



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



“CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO COLECTOR DE
LUZ DEL FOTOSISTEMA I DE DINOFLAGELADOS
SIMBIONTES”

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

VÍCTOR EMANUEL URRUTIA FIGUEROA

Director de Tesis: Dr. ROBERTO IGLESIAS PRIETO

Comité Tutorial: Dra. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDIA

Dra. BERTHA GUTIÉRREZ CIRLOS

Dra. SUSANA ENRÍQUEZ DOMÍNGUEZ

Dra. ANASTAZIA T. BANASZAK

Puerto Morelos, Q. Roo. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A mis Padres,
mi familia
y mis amigos**

Pleamar

*NADA ansío de nada,
mientras dura el instante de eternidad que es todo,
cuando no quiero nada.*

O. G.

Agradecimientos

- A mi segundo hogar la UNAM.
- Al Instituto y al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.
- Al personal de la Unidad Académica de Puerto Morelos.
- A mis compañeros del Laboratorio de Fotobiología por su apoyo.
- Al Dr. Roberto Iglesias Prieto por darme la oportunidad de realizar este proyecto.
- A los miembros de mi Comité Tutorial por sus valiosas correcciones y comentarios.
- Al CONACYT por la beca de maestría.

Índice

Dedicatoria.....	1
Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	3
1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes.....	9
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivos.....	12
6. Metodología.....	13
6.1 Cultivos.....	13
6.2 Aislamiento de los CCLs.....	13
6.3 Análisis espectroscópico de los CCLs.....	14
6.4 Análisis electroforético de los CCLs.....	15
6.5 Análisis inmunológico de los CCLs.....	16
7. Resultados.....	18
7.1 Porcentaje de clorofila a de los CCLs.....	18
7.2 Espectroscopía de los CCLs.....	19
7.3 Electroforesis e inmunología de los CCLs.....	21
8. Discusión.....	23
9. Conclusion.....	29
10. Referencias.....	30

Índice de Figuras

1. Gradientes de sacarosa y espectroscopía de los CCLs.....	20
2. Comparación espectroscópica del acpPC y el CCLI del FSI.....	21
3. Electroforesis e inmunología de los CCLs.....	22

Índice de Tablas

1. Porcentaje de Clorofila a de los CCLs.....	18
---	----

“Caracterización del Complejo Colector de Luz del Fotosistema I de Dinoflagelados Simbiontes”.

1. Resumen

Las reacciones de la fotosíntesis requieren de dos fotosistemas que trabajan coordinados en serie para obtener la máxima eficiencia fotosintética a través de un transporte lineal de electrones. Este flujo lineal, es modulado por la excitación lumínica que se transfiere a los fotosistemas desde los complejos colectores luz (CCLs). Los CCLs son muy similares tanto en estructura como en función entre los diferentes grupos, diferenciándose principalmente, por los tipos de pigmentos que poseen, los cuales varían de acuerdo con el ambiente en el que han evolucionado. Los dinoflagelados poseen dos CCLs: la PCP (peridinin-chlorophyll *a* protein) y el acpPC (chlorophyll *a*-*c*₂- peridinin protein complex). El acpPC es el principal CCL de los dinoflagelados, por lo tanto debido a que las diferencias espectrales entre los dos fotosistemas son mínimas, este complejo debería mantener el equilibrio en la transferencia de energía hacia los dos centros de reacción, o debería existir un CCL específico para cada fotosistema. El acpPC ha sido principalmente asociado con el FSII y ha sido sugerida la existencia de un CCL muy similar al acpPC, que está específicamente asociado con el FSI. Utilizando DDM (*n*-dodecyl- β -*d*-maltoside) y una doble centrifugación consecutiva en gradientes de sacarosa, fue posible aislar un complejo proteínico asociado funcionalmente con el FSI, el cual posee características espectrales similares al acpPC, aunque con algunas diferencias en la composición de pigmentos accesorios. Aun cuando el análisis con SDS-PAGE dio como resultado un polipéptido bien definido dentro del rango molecular del acpPC, que reacciona con anticuerpos policlonales desarrollados para detectar acpPC, este polipéptido posee un peso molecular ligeramente mayor. Estos resultados sugieren que el FSI de los dinoflagelados posee un CCL asociado, que en coordinación con el acpPC mantiene el equilibrio en la transferencia de energía hacia los dos fotosistemas, durante el transporte lineal de electrones.

2. Introducción.

Los dinoflagelados son flagelados unicelulares eucariontes que han sido clasificados como protozoarios o como algas, la mitad de ellos son heterótrofos, la otra mitad son autótrofos (Taylor 1987). Los dinoflagelados fotosintéticos pueden vivir en ambientes marinos, dulceacuícolas y en simbiosis con invertebrados marinos (Trench 1993). Los dinoflagelados de vida libre son importantes componentes de muchas comunidades fitoplanctónicas. En ocasiones estas comunidades pueden agregarse y formar mareas rojas produciendo efectos adversos en las pesquerías y en la salud humana (Taylor 1987). Como endosimbiontes de invertebrados marinos, los dinoflagelados se encuentran entre los más importantes productores primarios y particularmente en los arrecifes de coral donde además de contribuir con la construcción y mantenimiento de la estructura del arrecife, son responsables de la alta producción primaria característica de estos ecosistemas (Muscatine and Weis 1992). La gran mayoría de los productores primarios incluidos los dinoflagelados, utilizan la luz solar para generar nueva materia orgánica a partir de la hidrólisis del agua y la fijación de CO_2 , un fenómeno conocido como fotosíntesis. Durante la fotosíntesis, la energía luminosa es absorbida por los complejos colectores de luz (CCLs) y es transferida como excitación hasta los centros de reacción de los fotosistemas, donde las reacciones de separación de carga generan, una cadena de transporte lineal de electrones, oxígeno molecular y un gradiente de protones, utilizados en la síntesis acoplada de ATP y en la síntesis de NADPH (Clayton, 1965; Arnon, 1971). Las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis son catalizadas por dos complejos supra-moleculares: los fotosistemas I (FSI) y II (FSII), que contienen respectivamente:

