
- Analizar las consecuencias de los eventos de fosforilación/desfosforilación de SmicHSP75 con otros elementos bioquímicos en base a la información obtenida.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material biológico

Se utilizaron células de *Symbiodinium microadriaticum*, (filotipo A1), a las que para fines didácticos nos referiremos de aquí en adelante como *Symbiodinium* KB8 (*S.* KB8) donado de la colección de cultivos de la Dra. Mary Alice Coffroth de la Universidad de Buffalo, NY, USA, y mantenido por varios años ya en la colección de cultivos de diversos dinoflagelados en Puerto Morelos. Este es el simbionte predominante y originalmente aislado de la medusa *Cassiopea xamachana*. Los cultivos se propagaron en medio de cultivo ASP-8A (McLaughlin et al. 1966) axénicos, en luz de fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a una intensidad de luz de 80-120 $\mu\text{mol-fotón/m}^2\text{s}$ y una temperatura de 26°C.

B. Extracción de proteínas totales

Las preparaciones de extractos de proteínas se realizaron según la necesidades particulares de cada ensayo y se describen en cada una de ellas. En general, las células suspendidas en medio de cultivo (ASP-8A o LB líquido según sea *Symbiodinium* o bacteria, respectivamente) se colectaron por centrifugación y se suspendieron en el buffer conveniente para lisarlas mecánicamente mediante agitación vigorosa con perlas de vidrio o por cambio de presión abrupta en una prensa French (SLM-AMINCO French® pressure cell press).

C. Extracción de DNA genómico de *Symbiodinium* KB8

Células de *S.* KB8 en 50 ml de cultivo de 15 d se concentraron por centrifugación a 2600 g por 5 min. El concentrado se suspendió en 600 μl de solución de extracción de DNA (1 % (p/v) sarcosil, 0.8 M cloruro de sodio (NaCl), 0.22 mM EDTA, 220 mM Tris, 0.8 % (p/v) hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 0.14 M manitol, pH 8 y adicionado con 1 μl de β -mercaptoetanol. Las células se lisaron en agitación con perlas de vidrio en un mini-Bead Beater-1 (BioSpec) por 3 min a 4800 oscilaciones/min, y enseguida se adicionaron 600 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (relación 24:1) e incubaron a 65°C

por 30 min. Después, al homogenado se le aplicó una centrifugación a 12000 g por 10 min a 4°C para recuperar la fase acuosa, a la cual se le añadió un volumen de isopropanol frío y 10 volúmenes de 3 M acetato de sodio, pH 5.2 e incubó por 30 min a -20°C.

Posteriormente, se centrifugó a 12000 g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 75 % de etanol frío. Este precipitado se suspendió con 100 µl de buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8) y se le añadieron 2 µl de 100 mg/ml RNAsa A, 25 ml de 5 M NaCl y un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (relación 25:24:1), e incubó por 40 min a 37°C. Después, se le aplicó una centrifugación a 12000 g por 10 min a 4°C, y a la fase acuosa se le adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (relación 24:1) frío. La mezcla se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa en otro tubo. A dicha fase, se le adicionaron dos volúmenes de 75 % etanol frío y 10 volúmenes de 3 M acetato de sodio, pH 5.2 e incubó 30 min a -20°C para promover la precipitación del DNA. Después de la incubación, se centrifugó a 12000 g por 20 min a 4°C, y a la pastilla de DNA se le aplicaron tres lavados con 75 % etanol frío, centrifugando a 12000 g 5 min a 4°C en cada lavado. Finalmente, el DNA se secó por 5 min a temperatura ambiente y se suspendió en 50-100 µl de agua libre de DNAsas.

D. Extracción de RNA total de *Symbiodinium* KB8 y síntesis de cDNA

Debido a la alta susceptibilidad del RNA a ser degradado por RNAsas, el material que se utilizó fue esterilizado y tratado con dietil pirocarbonato (DEPC; [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO]), un agente inhibidor de la actividad de las RNAsas. Se extrajo RNA de un cultivo de 6 d de células de *S. KB8*, previamente sometido a 12 h de oscuridad. Las células se precipitaron por centrifugación y suspendieron en 1 ml de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) por cada 5-10 x 10⁶ células. Posteriormente, las células se lisaron con perlas de vidrio en un mini-Bead Beater-1 a una velocidad de 4800 oscilaciones/min durante 3 min. El lisado se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante con el RNA, se transfirió a otro tubo y se dejó reposar por 5 min. Después, se le adicionaron 0.3 ml de cloroformo por cada ml de TRI Reagent® y se agitó vigorosamente por 15 s, seguido por centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla consta de tres fases y en la superior se encuentra el RNA; ésta se transfirió a un tubo

Eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRI Reagent[®] usado, y se incubó por 5 min. Después de la incubación, la solución se centrifugó a 12000 g por 8 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado con el RNA se lavó con 75 % etanol, y se centrifugó a 12000 g durante 5 min a 4°C. Finalmente, la pastilla se suspendió con 20 µl de 0.1% DEPC en agua (agua-DEPC) y se guardó a -20°C hasta su uso posterior en la síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA). Por cada 5 µg de RNA se utilizaron 2 µl de “random primer” (100 ng), 1 µl de dNTP mix y agua con DEPC, hasta completar 12 µl de volumen final. La reacción se incubó a 65°C por 10 min y posteriormente se colocó a 4°C; al tubo se le agregaron 4 µl de 5X “first strand buffer” y 2 µl de 0.1 M DTT, y se mezcló e incubó por 2 min a 25°C. Después, se agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa Super Script[®] II (Thermo Fisher Scientific), se mezcló bien y se incubó como sigue: 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C. Seguidamente, se le agregó 1 µl de RNAasa H y se incubó por 20 min a 37°C. Finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

E. Técnicas bioquímicas y moleculares generales para el análisis de proteínas y material genómico.

a. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon a una concentración de 1-2 % agarosa (según requirió el análisis) en 50 ml de buffer TAE con 0.01 % de tinta fluorescente Gel Red (Biotium, Hayward, CA). A las muestras de DNA se le agregaron 2 µl de buffer de carga 6X Orange (Fermentas, St. Leon-Rot) por cada 5 µl de muestra y se separaron en el gel de agarosa a 80 V durante 1 h 20 min.

b. Electroforesis de proteínas en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos de proteínas se separaron en geles desnaturalizantes discontinuos (Laemmli 1970), de 10 o 16 % de acrilamida según la conveniencia, en la zona de separación [375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 10 o 16 % (p/v) acrilamida/bis-acrilamida; 0.1 %

(p/v) SDS; 0.1 % (p/v) persulfato de amonio (APS); 0.106 % (v/v) N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)], y de 4 % de acrilamida en la zona de apilamiento [125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4 % (p/v) acrilamida/bisacrilamida; 0.1 % (p/v) SDS; 0.1 % (p/v) APS; 0.066 % (v/v) TEMED]. Para la separación también se utilizó un buffer de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS, pH 8.3). Las muestras de proteínas y marcadores de peso molecular preteñidos (See Blue plus 2 o Page Ruler) se cargaron en los pozos del gel y se corrieron a 10 mA en la zona de apilamiento y 15 mA en la zona de separación en aparatos minigel de Hoefer® (Hoefer, Inc; Holliston, MA). Las corridas se detuvieron antes de que el colorante indicador del frente de proteínas se saliera de la matriz del gel. Las proteínas del gel se tiñeron con azul de coomassie coloidal, o se electrotransfirieron a una membrana de PVDF para analizarlas por western blot.

c. Electroforesis de proteínas en geles de doble dimensión (2D)

Las sales que provienen del organismo o de manipulaciones previas, son un factor importante que interfiere en la correcta separación de proteínas mediante esta técnica. Por ello, los extractos de proteínas se precipitaron primero con acetona-ácido tricloroacético o con el kit Cleanup ReadyPrep® 2D (BioRad), según la metodología del fabricante. La pastilla de proteínas precipitadas se suspendió en buffer de hidratación ReadyPrep de BioRad® (8 M urea, 2 % (p/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.2 % (v/v) anfolitos 3/10 BioLite® de BioRad y una traza de azul de bromofenol) para hidratar las tiras IPG (por sus siglas en Inglés: Immobilise pH Reagent). El lado del gel de una tira IPG ReadyStrip® pH 4-7 (BioRad) se embebió en 125 µl de extracto de proteínas para tiras de 7 cm, o en 300 µl para tiras de 17 cm, cuidando de no atrapar burbujas. Las tiras embebidas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h; después la tira se cubrió con aceite mineral y se continuó incubando, pero a 18°C durante 12 h. Después de la incubación, las proteínas en la tira se isoelectroenfocaron en una PROTEAN IEF cell® (BioRad) como sigue: a) para la de 7 cm, a una corriente programada de 250 V por 20 min, incremento gradual hasta 4000 V por 2 h y a 4000 V hasta cubrir 10000 V-h; o b) para la de 17 cm, 250 V por 30 min, incremento gradual hasta 10000 V por 2 h y a 10000 V hasta cubrir 43000 V-h. A continuación, para desnaturalizar las proteínas, las tiras se equilibraron primero en 1.5 ml (tira 7 cm) o 3 ml (tira 17 cm) de buffer I® (6 M urea, 2 % (p/v) SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 20 %

(v/v) glicerol y 2 % (p/v) DTT; BioRad) por 15 min y después en buffer II® (buffer I adicionado con 2.5 % (p/v) iodoacetamida; BioRad) durante 15 min en un volumen igual que con Buffer I, respectivamente. Las tiras se enjuagaron brevemente en buffer de corrida y se cargaron sobre un gel de SDS-PAGE de 10 % de acrilamida para continuar con la separación de las proteínas en la segunda dimensión (geles 2D). Las proteínas del gel se tiñeron con azul de coomassie coloidal, o se electrotransferieron a una membrana de PVDF para analizarlas por western blot con los anticuerpos anti-pThr.

d. Western blot

Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida desnaturalizantes o 2D, éstos se transfirieron a membranas de PVDF. El gel se colocó sobre la membrana de PVDF, reconstituida previamente en etanol absoluto e hidratada en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 10 % isopropanol, pH 8.3; Villanueva 2008), con papeles filtros y esponjas tanto debajo de la membrana como encima del gel; posteriormente, se ensamblaron en el módulo de transferencia húmeda según instrucciones del fabricante (MiniProtean® de BioRad; Hercules, CA). El cartucho se colocó en la cámara con buffer de transferencia y se le aplicó una corriente constante de 300 mA por 1 h. Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas se incubaron en una solución de 3 % (p/v) albúmina de suero de bovino (BSA: bovine serum albumin) en buffer de sales de fosfato (PBS; 2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, 136.9 mM NaCl, pH 7.5) durante 1 h a 50°C y con agitación constante para bloquear los espacios vacíos y sitios inespecíficos en la membrana. Posterior al bloqueo, a las membranas se les adicionaron los anticuerpos primarios con las diluciones adecuadas en PBS-T (0.01 % Tritón X-100 en PBS) según cada caso y se incubaron durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente. Se hicieron cinco lavados en PBS-T, 5 min cada vez con agitación. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios asociados a fosfatasa alcalina (anti-conejo o anti-ratón según cada caso), durante 2 h en agitación suave y a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces 5 min en agitación con PBS-T. Finalmente, se revelaron con soluciones comerciales de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) disueltas de acuerdo al fabricante (Promega; Madison, WI), en buffer PBS-T.

e. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en cada extracto fue determinada de acuerdo al método de Bradford (1976), que consiste en un ensayo colorimétrico para medir la concentración total de proteína. Las proteínas se unen al colorante comassie blue G-250 para formar un complejo proteína-colorante a través de residuos de arginina (Tal et al. 1985) con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato, y pocas sustancias interfieren en su determinación.

f. Precipitación de proteínas con acetona-ácido tricloroacético

Una alícuota de muestra de proteínas se mezcló con ocho volúmenes de acetona (-20°C) y se le adicionó un volumen de ácido tricloroacético (TCA); la mezcla se incubó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla se centrifugó a 5000 g por 5 min y a continuación, al precipitado de proteínas se le aplicaron dos lavados con 2 ml de acetona a -20°C en cada lavado. La acetona del último lavado se decantó cuidando de mantener la pastilla en el fondo del tubo y la acetona residual se dejó evaporar. Antes de que la pastilla se secase completamente, se suspendió en el buffer adecuado según el caso.

g. Tinción de geles de poliacrilamida

Para la tinción con azul de coomassie, los geles se enjuagaron brevemente en agua, y después se incubaron en una solución de 0.1 % (p/v) azul de coomassie (R250, Sigma) en agua:ácido acético glacial (19:1) y agitación suave por al menos 6 h o toda la noche. Para desteñirlos, éstos se incubaron en una solución de 40 % etanol, 10 % ácido acético en agua destilada y agitación suave, hasta que el trasfondo del gel quedó transparente y se observaron las bandas de proteínas.

F. Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpo anti-Fosfotreonina (pThr; Cell Signaling Technology[®], Inc; Danvers, MA). Anticuerpo policlonal producido por inmunización de animales con péptidos sintéticos que contienen fosfo-treonina, y está purificado con proteína A por cromatografía

de afinidad, con lo cual se detectan proteínas y péptidos fosforilados en residuos de Thr de manera muy independiente de la secuencia de aminoácidos que los rodean. En los ensayos se usó una dilución de 1:1000.

Anticuerpos anti-1017. Son anticuerpos IgG policlonales de conejo desarrollados mediante inmunización de un fragmento c-term-SmicHSP75 y purificados por cromatografía de afinidad en un columna de proteína A. Detectan específicamente a SmicHSP75 y algunos de sus homólogos en otras especies de *Symbiodinium*.

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

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

G. Aislamiento de SmicHSP75 a partir de geles 2D

En un trabajo previo desarrollamos un método para obtener una fracción enriquecida de SmicHSP75 (Castillo-Medina 2013, Tesis de Maestría). Brevemente, un extracto de proteínas totales de *S. KB8* adaptadas a oscuridad, y suspendidas en PBS, pH 7.8, se sometieron a centrifugación a 100000 g por 1 h. Después, el sobrenadante se disolvió con seis volúmenes de PB (PBS sin NaCl, pH 7.8) y se pasaron por una columna de 1 ml de matriz de DEAE-Sefacel. La columna se lavó con 0.075 M NaCl en PB y se eluyó con 0.4 M NaCl en PB. Esta última fracción contiene a SmicHSP75 enriquecida. Posteriormente, dicha fracción se precipitó con acetona-TCA para eliminar las sales. La pastilla de proteínas se suspendieron en buffer de hidratación ReadyPrep® (BioRad) y se sometieron a separación en geles de 2D (con tiras IPG ReadyStrip® pH 4-7 de 7 cm en la primera

dimensión, y en geles de 10% de SDS-PAGE en la segunda). Un gel se tiñó con azul de coomassie y el otro se transfirió a una membrana de PVDF para su análisis por western blot con anticuerpos anti-pThr. Los puntos correspondientes a SmicHSP75 se localizaron en el gel 2D teñido con azul de Coomassie; para confirmar que tales puntos corresponden a SmicHSP75, se extrajeron del gel por separado y se analizaron de nuevo por wester blot a partir de un gel 10% de SDS-PAGE. También se analizó como control negativo otro punto abundante de otra proteína vecina con peso molecular cercano a SmicHSP75. Los puntos isoelectrónicos de SmicHSP75 en el gel 2D se estimaron manualmente mediante relacionar la medición de la distancia de migración de las proteínas después de su isoelectroenfoque con pH estimado: esto último considerando que ambos parámetros se relacionan linealmente.

H. Secuenciación de aminoácidos de SmicHSP75 por LC-MS.

Muestras de los puntos correspondientes de SmicHSP75 extraídas por separado a partir de cinco geles 2D teñidos con azul de coomassie coloidal BioSafe® (BioRad), se sometieron a análisis por espectrometría de masas acoplado a cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS).

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digerida “*in gel*” con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución de reacción conteniendo 50 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 h a 37°C.

Los péptidos producidos por digestión enzimática fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con

detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z .

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 min utilizando una columna capilar. El flujo del sistema LC fue de 300 nL/min.

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 ms y tiempo máximo de inyección de 10 ms por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos en formato “.raw” fueron sometidos a búsqueda contra la base de datos de Swiss Prot (all organisms) y NCBI nr (*Symbiodinium*) a través del programa Discoverer 1.4 (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA). Posteriormente, los archivos “.raw” fueron analizados de forma manual para realizar secuenciación *de novo* parcial de proteínas.

I. Tratamientos a diferentes intensidades lumínicas

Cultivos de células de *S. KB8* a una concentración inicial de 4×10^4 cel/ml y después de 6 d de crecimiento, se concentraron por centrifugación y suspendieron en medio ASP-8A fresco hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 9×10^5 cel/ml. A continuación, las células se dividieron en alícuotas iguales de 10 ml en cinco tubos Falcon de 15 ml que fueron forrados con papel aluminio. Las células en los tubos se dejaron adaptar en el fotoperíodo de oscuridad (12 h) a 26°C. Después, las células de cada alícuota se colocaron en una celda transparente (3.5 cm de diámetro) y se expusieron a estímulos de luz a las intensidades lumínicas controladas de 1, 10, 40 o ~ 650 (control positivo (c+)) $\mu\text{mol-fotón/m}^2\text{s}$ durante 30 min y 26°C. A continuación, se realizaron extracciones de proteínas de las cuatro alícuotas tratadas con luz y la de 12 h de oscuridad; para ello, las células se

concentraron por centrifugación a 2600 g por 30 s, se suspendieron con 250 μ l de buffer de Laemmli y transfirieron a tubos Eppendorf de rosca con \sim 250 μ l de perlas de vidrio (450-600 μ m de diámetro; Sigma), y se procedió a su inmediata ruptura con una agitación vigorosa de 3 min en un mini-Bead Beater-1 (4800 oscilaciones/min). Las muestras se calentaron 5 min a 95°C y centrifugaron 10 min a 12000 g; se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron en geles de SDS-PAGE, y por western blot con anticuerpos anti-pThr (Cell Signaling Technology[®], Inc; Danvers, MA) o con anticuerpos monoclonales anti-actina (Amersham). Las bandas de las muestras fueron capturadas con un fotodocumentador ChemiDoc-It2 (UVP-Analytik Jena, Upland, CA, EE. UU.) y analizadas por densitometría con el software VisionWorks LS. Las densidades de las bandas correspondientes a SmicHSP75 fueron normalizadas con la densidad de la banda de actina para obtener un nivel arbitrario de intensidad. Finalmente, los datos obtenidos a partir de tres experimentos independientes se promediaron y se sometieron a análisis ANOVA, y se graficaron.

J. Tratamientos bajo diferentes espectros de luz en células adaptadas a oscuridad

Similar al experimento de intensidades lumínicas, cultivos de células de *S. KB8* a una concentración inicial de 4×10^4 cel/ml y después de 6 d de crecimiento, se concentraron por centrifugación y suspendieron en medio ASP-8A fresco hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 9×10^5 cel/ml. A continuación, las células se dividieron en alícuotas iguales de 10 ml en cinco tubos Falcon de 15 ml que fueron forrados con papel aluminio. Las células en los tubos se dejaron adaptar en el fotoperíodo de oscuridad (12 h) a 26°C. Después, las células de cada alícuota se colocaron en una celda transparente (3.5 cm de diámetro) y se trataron a espectros lumínicos de colores, amarillo (490-750), azul (450-490), rojo (610-750) o blanco (410-750) y a una intensidad lumínica de ~ 100 μ mol-fotón/m²s durante 30 min para cada espectro lumínico. A continuación, se realizaron extracciones de proteínas de las cuatro alícuotas tratadas con luz y la de 12 h de oscuridad como se describió para las extracciones después de los tratamientos de intensidades lumínicas. Las muestras se analizaron con anticuerpos anti-pThr (Cell Signaling Technology[®], Inc; Danvers, MA) o con anticuerpos monoclonales anti-actina (Amersham). Como en el caso del ensayo a

diferentes intensidades lumínicas, las densidades de las bandas correspondientes a SmicHSP75 se normalizaron con la de actina para obtener un nivel arbitrario de intensidad, y se graficaron los promedios de las tres réplicas para cada tratamiento.

K. Análisis del efecto de la temperatura sobre la desfosforilación inducida por luz

Similar al experimento de intensidades lumínicas, cultivos de células de *S. KB8* a una concentración inicial de 4×10^4 cel/ml y después de 6 d de crecimiento, se concentraron por centrifugación y suspendieron en medio ASP-8A fresco hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 9×10^5 cel/ml. A continuación, las células se dividieron en alícuotas iguales de 10 ml en seis tubos Falcon de 15 ml que fueron forrados con papel aluminio. Las células de dos alícuotas se dejaron adaptar al fotoperíodo de oscuridad (12 h) y a 21, 26 ó 32°C. Después, las células de una de las dos alícuotas para cada temperatura se colocaron en una celda transparente (3.5 cm de diámetro) y se trataron con luz $\sim 650 \mu\text{mol-fotón/m}^2\text{s}$ durante 30 min, y las otras sólo se mantuvieron en oscuridad hasta la extracción de proteínas. A continuación, se realizaron extracciones de proteínas como se describió para las extracciones después de los tratamientos de intensidades lumínicas. Las muestras se analizaron con anticuerpos anti-pThr (Cell Signaling Technology®, Inc; Danvers, MA) o con anti-actina. Cargas iguales de proteínas se aseguraron desde la separación en alícuotas homogéneas de células, y se confirmó como en el caso anterior arriba descrito.

L. Análisis de complejos proteicos de SmicHSP75 por cromatografía de exclusión molecular en Sefacril S-300-HR

Setenta y nueve ml de suspensión de sefacril (Sephacryl S-300-HR; Sigma) se empaclaron por gravedad en una columna de vidrio (Econo-Column® 1.5 x 50 cm, Bio Rad); el empaclado y manipulaciones subsiguientes de la columna se realizaron bajo condiciones refrigeradas a 8°C. La matriz se equilibró con 2 volúmenes de buffer PBS pH 7.8, filtrado a través de una membrana millipore de 0.22 μm (PBS-f), impulsada con una bomba peristáltica (Pump-1, Pharmacia Biotech) a una velocidad de flujo de 30 ml/h (~ 15 cm de columna/h). Para determinar en cuál fracción eluye cierto tamaño molecular, la columna se calibró con una mezcla de marcadores estándares disueltos en PBS que

contiene, azul de dextrano, apoferritina, β -amilasa, BSA (MW-GF-1000 kit; Sigma) y citocromo C, con Mr's ~2000, 443, 200, 66, y 13 kDa, respectivamente. Se cargaron 800 μ l de la mezcla de marcadores en la columna y se corrieron en PBS-f a una velocidad de 30 ml/h. Se colectaron 100 fracciones de 790 μ l por goteo con un colector de fracciones (RediFrac[®]; Pharmacia Biotech) y la presencia de proteína en las fracciones se determinó por absorbancia a 280 nm. Los valores calculados del coeficiente de distribución (K_{av}) y el \log_{10} del peso molecular para cada marcador se correlacionaron en una gráfica. El K_{av} es un coeficiente de distribución para cada marcador que se calcula con la diferencia del volumen de elución (V_e) menos el volumen vacío de la matriz (V_o) dividido entre la diferencia del volumen total (V_t) menos V_o .

Posteriormente, se realizó la extracción de proteínas de células de *S. KB8* de cultivos de seis días de crecimiento, adaptadas a su ciclo de 12 h de oscuridad o tratadas con 30 min de luz después 12 h oscuridad. Para ambos casos se procedió a la extracción de proteínas como sigue: las células de *S. KB8* se concentraron por centrifugación, se suspendieron en 2 ml de PBS y se lisaron a 20000 psi en una prensa French; después, el homogenado de proteínas se centrifugó a 20000 g por 20 min; 1 ml del sobrenadante se cargó en la columna previamente equilibrada como se describe arriba. La columna se corrió con PBS a un flujo constante de 30 ml/h y hasta coleccionar 100 fracciones de 790 μ l. Se tomaron alícuotas de 30 μ l de las fracciones pares a partir de la fracción 40 y hasta la 72, se les adicionaron 10 μ l de buffer de Laemmli 4X y se calentaron a 95°C, 5 min. Las muestras se analizaron por western blot con los anticuerpos anti-pThr.

M. Preparación de anticuerpos específicos contra SmicHSP75

Obtener anticuerpos que fueran capaces de detectar específica y endógenamente a SmicHSP75 nos permitiría desarrollar un estudio más profundo de los cambios en el nivel de su fosforilación, así como reforzar o complementar algunos objetivos tales como el encontrar su(s) ligando(s) mediante ensayos de inmunoprecipitación, y la inmunolocalización *in situ* en *Symbiodinium*. Esto nos daría información para conocer más sobre las vías de transducción de señales en las que participa SmicHSP75.

a. Selección de una secuencia específica de SmicHSP75 para el desarrollo de anticuerpos policlonales.

Adicional a la secuencia correspondiente a SmicHSP75, en la base de datos de S. KB8 (Aranda et al. 2016), se encontraron al menos otras cinco secuencias con identidades del homólogo de la proteína HSP70 de *S. microadriaticum*. Por ello, fue importante la selección de un fragmento que fuera específico de SmicHSP75 con tal de que los anticuerpos generados fueran específicos contra la proteína y capaces de discernir entre los otros presuntos homólogos. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple en el programa en línea Multalin (Corpet 1988) con todas las cinco secuencias traducidas a aminoácidos y la de SmicHSP75. Adicionalmente, las regiones que presentaron mayor divergencia en SmicHSP75 respecto de las otras secuencias, se evaluaron en el programa EMBOSS explorer (<https://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) para determinar cuál de ellas presentaba mayor antigenicidad.