a) los centros de reacción P_{700} y P_{680} , donde se realizan las reacciones de separación de carga y, b) los CCLs CCLI y CCLII, que absorben fotones y transfieren su energía de excitación a los centros de reacción (Clayton, 1965; Arnon, 1971). En plantas superiores y algas verdes los fotosistemas con sus CCLs asociados, poseen una sección transversal óptica de absorción muy similar: el FSII está asociado con aproximadamente 235 clorofilas por cada centro de reacción P_{680} , mientras que el FSI se asocia aproximadamente con 210 clorofilas por cada centro de reacción P_{700} (Bassi et al, 1987, 1992; Bruce and Malkin, 1988; Peter and Thornber, 1991). Aunque los fotosistemas poseen un diseño estructural muy similar, también tienen diferencias que se complementan para trabajar en serie durante la fotoquímica primaria y maximizar la eficiencia de la fotosíntesis. Por ejemplo, los CCLs poseen diferentes proporciones de pigmentos accesorios, además los centros de reacción tienen diferente absorción en la zona espectral del rojo (680nm y 700nm) y por último la eficiencia cuántica de los dos fotosistemas es diferente ($PSI=1$, $PSII=0.85$) (Melis 1989, Nelson y Ben-Shem 2004). Para mantener la función fotosintética bajo las variaciones naturales del ambiente lumínico se producen modificaciones continuas en la sección transversal óptica de absorción de los CCLs que sirven para regular la transferencia de energía hacia los dos fotosistemas durante el transporte lineal. Por ejemplo, durante el ciclo de las xantofilas, bajo un exceso de luz, se modifica la composición pigmentaria de los CCLs para disipar el exceso de energía de excitación como calor, lo cual modifica la tasa de transferencia de excitación a los centros de reacción (Arnon 1971, Allen 2003). En ocasiones, se puede llegar a interrumpir el flujo lineal entre los dos fotosistemas, como medida de equilibrio, la energía fluye únicamente alrededor del FSI, formando una cadena de transporte cíclico

de electrones que sirve únicamente para producir ATP, que a su vez es utilizado como complemento del que se genera normalmente durante el flujo lineal (Munekage 2004, 2005). Al examinar las similitudes estructurales entre los dos fotosistemas, se ha inferido que deben provenir de un ancestro común y que la estructura de los centros de reacción se ha conservado fuertemente a lo largo de su evolución (Nelson y Ben-Shem 2004). También los sitios de unión de las proteínas que conforman a los CCLs son caracteres ancestrales que explican su capacidad para unir diferentes tipos de clorofilas y pigmentos accesorios (Grabowski et al. 2001; Gantt et al. 2003).

La composición pigmentaria de los CCLs varía en relación al ambiente en que habitan los diferentes grupos de organismos que realizan fotosíntesis. El ambiente acuático donde habitan los dinoflagelados, se caracteriza por la absorción rápida y selectiva de la luz, esto produce una pérdida de energía en las zonas espectrales del azul y del rojo justo donde la clorofila *a* absorbe más luz (Iglesias Prieto, 1996). La mayor parte de la energía que permanece disponible se encuentra en el rango espectral del verde que es el rango de absorción de los pigmentos accesorios como la clorofila *c*₂ y la peridininina (Iglesias Prieto, 1996). Estos son los principales componentes de los CCLs de los dinoflagelados: la PCP compuesta por clorofila *a* y peridininina y el acpPC compuesto por clorofilas *a*, *c*₂ y peridininina (Hiller et al, 1993, Iglesias-Prieto et al, 1991,1993, 1996). Esta composición permite que la transferencia de energía desde los CCLs hacia los centros de reacción se realice con una enorme eficiencia a pesar de la atenuación de la luz que ocurre dentro del agua con el aumento en la profundidad (Iglesias-Prieto et al, 1993, 1996; Iglesias-Prieto y Trench, 1997a). A partir del análisis de la emisión de fluorescencia de células

completas de dinoflagelados en el estado estable, se ha sugerido que los dos fotosistemas de estos organismos poseen entre sí mínimas diferencias espectrales, por lo tanto debe existir un equilibrio en la energía que reciben los centros de reacción desde los CCLs (Govindjee et al, 1979; Iglesias-Prieto et al, 1993). Dado que aun no se ha aislado el FSII de los dinoflagelados, la difusión de la energía de excitación se ha asignado desde el acpPC asociado al FSII y por difusión al FSI, esta asignación supone que una parte del acpPC esta unida al FSI para equilibrar la transferencia de energía (Iglesias-Prieto, 1996). Por otro lado, se ha propuesto que existe un CCL con características similares al acpPC asociado al FSI. (Iglesias- Prieto et al, 1993; Iglesias-Prieto, 1996). Si el acpPC siendo el principal CCL de los dinoflagelados, mantiene el equilibrio en la tasa de transferencia de la energía de excitación, entonces este complejo debería estar unido a los dos fotosistemas. Alternativamente si existe un complejo colector unido al FSI diferente al acpPC, entonces ambos complejos se deben coordinar para mantener el equilibrio energético entre los fotosistemas, como ocurre en otros organismos como plantas y algas verdes. El presente estudio está dirigido a caracterizar el CCL asociado al FSI de los dinoflagelados simbiotes dado la importancia que su función significa en el equilibrio energético de la unidad fotosintética de este grupo de importantes productores primarios.

3. Antecedentes

El FSI se aisló por primera vez solubilizando las membranas tilacoidales con detergente, separándolas con centrifugación en gradientes de sacarosa y geles de poliacrilamida y fue definido por su actividad química con el nombre de plastocianina-ferredoxina-óxidoreductasa (Kung and Thornber, 1971; Nelson et al. 1973, 1975, 1977; Vierling and Alberte, 1983). Por otro lado la primera evidencia de la existencia del FSI se obtuvo, registrando el cambio en la absorción de luz a 700nm, utilizando luz monocromática en células fotosintéticas dando paso al descubrimiento del P₇₀₀ (Kok, 1957). El CCLI se aisló del FSI por primera vez y de una manera muy elegante utilizando mínimas concentraciones de detergente, centrifugación en gradientes de sacarosa consecutivos y comparando las diferencias espectroscópicas y moleculares entre las muestras consecutivas (Mullet et al. 1980). En los dinoflagelados el primer CCL que se aisló fue la proteína PCP, una proteína hidrosoluble, externa a la membrana que ha sido ampliamente caracterizada (Iglesias et al, 1991; Hofmann et al, 1996). El P₇₀₀ fue el primer CCL que se aisló de la membrana fotosintética de los dinoflagelados, utilizando detergente (Triton X-100), una columna de hidroxilapatita y geles nativos de SDS-PAGE (Prézelin and Alberte, 1978). Se propuso un modelo de trabajo para el estudio del aparato fotosintético de los dinoflagelados basado en algas verdes y rojas. El modelo situaba en la parte más interna al P₇₀₀ y al centro de reacción del FSII, rodeados por un CCL interno, compuesto por clorofila a, rodeado a su vez por un CCL externo compuesto por clorofilas a y c₂, carente de peridina y, en la parte más externa la PCP (Prézelin and Alberte, 1978). Los intentos posteriores por corroborar esta hipótesis, produjeron CCLs con nuevas asociaciones de

peridinin-clorofila *a* o clorofila *a-c₂*, pero con poca funcionalidad (Boczar et al, 1980, 1990; Boczar and Prézelin, 1986, 1987). Más tarde se demostró que estos CCLs eran productos de disociación de un solo CCL mayor (Hiller et al. 1993; Iglesias-Prieto et al. 1993). El acpPC se aisló en su forma funcional solubilizando las membranas tilacoidales de los dinoflagelados con detergentes glicosídicos y centrifugándolas en gradientes de sacarosa (Hiller et al. 1993; Iglesias-Prieto et al. 1993). El acpPC se encontró contenido en la fracción FII del gradiente de sacarosa y fue asociado con apoproteínas de 19 a 20 kD. Se propuso que el acpPC es el principal CCL de los dinoflagelados y responsable de la disipación del exceso de energía de excitación (Iglesias-Prieto y Trench, 1997a). También se propuso que las diferentes respuestas en composición y concentración del acpPC bajo altos flujos lumínicos podrían determinar la capacidad de aclimatación de los dinoflagelados (Iglesias-Prieto y Trench, 1997a). Con el descubrimiento del acpPC surgió un nuevo modelo explicativo del aparato fotosintético de los dinoflagelados. Este modelo propone que la energía de excitación que llega a los dos fotosistemas está equilibrada por los CCLs, principalmente por el acpPC, esto implicaba que una parte del acpPC debería estar unida al FSI para equilibrar la transferencia de energía (Iglesias-Prieto, 1996). Al mismo tiempo, se encontró evidencia de la presencia de un CCL unido al FSI en la fracción FIII del mismo gradiente de sacarosa donde se obtuvo el acpPC. En esta fracción FIII está contenido el 100% del FSI compuesto por siete polipéptidos discretos de 14 a 29 kD y un polipéptido menor de 55 kD, en contraste con el polipéptido de 60 kD presente en el FSI de plantas y algas verdes (Iglesias-Prieto et al, 1993). Estas proteínas no reaccionaron con la aplicación de anticuerpos policlonales desarrollados para reconocer al FSI de plantas, lo que indica que dichas proteínas están menos