Debido a que la secuencia de aminoácidos específica de SmicHSP75 seleccionada para desarrollar anticuerpos se encuentra cerca de la región carboxilo terminal (c-terminal), nos referiremos a ella en adelante como c-term-SmicHSP75, y a su secuencia en nucleótidos como *c-term-SmicHSP75* (en cursiva).

b. Amplificación por PCR, inserción en el vector pGEM T-easy y propagación en bacterias de *E. coli* del fragmento *c-term-SmicHSP75*

A partir de la secuencia de nucleótidos correspondiente de *SmicHSP75* de *Symbiodinium microadriaticum* (No. de acceso smic27213, base de datos coral reef), se enviaron a sintetizar oligonucleótidos (oligos) hacia adelante (Fw1) 5' gaggagttcgcgatgaggacaagaagg-3' y en reversa (Rv1) 5'- gccgccgtagtacttggagacgatgg -3' que flanquean el fragmento específico *c-term-SmicHSP75* de 345 pb. Para amplificarlo se utilizó la enzima DreamTaq DNA (Thermo Scientific) en un volumen total de reacción de 20 µl, a las concentraciones y parámetros de amplificación recomendados por el proveedor.

El producto amplificado de *c-term-SmicHSP75* se separó en un gel de agarosa y la banda correspondiente se extrajo del gel con un kit de elución (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega) según la metodología del proveedor. A continuación, el fragmento purificado se insertó en el vector de clonación pGEM®T-easy con la enzima T4

Ligasa (Promega), según metodología del fabricante. Después de la ligación, 2 µl de esta mezcla se adicionaron a un vial con 50 µl de bacterias de *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5α congeladas a -80°C seguido de incubación durante 30 min en un baño con hielo; a continuación, la suspensión de bacterias se sometió a choques de calor a 42°C durante 45 s y de frío al regresarlas al baño de hielo por 2 min. Posteriormente, se agregaron 950 µl de medio SOB (2 % bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.01 M NaCl, 0.0024 M KCl, pH 7), e incubó a 37°C durante 2 h y agitación a 200 RPM (en pantalla, lab companion SI300R). Después, las bacterias transformadas se inocularon en medio LB sólido (1 % bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.171 M NaCl, 1.5 % agar, pH 7.4) adicionado con ampicilina (100 µg/ml) para seleccionar las bacterias que fueron resistentes a este antibiótico, lo cual es indicativo de una transformación exitosa. A continuación, las colonias que contuvieron los plásmidos con el fragmento *c-term-SmicHSP75* integrado fueron seleccionadas a través de la amplificación por PCR de un fragmento de 423 pb con los oligos, T7 (hacia adelante) que se une específicamente a la secuencia del plásmido, y Rv1(reversa) que se une a la secuencia del fragmento. Las colonias que permitieron la amplificación de dicho fragmento se propagaron en medio LB líquido (LB sin agar) con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C y agitación a 200 RPM (en pantalla, lab companion SI300R). Al día siguiente, las bacterias se concentraron por centrifugación a 2600 g por 15 min y los plásmidos se purificaron con un kit Gene Jet Plasmid Minipreps (Thermo Scientific) según metodología de fabricante. Finalmente, los plásmidos seleccionados se enviaron a secuenciar para confirmar la identidad del inserto.

c. Transferencia del fragmento *c-term-SmicHSP75* del plásmido pGEM®T-easy al plásmido de expresión pCRT7/NT

El fragmento específico de 345 pb, *c-term-SmicHSP75*, ligado en el plásmido pGEM®T-easy se extrajo mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo Scientific), según la metodología del proveedor. Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa y la banda con el tamaño esperado correspondiente al fragmento específico se extrajo del gel con el kit QIAquick Gel extraction (QUIAGEN) según metodología del proveedor. Después, el plásmido de expresión pCRT/NT-TOPO

autoligado, fue linealizado con la enzima EcoRI en el sitio de inserción, donde se ligó posteriormente el fragmento purificado con la enzima T4 ligasa (Promega), según metodología del fabricante. Después, el vector con el inserto clonado se usó para transformar bacterias de *E. coli* quimiocompetentes DH5 α , según metodología del proveedor. A continuación, las bacterias se inocularon en medio LB sólido con antibiótico (100 μ g/ml de ampicilina) para seleccionar a las bacterias transformadas debido a la resistencia que les confiere el plásmido pCRT7/NT a dicho antibiótico. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunas colonias pudieran resistir al antibiótico debido a la presencia del plásmido ligado a sí mismo, aún sin la presencia del fragmento específico. Por ello, se analizaron algunas colonias por PCR con la combinación de oligonucleótidos T7-Rv1, para determinar cual(es) colonias contienen el vector pCRT7/NT con el fragmento específico de 345 pb (*c-term-SmicHSP75-pCRT7/NT*). Posteriormente, se seleccionaron al menos cinco de las colonias que permitieron la amplificación del fragmento esperado y se propagaron en 10 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C y 200 RPM (en pantalla, lab companion SI300R) durante toda la noche. Después se purificaron sus plásmidos con un kit Gene Jet Plasmid Minipreps (Thermo Scientific) según metodología de fabricante. Finalmente, mediante la secuenciación de nucleótidos se confirmó el correcto ensamblaje del inserto en el plásmido seleccionado.

d. Ensayo de expresión de *c-term-SmicHSP75-pCRT/NT* en bacterias BL21-D3

La metodología de expresión empleada fue la descrita por el proveedor (pCR[®]T7 TOPO[®] TA Expression Kits, Version J). Bacterias de *E. coli* quimiocompetentes de la cepa BL21 D3 congeladas a -80°C se transformaron con 2 μ l del plásmido *c-term-SmicHSP75-pCRT7/NT* e incubaron durante 30 min en un baño con hielo, a continuación, la suspensión de bacterias se sometió a choques de calor (a 42°C durante 45 s) y de frío al regresarlas al baño de hielo por 2 min. Después del choque, se les agregaron 250 μ l de medio SOB, e incubaron a 37°C y agitación a 200 RPM (en pantalla, lab companion SI300R) durante 2 h. Después de resuspendidas, las bacterias se inocularon en medio LB líquido adicionado con antibióticos (100 μ g/ml ampicilina y 34 μ g/ml cloranfenicol) para seleccionar y propagar las bacterias que fueron transformadas a 37°C y 200 RPM (en pantalla, lab companion

SI300R) durante toda la noche. Como control negativo, se realizó de forma paralela la transformación de la misma cepa con el plásmido pCRT7/NT vacío; es decir, sin el inserto (*vacío*-pCRT7/NT). Después, a partir de cultivos de las bacterias transformadas con los vectores *c-term-SmicHSP75*-pCRT7/NT o *vacío*-pCRT7/NT, y vector crecidos toda la noche, se realizó la prueba piloto de expresión según la metodología del proveedor del kit (pCR[®]T7 TOPO[®] TA Expression Kits, Version J). Las proteínas de las bacterias transformadas, expresadas a las 1, 2 y 4 h de su crecimiento, se analizaron por western blot con los anticuerpos anti-hexahistidina. Dichos anticuerpos detectan específicamente el epítipo de seis histidinas que debe estar presente en la secuencia del producto expresado.

e. Ensayo en columna de níquel para purificación de *c-term-SmicHSP75*-His

Un cultivo de 200 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol, se inoculó con bacterias BL21-D3 que fueron transformadas con el vector *c-term-SmicHSP75*-pCRT7/NT y propagadas previamente en 10 ml de medio LB líquido (más antibióticos) durante la noche anterior. El cultivo de bacterias se incubó a 37°C durante 4 h y agitación constante a 200 RPM (en pantalla, lab companion SI300R). Posteriormente, las bacterias se precipitaron mediante centrifugación a 2600 g por 8 min. Las bacterias se suspendieron en 20 ml de buffer de pegado (0.1 M fosfato de sodio, 0.4 M NaCl, 0.1 M KCl, 30 mM imidazol, 6 M urea, 0.5 % TX-100, pH 7.4 y filtrado en un cartucho de membrana de 0.22 µm), y se lisaron con una presión mecánica de 20000 psi al pasar la suspensión tres veces a través de una prensa French (SLM-AMINCO French[®] pressure cell press). El lisado celular se centrifugó a 20000 g por 20 min en frío y después el sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 µm para limpiar la muestra y evitar obstrucción de la columna durante la purificación del péptido. Posteriormente, la muestra se pasó por una columna empacada con 1.5 ml de matriz de agarosa cargada con níquel (HIS-Selecc[®] Nickel Affinity Gel, Sigma), previamente equilibrada con el buffer de pegado, a una velocidad de flujo de entre 10 a 15 ml/h. Después del pegado, la columna se lavó con al menos 100 ml de buffer de pegado y a la misma velocidad de flujo que cuando se pasó la muestra; finalmente, la proteína unida a la columna se eluyó con 10 ml de buffer de elución (buffer de pegado ajustado a 200 mM imidazol). Se tomaron alícuotas de proteínas del

sobrenadante (antes), después, lavado y eluido de la columna para analizar en un gel de 16 % de poliacrilamida SDS-PAGE.

f. Obtención de una fracción de proteínas de la mucosa del duodeno de bovino que contiene la enteroquinasa

Se adquirieron aproximadamente dos metros de la sección del duodeno del intestino delgado de un bovino recién muerto en el rastro de Cancún, Quintana Roo. El intestino se ciñó por los extremos con cuerdas para conservar el contenido a temperatura ambiente y fue transportado al laboratorio para su procesamiento posterior. Al intestino se le agregaron en su interior 100 ml de buffer A (20 mM acetato de sodio, 20 mM ácido acético, 100 mM CaCl_2 , 0.2 % (v/v) TX-100, pH 4) para solubilizar y drenar el contenido en un vaso de precipitado. Después, el intestino se cortó longitudinalmente y se extendió para exponer la pared interna. La mucosa de la pared se recuperó en el mismo vaso de precipitado, mediante un raspado suave con el dedo cubierto con guante y goteo simultáneo con buffer A. De aquí en adelante los siguientes pasos se realizaron en a 4°C. A continuación, el material del intestino colectado en el vaso de precipitado se aforó con buffer A hasta 200 ml y se agitó por 2 h para homogenizar el material. El homogenado se filtró primero con una malla de cielo y después a través de una malla de 300 μm para descartar el material particulado y tejido adiposo flotante. El filtrado se centrifugó a 20000 g por 30 min para clarificar la muestra. Después, el sobrenadante se ajustó a pH 8 con 1 M NaOH y entonces, se realizó una precipitación diferencial con sulfato de amonio como sigue: primero, se agregó sulfato de amonio hasta una concentración de 40 %, se incubó en agitación por al menos 6 h, se centrifugó a 14000 g por 1 h y se descartó el precipitado; después, al sobrenadante se le adicionó más sulfato de amonio hasta una concentración de 80 % y se aplicó el procedimiento anterior, pero en este caso, para coleccionar las proteínas del precipitado. A continuación, las proteínas precipitadas se suspendieron en 1ml de PBS y se dializaron en PBS para descartar los cristales de sulfato de amonio también precipitados. Después, las proteínas de la fracción dializada se separaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sefacril S-300-HR como en el caso de proteínas de *S. KB8* (ver mas adelante). Las fracciones de la 54 a la 58, que fueron colectadas de la columna y que contienen proteínas correspondientes a pesos moleculares cercanos al de la

enteroquinasa de 145 kDa, se mezclaron y analizaron en un gel de 7 % de poliacrilamida SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol). Este combinado de proteínas se cuantificó y se llevó hasta una concentración de 0.1 mg/ml, para ser usada como la fracción activa de la enzima enteroquinasa.

g. Ensayo de cinética de digestión de c-term-SmicHSP75-His para la remoción de la secuencia de hexahistidina

La secuencia de hexahistidina presente en el péptido recombinante c-term-SmicHSP75-His es altamente inmunogénica, lo que podría desfavorecer la inmunogenicidad del resto de la secuencia del péptido si se quieren desarrollar anticuerpos en algún animal. Por ello, se procedió a eliminarla específicamente por digestión con la enzima enteroquinasa en el sitio de cuatro ácidos aspárticos codificados en la secuencia del plásmido pCRT7/NT. Con la fracción de proteínas de la mucosa del duodeno de bovino que presuntamente contiene enriquecida a la enzima enteroquinasa enriquecida (ver en sección M, inciso f), se procedió a digerir el péptido recombinante. Se realizó una cinética de digestión como sigue: 1) se mezclaron 10 μ l de buffer 1 M Tris-HCl pH 6.8, con 5 μ l de enzima (la fracción de proteínas que debe contener a la enteroquinasa, a una concentración de 0.1 mg/ml en PBS), y 85 μ l del sustrato (fragmento específico c-term-SmicHSP75-His a una concentración de 0.459 mg/ml); 2) se incubó la mezcla en oscuridad a 26°C y se tomaron alícuotas de 15 μ l a los tiempos de 6, 12, 24 y 32 h, se les adicionaron 5 μ l de buffer de Laemmli 4X (sin β -mercaptoetanol) y se calentaron a 95°C por 5 min. Las alícuotas de la cinética de digestión y una alícuota de antes de la digestión, se analizaron en un gel no reductor de 16 % de acrilamida. Finalmente, las proteínas del gel se tiñeron con azul de coomassie para identificar la banda correspondiente al fragmento carboxilo terminal de SmicHSP75 libre de la secuencia de hexahistidina, c-term-SmicHSP75, producto de la digestión.

h. Purificación del péptido c-term-SmicHSP75

El fragmento proteico c-term-SmicHSP75 libre de la secuencia de histidinas se purificó después de una digestión por 48 h con la fracción que contiene la enteroquinasa, en las mismas proporciones descritas antes. A tres volúmenes de la mezcla de los productos de

digestión de 48 h se les añadió un volumen de buffer de Laemmli 4X, se calentó a 95 °C, y los productos proteicos se separaron en un gel preparativo de 16 % de poliacrilamida SDS-PAGE con espesor de 1.5 mm. Después, se cortaron dos tiras verticales del gel en ambos extremos de 5 mm de espesor, y se tiñeron con azul de coomassie para identificar la banda correspondiente al fragmento c-term-SmicHSP75. Usando ambas tiras como referencia, se identificó el área de la banda de c-term-SmicHSP75 en el resto del gel que no se tiñó y se cortó. A continuación, el gel del área cortada se maceró en nitrógeno líquido y se suspendió en 2 ml de PBS. Después, para liberar a c-term-SmicHSP75 del gel, el macerado se dializó a través de una membrana de corte de 3.5 kDa (Spectra/Por®) en PBS a 4°C y agitación constante durante toda la noche. El dializado se trasladó a un tubo Falcon de 15 ml, se centrifugó a 2600 g a 4°C y se recuperó el sobrenadante con el fragmento del péptido c-term-SmicHSP75. Finalmente, una alícuota del sobrenadante se desnaturalizó en buffer de Laemmli 4X y se analizó tanto en un gel de 16 % de poliacrilamida SDS-PAGE como por western blot con anticuerpos anti-hexahistidina; en este último se usó como control positivo a c-term-SmicHSP75-His antes de la digestión.

i. Inmunizaciones con el péptido c-term-SmicHSP75 a un conejo, y colectas y evaluación de los sueros obtenidos

A la muestra se le adicionó el adyuvante de Freund apropiado (completo o incompleto) en una relación 1:1, y se mezclaron vigorosamente para formar una emulsión estable la cual para cada fecha de inmunización fue inyectada debajo de la piel (subcutánea) de un conejo en 3 sitios, una en el área entre los hombros y otras dos en cada lado de las piernas traseras.

Las muestras de sangre se colectaron de la arteria central de la oreja con una aguja de calibre 19; la sangre se incubó por media hora a temperatura ambiente. Después, el suero de la sangre coagulada se recuperó y clarificó por centrifugación a 2600 g por 20 min; el sobrenadante se dividió en alícuotas de 100 µl y éstas se almacenaron a -80°C.

Calendario de inmunizaciones, y colectas de sangre:

En el día cero, se colectaron 2 ml de sangre del conejo antes de empezar el programa de inmunización (1a colecta = preinmune), y después se inició la inmunización con 150 µg del péptido c-term-SmicHSP75 (1a dosis), dividido en tres inyecciones de 50 µg

aproximadamente. Solamente en esta primera inmunización se usó el adyuvante completo de Freund.

En el día 5, se realizó la 2a colecta de 2 ml de sangre y se aplicó la 2a dosis con 210 µg de péptido dividida en tres inyecciones. En este caso se usó el adyuvante incompleto de Freund.

En el día 31, se realizó la 3a colecta de 2 ml de sangre de conejo, y se aplicó la 3a dosis con 258 µg de péptido dividida en tres inyecciones. Para esta se usó el adyuvante incompleto de Freund.

En el día 38, solo se realizó la 4a colecta de sangre del conejo.

Con los sueros obtenidos de las muestras de sangre se evaluó la especificidad de los anticuerpos para detectar a SmicHSP75 en extractos de proteínas totales de *S. KB8* por western blot. Para ello se utilizaron diluciones de 1/1000 de suero en PBS-T.

j. Purificación de inmunoglobulinas G del suero de conejo por afinidad en una columna de proteína G acoplada a sefarosa

Un ml de suero de conejo se diluyó con 9 ml de PB, y después se pasó a través de 1 ml de matriz de sefarosa-proteína G (sigma) empacada en una columna Poly-Prep® (BioRad) y equilibrada con PB. A continuación, la matriz se lavó con 10 volúmenes de PB, y los anticuerpos se eluyeron de la columna con 1 ml de 10 mM glicina-HCl, pH 3. Inmediatamente después, el eluido se neutralizó con 100 µl de 1 M Tris-HCl, pH 6.8. Después, se agregó azida de sodio hasta una concentración de 0.05 % (p/v) para preservar los anticuerpos a 4°C sin riesgo de crecimiento de microorganismos. Finalmente, se determinó que la dilución de 1/3000 fue la adecuada para detección de su antígeno en análisis por western blot. A estos anticuerpos los denominamos anti-1017 (ver en resultados).

N. Tratamientos con los inhibidores de síntesis de proteínas

Cultivos celulares de 100 ml de *S. KB8* de 6 d de crecimiento fueron tratados con inhibidores de síntesis de proteínas después de 3 h de iniciada su fase diurna con: 1mM cloranfenicol o 1 mM cicloheximida, por 0.5, 1, 4, y 7 h. Paralelamente, como control negativo las células también fueron tratadas con etanol, que fue el solvente con el que se

disolvieron ambos fármacos. Después de cada tiempo de incubación, se realizó una extracción de proteínas como sigue: las células de 15 ml de cultivo se concentraron por centrifugación a 2600 g por 1 min a 26 °C, se suspendieron en 300 µl de buffer de Laemmli y se lisaron con perlas de vidrio mediante agitación en un miniBead-Beater a 4500 rpm por 3 min. Después, el homogenado celular se calentó a 95 °C por 5 min, y se centrifugó 10 min a 12000 g; se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron en geles de SDS-PAGE, y por western blot con: anticuerpos anti-pThr (Cell Signaling Technology[®], Inc; Danvers, MA), anticuerpos anti-1017, o anticuerpos anti-PsbA.

VIII. RESULTADOS

A. SmicHSP75 es una proteína de la familia HSP70 y presenta al menos dos isoformas fosforiladas en *S. KB8*

El primer objetivo del presente trabajo fue confirmar que SmicHSP75 pertenece a la superfamilia de las HSP. Para ello, una fracción de proteínas que contienen a SmicHSP75 enriquecida (Castillo-Medina 2013), se separaron en geles de doble dimensión (2D). Los anticuerpos anti-pThr inmunodetectaron a dos proteínas de 75 kDa con puntos isoeléctricos de 5.4 y 5.6 (Fig. 3A, puntos 1 y 2, respectivamente). Esto indicó que SmicHSP75 está compuesta de al menos dos proteínas en un gel 2D, lo que sugiere dos posibilidades: a) que dichos pI's representan dos isoformas de una misma proteína de 75 kDa fosforiladas diferencialmente en treonina; o b) que son dos proteínas de 75 kDa diferentes y ambas están fosforiladas en dicho aminoácido. Los dos puntos correspondientes a las proteínas detectadas por los anticuerpos también se localizaron en otro gel 2D teñido con azul de coomassie (Fig. 3B, puntos 1 y 2). Ambos puntos de proteínas localizados en el gel fueron los mismos detectados por western blot con los anticuerpos anti-pThr. Dichos anticuerpos efectivamente solo detectaron a las proteínas de los puntos 1 y 2 (Fig. 3C, carriles 1 y 2, respectivamente), pero no reaccionaron con la proteína usada como control negativo (Fig. 3C, carril 3). Ambos puntos se extrajeron por separado a partir de cinco geles y se enviaron al servicio de secuenciación parcial de aminoácidos por espectrometría de masas a la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, Morelos, México.

Del análisis por espectrometría de masas se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de diez péptidos de la proteína del punto 1 y seis de la del punto 2. Mediante una búsqueda con dichas secuencias peptídicas en una base de datos de nucleótidos del NCBI traducidas a proteínas mediante un análisis por BLAST, se encontró que las secuencias de las proteínas tipo BiP (*Binding Protein*) de *Oryza sativa* y *Cryptocodinium cohnii* (No's. de acceso Q8S4R0 y Q6Z7B0, respectivamente) alinearon con una identidad de 71 % con las diez secuencias obtenidas del punto 1, y de 80.5 % con las otras seis secuencias del punto 2. Por otro lado, se observó también que las secuencias que son comunes entre ambos

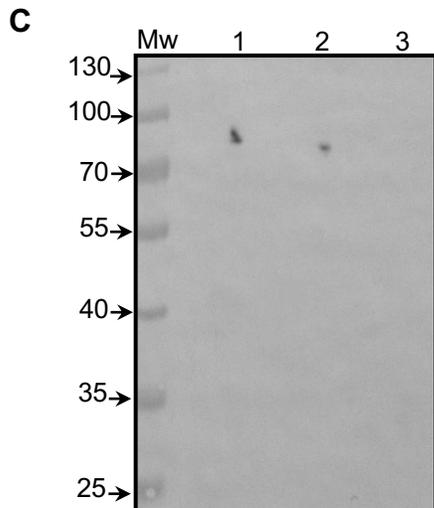
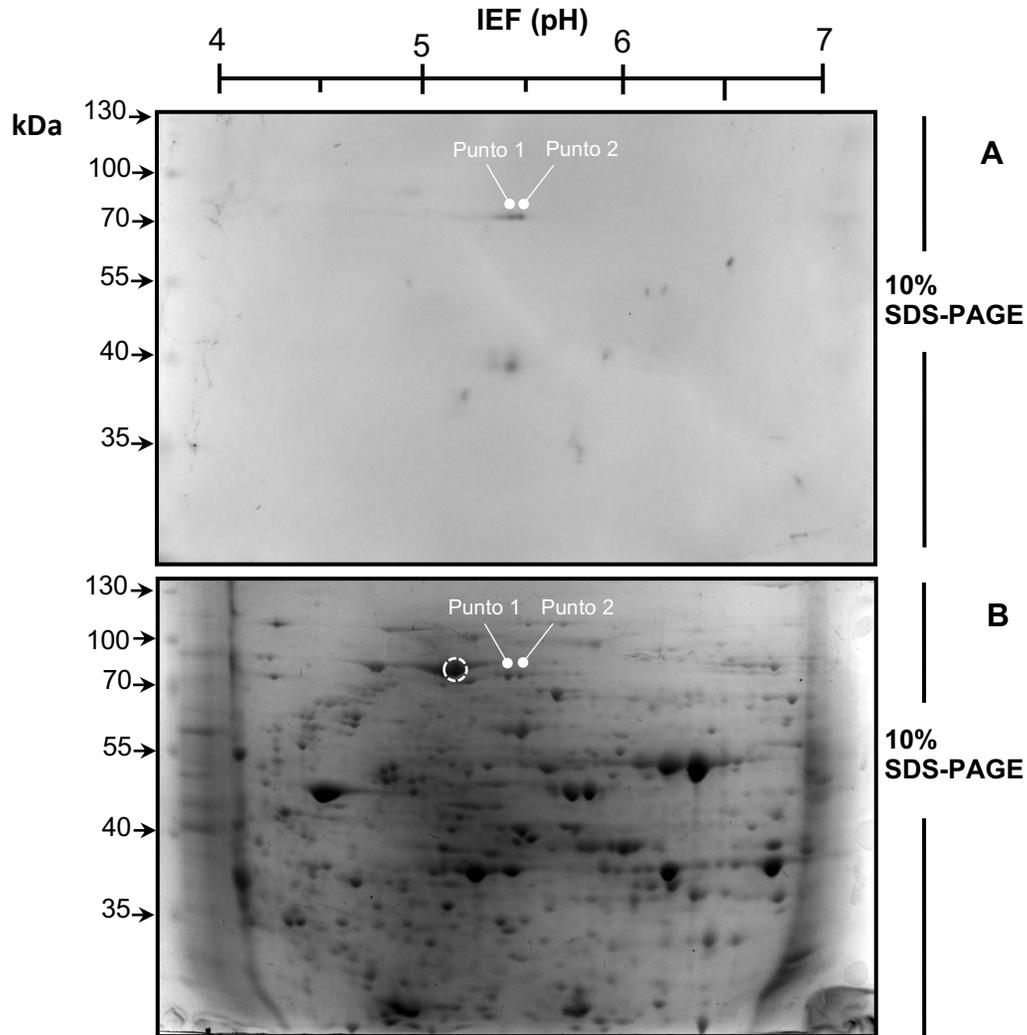


Figura 3. Ubicación y aislamiento de pp75 de *S. KB8* en gels de doble dimensión IEF + SDS-PAGE (2D) para secuenciación. Separación en gel de doble dimensión (B) y su análisis por western blot con anticuerpos anti-pThr (A), del sobrenadante de un microsonal de proteínas solubles en PBS-T, eluidas de una columna de DEAE-Sefacel. En ambos paneles las flechas de la izquierda indican los marcadores de pesos moleculares en kDa, las barras en la parte superior acotan la distancia de separación de proteínas por isoelectroenfoque (1a dimensión), y las barras del lado derecho la distancia de separación por pesos moleculares (2a dimensión). También se indican los puntos 1 y 2 de las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-pThr.