conservadas de lo que se creía (Iglesias-Prieto et al. 1993). El CCL del FSI, se mostró representado por una pequeña banda de emisión de la fracción FIII, que al ser desnaturalizada mostraba un aumento en fluorescencia de 24 veces (Iglesias-Prieto et al. 1993). Además el espectro de excitación a temperatura ambiente de esta banda de emisión, mostraba contribuciones de energía de excitación provenientes de la clorofila *c2* y la peridinina muy similares a las del acpPC (Iglesias-Prieto et al. 1993). Así mismo, a 77K la emisión de fluorescencia de la fracción FIII, mostraba un hombro de emisión a 709 nm (Iglesias-Prieto et al. 1993). Se interpretó que estas contribuciones a la fluorescencia se debían a una parte del acpPC que quedaba todavía unido al núcleo del FSI, pero alternativamente podían provenir de un CCL similar al acpPC y análogo al CCLI de plantas superiores (Iglesias-Prieto et al, 1993; Iglesias-Prieto 1996; Iglesias-Prieto y Trench, 1997a). Evidencias circunstanciales posteriores sugirieron que este CCL aumenta su sección transversal óptica de absorción en células aclimatadas a baja luz (Iglesias-Prieto y Trench, 1997a). El presente estudio está enfocado en caracterizar el CCL que ha sido asociado al FSI de los dinoflagelados simbiotes, debido a la importancia que representa su función en el balance energético de la unidad fotosintética de este importante grupo de productores primarios.

4. Hipótesis.

- Si en el estado estable los dos fotosistemas de los dinoflagelados simbiotes poseen mínimas diferencias espectrales y el acpPC se encuentra unido preferentemente al FSII, entonces el acpPC o alternativamente un CCL diferente del acpPC, debe estar unido al FSI para equilibrar la cantidad de energía de excitación que es transferida a los dos fotosistemas durante el transporte lineal de electrones.

5. Objetivos.

Objetivo General.

- Aislar y caracterizar el CCL del FSI de los dinoflagelados simbiotes.

Objetivos Particulares.

- Determinar las características espectroscópicas del CCL del FSI de los dinoflagelados simbiotes.
- Determinar el peso molecular del CCL del FSI de los dinoflagelados simbiotes.
- Determinar las diferencias entre el acpPC y el CCL del FSI de los dinoflagelados simbiotes.

6. Metodología.

6.1 Cultivos.

Células del dinoflagelado *Symbiodinium kawagutii* aislado del coral *Montipora verrucosa* y del dinoflagelado *Symbiodinium microadriaticum* aislado de la medusa *Cassiopea xamachana*, (Trench y Blank, 1987), se cultivaron en matraces Fernbach de 2.5 l, en un litro de medio ASP-8A a densidades iniciales de 100 000 células. Para conocer la densidad celular de los cultivos experimentales se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo de células en condiciones de esterilidad. Las células se fijaron con 25 μ l de una solución de Lugol. La densidad de células por ml para cada cultivo experimental se estimó del promedio de tres conteos en una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio óptico. Los cultivos fueron mantenidos a 25 ° C, bajo un fotoperiodo de 14h: 10h (luz: oscuridad), con una irradianza de 40 μ mol cuanta $m^2 s^{-1}$ de radiación fotosintéticamente disponible (PAR). La iluminación se realizó utilizando lámparas fluorescentes (OSRAM S448, SL 39 W).

6.2 Aislamiento de los CCLs

El aislamiento de los CCLs se realizó utilizando el método descrito en Iglesias-Prieto et al., (1993); con algunas modificaciones. Los cultivos se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm en una centrífuga clínica y se cosecharon al inicio de la fase estacionaria en tubos Falcon de 50 ml. Las células fueron resuspendidas en 15 ml de búfer TB (100 mM Tris-borato pH 8.0, 2mM $MgCl_2$, 2mM Na_2 EDTA, 1mM PMSF) y se rompieron en tres pasos por una prensa de French para células, bajo una presión de 1500 PSIG a 4 °C. La suspensión celular se llevó a 25 ml de búfer TB y fue centrifugada durante 1

h a 240 000 g a 4°C en una ultracentrífuga Sorval. Las membranas tilacoidales se homogenizaron y fueron resuspendidas en buffer TB con 1% de detergente (*n*-dodecyl-*B*-*d*-maltoside) DDM (p/v) en una relación surfactante 70: 1 (DDM:Cl a) (p/p) y solubilizadas con agitación suave durante 2 hrs a 4° C en obscuridad. Las membranas solubilizadas se centrifugaron durante 10 min, a 25 000 g y a 4° C en una centrifuga Sorval. El sobrenadante con las membranas solubles se cargó en un gradiente discontinuo de sacarosa (5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 %) en buffer TB con 0.1% de DDM y fue centrifugado durante 18 hrs a 240 000 g a 4° C. Las fracciones FII (acpP C) y FIII (FSI-CCLI) se recuperaron del gradiente de las capas de 15-20% y de 60% de sacarosa respectivamente (Fig. 1A). El porcentaje de sacarosa en las fracciones se redujo por diálisis en buffer TB durante 3 hrs a 4° C. Posterior a la diálisis la fracción FIII se solubilizó en 0.5% de DDM durante 2 horas a 4° C y se cargó en un gradiente discontinuo de sacarosa (5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 %) en buffer TB con DDM al 0.1% y se centrifugó durante 18 hrs a 240 000 g a 4° C. Las Fracciones FIIIa (FSI) y FIIIb (CCL I) se recuperaron del gradiente de sacarosa de las capas de 15-20% y de 60% respectivamente (Fig. 1A).