En C, western blot con anticuerpos anti-pThr de las proteínas de los puntos 1 y 2, y un punto mayoritario como posible control negativo, extraídos del gel de B. Los carriles son: Mw, marcadores de peso molecular; 1, proteína del punto 1; 2, proteína del punto 2; y 3, proteína acotada con un círculo en B como control negativo.

puntos alinearon con un 100 % de identidad (Fig. 4). Estas observaciones en conjunto indicaron que las proteínas de los puntos 1 y 2 comparten la misma identidad de una proteína tipo BiP de la familia HSP70 de retículo endoplásmico (RE; Munro y Pelham 1987); y sugirieron que ambas representan dos isoformas de una misma proteína fosforiladas diferencialmente en treonina. En resumen, los resultados obtenidos hasta aquí nos indicaron que SmicHSP75: a) es una proteína tipo BiP que pertenece a la familia HSP70; y b) presenta al menos dos isoformas, probablemente con arreglo(s) de fosforilacione(s) diferente(s) en *S. KB8*.

Adicionalmente, las secuencias de los mismos péptidos de ambas proteínas alinearon exactamente (100 % de identidad) con la secuencia de una proteína anotada como BiP-5 (*Luminal Binding Protein-5*, No de acceso OLP91134) en la base de datos transcriptómica ensamblada de *Symbiodinium microadriaticum* (Aranda et al. 2016), lo que indicó que esta secuencia debe ser la correspondiente a SmicHSP75. De manera inesperada, el peso molecular de esta proteína anotada fue de 250 kDa el cual es mucho mayor que el de SmicHSP75. Sin embargo, un análisis comparativo entre dicha secuencia transcriptómica ensamblada y la genómica correspondiente, permitió encontrar un codón de término omitido y otro codón de inicio en la secuencia transcriptómica que ajustaron mejor al peso molecular de 75 kDa, que ahora sí fue consistente con el de SmicHSP75. En la Fig. 4 se muestra la secuencia acotada de la presunta BiP-5 de *S. microadriaticum*. También se indican los residuos de treonina conservados más probables de sufrir fosforilación determinados con el programa NetPhosK (Blom et al. 2004), así como el sitio T502 fosforilable de BiP de *Chlamydomonas reinhardtii* reportado como involucrado en la síntesis de proteínas (Díaz-Troya et al. 2011).

B. El análisis por exclusión molecular sugiere que SmicHSP75 bajo condiciones de luz interacciona con otra(s) proteína(s)

El siguiente objetivo fue el determinar experimentalmente si SmicHSP75 es capaz de formar complejos con otras proteínas, para lo cual se llevó a cabo un análisis por cromatografía de exclusión molecular partiendo de las proteínas en su estado nativo. A partir de la calibración de la columna se determinaron los picos de elución de cada uno de los marcadores de pesos molecular mediante las lecturas de absorbancia a 280 nm

```

O. sativa MDRVRGCAFLLGVLLAGSLFAFVSAKEETKKL-GTVIGIDLGTTCVGVYKNG
C. cohnii GTSVDVLSFGKLSAWDTAPLFAMARLHWAGIFVLALACVAVAKDDEKKIDGPGVIGIDLGTTCVGVYKNG
S. mic MVISHGSRLPVSQRRTHGHEASCQGVCCSQTWHSVRCAQACKAFLVEAEPRVTMWKVAFVTVFALASFAAAKEDDKKIDGPGVIG----TTCVGVYKNG

O. sativa HVEI IANDQGNRITPSVVAFTDSERLIGEAANKQA AVNPERTIFDVKRLIGRKFEDKEVQRDMKLVYKIVNKGDKPYIQVKIKDGENKVFSPPEEVSAMI
C. cohnii RVEI IIPNDQGNRITPSVVAFTEDERLIGEAANKQATINPAQTLEFDVKRLIGRRFKDSTVQKDIKLLPFDIVDNGKPKQISVKVK-GETKQMAPEEVSAMV
S. mic RVEI IIPNDQGNRITPSVVAFTDDERLIGEAANKQATINPTQLFDVKRLIGRRFKDSTVQKDIKLLPYKIVDKSTKPMIAVKVK-GEEKVMAPEEVSAMV
Punto 1 VEI IIPNDQGNRITPSVVAFTDDE NQATINPTQLFDVK VMAPEEVSAMV
Punto 2 VEI IIPNDQGNRITPSVVAFTDDE NQATINPTQLFDVK VMAPEEVSAMV

O. Sativa LGKMKETA EAYLGKINDAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLNVARIINEPTAAAIAYGLDKKGGEKNILVFDLGGGTFDVSILTIIDNGVFEVLATNG
C. cohnii LTKMKETA ENYLGKEVKHAVITVPAYFNDAQRSSTKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKA-EKNILVFDLGGGTFDVSLLTIIDNGVFEVATNG
S. mic LTKMKETA ENYLGKEVKHAVITVPAYFNDAQRSSTKDAGTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKT-EKNILVFDLGGGTFDVSLLTIIDNGVFEVATNG
Punto 1 LTK HAVVTVPAYFNDAQR DAGTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDK
Punto 2 LTK DAGTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDK

O. sativa DTHLGGEDFDQRIMEYFIKLIKIKKYSKDISKDNRALGKLRREAEAKRALSNQHQRVVEIESLFDGTFDFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAMDDA
C. cohnii DTHLGGEDFDQRVMQHFMKVQKHKMSKDKRAIQKLRREVEKAKRALSSHQARLEIEALFDCVDFSETLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKQVIEDS
S. mic DTHLGGEDFDQRVMQHFMKIFEKHKGKMSKDKRSIQKLRREVEKAKRALSSHQARLEIEALYDGTDFSETLTRARFEELKADLFKNTLGPVKQVLDSS
Punto 1 LEIEALYDGTDFSETLTR
Punto 2 LEIEALYDGTDFSETLTR

O. sativa GLEKSQIHEIVLVGGSTRIPKVQQLLRDYFEGKEPNKGVNPEAVAYGAAVQGSILSGEGGDETKDILLDVAPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVIPTKK
C. cohnii GLKKTQIDEIVLVGGSTRIPKVQQLIKDFNFKGEPNRRINPDEAVAYGAAVQAGILSGEGGQ---DLLLLDVTPLTLGIETVGGVMTKLI NRNTVIPTKK
S. mic GLKKNQVDEIVLVGGSTRIPKVQQLIKDFNFKGEPNRRINPDEAVAYGAAVQ-----DVTPLTLGIETVGGVMTKLI SRNTVIPTKK
Punto 1 NQVDEIVLVGGSTR
Punto 2 NQVDEIVLVGGSTR

O. sativa SQVFSTYQDQQT VVS IQVFEGERSMTKDCRLLGKFDLSGIPAAPRCTPQIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGKSEKIIITNKGRLSQEEIDRMVREAE
C. cohnii SQTFSTYQDNQ PAVNIQVFEGERPMTKDNHLLGKFLGGIPAPRQGPQIEVTFEIDSNGLNVGAEDKATGKGEKIIITNKGRLTEEQIEKMIKEAEQ
S. mic SQIFSTYQDNQ PAVNIQVFEGERPMTKDNHLLGKFLGGIPAPRQGPQIEVTFEIDSNGLNVGAEDKGTGKSEKIIITNKGRLTEEQIEKMIKEAE
Punto 1 SQIFSTYQDNQ PAVNIQVFEGERPMTK

O. sativa FAEDDKVKKERIDARNQLETYVYNMKNV---GDKDKLADKLESEKEKVEEALKKEALEWLDENQTAEKEEYEKLEKEVEAVCNPIISAVYQRTGGAPGG
C. cohnii FAEDDKVKKERVDAKNSFDGYIHSMSRATEGSGDNKGLSEKMDDEKEKILEALKDQGSWLDNSNPEGDAEDIKHKHKEVEGICAPIVSK-YYGVGG-GGA
S. mic FAEDDKVKKERVDAKNAFDGYIHSMSRATEGSGDNKGLSEKMDDEKEKILDALKDQGSWLDNSNPEADAEEIKEKHKEVEGICAPIVSK-YYGGGAGGA
Punto 1 NAFDGYIHSMR DGQSWLDNSNPEADAEEIKEKHKEVEGICAPIVSK

O. sativa GADGEGGVDD EDEL
C. cohnii GAADDE-DEA EDEL
S. mic GGADDE-EEA EDEL

```

Figura 4. SmicHSP75 es homólogo a una proteína tipo BiP perteneciente a la familia HSP70. Alineamiento múltiple de las secuencias parciales de los péptidos obtenidos de ambos puntos con las secuencias HSP70 / BiP de *Oryza sativa* (No de acceso Q6Z7B0) y *Cryptocodium cohnii* (No de acceso Q8S4R0), y la secuencia de BiP-5 de *Symbiodinium microadriaticum* (No de acceso OLP91134) que contine el codón de terminación originalmente omitido, y otro de inicio que concuerda con el peso esperado de SmicHSP75. La figura está resaltada, en gris, con el motivo de retención en el retículo endoplásmico (Munro y Pelham, 1987) característico de la BiP, en verde los sitios más probables de fosforilación en la treonina predichos por el servidor de NetPhosK (Blom et al. 2004); además, el asterisco indica el sitio fosforilable presuntamente implicado en la síntesis de proteínas en *C. reinhardtii* (Diaz-Troya et al. 2011).

(Fig. 5A). Esto nos permitió calcular los volúmenes y coeficientes de elución (V_e y K_{av} , respectivamente) de cada marcador y el volumen vacío (V_0) de la matriz que fue de 31.6 ml. Éstos a su vez nos permitieron graficar y determinar la curva de calibración de la columna, cuya ecuación fue $Y = -3.78X + 3.25$ (Fig. 5B), en donde el eje de las X representa el K_{av} , y el de las Y el logaritmo base diez del peso molecular.

Posteriormente, extractos de proteínas nativas de *S. KB8*, ya sea en condiciones de 12 h de oscuridad, o con estímulo de 30 min de luz, se analizaron en la columna con los mismos parámetros de separación que fueron usados para los marcadores de peso molecular. Se observó que el pico de elución de la proteína SmicHSP75 se encontró en la

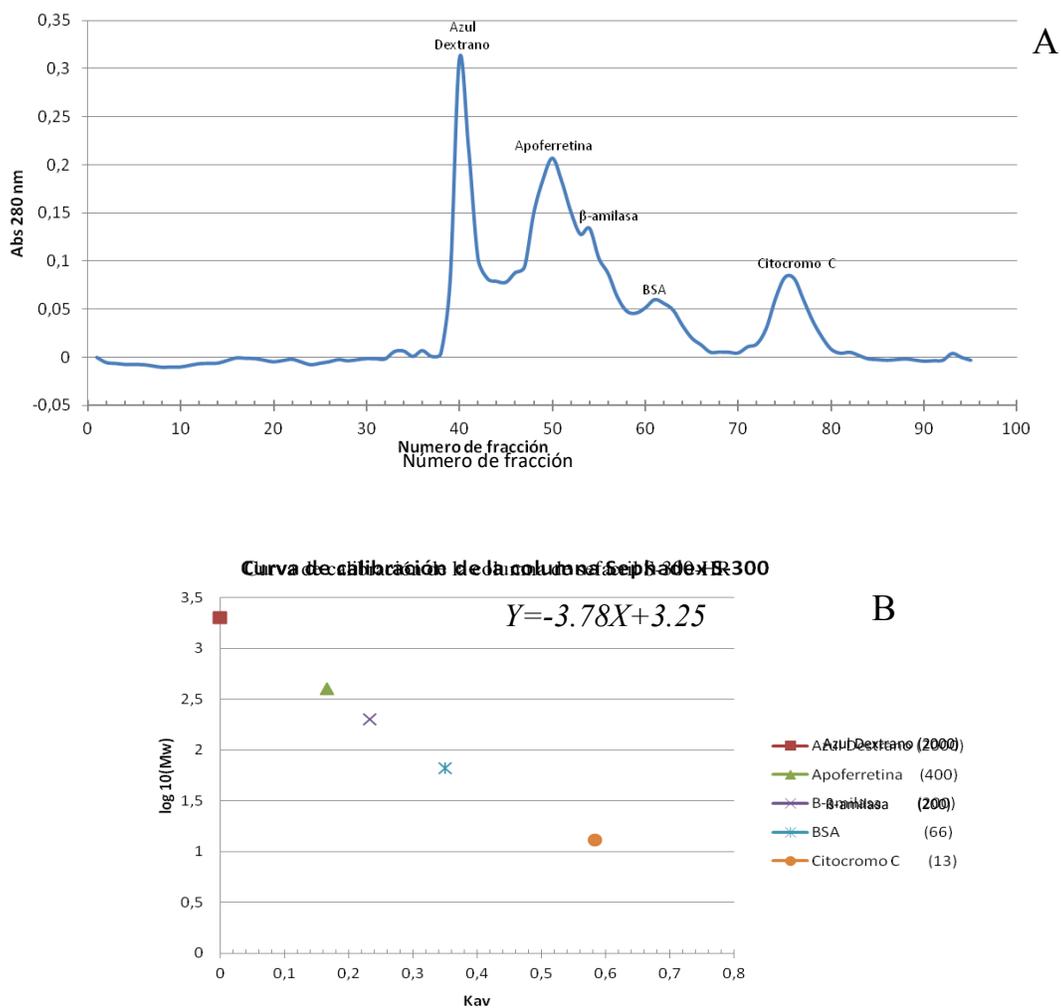


Figura 5. Curva de calibración de la columna de sefacril S-300-HR. Gráfico de los picos de elución de molecular, y Kav es el coeficiente de elución.

fracción 62 en la condición de oscuridad (Fig. 6A) que equivale a un V_e de 49 ml, y un K_{av} de 0.3667. Al sustituir el valor de K_{va} en la ecuación de la curva de calibración, y al resultado aplicarle el antilogaritmo, se determinó una M_r de ~ 73 kDa, la cual concuerda con la masa molecular de SmicHSP75 observada en un gel de SDS-PAGE. Este resultado sugirió que cuando la proteína SmicHSP75 se encuentra en un nivel de alta fosforilación, no forma complejos con otras proteínas ni conformaciones oligoméricas con ella misma.

Por otro lado, a pesar de que en la condición de 30 min de luz el nivel de fosforilación de SmicHSP75 disminuye considerablemente, fue posible observar que el pico de elución de la columna se encontró en la fracción 60 (Fig. 6B). En este caso, el valor calculado de V_e fue de 47.4 ml, y el de K_{va} fue 0.333 con lo que se determinó una M_r de ~ 97.7 kDa. Este último valor es 24.7 kDa mayor que el de 73 kDa calculado para SmicHSP75 en este mismo análisis, lo que sugiere que otra proteína de $M_r \sim 25$ kDa pudiera estar interaccionando con SmicHSP75 al menos en las condiciones de 30 min luz.

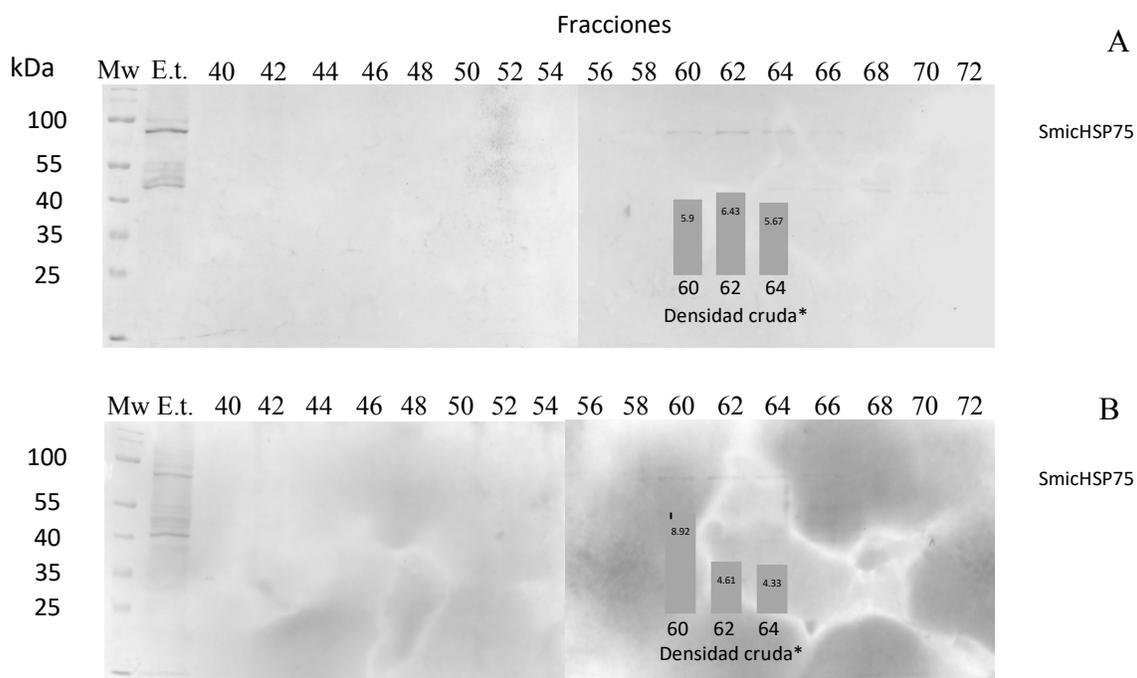


Figura 6. Western blot con anti-pThr de las fracciones eluidas de la columna de sefacril S-300-HR y

correspondientes a las fracciones 60, 62 y 64.

C. La respuesta de desfosforilación de SmicHSP75 es sensible a bajas intensidades de luz

Para determinar si la respuesta de desfosforilación sobre SmicHSP75 está en función de la intensidad lumínica, las células de *S. KB8* se estimularon durante 30 min a intensidades de 1, 10, 40 y 250 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$. Una disminución estadísticamente significativa se observó en el nivel de fosforilación de SmicHSP75 en todas las intensidades de luz ensayadas (Fig. 7B, barras, todas las intensidades de luz) en comparación a la condición de oscuridad (Fig. 7B, barra, 12 h Osc). En la figura 7A se muestra el western blot representativo de una de las tres réplicas obtenidas. Es destacable que la respuesta de desfosforilación de SmicHSP75 fue tan sensible que ocurrió inclusive a la intensidad más baja probada de 1 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$ (Fig. 7A y B, carril 1 y barra 1 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$, respectivamente). Por otro lado, también se observó una tendencia de respuesta dosis-dependiente entre las intensidades de luz a 1, 10 y 40 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellas (Fig. 7B, barras: 1, 10 y 40 de intensidad de luz). Un análisis estadístico con mayor número de réplicas podría confirmar este hecho.

D. La desfosforilación de SmicHSP75 ocurre bajo todos los espectros de luz ensayados

Estudiar si la desfosforilación de SmicHSP75 está en función de algún espectro de luz en particular nos daría pistas importantes para conocer la cascada de señalización en la que pudiera estar participando. Para este ensayo se utilizaron lámparas que cubrieron el espectro siguiente: azul entre 450-490 nm, amarillo entre 450-750 nm, rojo entre 610-750 nm y blanco entre 410-750 nm. Estos valores cubren la mayor parte del espectro de luz visible (Fig. 8A). Después, células de *S. KB8* adaptadas a 12 h de oscuridad, se estimularon durante 30 min con la luz de dichas lámparas a una intensidad lumínica aproximada de 100 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$. Como en el caso del estudio de las intensidades lumínicas, los resultados densitométricos de las bandas (como las de la Fig. 8B) de tres ensayos independientes se normalizaron con la banda inmunodetectada de actina, se sometieron a un análisis estadístico ANOVA y se graficaron (Fig. 8C). Interesantemente, se observó que el nivel de fosforilación de SmicHSP75 en todos los espectros de luz analizados disminuyó

significativamente (Fig. 8C, barras; azul, amarilla, roja y blanca), en comparación al nivel observado bajo condiciones de oscuridad (Fig. 8C, barra, 12 h Osc). Esto indicó que todos los tipos de luz analizados produjeron la respuesta de desfosforilación de SmicHSP75, y sugiere que dicha respuesta no es particular a algún tipo de espectro particular de luz. Las luces que provocaron mayor y menor efecto significativo en el nivel de desfosforilación fueron la amarilla y la roja, respectivamente (Fig. 8C, barras, amarilla y roja, respectivamente).

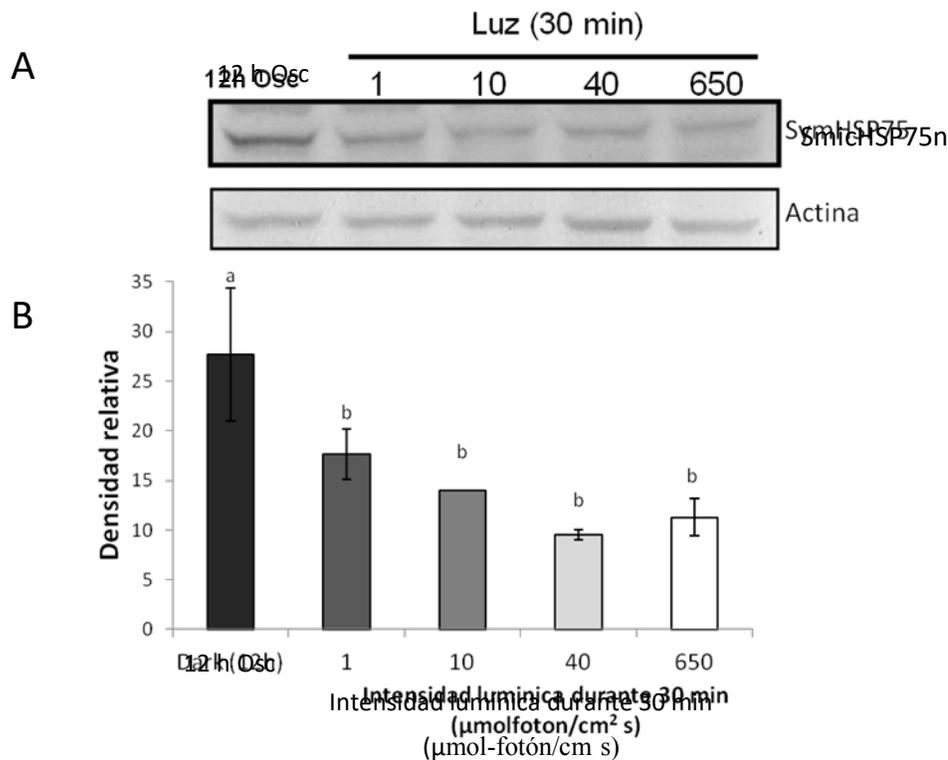


Figura 7. Efecto de la intensidad luminosa en el comportamiento de fosforilación sobre SmicHSP75. En Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

E. La temperatura también promueve cambios en la fosforilación de SmicHSP75

Así como la luz, la temperatura también afecta de forma importante la fisiología de *Symbiodinium* y por ello nos planteamos estudiar si la temperatura afecta la fosforilación de

SmicHSP75 particularmente en la respuesta de desfosforilación debida a la luz. Se analizaron los niveles de fosforilación de SmicHSP75 (Fig. 9A, SmicHSP75) de células de *S. KB8* incubadas a 21, 26 (control) o 32°C por 12 h en condiciones de oscuridad, y después de someterlas a estímulos de luz por 30 min para cada temperatura. Para el caso de la temperatura control de 26°C el resultado fue similar al de los controles de los ensayos de intensidades y tipos de luz. Se observó que el nivel de fosforilación de SmicHSP75 en oscuridad (Fig. 9B, barra, 26°C y 12 h Osc), disminuyó significativamente con el estímulo de 30 min de luz (Fig. 9B, barra, 30 min de luz). Esto indicó que dicha respuesta de desfosforilación en las condiciones control es reproducible. De forma interesante, se observó que el nivel de fosforilación de SmicHSP75 a 21°C en oscuridad (Fig. 9B, barra, 21°C y 12 h Osc), también disminuyó significativamente con el estímulo de 30 min de luz (Fig. 9B, barra, 21°C y 30 min de luz), aunque a diferencia de la temperatura control, la respuesta fue menos pronunciada (Fig. 9B, barra 26°C y 30 min de luz). Esto indicó que la respuesta de desfosforilación de SmicHSP75 inducida por la luz, sí fue afectada por la temperatura.

Por otro lado, se observó que en condiciones de al menos 12 h de oscuridad, tanto a la temperatura control de 26°C como con una disminución de hasta 21°C por 12 h, SmicHSP75 manifestó en un nivel de fosforilación elevado (Fig. 9B, barras, 26°C y 12 h Osc, y 21°C y 12 h Osc, respectivamente). Sin embargo, el incremento en la temperatura de hasta 32°C por 12 h en oscuridad, provocó una disminución importante en el nivel de fosforilación de SmicHSP75 (Fig. 9B, barra, 32°C y 12 h Osc), inclusive más pronunciada que la inducida por la luz en condiciones control (Fig. 9B, barra, 26°C y 30 min de luz). Por otra parte, contrario a lo esperado, el estímulo posterior de 30 min de luz a 32°C, incrementó significativamente el nivel de fosforilación de SmicHSP75 (Fig. 9B, barra, 32°C y 30 min de luz). Estos resultados indicaron que la exposición a la temperatura de 32°C por 12 h de oscuridad indujo, por un lado una desfosforilación de SmicHSP75 en condiciones de oscuridad, pero por el otro, el estímulo de 30 min de luz a esa misma temperatura indujo un incremento en dicha fosforilación que fue estadísticamente significativo (Fig. 9B, barras de error en rangos diferentes) en la fosforilación.