6.3 Análisis espectroscópico de los CCLs.

La clorofila de alícuotas de 100 µl de las células lisadas y de las membranas tilacoidales totales, solubles y no solubles fue extraída en 90 % de acetona. Las muestras fueron llevadas a 3 ml con acetona en celdas espectrofotométricas con un paso óptico de 1 cm. Se hicieron lecturas de la absorción de las muestras a 630nm, 663 nm y 725 nm en un espectrofotómetro Elyptica (Instrumentación electro-óptica Ensenada, México). La concentración de clorofila *a* se calculó a partir de la fórmula de Jeffrey y Humphrey, 1975. Los

espectros de absorción de los CCLs se determinaron a temperatura ambiente, utilizando un espectrofotómetro Aminco DW-2C conectado a una computadora con un programa de captura de datos OLIS y utilizando un slit de 0.5nm. Los espectros de emisión y excitación de las fracciones se obtuvieron utilizando un espectrofluorómetro SLM-4800 conectado a una computadora con un programa de captura de datos SABLE y se utilizó un slit de 0.5nm para los espectros de excitación y de 1nm para los espectros de emisión. La concentración de clorofila *a* en los CCLs se calculó a partir de los espectros de absorción utilizando un coeficiente de extinción molar de $60 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Shiozawa et al, 1974).

6.4 Análisis electroforético de los CCLs.

Los CCLs obtenidos de la centrifugación en los gradientes de sacarosa fueron transferidos a bolsas de diálisis y mantenidos en agitación suave en 500 ml de buffer TB a 4°C durante 1 h en oscuridad. Posteriormente fueron transferidos a un litro de búfer TB y fueron dializados a lo largo de la noche a la misma temperatura y en oscuridad. Las muestras dializadas se concentraron con poli-etilen-glicol, hasta obtener volúmenes con concentraciones similares de clorofila *a* entre los diferentes CCLs. Los CCLs se solubilizaron a 55°C por 15 min, en buffer reductor 65 mM de Tris-Cl (pH 6.8), 10% de glicerol (v/v), 2% de B-mercaptoetanol (v/v), y 2% de SDS (w/v) y con 0.05% de Bromofenol azul (p/v).

Los pesos moleculares de las proteínas de los CCLs se determinaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La concentración de poliacrilamida en los geles separadores de gradiente lineal

fue de 12-18% y de 4% para los geles concentradores. La electroforesis se llevó a cabo con una corriente constante de 30 mA. Las proteínas embebidas en los geles se tiñeron con Azul brillante de Comassie R-250 para su visualización.

Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron en base a su movilidad electroforética utilizando los siguientes estándares: Albúmina-Bovina, (66,000), Ovo albúmina de Pollo, (45,000), Pepsina de Mucosa de Estómago de Puerco, (34,700), Tripsinógeno-Bovino, tratado con PMSF, (24,000), β -Lactoglobulina-Bovina, (20,100), Lisozima de huevo blanco, (14,200), (Dalton Mark VI para SDS-PAGE de SIGMA); y con los siguientes estándares preteñidos: Miosina (202,000), beta-galactosidasa (133,000), BSA (71,000), anhidrasa-carbonica (41,800), inhibidor de tripsina de soya (30,600), Lisozima (17,800), Aprotinina (6,900), (Kaleidoscope proteínas preteñidas de BioRad).

6.5 Análisis inmunológico de los CCLs.

Los geles teñidos con Comassie fueron desteñidos y se recargaron durante 1hr en Buffer para electrodos (Tris 0.125 M pH 8.3), Glicina 1 M y 0.5% de SDS (p/v)), antes de transferir las proteínas de los CCLs a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida y las membranas de nitrocelulosa se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 0.2 M y 20% de Metanol (v/v)) durante 15 minutos previos a la transferencia. Las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa con un voltaje constante de 100 V durante 90 min (Towbin et al 1979). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas trasferidas se equilibró con buffer TBS durante 30 min previos al análisis inmunológico con el Western Blot.

El Western Blot fue realizado de acuerdo al protocolo del Inmuno- kit para peroxidasa (BioRad). El buffer TBS se retiró y la membrana de nitrocelulosa con las proteínas fue tratada con una solución bloqueadora con 3 % de gelatina en TBS (p/v) durante 30 min. La solución bloqueadora se retiró y la membrana se lavó durante 10 min con 0.05% de Twin en TBS (TTBS). El TTBS se retiró y se aplicó un anticuerpo primario policlonal desarrollado para detectar acpPC, diluido 1:10 000 en una solución con 1 % de gelatina en TBS (buffer para anticuerpo) durante la noche. El anticuerpo desarrollado para detectar acpPC se retiró y la membrana se lavó con TTBS durante 10 min. El TTBS se retiró y se aplicó un anticuerpo secundario contra globulina gama de conejo marcado con peroxidasa diluido 1:3300 en buffer para anticuerpo durante 2 hr. La solución con el anticuerpo secundario se retiró y la membrana se lavó con TTBS durante 10 min. El TTBS se retiró y el exceso de Twin se lavó con TBS durante 10 min. El TBS se retiró y la reacción de revelado de la peroxidasa se desarrolló durante 30 min. La solución reveladora se retiró y la reacción de revelado se neutralizó con agua durante 10 min. La membrana con las proteínas marcadas se secó en papel filtro y posteriormente fue escaneada.

7. Resultados

7.1 Porcentaje de clorofila a de los CCLs

En *S. kawagutii* se colectó el 56 % de la clorofila a proveniente de las células lisadas en las membranas tilacoidales, mientras que en *S. microadriaticum* este valor fue del 48 %. Después del tratamiento con DDM al 1%, la clorofila a presente en la fracción soluble de las membranas fue del 43 % y 49% para *S. microadriaticum* y *S. kawagutii*, respectivamente. El porcentaje de clorofila a encontrado en la fracción insoluble de las membranas tilacoidales fue de 3 y 5% respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de clorofila a en las células lisadas (CL), en las membranas tilacoidales (MT) solubles (MTS) y no solubles (MTI) y en los CCLs (\pm error estándar), el valor presentado para las fracciones FI, FII y FIII es el resultado de 3 mediciones. El valor para las fracciones FIIIa y FIIIb es el promedio de dos mediciones.

Fracción	<i>S. microadriaticum</i>		<i>S. kawagutii</i>	
	% Cl a	\pm ES	% Cl a	\pm ES
CL	100	-	100	-
MT	48	11	56	9
MTS	43	7	49	6
MTI	3	1	5	1
FI	10	3	11	1
FII	21	3	22	4
FIII	10	2	11	2
FIIIa	4	-	5	-
FIIIb	2	-	4	-

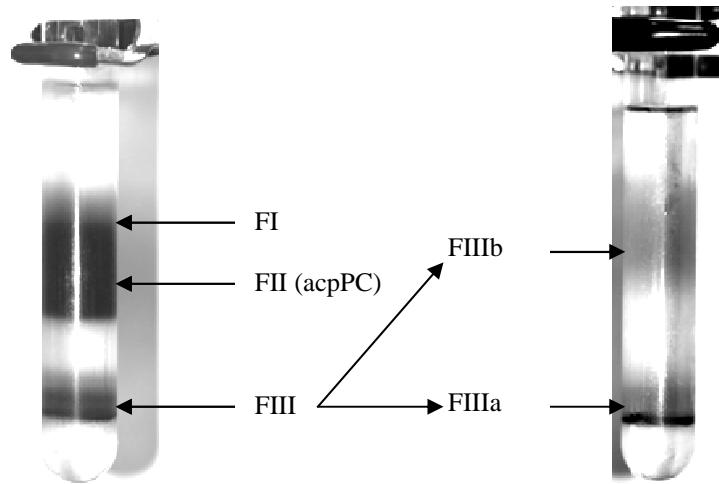
El porcentaje de clorofila a colectado de la fracción FIII fue de 10% y 11%. El gradiente de sacarosa secundario dio como resultado dos fracciones FIIIa y FIIIb las cuales representan respectivamente el 4-5% y el 2-3% de la clorofila a. (Fig. 1A; Tabla 1).

7.2 Espectroscopía de los CCLs.

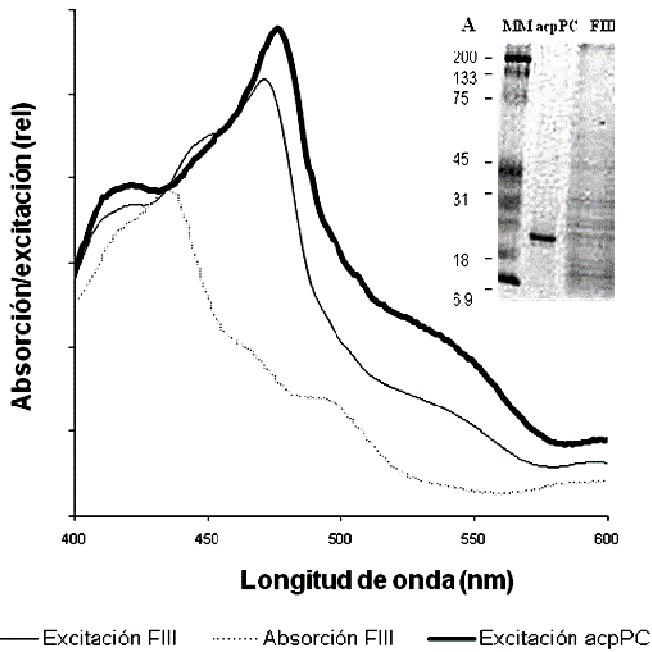
La fracción FIII presentó las contribuciones de fluorescencia provenientes de los pigmentos accesorios que sugieren la presencia de un CCL asociado al FSI. (Fig. 1B).

La fracción FIIIa (FSI) colectada de la capa del 60% del gradiente de sacarosa, posee dos picos máximos a 435 y 676nm. El espectro de absorción de esta fracción presenta las mismas características espectrales que la fracción FIII (PSI-LHCI), (Fig. 1C). La fracción FIIIb recuperada de la capa de 15-20 % del gradiente de sacarosa, presenta dos picos máximos a 441nm y a 672nm (Fig. 1C). La comparación entre los espectros de absorción de las fracciones FIIIa y FIIIb muestra diferencias en la zona espectral de absorción de los pigmentos accesorios (Fig. 1C). El espectro diferencial de las fracciones FIIIa y FIIIb, muestra un pico máximo a 456 nm como el acpPC (Fig. 1C). Al comparar los espectros de absorción de las fracciones FIIIb y FII (acpPC) se observa en la zona azul del espectro, que el pico máximo coincide con el pico máximo del acpPc a 441 nm (Fig. 2A). El otro pico máximo característico del acpPC en la zona azul del espectro a 456 nm, desaparece en la fracción FIIIb por una disminución en la zona de absorción de los pigmentos accesorios (Fig. 2A). El segundo pico máximo de absorción de la clorofila *a* en la zona del rojo se observa a 672 nm, tanto en la fracción FIIIb como en el acpPC (Fig.2A). La comparación entre los espectros de excitación de las fracciones FIIIb y el acpPC, muestra que las diferencias en la transferencia de energía se deben principalmente a las contribuciones de los pigmentos accesorios, siendo más abundantes en el acpPC (Fig. 2B).