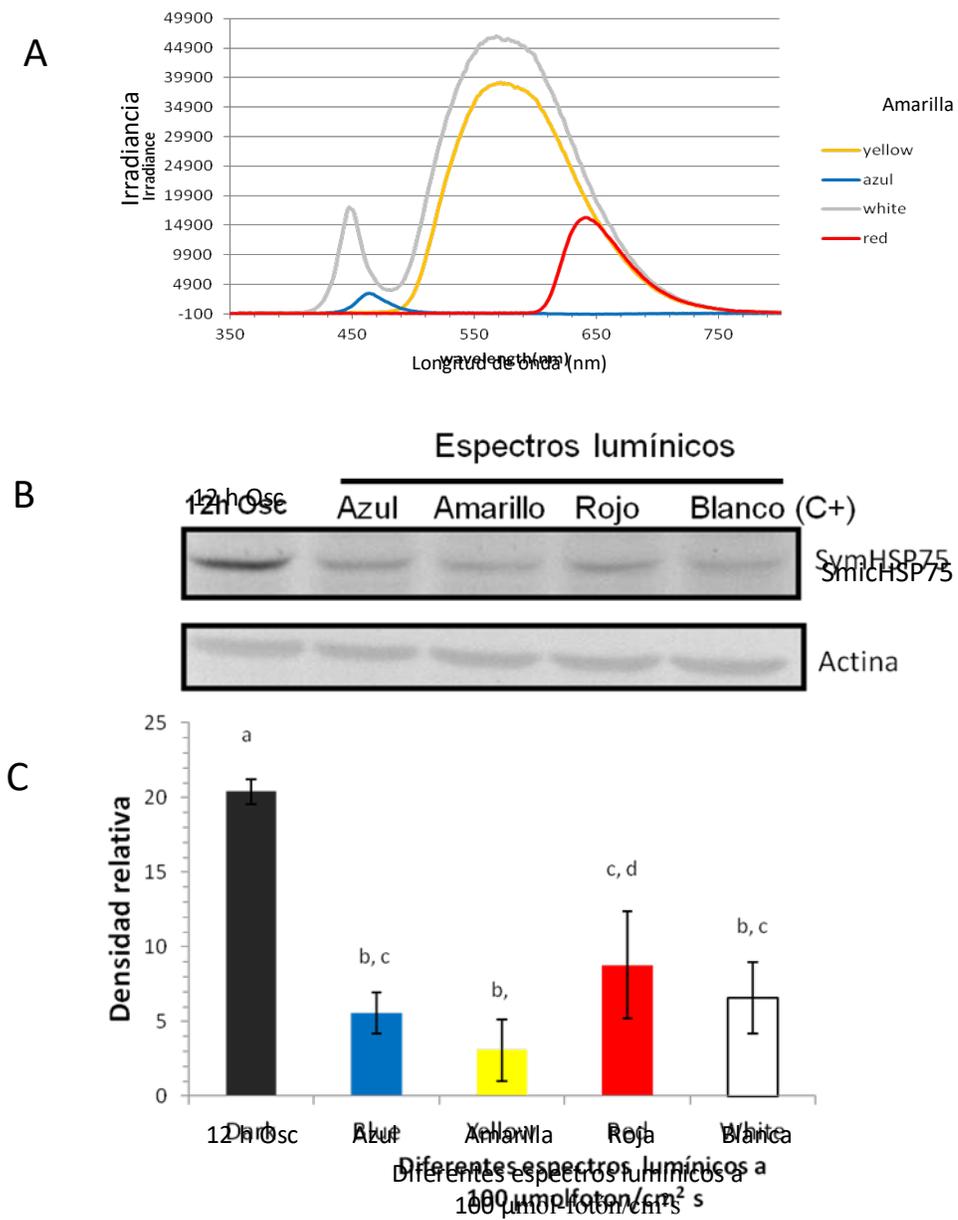


Figura 8. Comportamiento de la fosforilación de SmicHSP75 bajo diferentes espectros lumínicos. En A, se

Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

F. Preparación de anticuerpos específicos contra SmicHSP75

a. Selección, amplificación y clonación, expresión, y purificación del fragmento c-term-SmicHSP75 para la preparación de anticuerpos específicos

Adicionalmente a la secuencia correspondiente a SmicHSP75, en la base de datos de S. KB8 (Aranda et al. 2016), se encontraron al menos otras cinco secuencias con identidades de la proteína HSP70, dos de las cuales están anotadas también como tipo BiP (Fig. 10, secuencias con No's de acceso OLP86850.1 y OLP81269.1). En el análisis de alineamiento múltiple para la selección de un fragmento de secuencia que fuera particular a SmicHSP75, se encontraron secuencias idénticas (Fig. 10, letras en rojo) y secuencias parcialmente conservadas (Fig. 10, letras en azul) entre ellas, así como secuencias que en SmicHSP75 presentaban baja identidad respecto de las otras (Fig. 10, letras negras en

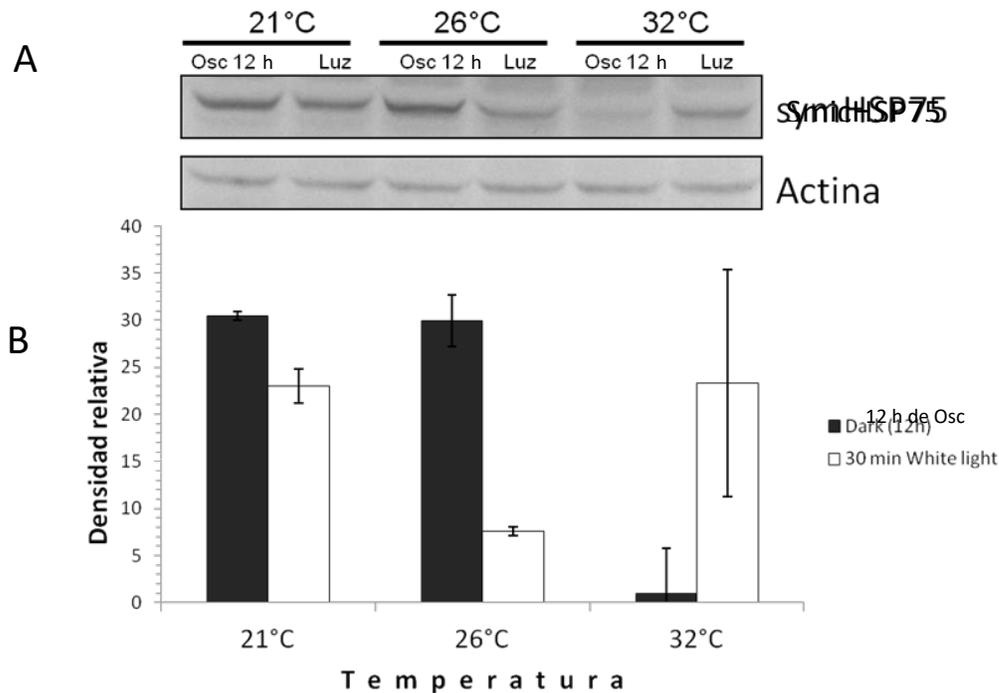


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la repuesta de desfosforilación de SmicHSP75. “Osc” significa oscuridad. Los datos en la gráfica son promedios \pm error estándar (n=3 réplicas).

SmicHSP75) y que las hacía candidatas para el desarrollo de anticuerpos específicos. Sin embargo, se seleccionó un tramo de 95 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (Fig. 10, c-term-SmicHSP75, indicada con una línea roja), debido a que además de una baja identidad, presentó dentro de ella una secuencia de 12 aminoácidos (Fig. 10, recuadro) que según el programa bioinformático “EMBOSS explorer”, es una secuencia altamente antigénica.

La secuencia correspondiente a *c-term-SmicHSP75*) se amplificó correctamente como una única banda de 345 pb (Fig. 11A, carril 2) que correspondió al peso esperado. Posteriormente, el fragmento amplificado se logró ligar en el vector de expresión pCRT7/NT, y el correcto ensamblaje de la secuencia en fase se confirmó a través de la secuenciación de nucleótidos (Fig. 11B, letras minúsculas). La traducción *in silico* a aminoácidos de dicha secuencia obtenida (Fig. 11B, letras mayúsculas) mostró que dentro de la secuencia de aminoácidos provenientes del plásmido pCRT7/NT, estuvieron presentes el motivo de seis histidinas y el de cuatro ácidos aspárticos, los cuales permitieron detectar y purificar el producto recombinante, y posteriormente digerirlo para eliminar estos 10 aminoácidos.

Con la construcción *c-term-SmicHSP75*-pCRT7/NT correctamente ensamblada (Fig. 11B) se procedió expresar el fragmento en bacterias. Las proteínas expresadas en los tiempos de 1, 2 y 4 h de crecimiento de las bacterias, se analizaron por western blot con anticuerpos anti-hexaHis. Paralelamente, también se analizaron las proteínas de bacterias transformadas con otro plásmido pCRT7/NT vacío (*vacío*-pCRT7/NT); es decir, sin la presencia del fragmento específico. Los anticuerpos anti-hexaHis detectaron una banda que migró a la altura de $M_r \sim 17$ kDa en los extractos de las bacterias transformadas con el plásmido *c-term-SmicHSP75*-pCRT7/NT desde la primera hora de expresión (Fig. 12A, carril 5). Dicha banda no se observó en los extractos de las bacterias transformadas con el plásmido *vacío*-pCRT7/NT en ninguno de los tiempos analizados (Fig. 12A, carriles 2-4). Este resultado, y la concordancia del peso esperado de 17 kDa, indicaron que dicha banda fue la correspondiente al fragmento C-terminal-SmicHSP75 expresada en conjunto con la secuencia de seis histidinas (*c-term-SmicHSP75*-His) provenientes del plásmido pCRT7/NT.

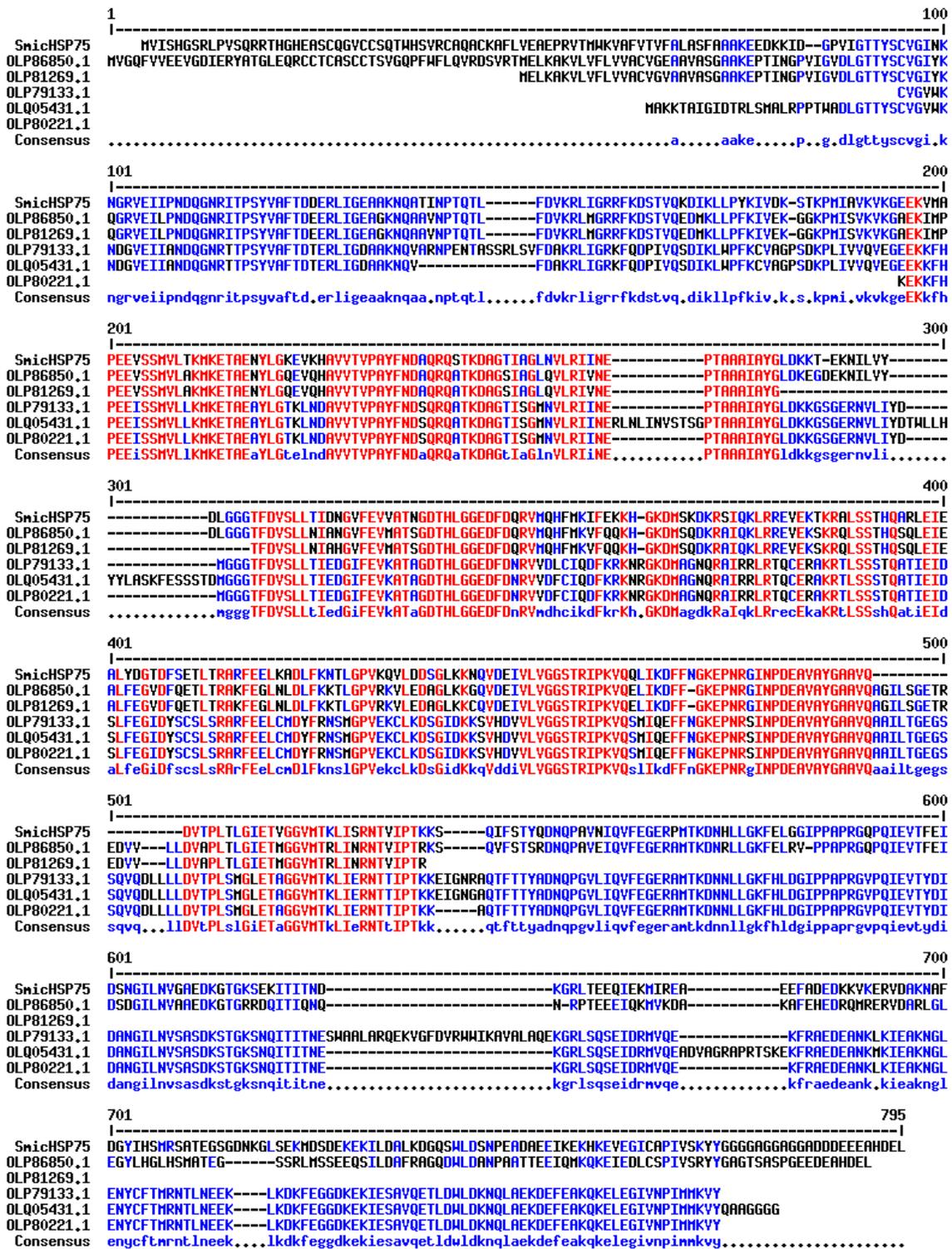


Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de SmicHSP75 con otras cinco secuencias de la base de

secuencia altamente antigénica según el programa “EMBOSS explorer”.

A continuación, se llevó a cabo el aislamiento de c-term-SmicHSP75-His a través de la unión específica de sus seis histidinas a una columna de níquel. Como la expresión de c-term-SmicHSP75-His se incrementó ligeramente a las 4 h de expresión (Fig. 12A, carril 7), se pasaron por una columna acoplada de níquel extractos de proteínas de bacterias con al menos 4 h de crecimiento. Se observó la presencia de c-term-SmicHSP75-His entre las proteínas del antes de la columna como una banda mayoritaria (Fig. 12B, carril 2), misma que estuvo ausente entre las proteínas que no se unieron a la columna y entre las que estuvieron presentes en el lavado de la columna (Fig. 12B, carriles 3 y 4, respectivamente). Este resultado, y la presencia de c-term-SmicHSP75-His en el eluido específico como una banda enriquecida y significativamente aislada (Fig. 12B, carril 6, indicada con la flecha roja), indicaron que se unió específicamente a la columna. La inmunodetección con los anticuerpos anti-hexaHis confirmaron que dicha banda aislada fue c-term-SmicHSP75-His (Fig. 12C, carril 2).



Figura 11. Amplificación por PCR y secuencia de nucleótidos del fragmento específico de SmicHSP75.

TOPO. Las letras mayúsculas representan la correspondiente secuencia de aminoácidos traducida *in silico*, en la que se subraya la región de seis histidinas que tiene afinidad a la columna de níquel, y la región ácida de cuatro ácidos aspárticos, donde corta la enzima enteroquinasa.

b. Digestión del péptido c-term-SmicHSP75-His con una fracción enriquecida de enteroquinasa.

La secuencia de hexahistidina es un epítipo muy antigénico que puede llegar a enmascarar a los otros epítipes dentro de la misma secuencia, sobre todo cuando se trata de un péptido de secuencia corta. Esta peculiaridad podría impedir la formación de anticuerpos contra el fragmento de SmicHSP75. Por ello, fue importante eliminar dicha secuencia desde el sitio de cuatro ácidos aspárticos (Fig. 11B) mediante la digestión específica con la enzima enteroquinasa.

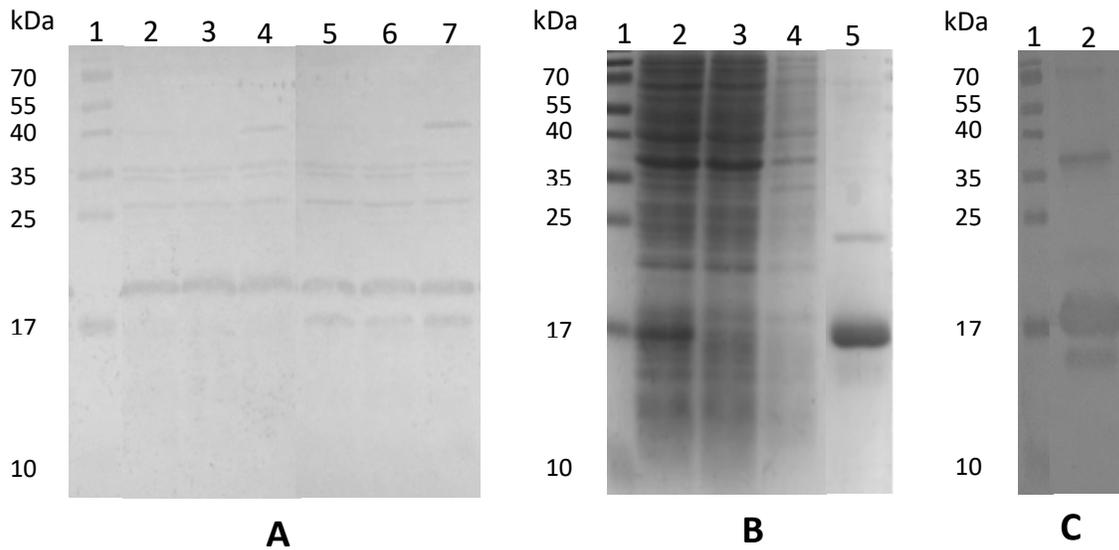


Figura 12. Resultado del análisis de expresión del fragmento recombinante específico de SmicHSP75 (c-

posición de migración del fragmento específico c-term-SmicHSP75-His.

La enteroquinasa es una enzima del sistema digestivo de mamíferos de Mr ~145 kDa, expresada principalmente en el duodeno del intestino delgado. A partir de un raspado de la mucosa del duodeno de bovino, se obtuvo por exclusión molecular una fracción de proteínas dentro del rango del peso molecular de la enteroquinasa (Fig. 13A, carril 2; y B, carriles 3-6, indicadas con un corchete). Con dicha fracción se realizó un ensayo de cinética de digestión, y se demostró que ésta fue capaz de digerir a c-term-SmicHSP75-His (Fig. 13B), lo que indicó que corresponde a una fracción enriquecida de la enteroquinasa. Se observó que en presencia de tal fracción, la intensidad de la banda de c-term-SmicHSP75-His disminuyó desde las 3 h (Fig. 13B, carril 3, indicada con la flecha roja), y cada vez más a las 6, 12 y 24 h (Fig. 13B, carriles 4, 5 y 6, respectivamente); mientras que otra banda de 12 kDa que se evidenció a partir las 3 h (Fig. 13B, carril 3, indicada con la flecha azul), incrementó su intensidad a las 6, 12 y 24 h (Fig. 13B, carriles 4, 5 y 6, respectivamente, indicadas con la flecha roja). Esta concordante disminución de c-term-SmicHSP75-His con el incremento de la intensidad de la banda de 12 kDa, sugirió que ésta proviene de c-term-SmicHSP75-His como consecuencia de la digestión por la enteroquinasa. Adicionalmente, el peso de esta banda coincidió con el peso esperado de 12 kDa, producto de la digestión de c-term-SmicHSP75-His con la enteroquinasa en el sitio de cuatro ácidos aspárticos; es decir, un producto sin la secuencia de hexahistidina (c-term-SmicHSP75). Por otro lado, los anticuerpos anti-hexaHis detectaron a c-term-SmicHSP75-His (Fig. 13C, carril 2, flecha roja), pero no fueron capaces de detectar la banda de 12 kDa (Fig. 13C, carril 3), lo cual fue indicativo de la ausencia de la secuencia de hexahistidina en la misma. En conjunto, estos resultados indicaron que la banda de 12 kDa es la correspondiente a c-term-SmicHSP75. Esta banda se extrajo del gel, se maceró en nitrógeno líquido y se dializó en PBS para usarla finalmente en la preparación de los anticuerpos específicos de SmicHSP75 (Fig. 13B, carril 7).

c. Los anticuerpos levantados contra el péptido c-term-SmicHSP75 inmunodetectan específicamente a SmicHSP75

Al evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos contra c-term-SmicHSP75, se observó que los anticuerpos, obtenidos desde la 3a colecta, detectaron a una proteína como la banda más intensa (Fig. 14A, carriles 4 y 5), la cual migró a la misma altura que

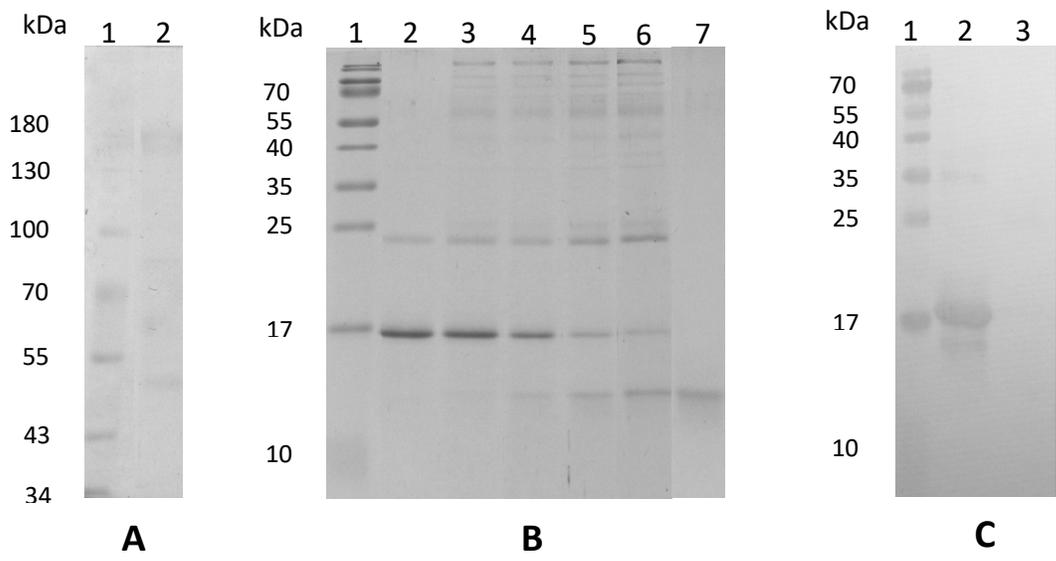


Figura 13. Resultado de la digestión del péptido recombinante c-term-SmicHSP75-His con una fracción

4, 5 y 6, las digestiones a 6, 12, 24 y 32 h a 26 °C de c-term-SmicHSP75-His con la fracción del carril 2 de

SmicHSP75 (Fig. 14A, carril 6). Esta misma no fue detectada por los anticuerpos del suero preinmune (Fig. 14A, carril 2). Estos resultados indicaron que dichos anticuerpos detectaron específicamente a SmicHSP75.

Seguidamente, las inmunoglobulinas G del suero de la 4a colecta se purificaron mediante una columna de proteína G, y al evaluarlas también reaccionaron con SmicHSP75 de *S. KB8* (Fig. 14B), pero en una manera más específica; es decir, con menos fondo y menos reacciones con otras proteínas en comparación con el suero del cual se purificó (Fig. 14A, carril 5). A estos anticuerpos purificados los denominamos como anticuerpos anti-1017.

Después, se analizaron extractos de proteínas totales de *S. MF11* y *S. kawagutii* con los anticuerpos anti-1017. Estos detectaron epítopes comunes a SmicHSP75 en otras proteínas de pesos moleculares de 75 kDa en ambas especies (Fig. 14C, carriles 2 y 3), lo que indicó que tales anticuerpos fueron capaces de detectar los homólogos de SmicHSP75 de ellas, y sugirió que podrían detectar a los homólogos de otras especies del mismo género.

Adicionalmente, se analizaron extractos de proteínas de células de *S. KB* (adaptadas a 12 h oscuridad) separadas con una mejor resolución en geles 2D (IEF con tiras pH 4-7 de 17 cm) por western blot con anticuerpos anti-pThr y anti-1017. Se observó que los anticuerpos anti-1017 detectaron cuatro puntos (Fig. 14D, anti-1017), lo que indicó que comparten epítopes comunes y sugirió fuertemente que tienen la misma identidad. Paralelamente, los anticuerpos anti-pThr detectaron los mismos cuatro puntos (Fig. 14D, anti-pThr). Esto indicó que SmicHSP75 se separa como cuatro isoformas fosforiladas bajo condiciones de oscuridad.

G. Los anticuerpos anti-1017 demostraron que los cambios en la intensidad de las bandas de SmicHSP75 provocados por el estímulo de luz son debidos a su estado de fosforilación

Se descartó la posibilidad de que los cambios detectados con los anticuerpos anti-pThr inducidos por la luz en SmicHSP75 hayan sido debidos a cambios en su expresión mediante un análisis comparativo con los anticuerpos anti-pThr, y anti-1017 que inmunodetectan específicamente a la proteína expresada constitutivamente. Como estaba previsto, se observó que los anticuerpos anti-pThr detectaron disminuciones en las intensidades de las bandas en todos los tratamientos de luz en las tres especies (Fig. 15A, B y C, carriles 2, 3, y 4), en comparación con la intensidad de la banda de condición de oscuridad correspondiente a cada especie (Fig. 15A B y C, carriles 1). Sin embargo y como se esperaba, los anticuerpos anti-1017 no detectaron cambios con ningún tratamiento de luz en células de ninguna de las especies adaptadas a condiciones de oscuridad (Fig. 15A, B y C, todos los carriles, respectivamente). En conjunto, estos resultados confirmaron que los cambios observados con los anticuerpos anti-pThr fueron debidos a cambios postraduccionales de fosforilación y no a cambios en la expresión de la proteína.