A



B



C

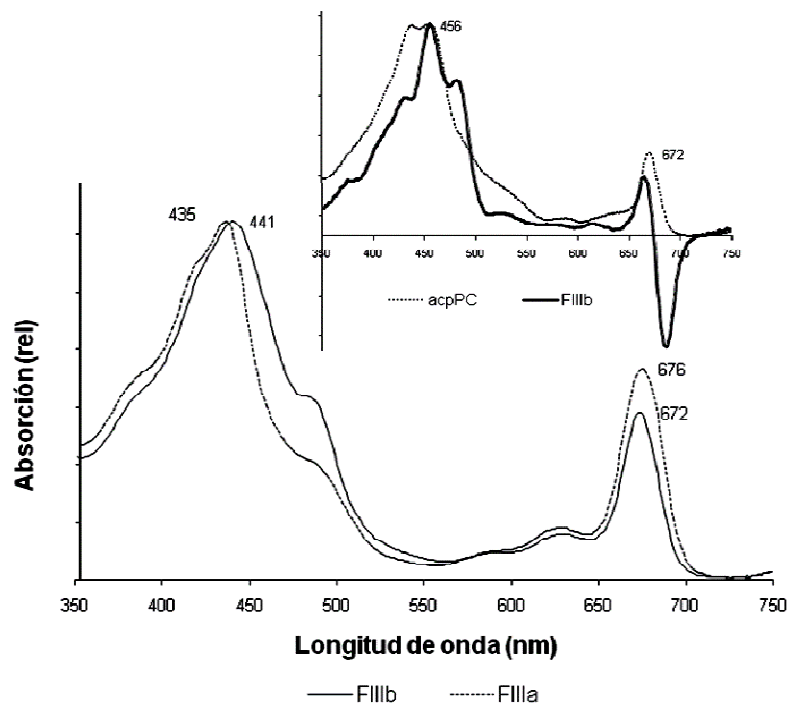


Figura 1. A. Gradiente primario con las tres fracciones componentes del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes FI, FII y FIII y gradiente secundario con las fracciones FIIIa y FIIIb obtenidas a partir de la fracción FIII. B. Espectro de absorción de la FIII, espectros de excitación de las fracciones FIII y FII y perfil electroforético de las fracciones FII y FIII para comparación. C. Espectros de absorción de las fracciones FIIIa y FIIIb y en la esquina superior derecha la comparación del espectro diferencial de las fracciones FIIIa y FIIIb con el espectro de absorción de la acpPC.