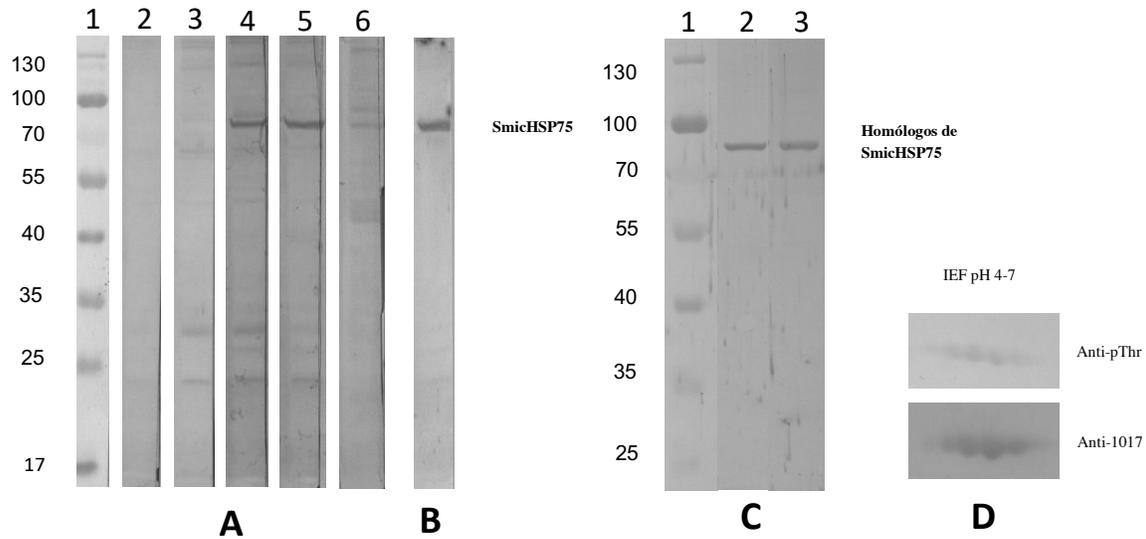


Figura 14. Resultado del análisis de la especificidad de los anticuerpos de los sueros de conejo contra KB8 analizadas con: los anticuerpos de los sueros de las 1a (preimmune, carril 2), 2a (carril 3), 3a (carril 4)

1017.

H. Tratamientos con cloranfenicol o cicloheximida de células de *Symbiodinium* bajo condiciones de luz sugieren una relación de la fosforilación de SmicHSP75 con la síntesis de proteínas.

SmicHSP75 es un homólogo de BiP involucrada en la asistencia al plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas. Por lo tanto, exploramos si la fosforilación de SmicHSP75 pudiera estar relacionada con síntesis de proteínas a través de tratamientos con cloranfenicol y cicloheximida en células de *S. KB8*. Análisis por western blot con anticuerpos anti-pThr y anti-1017 demostraron que el cloranfenicol promovió un

incremento en el nivel de fosforilación hasta después de 4 h de tratamiento (Fig 16, cloranfenicol, carriles, 3 y 4), en comparación al grupo control donde no se observaron cambios en el transcurso del tiempo (Fig. 16, control, carriles 1, 2, 3 y 4). Paralelamente, se analizó la síntesis *de novo* de la proteína PsbA/D1 del fotosistema II que es dependiente de la luz; se observó que su expresión disminuyó gradualmente desde 1 h de tratamiento con cloranfenicol (Fig. 16, cloranfenicol, carriles 2, 3 y 4), lo que indicó un efecto inhibitorio del fármaco en la síntesis de proteínas. Por otro lado, el efecto de la cicloheximida se reflejó en un incremento en la fosforilación de SmicHSP75 inclusive con tan solo 0.5 h de tratamiento (Fig. 16, cicloheximida, carriles 1, 2, 3 y 4), en comparación al grupo control que no mostró ningún cambio (Fig. 16, control, carriles 1, 2, 3 y 4). Por su parte, la expresión de PsbA/D1 mostró una disminución evidente a partir de 1 h de tratamiento (Fig. 16, cicloheximida, carril 2) con un máximo efecto a las 4 h y una recuperación de la expresión de la proteína a las 7 h (Fig.16 cicloheximida, carriles 3 y 4). En conjunto, estos resultados demostraron que la cicloheximida fue más efectiva que el cloranfenicol para inhibir la síntesis de la proteína PsbA/D1. Adicionalmente, su efecto en el incremento de la fosforilación de SmicHSP75 también fue mayor que el del cloranfenicol. Esto sugirió que los cambios en la fosforilación de SmicHSP75 pueden estar relacionados con la síntesis de proteínas.

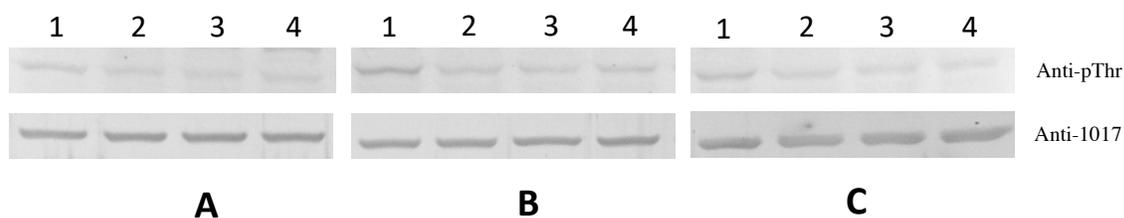


Figura 15. Análisis comparativo de la inmunodetección por western blot de SmicHSP75 y sus homólogos en *S. KB8* (A), *S. MF11* (B) y *S. kawagutii* (C), con los anticuerpos anti-pThr y anti-1017 en la respuesta a

fotón/cm s.

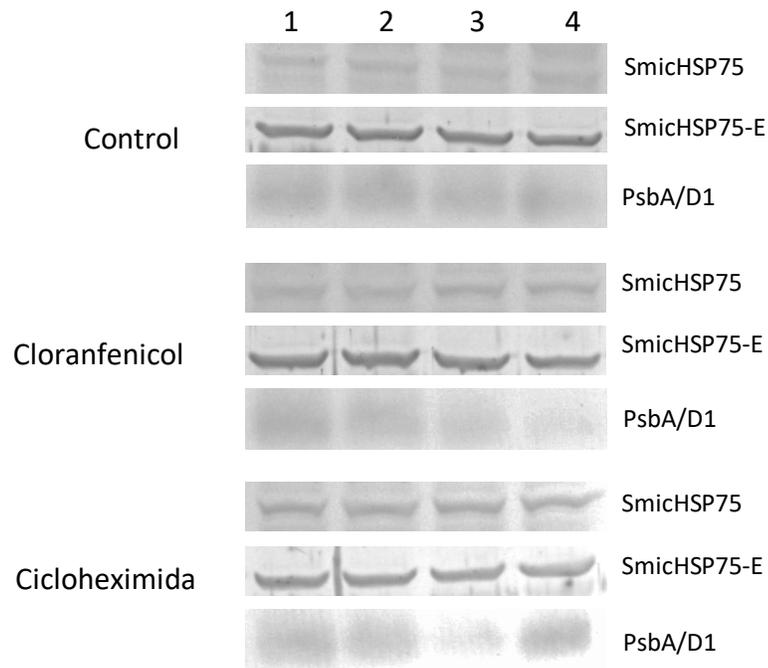


Figura 16. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas por cloranfenicol o cicloheximida en la

IX. DISCUSIÓN

Las células de género *Symbiodinium* generalmente viven como endosimbiontes en corales formadores de arrecifes (Muscatine y Porter 1977). Debido a su naturaleza fotosintética, deben poseer mecanismos de detección exquisitos para responder y regular las condiciones de luz cambiantes en su entorno. Estos, a su vez, deben transducirse a señales moleculares que activan procesos que resultan en respuestas fisiológicas. En estas células, cambios sutiles en el nivel de expresión que ocurren bajo condiciones de estrés y una escasa presencia de factores de transcripción en su transcriptoma, han sugerido que los mecanismos de regulación deben ocurrir principalmente a nivel traduccional y/o postraduccional (Baumgarten et al. 2013). En un trabajo previo, demostramos la presencia de proteínas fosforiladas en aminoácidos de treonina, serina y tirosina en tres especies de *Symbiodinium* (Castillo-Medina 2013; Castillo-Medina et al. 2019). Lo anterior indica que la fosforilación es una característica importante de sus proteínas, y es consistente con la idea de que podrían ser actores clave de los eventos de señalización, ya que son importantes interruptores celulares que desencadenan respuestas celulares a estímulos ambientales (Graves y Krebs 1999). En este sentido, una proteína de 75 kDa de *Symbiodinium microadriaticum* (S. KB8) demostró cambios en su nivel de fosforilación en treonina en respuesta a estímulos de luz (Castillo-Medina 2013). En el presente trabajo identificamos que tal proteína es la de un homólogo de BiP que pertenece a la familia HSP70 de retículo endoplásmico, a la cual denominamos SmicHSP75. A partir de datos obtenidos respecto a su fosforilación y con antecedentes que existen en la literatura sobre la misma, se sugiere una relación entre dicha fosforilación y la síntesis de proteínas.

La identidad previa de SmicHSP75 presentó datos confusos. Inicialmente, la identificamos como una HSP90 (Castillo-Medina 2013); sin embargo, se observó con un peso molecular de 75 kDa en geles SDS-PAGE. Existen registros de HSP90 con pesos moleculares de hasta 82 kDa (Ahn et al. 2003), pero no se tiene conocimiento de alguna HSP90 con peso de 75 kDa. Por otro lado, dicha identidad inicial se obtuvo de la secuencia parcial de tan solo dos péptidos de 12 y 8 aminoácidos, obtenidos a partir de una banda de un gel convencional de SDS-PAGE que presuntamente correspondía a SmicHSP75. Por ello, un posible solapamiento de varias proteínas que pudieran haber co-migrado en esa

misma banda no podía ser descartado. Consecuentemente, en éste trabajo nos planteamos como primer objetivo confirmar la identidad de SmicHSP75. Para ello, adicionalmente a la pre-purificación desarrollada por Castillo-Medina (2013), la proteína fue separada en un gel de doble dimensión para descartar una posible co-migración de proteínas en una misma zona de gel de SDS-PAGE, y así obtenerla aislada para identificarla por secuencia parcial de aminoácidos. Interesantemente, encontramos que en geles de doble dimensión la banda que corresponde a SmicHSP75 se separó en al menos dos proteínas con el mismo peso molecular con puntos isoeléctricos de 5.4 y 5.6 (Fig. 1A, puntos 1 y 2, respectivamente), ambas inmunodetectadas con los anticuerpos anti-pThr (Fig. 1B, puntos 1 y 2, respectivamente). Sugiriendo que se trataba de dos isoformas. En concordancia, a partir de las secuencias polipeptídicas parciales obtenidas por separado de ambos puntos (Fig. 4), se demostró que se trataba de la misma proteína cuya identidad inequívoca es de una tipo BiP, miembro de la familia HSP70, lo cual indicó que, en efecto, se trataba de isoformas con fosforilación diferencial. La identidad errónea que se obtuvo inicialmente pudo deberse a un fragmento de degradación de una proteína tipo HSP90 de *Symbiodinium* que migró con una masa molecular de ~ 75 kDa. Por otro lado, la separación de SmicHSP75 como dos isoformas del mismo peso en el gel de 2D (Fig. 3A y B) fue consistente con los cambios que se observaron en su nivel de fosforilación después de estímulos de luz (Fig. 15A). Esto se confirmó cuando se llevó a cabo un análisis por western blot en geles de doble dimensión con tiras de isoelectroenfoque de un rango de pH *ad hoc* para obtener una mejor resolución. En este análisis los anticuerpos anti-pThr y anti-1017 demostraron la existencia de hasta cuatro isoformas fosforiladas de SmicHSP75 (Fig. 14D).

Debido a que se cuenta con una base de datos genómicos de *S. KB8* (Aranda et al. 2016), se pudo identificar una secuencia completa traducida a aminoácidos correspondiente a SmicHSP75 (Fig. 4, *S. mic*). Esta presentó en el C-terminal la secuencia de aminoácidos H/KDEL (Fig. 4, *S. mic*, sombreado en gris), que es una de las características de las HSP70 de retículo endoplásmico, comúnmente denominadas como BiP. Las proteínas que residen permanentemente en el lumen del retículo endoplásmico (RE) parecen distinguirse de las proteínas secretoras recién sintetizadas por la presencia de esta secuencia C-terminal (Pelham 1990). Esta secuencia permite que estas proteínas sean retenidas en el RE mediante de un mecanismo de reciclaje vesicular, por ser proteínas vitales dentro de la

célula. De hecho, la delección completa del gen que codifica para BiP y una mutante sin la secuencia K/HDEL de BiP de mamíferos fueron letales para células de levadura y en ratones, respectivamente (Rose et al. 1989; Mimura et al. 2007). Esto sugirió que SmicHSP75 podría estar localizada en este organelo y que su función podría ser vital para *Symbiodinium*. Poco se conoce acerca de las proteínas de RE en *Symbiodinium*, e inclusive a la fecha no hay evidencias de imágenes micrográficas de estos organelos en éstas células; sin embargo, por la presencia de secuencias de proteínas de RE en el transcriptoma de *Symbiodinium*, se infiere su existencia. Ensayos de inmunolocalización con los anticuerpos específicos anti-1017 contra SmicHSP75, levantados en el laboratorio, podrían confirmar su localización subcelular.

Se han reportado modificaciones postraduccionales de fosforilación, ADP ribosilación y AMPilación en proteínas BiP de células de mamíferos (Hendershot et al. 1988; Ham et al. 2014). Un análisis de fosfoaminoácidos de BiP purificada de mamífero demostró que esta proteína está fosforilada predominantemente en residuos de treonina y en menor grado, en serina (Hendershot et al. 1988). Esto concuerda con el hecho de haber detectado cuatro isoformas de SmicHSP75 con anti-pThr (Fig. 14D) y que el programa NetPhos predijera que el aminoácido con mayor probabilidad de fosforilación sea treonina (Fig 4. *S. mic*, asteriscos). Lo anterior sugiere que más de un sitio de SmicHSP75 puede estar fosforilado en treonina aunque no se puede descartar la posibilidad de que esté fosforilada en un solo sitio de treonina y que la migración diferencial se deba a modificaciones en aminoácidos diferentes o a algún otro tipo de modificación postraducciona. Hasta donde se sabe, aún no se tienen registros de modificaciones de ADP ribosilación ni AMPilación de BiP en plantas y mucho menos en microalgas fotosintéticas; de hecho, la AMPilación se presume que es una modificación restringida a células animales (Preissler y Ron 2018).

Las modificaciones postraduccionales de BiP parecen estar dirigidas a aquellas BiP que no se unen a proteínas cliente (Hendershot et al. 1988), y se ha observado que el estrés induce la transición de BiP no activa (fosforilada) a activa (no fosforilada). Por lo tanto, se infirió que el estrés promovió la desfosforilación de BiP y su asociación con otras proteínas (Sato et al. 1993). Estas evidencias llevaron a proponer que la BiP modificada representa una forma inactiva y que la BiP no modificada (activa) es la que puede unirse a las

proteínas cliente y promover su plegamiento y ensamblaje correctos (Hendershot et al. 1988). Esta teoría se encuentra vigente y a partir de ella también se ha propuesto que la modificación postraduccional podría proporcionar un conjunto de BiP de almacenamiento inactivas que pueden ser reclutadas nuevamente a la forma activa (Gething 1999; Preissler y Ron 2018). En función a esta teoría, nuestros resultados sugieren que la luz activa a SmicHSP75 mediante su desfosforilación, y la oscuridad la mantiene inactiva a través de su estado fosforilado. Adicionalmente, sugieren fuertemente que la regulación de SmicHSP75 por fosforilación está conservada en organismos fotosintéticos unicelulares como *Symbiodinium*, y permite proponer un nuevo papel de proteínas tipo BiP en la transducción de señales inducidas por la luz a través de la modulación de su fosforilación. Por otro lado, los tratamientos de las células de *Symbiodinium* con cloranfenicol o cicloheximida las afectaron de tal manera que se observó un aumento de la fosforilación de SmicHSP75 después de los tratamientos (Fig. 16). Ambos fármacos tienen un efecto negativo sobre el mecanismo celular de síntesis de proteínas, la diferencia es que cloranfenicol inhibe la síntesis de las proteínas que son codificadas desde el cloroplasto, y la cicloheximida inhibe la síntesis de aquellas que son codificadas desde el núcleo. La fosforilación de SmicHSP75 ocurrió más rápido después del tratamiento con cicloheximida, ya que esta aumentó desde los 30 min después de la exposición al fármaco, mientras que el cloranfenicol la indujo hasta después de al menos 4 h (Fig. 16). En conjunto, estos resultados sugieren que SmicHSP75 pudiera estar participando en la síntesis de proteínas codificadas en el núcleo, lo que concuerda con su posible localización en RE (Fig. 4), y es consistente con un papel de asistencia en el plegamiento correcto de proteínas nucleares recién sintetizadas (Fig. 17). Por lo tanto, nuestros resultados también sugieren una correlación entre la fosforilación de SmicHSP75 y la síntesis de proteínas nucleares a través de una vía de señalización promovida por la percepción de la llegada de la luz en *Symbiodinium*.

No sabe qué otras proteínas participan tanto corriente arriba como abajo de la cascada de señalización de SmicHSP75, pero la respuesta de desfosforilación implica la existencia de alguna o varias proteína(s) fotoreceptora(s) que transmite(n) la señal a otras moléculas de transducción. Al respecto, exploramos esta implicación mediante tratamientos de células de *Symbiodinium* mantenidas bajo diferentes intensidades o espectros de luz. Se conoce que algunos fotoreceptores son activados a longitudes de onda particulares; los fitocromos

y criptocromos por ejemplo, perciben las longitudes de onda de la luz roja y azul, respectivamente (Somers et al. 1998). Sin embargo, no se observó una respuesta particular en la fosforilación de SmicHSP75 ante algún espectro específico, ya que en todos los ensayos se indujo su desfosforilación (Fig. 8). Por tanto, dichos fotoreceptores deben ser capaces de ser estimulados dentro de las longitudes de onda que abarca el espectro de luz visible. Por otro lado, los arreglos de los pigmentos peridina y clorofilas *a* y *c2* (Niedzwiedzki et al. 2014), que colectan la luz para la fotosíntesis de *Symbiodinium* pueden ser estimulados dentro de este amplio espectro de luz. La absorción de la luz a través de dichos pigmentos para la fotosíntesis genera un daño natural sobre la proteína D1 en el PSII, por lo cual éste es reparado mediante la síntesis *de novo* (Karim et al. 2015). Nuestros análisis permitieron observar que, al detener dicho mecanismo de reparación a través de la inhibición de la síntesis *de novo* de la proteína D1 con cloranfenicol, se reveló el fotodaño generado por la luz a partir de 1 h de exposición al fármaco (Fig. 16, cloranfenicol y D1, carril 2). Esta inhibición fue concomitante con un incremento evidente en el nivel de fosforilación de SmicHSP75 hasta después de 4 h de iniciada la inhibición (Fig. 16, cloranfenicol y SmicHSP75, carril 3). Por lo tanto, estos datos sugieren que la fosforilación de SmicHSP75 podría responder a la luz a través de procesos que subyacen a la fotosíntesis. Análisis adicionales con otro tipo de fármacos especializados para inhibición de la fotosíntesis, como DCMU, podrían confirmar esta idea.

El hecho de que la proteína esté altamente fosforilada durante la fase oscura y se produzca una desfosforilación con el estímulo de la luz, apunta hacia otras dos implicaciones importantes; primero, debe haber una cinasa que fosforila la proteína al final de la fase de luz y durante la fase de oscuridad del ciclo; y segundo, también debe haber una fosfatasa que responda a la activación del interruptor molecular que se activa después de 30 min de un estímulo de luz. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de alguna fosfatasa o cinasa que pueda regular a BiP en el RE mediante fosforilación. Del mismo modo, deben existir moléculas desconocidas corriente abajo de SmicHSP75 para transducir la señal en una respuesta fisiológica. Las proteínas BiP pueden interactuar con otras co-chaperonas HSP40 y/o factores intercambiadores de nucleótidos, los cuales ayudan a regular su función dentro del RE de células animales (Melnik et al. 2015). Los resultados del análisis por cromatografía de exclusión molecular sugirieron que SmicHSP75

probablemente interacciona con otra proteína de peso molecular aproximado de 25 kDa (Fig. 6). Sin embargo, los picos de elución estuvieron muy cercanos (Fig. 6, fracción 60 en A y 62 en B) y este resultado bien puede ser debatible y requiere una mayor validación. Ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-1017, nos permitirían confirmar tal interacción y aislar a la presunta proteína de 25 kDa para obtener su identidad. Esto último nos daría información novedosa e interesante para disectar la vía de señalización en la cual podría estar participando SmicHSP75 en *Symbiodinium*. Por otro lado, la interacción de SmicHSP75 con la proteína de 25 kDa pareció ocurrir en condiciones de luz pero no de oscuridad (Fig. 6 B y A, respectivamente). Esto concuerda con la teoría propuesta de que la BiP solo interacciona con otras proteínas en su estado no modificado (Hendershot et al. 1988). De acuerdo a esta teoría y de confirmarse el resultado anterior, en el caso de *Symbiodinium*, la luz favorecería la desfosforilación de SmicHSP75 para interaccionar con la presunta proteína de 25 kDa, mientras que la condición de oscuridad en su estado fosforilado, dicha interacción no ocurriría.

Los cambios en el nivel de fosforilación de SmicHSP75 no fueron únicamente dependientes de la luz. Los resultados de la disminución de el nivel de fosforilación de la proteína debido a la luz y la posible dosis dependencia de la misma a bajas intensidades (Figs. 15 y 7, respectivamente), aunados a un incremento en el nivel de fosforilación de la proteína debido a tratamientos con cloranfenicol (Fig. 16, cloranfenicol), sugirieron que la modificación en estos niveles de fosforilación de SmicHSP75 podrían estar relacionados con algún proceso modulado por la luz. Sin embargo, en la condición de ausencia de luz, la temperatura también promovió una disminución en el nivel de fosforilación de SmicHSP75 (Fig. 9, 32°C y Osc), indicando que ésta no representa un mecanismo exclusivo que subyace a la luz, sino uno en el cual pueden converger las respuestas a más de un factor y/o al estrés ambiental. En *Chlamydomonas reinhardtii* existe la evidencia de una regulación de la expresión del gen HSP70A por la luz a través de una vía de señalización independiente del estrés térmico (Kropat et al. 1995); adicionalmente, en plantas de soya los estados de fosforilación y expresión de las isoformas de BiP/HSP70 responden diferencialmente a distintos factores de estrés (Cascardo et al. 2000). Por lo tanto, sería interesante analizar si la respuesta de desfosforilación de SmicHSP75 inducida

por la luz o la temperatura proviene de mecanismos diferentes o de una misma vía de señalización.

Es sabido que la alta temperatura (32 °C) en combinación con la luz alta representan una condición estresante para *Symbiodinium*. Interesantemente, encontramos que un estímulo de luz de intensidad alta (650 $\mu\text{mol-fotón/cm}^2\text{s}$), revirtió el estado desfosforilado de SmicHSP75, promovido por una temperatura de 32 °C bajo condiciones de oscuridad (Fig. 9, 32 °C y Osc; comparada con 26 °C y Osc), al estado fosforilado (Fig. 9, 32 °C y Luz). El incremento de la temperatura interrumpe el ciclo de Calvin mediante la inactivación de la Rubisco (Leggat et al. 2004) o afecta la síntesis de ATP a través del daño de la membrana tilacoidal (Tchernov et al. 2004). En tales condiciones, los electrones que se originan de la oxidación del agua en PSII durante la fotosíntesis, se transfieren a oxígeno y producen especies reactivas de oxígeno (ROS; Asada 1999; Lesser 2006). Adicionalmente, en condiciones de temperaturas estresantes, la luz conduce a inhibición de la síntesis de *novo* de proteínas de la antena (Takahashi et al. 2008), probablemente a través de la inhibición por ROS en el paso de elongación de la proteína naciente durante la traducción (Nishiyama et al. 2001). Por lo tanto, en un escenario de estrés, los probables ROS generados pueden ser parte del mecanismo de convertir a SmicHSP75 de un estado desfosforilado activo a uno fosforilado inactivo, a través de la inhibición de la síntesis de proteínas (Fig. 17, colores degradados). Los datos obtenidos concuerdan con la teoría propuesta por Hendershot et al. (1988) en la cual la BiP modificada (SmicHSP75 fosforilada) representa una forma inactiva y que la BiP no modificada (SmicHSP75 no fosforilada) es la que puede unirse a las proteínas cliente y promover su plegamiento y ensamblaje correctos.

Hasta donde sabemos, no existen reportes de alguna vía en la cual la modificación de BiP por fosforilación sea controlada por la luz en *Symbiodinium*. Sin embargo, en la microalga *C. reinhardtii*, la inhibición de la vía de señalización de TOR (Target of Rapamycin) condujo a la fosforilación de BiP en residuos de treonina, lo que sugirió una relación entre la vía TOR, y la fosforilación de BiP (Díaz-Troya et al. 2011). La fosforilación de BiP se produjo en un sitio altamente conservado del dominio de unión a sustrato (Díaz-Troya et al. 2011) que juega un papel importante en la regulación de la actividad de chaperona de BiP (Otero et al. 2010); dicho sitio también se encontró

conservado dentro de la secuencia de SmicHSP75 (Fig. 4, asterisco). La vía TOR se encarga de sensar la disponibilidad de nutrientes y estimula la maquinaria de crecimiento celular promoviendo procesos anabólicos, que incluyen la traducción de proteínas y la biogénesis de los ribosomas (Crespo y Hall 2002). Esto explicaría el porqué de que en *Symbiodinium*, la activación de SmicHSP75 por desfosforilación ocurre principalmente en etapas del alta proliferación celular (Castillo-Medina 2013), y/o en respuesta a la llegada de luz (Fig. 15), que es cuando el contenido de metabolitos nutritivos endógenos se incrementa debido a la fotosíntesis y los procesos de síntesis de proteínas son activados. Cabe señalar que la funcionalidad de esta vía no ha sido desmostrada en *Symbiodinium*.

X. CONCLUSIÓN

Las proteínas BiP son chaperonas moleculares cuyas funciones canónicas son las de ayudar al plegamiento y ensamblaje correcto de proteínas recién sintetizadas a medida que se translocan al ER, así como también asistir a proteínas mal plegadas o desplegadas debido a condiciones de estrés en el RE (Schroda 2004; Otero et al. 2010). Dichas funciones pueden ser reguladas mediante inactivación/activación por fosforilación/desfosforilación, respectivamente (Herdershot et al. 1988; Díaz-Troya et al. 2011). La modificación de SmicHSP75 por fosforilación se suprimió en condiciones que requieren la actividad de esta chaperona, tales como el estímulo de luz o con el tratamiento de temperatura, que a 32°C representan un escenario estresante para esta especie. Por el contrario, un estado fosforilado se observó en condiciones de oscuridad, y el incremento con inhibidores de síntesis de proteínas a pesar de estar bajo condiciones de luz, dejaron inferir un vínculo entre la fosforilación y su estado inactivo. Por lo tanto, nuestros datos sugieren un modelo en el que SmicHSP75 de *Symbiodinium microadriaticum* existe en dos formas diferentes que se pueden interconvertir entre una proteína inactiva fosforilada y una forma desfosforilada activa (Fig. 17). La interconversión entre estos dos estados debe ser catalizada por proteínas cinasa(s) y fosfatasa (s), cuya actividad debe estar finamente regulada en respuesta a requerimientos de síntesis de proteínas y/o señales de estrés en el RE (Fig. 17). Según este modelo, la luz a través de la fotosíntesis, y la temperatura probablemente por otra vía alterna, cambien alguna condición interna en *S. microadriaticum*, la cual debe controlar la función chaperona de SmicHSP75 en el RE, ya sea regulando positivamente la actividad de una fosfatasa o inhibiendo una cinasa (Fig. 17). Por lo tanto, nuestro estudio revela un mecanismo regulatorio de SmicHSP75 de *S. microadriaticum* a través de eventos de fosforilación/desfosforilación en una vía que responde a estímulos de luz y temperatura, probablemente relacionada con la síntesis de proteínas.

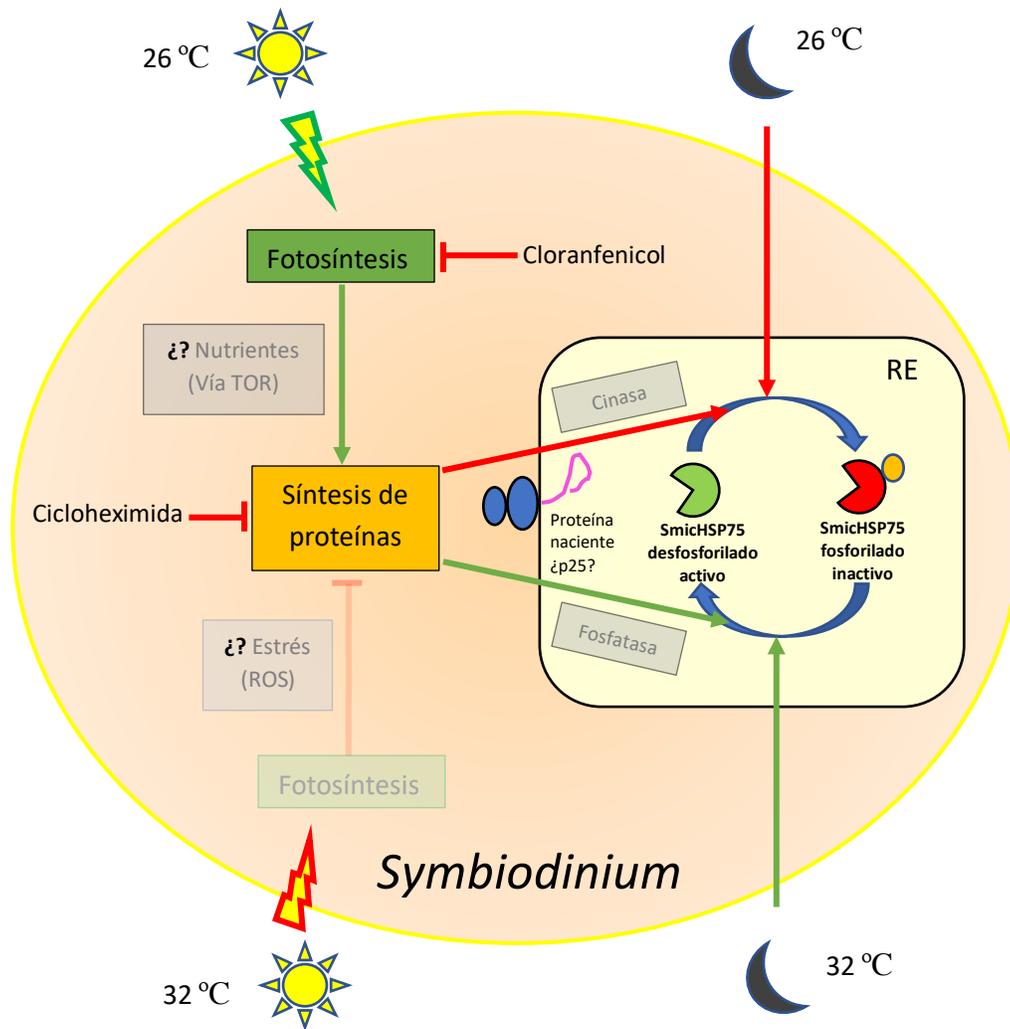


Figura 17. Modulación de la fosforilación de SmicHSP75 bajo condiciones de luz, oscuridad y temperatura. Las líneas en verde indican las condiciones que llevan a un estado activo de SmicHSP75 desfosforilado, y en rojo las que lo llevan al estado inactivo fosforilado. Los colores vivos son las condiciones según los datos encontrados en el presente trabajo, mientras que los degradados son las propuestas o hipótesis según las evidencias indirectas analizadas en la discusión.

XI. REFERENCIAS

Ahn V. E., Faull K. F., Whitelegge J. P., Fluharty A. L. y Privé G. G. (2003). Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:38–43.

Anckar J. y Sistonen L. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 80:1089-1115.

Aranda M., Li Y., Liew Y. J., Baumgarten S., Simakov O., Wilson M. C., Piel J., Ashoor H., Bougouffa S., Bajic V. B., Ryu T., Ravasi T., Bayer T., Micklem G., Kim H., Bhak J., LaJeunesse T. C. y Voolstra C. R. (2016). Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Sci. Rep.*, 6:39734.

Aro E. M., Virgin I. y Andersson B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143:113-134.

Arya R., Mallik M. y Lakhota S. C. (2007). Heat shock genes integrating cell survival and death. *J. Biosci.*, 32:595-610.

Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:601-639.

Assimon V. A., Southworth D. R. y Gestwicki J. E. (2015). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to heat shock protein 70 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation. *Biochem.*, 54:7120-7131.

Baker N. R., Ort D. R., Harbinson J. y Whitmarsh J. (2004). Sunlight processing: chloroplast to leaf. En: *Photosynthetic Adaptation: Chloroplast to Landscape* (eds Smith W. K., Vogelmann T. C. y Critchley C.), pp. 89-104. Springer, New York, U. S. A.

Banaszak A. T., Barba Santos M. G., LaJeunesse T. C. y Lesser M. P. (2006). The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 337:131-146.

Banaszak A. T. y Trench R. K. (1995). Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. I. Response of the algal symbionts in culture and *in hospite*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 194(2):213-232.

Baumgarten S., Bayer T., Aranda M., Liew Y. J., Carr A., Micklem G. y Voolstra C. R. (2013). Integrating microRNA and mRNA expression profiling in *Symbiodinium microadriaticum*, a dinoflagellate symbiont of reef-building corals. *BMC Genom.*, 14:704.

Beissinger M. y Buchner J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.*, 379:245-259.

Beltrao P., Albanése V., Kenner L. R., Swaney D. L., Burlingame A., Villén J., Lim W. A., Fraser J. S., Frydman J. y Krogan N. J. (2012). Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell*, 150:413-425.

Berkelmans R. y Van Oppen M. J. H. (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 273:2305-2312.

Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S. y Brunak S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4:1633-1649.

Bradford M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.

Cascardo J. C. M., Almeida R. S., Buzeli R. A. A., Carolino S. M. B., Otoni W. C. y Fontes E. P. B. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J. Biol. Chem.*, 275:14494-14500.

Castillo-Medina R. E. (2013). Incorporación de fosfato en proteínas de *Symbiodinium* spp. Durante el crecimiento y bajo diversos estímulos externos (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Castillo-Medina R. E., Islas-Flores T., Thomé P. E., Iglesias-Prieto R., Lin S., Zhang H. y Villanueva M. A. (2013). The PsbO homolog from *Symbiodinium kawagutii* (Dinophyceae) characterized using biochemical and molecular methods. *Photosynth. Res.*, 115:167-178.

Castillo-Medina R. E., Islas-Flores T. y Villanueva M. A. (2019). Phosphorylation/dephosphorylation response to light stimuli of *Symbiodinium* proteins: specific light-induced dephosphorylation of an HSP-like 75 kDa protein from *S. microadriaticum*. *PeerJ*, 7:7406.

Carpenter K. E., Abrar M., Aeby G., Aronson R. B., Banks S., Bruckner A., Chiriboga A., Cortes J., Delbeek J. C. y DeVantier L. (2008). One third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science.*, 321:560-563.

Chen Y. J., Kuo-Chu L., Hsiao-Hui K., Lu-Ping C., Ling-Huei Y. y Te-Chang L. (2014). HSP70 colocalizes with PLK1 at the centrosome and disturbs spindle dynamics in cells arrested in mitosis by arsenic trioxide. *Arch. Toxicol.*, 88:1711-1723.

Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, 16: 10881-10890.

Crespo J. L. y Hall M. N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66:579-591.

Díaz-Troya S., Pérez-Pérez M. E., Pérez-Martín M., Moes S., Jenó P., Florencio F. J. y Crespo J. L. (2011). Inhibition of protein synthesis by TOR inactivation revealed a conserved regulatory mechanism of the BiP chaperone in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.*, 157:730-741.

Einbinder S., Gruber D. F., Salomon E., Liran O., Keren N., y Tchernov D. (2016). Novel adaptive photosynthetic characteristics of mesophotic symbiotic microalgae within the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Front. Mar. Sci.*, 3:195.

Falkowski P. G., Dubinsky Z., Muscatine L. y Porter J. W. (1984). Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. *BioScience*, 34:705-709.

Falkowski P. G. y Raven J. A. (1997). Aquatic photosynthesis. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, pp. 375.

Feder M. E. y Hofmann G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243-282.

Fischer B. B., Ledford H. K., Wakao S., Huang S. G., Casero D. y Pellegrini M. (2012). Singlet oxygen resistant 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109:1302-1311.

Fitt W. K. (2000). Cellular growth of host and symbiont in a cnidarian-zooxanthellae symbiosis. *Biol. Bull.*, 198:110-120.

Freudenthal H. D. (1962). *Symbiodinium* gen. Nov. *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: Taxonomy, life cycle, and morphology. *J. Protozool.*, 9:45-52.

Genty B. y Harbinson J. (1996). Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. En: *Photosynthesis and the Environment* (ed. Baker N. R.), pp. 67-99. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Gething M. J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10:465-472.

Govind G., Harshavardhan V. T., Patricia J. K., Dhanalakshmi R., Senthil-Kumar M. y Sreenivasulu N. (2009). Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Mol. Genet. Genomics*, 281:591-605.

Govindjee, Wong D., Prezelin B. B. y Sweeney B. M. (1979). Chlorophyll *a* fluorescence of *Gonyaulax polyedra* grown on a light-dark cycle and after transfer to constant light. *Photochem. Photobiol.*, 30:405-411.

- Graves J. D. y Krebs E. G. (1999). Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.*, 82:111-121.
- Green B. R. y Durnford D. G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:685-714.
- Gunter H. M. y Degnan B. M. (2007). Developmental expression of Hsp90, Hsp70 and HSF during morphogenesis in the vetigastropod *Haliotis asinina*. *Dev. Genes Evol.*, 217:603-612.
- Hakala M., Tuominen I. y Keränen M. (2005). Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1706:68-80.
- Ham S., Kim K. H., Kwon T. H., Bak Y., Lee D. H., Song Y. S., Park S. H., Park Y. S., Kim M. S., Kang J. W., Hong J. T. y Yoon D. Y. (2014). Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7 oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18-associated cells. *Oncol. Rep.*, 31:2683-2691.
- Hendershot L. M., Ting J. y Lee A. S. (1988). Identity of the immunoglobulin heavy chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol. Cell. Biol.*, 8:4250-4256.
- Heron S. F., Eakin C. M. y Douvère F. (2017). Impacts of climate change on world heritage coral reefs: A first global scientific assessment. Paris, UNESCO World Heritage Centre.
- Hill R. y Ralph P. J. (2006). Photosystem II heterogeneity of *in hospite* zooxanthellae in scleractinian corals exposed to bleaching conditions. *Photochem. Photobiol.*, 82:1577-1585.
- Hoegh-Guldberg O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshw. Res.*, 50:839-866.
- Hoegh-Guldberg O., Mumby P. J., Hooten A. J., Steneck R. S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C. D., Sale P. F., Edwards A. J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C. M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R. H., Dubi A. y Hatziolos M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318:1737-1742.
- Hoegh-Guldberg O., Muscatine L., Goiran C., Siggaard D. y Marion G. (2004). Nutrient induced perturbations to ¹³C and ¹⁵N in symbiotic dinoflagellates and their coral hosts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 280:105-114.
- Hofmann E., Wrench P. M., Sharples F. P., Hiller R. G., Welte W. y Diederichs K. (1996). Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science*, 272:1788-1791.

Hughes T. P., Kerry J. T., Baird A. H., Connolly S. R., Chase T. J., Dietzel A., Hill T., Hoey A. S., Hoogenboom M. O., Jacobson M., Kerswell A., Madin J. S., Mieog A., Paley A. S., Pratchett M. S., Torda G. y Woods R. M. (2019). Global warming impairs stock-recruitment dynamics of corals. *Nature*, 568:387-390.

Iglesias-Prieto R. (1996). Biochemical and spectroscopic properties of the light-harvesting apparatus of Dinoflagellates. En: *Citology, Genetic and Molecular Biology of Algae* (eds Chaudhary B. R. y Agrawal S. B.), pp. 301-322.

Iglesias-Prieto R., Govind N. S. y Trench R. K. (1991). Apoprotein composition and spectroscopic characterization of the water-soluble peridinin-chlorophyll *a* protein from three symbiotic dinoflagellates. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 246:275-283.

Iglesias-Prieto R., Govind N. S. y Trench R. K. (1993). Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lon. B.*, 340:381392.

Iglesias-Prieto R. y Trench R. K. (1994). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113:163-175.

Iglesias-Prieto R. y Trench R. K. (1997). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Responses of chlorophyll protein complexes to different light regimes. *Mar. Biol.*, 130:23-33.

Jokiel P. L. (1980). Solar ultraviolet radiation and coral reef epifauna. *Science*, 207:1069-1071.

Karim W., Seidi A., Hill R., Chow W. S., Minagawa J., Hidaka M. y Takahashi S. (2015). Novel characteristics of photodamage to PSII in a high-light-sensitive *Symbiodinium* phylotype. *Plant Cell Physiol.*, 56:1162-1171.

Karlin S. y Brocchieri L. (1998). A symmetric-iterated multiple alignment of protein sequences. *J. Mol. Biol.*, 276:249-264.

Kemp D. W., Hernandez-Pech X., Iglesias-Prieto R., Fitt W. K. y Schmidt G. W. (2014). Community dynamics and physiology of *Symbiodinium* spp. before, during, and after a coral bleaching event. *Limnol. Oceanogr.*, 59:788-797.

Kiessling W. (2009). Geologic and biologic controls on the evolution of reefs. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40:173-192.

Koike K., Jimbo M., Sakai R., Kaeriyama M., Muramoto K., Ogata T., Maruyama T. y Kamiya H. (2004). Octocoral chemical signalling selects and controls dinoflagellate symbionts. *Biol. Bull.*, 207:80-86.

- Kropat J., Von Gromoff E. D., Müller F. W. y Beck C. F. (1995). Heat shock and light activation of a *Chlamydomonas* HSP70 gene are mediated by independent regulatory pathways. *Mol. Gen. Genet.*, 248:727-734.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LaJeunesse T. C., Finney J. C., Smith R. T. y Oxenford H. (2009). Outbreak and persistence of opportunistic symbiotic dinoflagellates during the 2005 Caribbean mass coral 'bleaching' event. *Proc. Roy. Lond. Soc. B.*, 276:4139-4148.
- LaJeunesse T. C., Parkinson J. E. y Reimer J. D. (2012). A genetics-based description of *Symbiodinium minutum* sp. nov. and *S. psysgmophilum* sp. nov. (Dinophyceae), two dinoflagellates symbiotic with Cnidaria. *J. Phycol.*, 48:1380-1391.
- LaJeunesse T. C., Parkinson J. E., Gabrielson P. W., Jeong H. J., Reimer J. D., Voolstra, C. R. y Santos S. R. (2018). Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr. Biol.*, 28:2570-2580.
- LaJeunesse T. C., Smith R., M. Walther, Pinzón J., Pettay D. T., McGinley M., Aschaffenburg M., Medina-Rosas P., Cupul-Magaña A. L., López-Pérez A., Reyes-Bonilla H., y Warner M. E. (2010). Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proc. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci.*, 277: 2925-2934.
- Leggat W., Whitney S. y Yellowlees D. (2004). Is coral bleaching due to the instability of the zooxanthellae dark reactions? *Symbiosis*, 37:137-153.
- Lesser M. P. (2007). Coral reef bleaching and global climate change: Can corals survive the next century? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104:5259-5260.
- Lesser M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68:253-278.
- Lin C. H., Yeh S. H., Lu K. T., Leu T. H., Chang W. C. y Gean P. W. (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, 31:841-851.
- Lindquist S. (1986). The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55:1151-1191.
- Lundin B., Hansson M., Schoefz B., Vener A. V. y Spetea C. (2007). The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *Plant J.*, 49:528-539.

Maruyama K., Fukasaka M., Uematsu S., Takeuchi O., Kondo T., Saitoh T., Martino M. M. y Akira S. (2015). 5-Azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival. *J. Biol. Chem.*, 290:9377-9386.

Mayer M. P. y Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62:670-684.

McGinty E. S., Pieczonka J. y Mydlarz L. D. (2012). Variations in reactive oxygen release and antioxidant activity in multiple *Symbiodinium* types in response to elevated temperature. *Microb. Ecol.*, 64:1000-1007.

McLaughlin J. J., Zahl P. A. y Henry S. M. (1966). Endozoic algae. En: *Symbiosis* (ed Henry S. M.), Academic Press, New York, 1:257-297.

Mehler A. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33(1): 65-77.

Melis A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage? *Trends Plant Sci.*, 4:130-135.

Melnyk A., Rieger H. y Zimmermann R. (2015). Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum. *Subcell. Biochem.*, 78:179-200.

Mimura N., Hamada H., Kashio M., Jin H., Toyama Y., Kimura K., Iida M., Goto S., Saisho H., Toshimori K., Koseki H. y Aoe T. (2007). Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP. *Cell Death Differ.*, 14:1475-1485.

Mitsuru J., Yanohara T., Koike K., Sakai K., Muramoto K. y Kamiya H. (2000). The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellate. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 125:227-236.

Morgner N., Schmidt C., Beilsten-Edmands V., Ebong I., Patel N. A., Eugenia M., Clerico E. M., Kirschke E., Daturpalli S., Jackson S. E., Agard D. y Robinson C. V. (2015). Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90. *Cell Rep.*, 11:759-769.

Müller P., Ruckova E., Halada P., Coates P. J., Hrstka R., Lane D. P. y Vojtesek B. (2013). C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*, 32:3101-3110.

Munro S. y Pelham H. R. (1987). Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell*, 48:899-907.

- Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y. y Allakhverdiev S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1767:414-421.
- Muscatine L. (1967). Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control on the host. *Science*, 156:516-519.
- Muscatine L. y Porter J. W., (1977). Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *BioScience*, 27:454-460.
- Niedzwiedzki D. M., Liu H., Chen M. y Blankenship R. E. (2014). Excited state properties of chlorophyll. *Photosynth. Res.*, 121:25-34.
- Nishiyama S. I., Allakhverdiev N. y Murata. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757:742-749.
- Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S. I., Inaba M., Yokota A. y Murata N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.*, 20:5587-5594.
- Nitika y Truman A. W. (2017). Cracking the chaperone code: Cellular roles for Hsp70 phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.*, 42:932-935.
- O'Regan L., Sampson J., Richards M. W., Knebel A., Roth D., Hood F. E., Straube A., Royle S. J., Bayliss R. y Fry A. M. (2015). Hsp72 is targeted to the mitotic spindle by Nek6 to promote K-fiber assembly and mitotic progression. *J. Cell Biol.*, 209:349-358.
- Otero J. H., Lizák B. y Hendershot L. M. (2010). Life and death of a BiP substrate. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21:472-478.
- Pandolfi J. M., Connolly S. R., Marshall D. J. y Cohen A. L. (2011). Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. *Science*, 333:418-422.
- Pawlowski J., Holzmann M., Berney C., Fahrni J., Gooday A. J., Cedhagen T., Habura A. y Bowser S. S. (2003). The evolution of early foraminifera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:11494-11498.
- Pawlowski J., Holzmann M., Fahrni J., Pochon, X. y Lee J. J. (2001). Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *J. Euk. Microbiol.*, 48:368-373.
- Pelham H. R. B. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.*, 15:483-486.

- Preissler S. y Ron D. (2018). Early events in the endoplasmic reticulum unfolded protein response (UPR). *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 1:11.
- Renner T. y Waters E. R. (2007). Comparative genomic analysis of the Hsp70s from five diverse photosynthetic eukaryotes. *Cell Stress Chaper.*, 12:172-185.
- Rose M. D., Misra L. M. y Vogel J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, 57:1211-1221.
- Rosic N. y Dove S. (2011). Micosporine-like amino acids from coral dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:8478-8486.
- Rowan R. y Knowlton N. (1995). Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92:2850-2853.
- Rowan R. y Powers D. A. (1992). Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:3639-3643.
- Roy S. y Morse D. (2013). Transcription and maturation of mRNA in dinoflagellates. *Microorganisms*, 1:71-99.
- Saidi Y., Finka A., Muriset M., Bromberg Z., Weiss Y. G. y Maathuis F. J. M. (2009). The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell*, 21:2829-2843.
- Santos S. R., Gutierrez-Rodriguez C., Lasker H. R. y Coffroth M. A. (2003). *Symbiodinium* sp. associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: high levels of genetic variability and population structure in symbiotic dinoflagellates. *Mar. Biol.*, 143:111-120.
- Satoh M., Nakai A., Sokawa Y., Hirayoshi K. y Nagata K. (1993). Modulation of the phosphorylation of glucose-regulated protein, GRP78, by transformation and inhibition of glycosylation. *Exp. Cell Res.*, 205:76-83.
- Schoenberg D. A. y Trench R. K. (1980). Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and its specificity in its symbiosis with marine invertebrates. II. Morphological variation in *Symbiodinium microadriaticum*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 207:429-444.
- Schroda M. (2004). The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: Chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth. Res.* 82:221-240.
- Shi L. X. y Theg S. M. (2010). A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 22:205-220.

Smith D. J., Suggett D. J. y Baker N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Glob. Chang. Biol.*, 11:1-11.

Somers D. E., Devlin P. F. y Kay S. A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 282:1488-1490.

Sørensen J. G., Kristensen T. N. y Loeschcke V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6:1025-1037.

Stat M., Carter D. y Hoegh-Guldberg O. (2006). The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts-symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, 8:23-43.

Steidinger K. A. (1983). A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. En: *Progress in phycological Research 2*. Elsevier Science Publishers (eds Round/Chapman), pp. 147-188.

Suggett D. J., Warner M. E., Smith D. J., Davey P., Hennige S. y Baker N. R. (2008). Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by *Symbiodinium* (Pyrrophyta) phylotypes with different thermal tolerances. *J. Phycol.*, 44:948-956.

Takahashi S. y Murata N. (2006). Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757:198-205.

Takahashi S. y Murata N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.*, 13:178-182.

Takahashi S. y Murata N. (2005). Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of photosystem II from photodamage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1708:352-361.

Takahashi S., Nakamura T., Sakamizu M., Van Woesik R. y Yamasaki H. (2004). Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant Cell Physiol.*, 45:251-255.

Takahashi S., Whitney S. M. y Badger M. R. (2009). Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured *Symbiodinium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106:3237-3242.

Takahashi S., Whitney S., Itoh S., Maruyama T. y Badger M. (2008). Heat stress causes inhibition of the *de novo* synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105:4203-4208.

Tal M, Silberstein A, Nusser E. (1985). Why does coomassie brilliant blue R interact differently with different protins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* 260:9976-9980.

Tchernov D., Gorbunov M. Y., de Vargas C., Yadav S. N., Milligan A. J., Haggblom M. y Falkowski P. G. (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101:13531-13535.

Trench R. K. (1997). Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. En: *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Symposium* (eds Lessios H. A. y Macintyre I. G.) vol 2 pp. 1275-1286. Smithsonian Tropical Research Institute, Panama.

Trench R. K. (1979). Cell biology of plant-animal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 30:485-531.

Truman L. A., Bentley K. L., Smith E. C., Massaro S. A., Gonzalez D. G. y Haberman A. M. (2012). ProxTom lymphatic vessel reporter mice reveal Prox1 expression in the adrenal medulla, megakaryocytes, and platelets. *Am. J. Pathol.*, 180:1715-1725.

Villanueva M. A. (2008). Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly metanol-free transfer buffer. *Anal. Biochem.*, 373:377-379.

Wang L. H., Liu Y. H., Ju Y. M., Hsiao Y. Y., Fang L. S. y Chen C. S. (2008). Cell cycle propagation is driven by light-dark stimulation in a cultured symbiotic dinoflagellate isolated from corals. *Coral Reefs*, 27:823-835.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. y Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.*, 9:244-252.

Warner M. E., Fitt W. K. y Schmidt G. W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96:8007-8012.

Warner M. E., Fitt W. K. y Schmidt G. W. (1996). The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral: A novel approach. *Plant Cell Environ.*, 19:291-299.

Williamson A.K. (2008). Structural and functional aspects of the MSP (PsbO) and study of its differences in thermophilic versus mesophilic organisms. *Photosynth. Res.*, 98:365-389.

Wu C. (1995). Heat shock transcription factors: Structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11:441-469.

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

XII. ANEXO DE PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



Phosphorylation/dephosphorylation response to light stimuli of *Symbiodinium* proteins: specific light-induced dephosphorylation of an HSP-like 75 kDa protein from *S. microadriaticum*

Raúl E. Castillo-Medina^{1,2}, Tania Islas-Flores² and Marco A. Villanueva²

¹ Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

² Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM, Puerto Morelos, Quintana Roo, México

ABSTRACT

Background. Some genera of the family Symbiodiniaceae establish mutualistic endosymbioses with various marine invertebrates, with coral being the most important ecologically. Little is known about the biochemical communication of this association and the perception and translation of signals from the environment in the symbiont. However, specific phosphorylation/dephosphorylation processes are fundamental for the transmission of external signals to activate physiological responses. In this work, we searched phosphorylatable proteins in amino acids of Ser, Thr and Tyr from three species of the family Symbiodiniaceae, *Symbiodinium kawagutii*, *Symbiodinium* sp. Mf11 and *Symbiodinium microadriaticum*.

Methods. We used specific antibodies to the phosphorylated aminoacids pSer, pThr and pTyr to identify proteins harboring them in total extracts from three species of *Symbiodinium* in culture. Extractions were carried out on logarithmic phase growing cultures under a 12 h light/dark photoperiod. Various light/dark, nutritional and other stimuli were applied to the cultures prior to the extractions, and proteins were subjected to SDS-PAGE and western immunoblotting. Partial peptide sequencing was carried out by MALDI-TOF on specific protein spots separated by 2D electrophoresis.

Results. At 4 h of the light cycle, several Thr-phosphorylated proteins were consistently detected in the three species suggesting a genus-dependent expression; however, most Ser- and Tyr-phosphorylated proteins were species-specific. Analysis of protein extracts of *S. microadriaticum* cultures demonstrated that the level of phosphorylation of two Thr-phosphorylated proteins with molecular weights of 43 and 75 kDa, responded inversely to a light stimulus. The 43 kDa protein, originally weakly Thr-phosphorylated when the cells were previously adapted to their 12 h dark cycle, underwent an increase in Thr phosphorylation when stimulated for 30 min with light. On the other hand, the 75 kDa protein, which was significantly Thr-phosphorylated in the dark, underwent dephosphorylation in Thr after 30 min of the light stimulus. The phosphorylation response of the 43 kDa protein only occurred in *S. microadriaticum*, whereas the dephosphorylation of the 75 kDa protein occurred in the three species studied suggesting a general response. The 75 kDa protein was separated on 2D gels as two isoforms and the sequenced spots corresponded to a BiP-like protein of the

Submitted 4 March 2019
Accepted 3 July 2019
Published 12 August 2019

Corresponding author
Marco A. Villanueva,
marco@cmarl.unam.mx

Academic editor
Vladimir Uversky

Additional Information and
Declarations can be found on
page 15

DOI 10.7717/peerj.7406

© Copyright
2019 Castillo-Medina et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Castillo-Medina RE, Islas-Flores T, Villanueva MA. 2019. Phosphorylation/dephosphorylation response to light stimuli of *Symbiodinium* proteins: specific light-induced dephosphorylation of an HSP-like 75 kDa protein from *S. microadriaticum*. *PeerJ* 7:e7406 <http://doi.org/10.7717/peerj.7406>

HSP70 protein family. The presence of differential phosphorylations on these proteins after a light stimulus imply important light-regulated physiological processes in these organisms.

Subjects Biochemistry, Cell Biology, Marine Biology, Microbiology

Keywords Light-regulation, Phosphorylation, Dephosphorylation, Signal-transduction, *Symbiodinium*, Coral reefs

INTRODUCTION

The dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* are photosynthetic microorganisms that live either freely in the sea or captured within a mutualistic symbiotic relationship in the tissues of some marine invertebrates. In both their free and symbiotic stages, they require fine sensing mechanisms to respond to changing light conditions and other stimuli from the environment that trigger signal-transduction pathways. Such signaling cascades must function with particular sets of receptor, adapter and effector proteins. One particular and fundamental switch to turn on and off signaling within the cell is through exquisitely regulated phosphorylation and dephosphorylation reactions via protein kinases and phosphatases, respectively, on key target molecules. Protein kinases are involved in all cellular functions, and in eukaryotic organisms belong to a superfamily formed by hundreds to thousands of copies. The larger protein kinase repertoire is encoded by flowering plants (600–2,500 members; over 1,000 were identified in the *Arabidopsis thaliana* genome), while a smaller number of related genes (only 518 plus 106 pseudogenes) were identified in the human genome (*The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Manning et al., 2002; Lehti-Shiu & Shiu, 2012*). In *Symbiodinium* however, the kinase domains are the second most abundant domains in the so far sequenced genomes, with 869 sequences (Pfam PF00069) showing a potential kinase activity (*González-Pech, Ragan & Chan, 2017; Liu et al., 2018*). This abundance highlights the fundamental regulatory functions of the protein kinase superfamily. For example, 177 transcripts from more than 20 serine/threonine-protein kinase families significantly changed their expression levels when *Symbiodinium* sp. (clade F, ITS2) was thermally stressed (*Giertz, Forêt & Leggat, 2017*). In another example, the general dephosphorylation of PSII proteins under stress conditions plays an important regulatory role; that is, the dephosphorylation of the D1 and D2 proteins leads to their proteolytic degradation within the PSII repair cycle in response to light stress (*Aro & Ohad, 2003; Baena-Gonzalez, Barbato & Aro, 1999; Rintamaki, Kettunen & Aro, 1996*). Additionally, a rapid dephosphorylation of the proteins of the PSII reaction center seems to be a regulatory reaction to water stress in the photosynthetic membranes of plants (*Liu et al., 2009*). On the other hand, it is believed that the dephosphorylation of LHCII promotes the association with the PSII to prevent its lateral migration within the thylakoid membrane (*Vener, 2007*), thus maintaining the LHCII *in situ* for further degradation (*Liu et al., 2009*). These reactions occur through sensing environmental signals by specific receptors at the cell membrane, transducing the signals through adapter/mediator proteins which subsequently

turn targets on and off by interaction and/or phosphorylation/dephosphorylation, to finally reach their effectors.

Photoreceptors are widely used by organisms to detect and respond to their light environment. Several putative photoreceptors, including phytochromes, cryptochromes, phototropins and rhodopsins, have been identified in the *Symbiodinium* transcript (Xiang et al., 2015). Cryptochromes are receptors for flavoproteins that are sensitive to blue light. They are found in plants, animals, insects, fungi and bacteria (Chaves et al., 2011), and have recently been shown to respond to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii* (Beel et al., 2012). Studies in animals and plants suggest that cryptochromes play a critical role in the generation and maintenance of circadian rhythms (Chaves et al., 2011). It is possible that *Symbiodinium* cryptochromes are involved in the circadian control of several light sensitive processes (Jones & Hoegh-Guldberg, 2001; Sorek et al., 2014), especially because blue is the main type of light that penetrates the water column in the oceans. Unfortunately, no detailed information on the possible light-sensing mechanisms and/or consequent signaling cascades in marine dinoflagellates is available.

Since there is very little information from the genus *Symbiodinium* regarding proteins that participate in key phosphorylation processes for signal-transduction events that arise from environmental stimuli, we sought to identify phosphorylated proteins from *S. kawagutii*, *S. microadriaticum* and *S. Mf11*. We identified a 75 kDa protein that was susceptible of changes in its phosphorylation levels upon a light stimulus. Our findings indicate that light is an important switch that impacts the phosphorylation status of several proteins in *Symbiodinium*. In particular, the 75 kDa protein may be regulated through putative conserved regulatory mechanisms of phosphorylation/dephosphorylation since its presence and light-stimulated dephosphorylation response were found in all three *Symbiodinium* species analyzed.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and reagents

Polyclonal anti-phosphothreonine (anti-pThr cat. 9381S) and anti-phosphoserine (anti-pSer cat. 2261S) antibodies were from Cell Signaling Technology™, Inc. (Danvers, MA). Monoclonal anti-phosphotyrosine antibodies (anti-pTyr sc-508) were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Monoclonal anti-actin antibody N350 was from Amersham; this antibody is commercially discontinued but we still maintain an available stock (Villanueva, Arzápalo-Castañeda & Castillo-Medina, 2014). Alkaline-phosphatase (AP) conjugated polyclonal anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG antibodies raised in goat were from Zymed™ -Life Technologies (Grand Island, NY). The tripeptides RAD (Arg-Ala-Glu) or RGD (Arg-Gly-Glu) were from CALBIOCHEM®-Millipore (Billerica, MA, USA). Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-NNN'N'-tetraacetic acid (EGTA), bovine casein hydrolyzate (N-Z-Amine A), and the amino acids, glutamic acid, arginine and glycine, were all from Sigma. Reagents 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT) were from Promega (Madison, WI, USA).

Symbiodinium cell cultures

Dinoflagellate cultures of *Symbiodinium kawagutii* (referred as *S. kawagutii*) were a kind gift of Dr. Robert K. Trench (University of California at Santa Barbara). *Symbiodinium* sp. Mf11.5b.1 (referred as *S. Mf11*), and *Symbiodinium microadriaticum* Subsp. *microadriaticum* (also known as MAC-CassKB8 and from now on referred to as *S. KB8*) originally isolated from the jellyfish *Cassiopea xamachana*, were a kind gift of Dr. Mary Alice Coffroth (State University of New York at Buffalo). These cell lines correspond to clades F, B and A, respectively; they were routinely maintained in our laboratory in ASP-8A medium under photoperiod cycles of 12 h light/dark at 25 °C. Light intensity was maintained at 80–120 $\mu\text{mole quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Preparation of total protein extracts for phospho protein screening and responses to stimuli

Six-d-old *Symbiodinium* cells in ASP-8A culture medium were collected 4 h after the light phase of the photoperiod initiated, and were concentrated by centrifugation at 1,400 \times g for 8 min. The cell pellet was suspended with 500 μl of 1 \times Laemmli buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% (v/v) glycerol, 3% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue) (Laemmli, 1970), supplemented with 0.2 mM NaVO_3 , 10 mM NaPPI and a cocktail of protease inhibitors (Complete®; Roche, Basel, Switzerland), and placed in screw-cap polypropylene vials with a 0.25 ml total volume of glass beads (465–600 μm diameter) previously cooled. Subsequently, the cells were lysed with vigorous shaking in a MINI-BEAD BEATER™ (Biospec products) at maximum speed for 3 min. Then, the cell lysate was heated at 95 °C for 5 min, and centrifuged at 16,000 \times g for 10 min. The supernatant was used for analysis in polyacrylamide gels by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and western blot.

Protein electrophoresis in SDS-PAGE gels and western blot

The protein extracts were separated in discontinuous denaturing gels (Laemmli, 1970), of 10% polyacrylamide in the separation zone [375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 10% acrylamide/bis-acrylamide; 0.1% SDS; 0.1% ammonium persulfate (APS); 0.106% N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)], and 4% polyacrylamide in the stacking zone [125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% acrylamide; 0.137% bisacrylamide; 0.1% SDS; 0.1% APS; 0.066% TEMED], in a Mini-PROTEAN®3 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, the proteins were transferred to PVDF membranes in “friendly buffer” (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 10% isopropanol, Villanueva, 2008) at a constant current of 300 mA for 1 h. The membranes were blocked in a solution of 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS (2.79 mM NaH_2PO_4 , 7.197 mM Na_2HPO_4 , 136.9 mM NaCl, pH 7.5) for 1 h at 50 °C, with gentle agitation. After blocking, the primary antibodies, anti-pThr (1:2,500), anti-pSer (1:500), anti-pTyr (1:500) or anti-actin (1:1,000) diluted in PBS containing 0.01% Triton X-100 (PBS-T), were added to the membranes and incubated overnight with gentle rocking at room temperature. Then, the membranes were washed five times, 5 min each, in PBS-T, and incubated with the appropriate secondary antibodies (alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse

IgG) at 1:2,500 dilution for 2 h at room temperature. Subsequently, the membranes were washed again five times, 5 min with PBS-T. Finally, they were developed with a commercial solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT) according to the manufacturer (Promega, Madison, WI, USA) in PBS-T for the primary polyclonal antibodies to ensure more astringency and less background. In the case of primary monoclonal antibodies, the final wash was followed by a brief rinse with alkaline developing solution (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9), and development in the same buffer. Western blot incubations, washing and development were also carried out in PBS-T or TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.01% TX-100, pH 7.6) with identical results.

Two-dimensional gel electrophoresis and partial peptide sequencing

Six-d-old cell cultures of *S. KB8* collected 2 h before the dark phase of the photoperiod, were concentrated by centrifugation and suspended in 50 ml of fresh ASP-8A medium. After a 12 h incubation in the dark, the cells were precipitated by centrifugation at 2,600×g, 5 min, 26 °C and suspended in 10 ml of 0.2 mM NaVO₃ and 10 mM NaPPI in PBS-T added with a Complete® (Roche, Basel, Switzerland) cocktail of protease inhibitors, taking special care to carry out the whole procedure under dark conditions. The cells were then disrupted with a French press (SLM-AMINCO French® pressure cell press) at a pressure of 20,000 psi. Then, the cell lysate was chilled on ice and centrifuged at 100,000×g, 1 h to recover the proteins from the supernatant.

Next, the protein pellet was dissolved with seven volumes of PB (2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, pH 7.6) and applied to a column with 1 ml matrix volume of DEAE-sephacel previously equilibrated with 50 ml 0.02 M NaCl in PB. Then, the column was washed with 10 ml of the same buffer and eluted with 2 ml of 0.4 M NaCl in PB. The eluted proteins were precipitated with 8 volumes of cold acetone (at -20 °C), and one volume of trichloroacetic acid (TCA) for 1 h at -20 °C. Then, the mixture was centrifuged at 5,000×g for 5 min and the protein pellet was washed twice with 2 ml of acetone at -20 °C. Afterwards, the proteins were dissolved in BioRad® ReadyPrep buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% w/v ampholytes 3/10 BioLite® from BioRad and bromophenol blue), and the solution was used to hydrate a 7 cm IPG strip (ReadyStrip pH 4-7; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 12 h at 18 °C. Then, the proteins adsorbed in the strip were separated with a programmed current of 250 V, 20 min, 4,000 V, 2 h and 4,000 V to cover 10,000 V-h in a PROTEAN IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA). Subsequently, the proteins in the strips were first denatured in 1.5 ml of Buffer I® (Bio-Rad; 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol and 2% w/v DTT) for 15 min, and then in 1.5 ml of Buffer II® (Bio-Rad; 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol added with 2.5% w/v iodoacetamide) for 15 min. Then, the strip was briefly rinsed in running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3.) and loaded onto a 10% polyacrylamide SDS-PAGE gel to separate the proteins in the second dimension. Finally, the proteins were either stained with colloidal coomassie blue, or transferred onto a PVDF membrane for analysis with anti-pThr antibodies. The gel spots corresponding to the anti-pThr immunodetected signal were excised with a pipet tip, placed in a sterile

pendorf tube with 50 μ L milliQ water, and sent for partial peptide sequencing to the Unit of Proteomics of the Institute of Biotechnology from UNAM in Cuernavaca, Morelos, México. Each spot was also reanalyzed by western blot with the anti-pThr antibodies to ensure their identity. In parallel, an adjacent mock spot corresponding to a major Mr \sim 77 kDa protein was included as negative control for the analysis. The most probable sites of phosphorylation in threonine from the sequences were predicted by the NetPhosK server (Blom et al., 2004).

Light treatments on *Symbiodinium* cells adapted to darkness

Six-d-old cultures from *S. KB8*, *S. Mf11* and *S. kawagutii* from three biological replicates collected 2 h before the dark phase of the photoperiod, were concentrated and suspended in 40 ml of fresh ASP-8A medium to reach $0.8\text{--}1.4 \times 10^6$ cells/ml. Equal aliquots of each phylotype were placed in four 15 ml Falcon tubes wrapped with aluminum foil. The cells in the tubes were allowed to adapt in the dark (12 h) during their night cycle. After this period, the cells from one of the tubes were concentrated and broken with glass beads without exposing them to light throughout the process (control), and the other three tubes were released from the aluminum foil to expose them to light. Protein extractions with glass beads were performed at 30, 60 and 240 min after light exposure, and the supernatant from the lysate was heated at 95 $^{\circ}$ C, 5 min, and used for the analysis. Equal loads of proteins were adjusted with equal aliquots of cells and also standardized by staining with coomassie blue in 10% polyacrylamide SDS-PAGE gels. Finally, the extracts were analyzed by western blot which included actin as an additional internal loading control. The bands from the triplicate samples were captured with a ChemiDoc-It2 Imager (UVP-Analytik Jena, Upland, CA, USA) and analyzed by densitometry with the system's VisionWorks LS software, normalized with the internal actin control to obtain an arbitrary level of intensity for each antibody reaction. The results were integrated into graphs displaying the average band intensity of the three biological replicates for each treatment.

Treatments of *Symbiodinium* cells with various stimulating agents

Six-d-old *S. KB8* cells from a 1 L culture were collected by centrifugation at $1,400\times g$ for 8 min, and suspended in 10 ml fresh medium, they were then divided into 9 aliquots of 1 ml in 15 ml Falcon tubes. The cells were concentrated again by centrifugation as above and the pellets were resuspended in: (a) 10 ml of fresh ASP-8A medium (control); or (b) 10 ml fresh medium supplemented with either 0.1% (w/v) casein, 10 mM glycine, 10 mM arginine, 10 mM glutamic acid, 100 μ g/ml of the tripeptides RAD (Arg-Ala-Glu), RGD (Arg-Gly-Glu) (CALBIOCHEM®; Millipore, Billerica, MA, USA), 15 mM EGTA (ethylene glycol-bis (2-aminoethylene)-NNN'-tetra acetic acid), or 20 mM CaCl_2 . All samples were incubated for 30 min at room temperature and after the incubations, the cells were concentrated by centrifugation followed by protein extraction with glass beads using the Bead Beater. Equal loads of proteins were analyzed by protein staining on SDS-PAGE and western blot with anti-pThr antibodies.

RESULTS

Anti-pTyr, -pSer and -pThr antibodies immunodetect several phosphoproteins from *S. kawagutii*, *S. KB8* and *S. Mf11* total extracts

Protein extracts from the three phylotypes under study were analyzed with the three anti-phosphoaminoacid antibodies by western blot. Anti-pTyr antibodies revealed intense bands with Mr ~32 kDa in all three species (asterisk in Fig. 1C, lanes 1–3, respectively, and Fig. S1C), whereas species-specific bands of Mr's ~43, 57, 62 and 77 kDa were observed for *S. KB8* (Fig. 1C, lane 1, and Fig. S1C, lane 1); of Mr's ~30 and 54 kDa for *S. Mf11* (Fig. 1C, lane 2, and Fig. S1C, lane 2); and of Mr's ~48, 51 and 79 kDa for *S. kawagutii* (Fig. 1C, lane 3, and Fig. S1C, lane 3), indicating that these bands corresponded to proteins phosphorylated on Tyr residues but were not ubiquitous, except for the Mr ~32 kDa protein. Anti-pSer antibodies revealed intense bands with Mr ~65 kDa in all three species (Fig. 1B, asterisk in lanes 1–3, and Fig. S1B, lanes 1–3), and a weaker Mr ~35 kDa band also in the three species analyzed (asterisk in Fig. 1B, lanes 1–3, and Fig. S1B, lanes 1–3). A relatively high number of weaker bands both ubiquitous and species-specific, were also detected with these antibodies in the three species analyzed (Fig. 1B, lanes 1–3, and Fig. S1B, lanes 1–3). These results indicated that a considerable number of proteins from all three species were phosphorylated on Ser residues. Finally, anti-pThr antibodies revealed several phospho proteins that were present in all three species analyzed. Here, we observed weak bands of Mr's ~43, 46, 50 and 55 kDa (asterisks in Fig. 1A, lanes 1, 2 and 3), and two clear bands with Mr's ~75 (double asterisk in Fig. 1A, lanes 1–3, and Fig. S1A, lanes 1–3) and 91 kDa (asterisk in Fig. 1A, lanes 1–3, and Fig. S1A, lanes 1–3). Additionally, the anti-pThr antibodies detected a clear band of Mr ~29 kDa present in *S. KB8* and *S. Mf11* (Fig. 1A, lanes 1 and 2, and Fig. S1A, lanes 1 and 2) as well as a clear Mr ~31 kDa protein band present only in *S. kawagutii* (Fig. 1A, lane 3, and Fig. S1A, lane 3), and a Mr ~107 kDa protein band present only in *S. KB8* (Fig. 1A, lane 1, and Fig. S1A, lane 1). All the proteins found to cross-react with the anti-phospho amino acid antibodies and their corresponding Mr's are shown in Fig. S1. These data indicated: (a) the presence of proteins also phosphorylated on Thr residues; and (b) that there were phosphorylated proteins on the amino acids Tyr, Ser and Thr, in all three *Symbiodinium* species. One protein of Mr ~75 kDa, which at this point we named pp75, fulfilled our criteria of being present in all three species and presenting a clear reproducible reaction upon developing by western blot. Therefore, we chose to further analyze this protein for possible changes upon treatment of the cells with light/dark and other stimuli.

Some phosphorylated proteins in threonine responded to a light stimulus

Analysis by western blot with anti-pThr in cells from all three species adapted to darkness during the dark phase of the 12-h photoperiod showed that pp75 maintained a considerable degree of apparent phosphorylation under this condition (Figs. 2A–2C, lanes 1; arrow labeled 75). Conversely, when the cells were stimulated with light for 30 min and analyzed by western blot, the intensity of pp75 decreased significantly (Figs. 2A–2C, lanes 2; arrow labeled 75). The weak intensity of the band was maintained even after 60 and 240 min

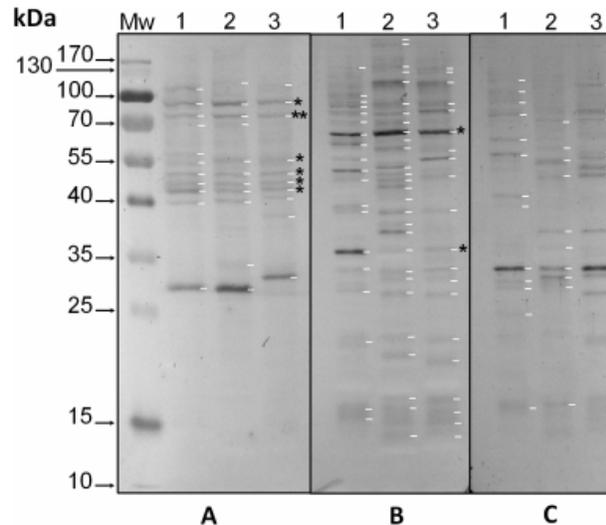


Figure 1 Immunodetection by western blot of phospho amino acids present in proteins of three species of *Symbiodinium* with anti-pThr (A), anti-pSer (B) and anti-pTyr (C) antibodies. In the figure, the lanes correspond to: molecular weight markers (Mw); protein extracts of *Symbiodinium* KB8 (lanes 1), *Symbiodinium* Mf11 (lanes 2) and *Symbiodinium kawagutii* (lanes 3). The asterisks within the figure indicate protein bands immunodetected in all three species and the arrows to the left indicate the relative molecular weights in kDa. pp75 is denoted with a double asterisk in A.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7406/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.7406/fig-1)

of exposure to light (Figs. 2A–2C, lanes 3 and 4, respectively; arrow labeled 75). These results indicated that this protein, during the dark phase, is significantly phosphorylated on Thr; however, it dephosphorylates after 30 min of a “shock” of light and remains dephosphorylated for at least 240 min of such light exposure. Interestingly, the opposite behavior was clearly observed for a Mr ~43 kDa protein only in *S. KB8* cells before the light stimulus. This protein was not observed as phosphorylated in Thr when the cells were adapted to darkness (Fig. 2A, lane 1; arrow labeled 43). However, after 30 min of light exposure, the anti-pThr antibodies detected an intense band, indicating an enhanced phosphorylated state (Fig. 2A, lane 2; arrow labeled 43), which was maintained even after 60 and 240 min of exposure to light (Fig. 2A, lanes 3 and 4, respectively; arrow labeled 43). Species-specific light-stimulated phosphorylation behaviors were observed for a number of proteins immunodetected with anti-pThr antibodies. One Mr ~29 kDa protein with similar behavior was detected in *S. KB8* and *S. Mf11* (Fig. 2A and B, lanes 1–4; arrow labeled 29), two of Mr’s ~40 and 107 kDa in *S. KB8* (Fig. 2A, lanes 1–4; arrows labeled 40 and 107, respectively); and finally, one of Mr ~31 kDa from *S. kawagutii* (Fig. 2C, lanes 1–4; arrow labeled 31). The dephosphorylation of pp75 on Thr was consistently and reproducibly observed in cells from all three species when the light stimulus was applied in comparison to the cells adapted to darkness before the stimulus. The revealed bands

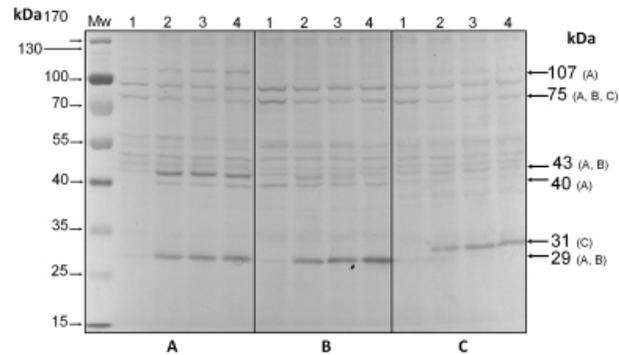


Figure 2 Immunodetection by western blot with anti-pThr antibodies of pp75 from *in vitro* cultures of *Symbiodinium* KB8 (A), *Symbiodinium* Mf11 (B) and *Symbiodinium kawagutii* (C), incubated for 12 h in darkness (lanes 1) and after stimulation with light for 30 (lanes 2), 60 (lanes 3) and 240 (lanes 4) min.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7406/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.7406/fig-2)

were specific and the whole membrane showed specific reactions of the 75 and 43 kDa bands upon development of the blot (Fig. 2). In both cases, we quantified the response by densitometric analysis of the blots using triplicate biological samples and the intensity of the bands was normalized to the reaction of an anti-actin monoclonal antibody as internal control. The results were normalized, averaged, subjected to ANOVA, and graphed. In all cases, a statistically significant decrease in the phosphorylation level of pp75 in at least one time point after the light treatment was detected for all three species analyzed (Fig. 3A; *S. KB8*, lane 3; *S. Mf11*, lanes 2 and 3; *S. kw*, lane 4). The same analysis was carried out on the 43 kDa protein with similar results showing the opposite behavior for *S. KB8* but not for the other two species (Fig. 3B). Although we cannot assure that they are the same as the 43 kDa protein that responds to light in *S. KB8*, Mr ~43 kDa proteins from *S. Mf11* and *S. kawagutii* cells, also recognized by the anti-pThr antibodies did not change their level of apparent phosphorylation after equivalent times after the light stimulus (Figs. 2B and 2C, lanes 2–4; Fig. 3B, *S. Mf11* and *S. kw*, respectively), compared to the control (cells adapted to darkness, Fig. 2B and C, lanes 1; Fig. 3B, *S. Mf11* and *S. kw*, respectively). This indicated that the Mr ~43 kDa protein may have a species-specific behavior and only pp75 fulfilled the criterion of ubiquity in at least all three *Symbiodinium* species analyzed.

Threonine-phosphorylated proteins from *S. KB8* did not show differential phosphorylation in response to other stimuli

In addition to light, we sought to stimulate *S. KB8* cells in culture in order to observe possible changes in phosphorylation levels of proteins and relate those changes with other metabolic or signal-transduction pathways. Nevertheless, no changes were detected upon any of the treatments. None of the nutritional stimuli provided by incubation with the amino acids: glycine, arginine, glutamate, or a casein hydrolyzate caused significant changes in the degree of apparent phosphorylation in Thr of any protein including pp75 (Fig. S3,

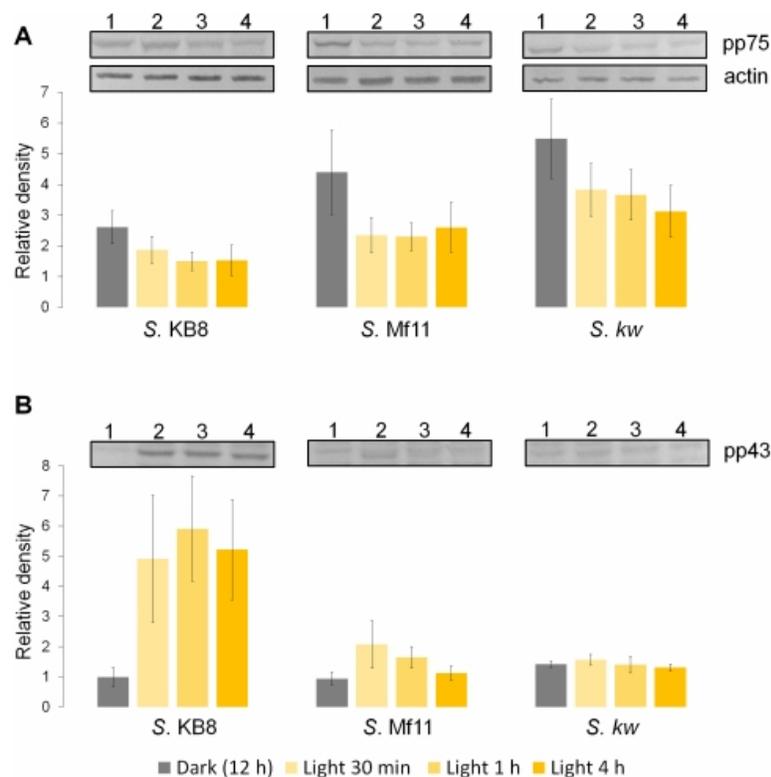


Figure 3 Changes in the phosphorylation level of three independent biological replicates determined by western blot and densitometric analysis with anti-pThr and anti-actin monoclonal antibodies (panel labeled “actin” shown as example) used as internal loading control for normalization. The figure shows the bands corresponding to pp75 (A), and the 43 kDa (B) protein from *in vitro* cultures of *Symbiodinium* KB8 (S. KB8), *Symbiodinium* Mf11 (S. Mf11) and *Symbiodinium kawagutii* (S. kw), after the cells were incubated for 12 h in darkness (lanes 1) and analyzed after light stimulation for 30 (lane 2), 60 (lane 3) and 240 (lane 4) min. The bars in the graphs represent the average of the relative density for each band normalized with the density of the actin band (panel labeled “actin”).

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7406/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.7406/fig-3)

lanes 2, 3, 4 and 5, respectively), compared to the control (Fig. S3, lane 1). In parallel, extracellular matrix stimuli were tested with the tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp), which is an inhibitor of the adhesion of integrins to their receptors. These RGD tripeptides did not cause any change on the phosphorylation of the analyzed proteins in S. KB8 cells (Fig. S3, lane 6), compared to the control without stimulation (Fig. S3, lane 1). As expected, the non-active tripeptide control RAD (Arg-Ala-Asp), did not cause any significant effect either (Fig. S3, lane 7). Finally, no alterations were observed in the phosphorylation pattern when the CaCl₂ concentration was increased in the medium (Fig. S3, lane 8), or when calcium ions were sequestered with EGTA (Fig. S3, lane 9), compared to the control (Fig. S3, lane 1).

These results support the role of specific pThr phosphorylation as part of a light-regulated response in *Symbiodinium*.

The threonine-phosphorylated 75 kDa protein from *S. KB8* is a BiP-like protein of the HSP70 protein family

The light-responding pp75 from *S. KB8* was enriched through anion exchange column chromatography on DEAE-sephacel and the eluted fraction precipitated with ice-cold acetone-TCA, followed by analysis and separation by two-dimensional gel electrophoresis as described in 'Materials and Methods'. The western blot of the separated proteins immunodetected with anti-PThr antibodies identified two Mr ~75 kDa phospho protein spots of pI's ~5.4 and 5.6 (Fig. 4A, spots 1 and 2, respectively), indicating the presence of at least two isoforms of pp75. Only a few spots corresponding to the Mr's of the phospho proteins previously immunodetected by the anti-PThr antibodies from *S. KB8* extracts (Fig. S1A, lane 1) were observed, whereas a complex mixture of proteins was observed in the equivalent coomassie blue-stained 2D gel (Fig. 4B, spots 1 and 2). In addition, the excised spots as well as an adjacent mock spot (Fig. 4B, M) corresponding to a major protein of similar Mr, were re-analyzed by western blot with anti-PThr antibodies and only the lanes corresponding to the phospho protein spots were immunostained (Fig. S4, lanes 1 and 2), while the mock spot showed no cross-reaction (Fig. S4, lane 3). Both spots were sent for a partial peptide sequencing service and the identity from either spot matched a BiP-like protein sequence belonging to the HSP70 protein family from the *S. microadriaticum* transcriptome with 100% identity (Fig. 4C, Spot 1 and 2 sequences in red; Accession No. OLP91134). It is important to note that the reported sequence displayed a putative molecular weight of >200 kDa for the translated product, while pp75 migrates at Mr ~75 kDa. Therefore, we analyzed this sequence further by comparing the corresponding genomic and transcriptomic sequences. This comparison revealed the correct start ATG and stop codons that resulted in the correctly translated product of 75 kDa. This corrected sequence is shown in Fig. 4C and it was used for a BLAST analysis against the *S. microadriaticum* transcriptome, which yielded at least other four related sequences encoding HSP70-like proteins (with long enough sequence showing relevant domains; accession numbers OLP05431, OLP79133, OLP80221 and OLP86850), and one likely related short sequence (Accession No. OLP81269). Three of these sequences, including pp75, corresponded to BiP-like proteins (Accession No's. OLP91134, OLP86850 and OLP81269). The sequence also contained 6 potential phosphorylated threonine residues (Fig. 4C, green Thr residues). These results indicated that the Mr ~75 kDa protein from *S. KB8* displaying differential phosphorylation on Thr upon a light stimulus was unequivocally identified as a BiP- or HSP70-like protein. Therefore, we renamed the protein as SmicHSP75.

DISCUSSION

Symbiodinium usually lives as endosymbiont in reef hosts (Muscatine & Porter, 1977). Due to its photosynthetic nature, it must rely on fine sensing mechanisms to respond to changing light conditions in its environment, which must also be transduced to molecular signals that become physiological responses. Phosphorylation and dephosphorylation events are major

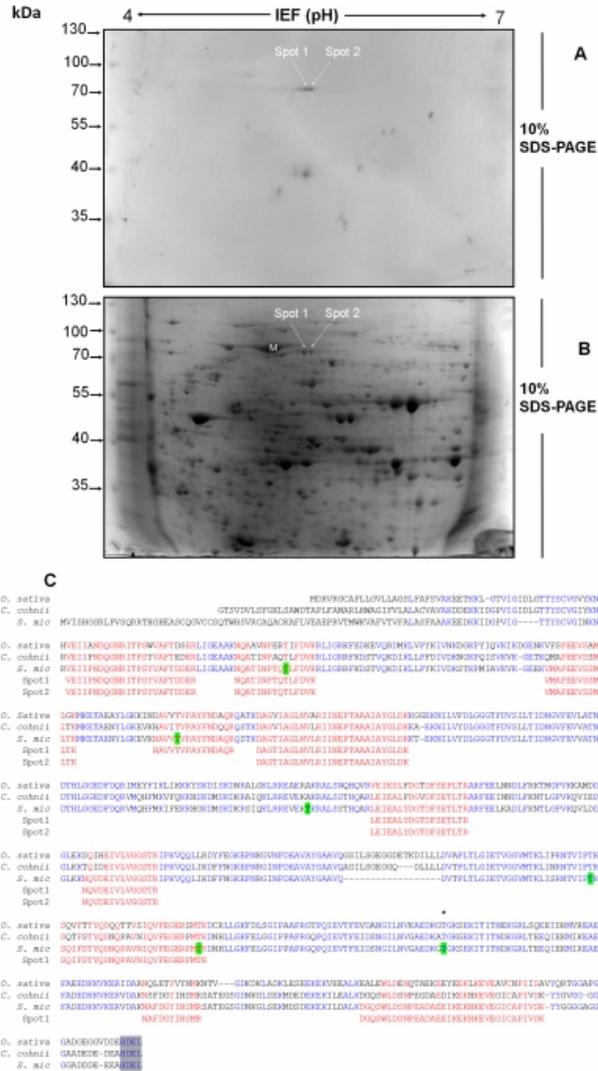


Figure 4 Separation by two-dimensional (2D) gel electrophoresis (IEF + SDS-PAGE) and immunodetection of SmicHSP75 from *S. KB8* enriched protein extracts for subsequent isolation and partial peptide sequencing. (A) Western blot of the resolved proteins on the 2D gel of DEAE-sephacel enriched extracts incubated after 12 h darkness. The two spots labeled spot 1 and spot 2 correspond to two SmicHSP75 isoforms of pI's 5.4 and 5.6, respectively. (B) An equivalent 2D gel stained with coomassie blue where the SmicHSP75 isoforms are located (spot 1 and 2, respectively). (continued on next page...)

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7406/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.7406/fig-4)

Figure 4 (...continued)

(C) Multiple alignment of the partial sequences of the peptides obtained from both spots with the HSP70/BiP sequences of *Oryza sativa* (accession number Q6Z7B0), *Cryptocodinium colnii* (accession number Q8S4R0), and *Symbiodinium microadriaticum* (*S. mic*; accession number OLP91134). The figure shows the motif of retention in the endoplasmic reticulum (Munro & Pelham, 1987) highlighted in gray and characteristic of the BiP; highlighted in green are the most probable sites of phosphorylation in threonine predicted by the NetPhosK server (Blom et al., 2004); in addition, the asterisk indicates a conserved phosphorylatable threonine presumably involved in protein synthesis regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Troya et al., 2011).

cellular switches that trigger cellular responses upon environmental stimuli and are likely to play an important role in such fine sensing mechanisms (Graves & Krebs, 1999). Since there is very little information regarding proteins that participate in key phosphorylation processes for signal-transduction events from the genus *Symbiodinium*, we sought to identify phosphorylated proteins on the amino acids, threonine, serine and tyrosine from three different *Symbiodinium* species, *S. kawagutii*, *S. KB8* and *S. Mf11*. We further sought to identify a protein that was susceptible of changes in its phosphorylation levels upon various types of stimulus. Several proteins containing phosphorylated amino acids were identified, although there were variations in the three species analyzed. Therefore, we chose to focus our analysis on proteins that fulfilled two criteria. First, that their cross-reaction with the antibody was clear and reproducible. Second, that their presence was not species-specific so that they were observed in all three species analyzed. Our first screening with anti-pThr, anti-pSer and anti-pTyr antibodies, revealed several candidate proteins (Fig. S1), indicating that phosphorylation is an important feature of *Symbiodinium* proteins, which is also consistent with the hypothesis that such proteins could be key players of signaling events. A first attempt revealed only a few bands; however, we found two critical conditions that improved the signal-to-noise ratio significantly: first, when we used PBS-T for development of the incubations with polyclonal primary antibodies but alkaline developing solution for monoclonal primary antibodies (see 'Materials and Methods'), more and stronger bands appeared; second, the use of PVDF instead of nitrocellulose as transfer media increased the band resolution significantly. Therefore, we used these conditions for all subsequent western blot experiments. The proteins detected with anti-pThr antibodies with $M_r \sim 43, 46, 50, 55, 75$ and 91 kDa, were present in all three species (Fig. 1A and Fig. S1A). A relatively high number of bands both ubiquitous and species-specific were also detected with anti-pSer antibodies (Fig. 1B and Fig. S1B), as well as with anti-pTyr antibodies (Fig. 1C and Fig. S1C), but none fulfilled the criteria of both clear identification and presence in all three species. Conversely, one protein cross-reactive with anti-pThr antibodies, that of $M_r \sim 75$ kDa (pp75), that was present in all three species, gave a strong cross-reaction with the anti-pThr antibodies (Fig. 1A), and underwent significant changes in its phosphorylated state upon a light stimulus (Figs. 2A and 3A). This protein displayed at least two isoforms of the same molecular weight (Fig. 4A, spot 1 and 2), as immunodetected with the anti-pThr antibodies likely indicating a differential degree of phosphorylation. This is consistent with the modifications in the phosphorylation level detected upon light exposure of the cells (Fig. 3A). The partial peptide sequencing of this protein allowed its

inequivocal identification as a BiP-like protein of the HSP70 protein family (Accession No. OLP91134) from *S. microadriaticum*. We therefore re-named pp75 as SmicHSP75. Since the annotated transcriptomic sequences are uncurated raw sequences, and the one corresponding to SmicHSP75 yielded a translated product of >200 kDa, we took the full SmicHSP75 genomic sequence from the *S. microadriaticum* genome (Aranda et al., 2016) and used it to obtain the correct amino acid sequence (Fig. 4C). When we used this corrected sequence for BLAST analysis against the transcriptome, we detected at least six isoforms of the protein, as well as a conserved Thr in such sequences (Fig. 4C, asterisk). This conserved Thr has been reported as a target of phosphorylation in *C. reihardtii*, involved in metabolic regulation upon a nutritional stimulus (Díaz-Troya et al., 2011). In addition, we detected six potential phosphorylated threonine residues (Fig. 4C, green Thr residues), which are consistent with the possibility that the identified isoforms could correspond to different combinations of phosphorylations. The subsequent finding that this protein was originally phosphorylated on Thr during the dark phase of the *Symbiodinium* growth cycle, and was dephosphorylated upon light exposure, indicated that light was an important signal that triggered a number of signaling cascades that lead to its dephosphorylation. This also implied the existence of a phosphatase that must be able to rapidly respond to the light stimulus and act upon SmicHSP75. Another protein of Mr ~43 kDa present in all three species and cross-reactive with anti-pThr antibodies appeared to undergo a gradual enhanced phosphorylation upon light exposure but this modulatory effect was detected exclusively in *S. KB8* (Fig. 3B, *S. KB8*). This suggested that it was part of a species-specific process; therefore, our subsequent analyses were performed exclusively on SmicHSP75, which was present in all three species.

We do not know which other proteins participate both upstream and downstream of the signaling cascade of SmicHSP75 but the dephosphorylation response also implies the existence of a photoreceptor which transmits the signal to other relay molecules that lead to the action of the yet unknown phosphatase. Similarly, unknown molecules downstream of SmicHSP75 must exist, to transduce the signal into a physiological response. The fact that the protein is highly phosphorylated during the dark phase and a dephosphorylation occurs upon the light stimulus, points towards two other important implications: first, there must be a kinase that phosphorylates the protein at the end of the light phase and during the dark phase of the cycle; and second, there must also be a phosphatase that responds upon the activation of the molecular switch that is triggered after 30 min of a light stimulus. This is also suggestive of a mechanism that puts the cell into a new metabolic (photosynthetic) state after the light is turned on. This may also reflect a light-sensing mechanism occurring under the natural state of the free-living and/or endosymbiotic cells in the water column after sunrise. It has been reported that blue light is most likely the type of radiation that enters the water column (Braun & Smirnov, 1993) and perception mechanisms by cryptochromes are likely to be at play under those conditions. We are currently searching for the companion proteins of SmicHSP75 in this interesting light-modulated interplay.

Besides light, other stimuli might also cause changes in phosphorylation on the same protein. We tested a number of such stimuli that included nutritional (casein hydrolyzate and amino acids), extracellular matrix stimulating peptide (RGD), and calcium exposure

and depletion (Ca^{2+} and EGTA). In none of the cases significant dephosphorylation of SmicHSP75 or enhanced phosphorylation of the 43 kDa protein were observed (Fig. S3). This indicated that *Symbiodinium* cells are much more sensitive to light than other stimuli, which is also consistent with their photosynthetic nature.

Our results represent pioneer studies on proteins that are likely to participate in light modulated signal-transduction events and that have not been studied in these symbiotic photosynthetic microorganisms to date. Future research will focus on the detailed functional characterization of this light-responsive protein target and its companion players in the light-sensing mechanism.

CONCLUSIONS

We identified a 75 kDa protein (SmicHSP75) cross-reactive with anti-pThr antibodies, that was present in the three species of *Symbiodinium*, *S. KB8* (*S. microadriaticum*), *S. kawagutii* and *S. Mf11*. The protein was significantly phosphorylated at the end of the dark phase of the growth cycle but underwent a significant decrease in its phosphorylated state after 30 min of a light stimulus, and remained hypophosphorylated even after 260 min. This phosphorylation/dephosphorylation behavior indicated that light was an important signal that triggered a number of signaling cascades that are likely to be transient and this protein could be part of a mechanism that warns the cell to switch to a new (photosynthetic) metabolic state. The protein was unequivocally identified as a BiP-like protein of the HSP70 protein family.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the technical help of MI Miguel Ángel Gómez-Realí.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by grants PAPIIT IN210514 and PAPIIT IN203718 from the National Autonomous University of México (DGAPA-UNAM), and 285802 from the National Council of Science and Technology (CONACyT) to Marco A. Villanueva. Raúl E. Castillo-Medina was supported by fellowship 255464 from CONACyT. The Association of Marine Laboratories of the Caribbean paid the open access fee for publication of this work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

National Autonomous University of México (DGAPA-UNAM): PAPIIT IN210514, PAPIIT IN203718.

National Council of Science and Technology (CONACyT): 285802.

CONACyT: 255464.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- Raúl E. Castillo-Medina and Tania Islas-Flores conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Marco A. Villanueva conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw measurements of the densitometric determinations are available in [File S5](#). In addition, the figures shown in the article were assembled with the original, non-manipulated western blots.

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7406#supplemental-information>.

REFERENCES

- Aranda M, Li Y, Liew YJ, Baumgarten S, Simakov O, Wilson MC, Piel J, Ashoor H, Bougouffa S, Bajic VB, Ryu T, Ravasi T, Bayer T, Micklem G, Kim H, Bhak J, LaJeunesse TC, Voolstra CR. 2016. Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Scientific Reports* 6:39734 DOI 10.1038/srep39734.
- Aro E, Ohad I. 2003. Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation. *Antioxidants and Redox Signaling* 5:55–67 DOI 10.1089/152308603321223540.
- Baena-Gonzalez E, Barbato R, Aro E. 1999. Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta* 208:196–204 DOI 10.1007/s004250050550.
- Beel B, Prager K, Spexard M, Sasso S, Weiss D, Müller N, Heinnickel M, Dewez D, Ikoma D, Grossman A, Kottke T, Mittag M. 2012. A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 24:2992–3008 DOI 10.1105/tpc.112.098947.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4:1633–1649 DOI 10.1002/pmic.200300771.
- Braun CL, Smirnov SN. 1993. Why is water blue? *Journal of Chemical Education* 70:612–614 DOI 10.1021/ed070p612.

- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, Van der Horst GT, Batschauer A, Ahmad M. 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology* 62:335–364 DOI 10.1146/annurev-arplant-042110-103759.
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Pérez-Martín M, Moes S, Jenó P, Florencio FJ, Crespo JL. 2011. Inhibition of protein synthesis by TOR inactivation revealed a conserved regulatory mechanism of the BiP chaperone in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 157:730–741 DOI 10.1104/pp.111.179861.
- Giertz SL, Forêt S, Leggat W. 2017. Transcriptomic analysis of thermally stressed *Symbiodinium* reveals differential expression of stress and metabolism genes. *Frontiers in Plant Science* 8:271 DOI 10.3389/fpls.2017.00271.
- González-Pech RA, Ragan MA, Chan CX. 2017. Signatures of adaptation and symbiosis in genomes and transcriptomes of *Symbiodinium*. *Scientific Reports* 7:15021 DOI 10.1038/s41598-017-15029-w.
- Graves JD, Krebs EG. 1999. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacology and Therapeutics* 82:111–121 DOI 10.1016/S0163-7258(98)00056-4.
- Jones R, Hoegh-Guldberg O. 2001. Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: photoprotection, photoinactivation and the relationship to coral bleaching. *Plant Cell and Environment* 24:89–99 DOI 10.1046/j.1365-3040.2001.00648.x.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 DOI 10.1038/227680a0.
- Lehti-Shiu MD, Shiu S-H. 2012. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:2619–2639 DOI 10.1098/rstb.2012.0003.
- Liu W, Chen Y, Tian W, Du B, Zhang Z, Xu F, Zhang F, Yuan S, Lin H. 2009. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787:1238–1245 DOI 10.1016/j.bbabi.2009.04.012.
- Liu H, Stephens TG, González-Pech RA, Beltran VH, Lapeyre B, Bongaerts P, Cooke I, Aranda M, Bourne DG, Forêt S, Miller DJ, Van Oppen MJH, Voolstra CR, Ragan MA, Chan CX. 2018. *Symbiodinium* genomes reveal adaptive evolution of functions related to coral-dinoflagellate symbiosis. *Communications Biology* 1:95 DOI 10.1038/s42003-018-0098-3.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934 DOI 10.1126/science.1075762.
- Munro S, Pelham HRB. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899–907 DOI 10.1016/0092-8674(87)90086-9.
- Muscatine L, Porter JW. 1977. Reef corals-mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience* 27:454–460 DOI 10.2307/1297526.

- Rintamaki E, Kettunen R, Aro E. 1996. Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers. *Journal of Biological Chemistry* 271:14870–14875 DOI 10.1074/jbc.271.25.14870.
- Sorek M, Diaz-Almeyda E, Medina M, Levy O. 2014. Circadian clocks in symbiotic corals: the duet between *Symbiodinium* algae and their coral host. *Marine Genomics* 14:47–57 DOI 10.1016/j.margen.2014.01.003.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815 DOI 10.1038/35048692.
- Vener A. 2007. Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767:449–457 DOI 10.1016/j.bbabi.2006.11.007.
- Villanueva MA. 2008. Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly methanol-free transfer buffer. *Analytical Biochemistry* 373:377–379 DOI 10.1016/j.ab.2007.08.007.
- Villanueva MA, Arzapalo-Castaneda G, Castillo-Medina RE. 2014. The actin cytoskeleton organization and disorganization properties of the photosynthetic dinoflagellate *Symbiodinium kawagutii* in culture. *Canadian Journal of Microbiology* 60:767–775 DOI 10.1139/cjm-2014-0325.
- Xiang T, Nelson W, Rodriguez J, Tolleter D, Grossman A. 2015. *Symbiodinium* transcriptome and global responses of cells to immediate changes in light intensity when grown under autotrophic or mixotrophic conditions. *Plant Journal* 82:67–80 DOI 10.1111/tpj.12789.