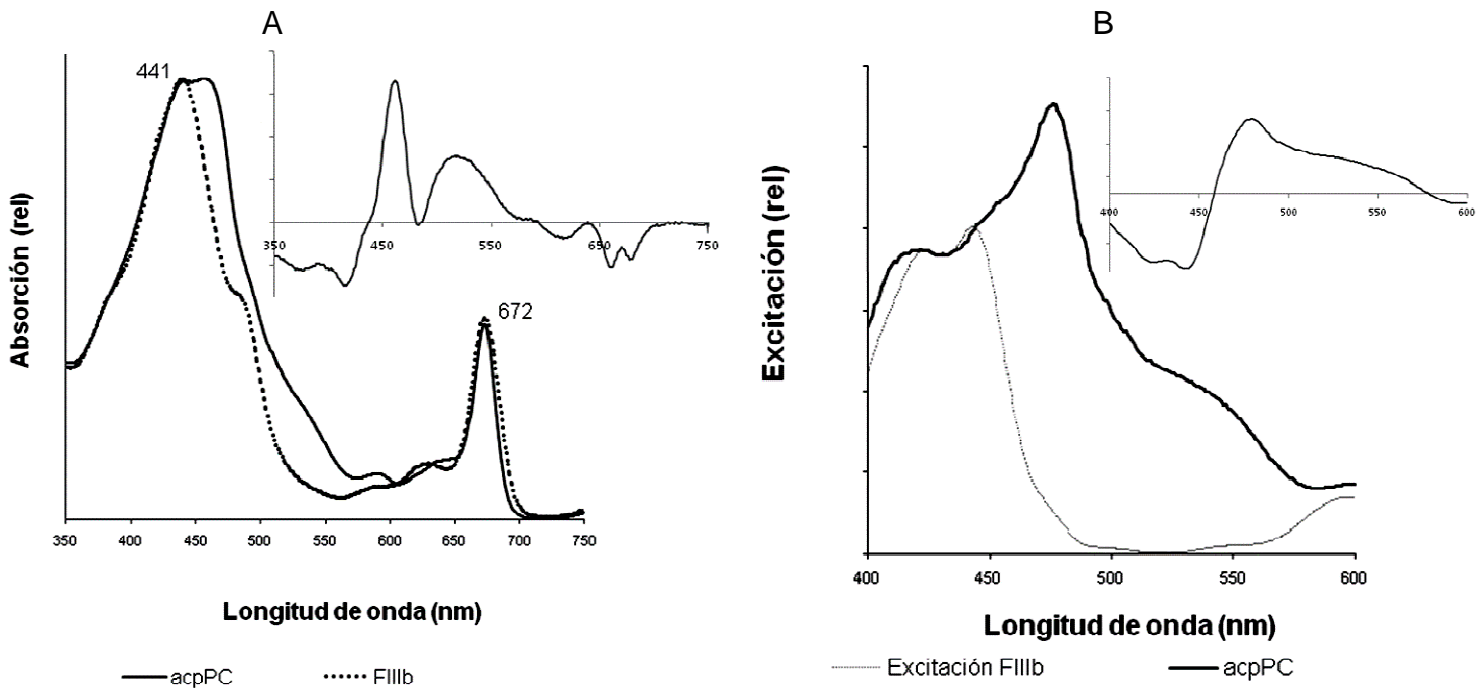
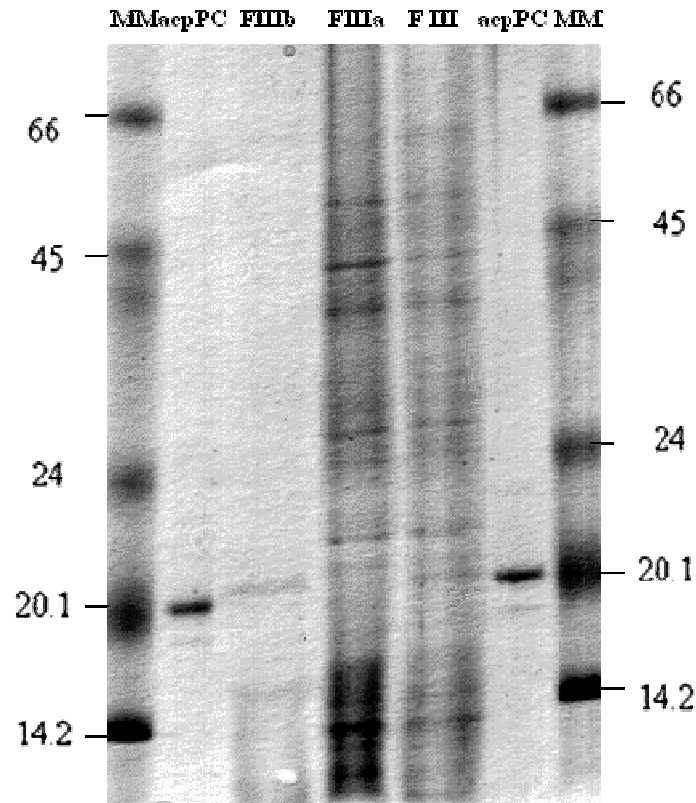


Figura 2. A. Espectros de absorción de la fracción FII (acpPC) y de la fracción FIIIb y en la esquina superior derecha su espectro diferencial para comparación.
 B. Espectros de excitación de la fracción FII (acpPC) y de la fracción FIIIb y en la esquina superior derecha su espectro diferencial para comparación.

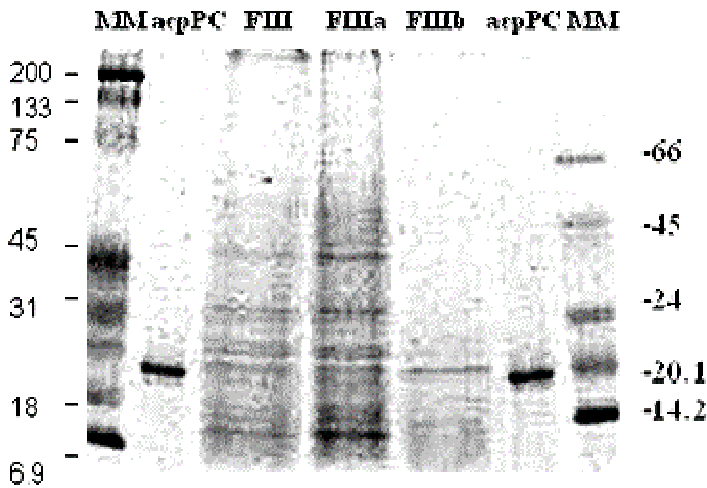
7.3 Electroforesis e inmunología de los CCLs.

Con el análisis electroforético preliminar en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), de las fracciones FII (acpPC) y FIII se detectaron los polipéptidos componentes del acpPC dentro del rango molecular de 19 a 20 kD, así como los polipéptidos del rango molecular de los 14 a los 29 kD y el polipéptido mayor a los 55 kD del FSI (FIII) (Fig. 1B). Con el análisis electroforético posterior de las fracciones FIII, FIIIa y FIIIb, se detectó un polipéptido en el rango del peso molecular del acpPC en las tres muestras siendo más evidente en la fracciones FIII y FIIIb (Fig. 3A). El análisis inmunológico con el anticuerpo desarrollado para detectar el acpPC, reveló una reacción con un polipéptido dentro del rango molecular del acpPC en las fracciones FIIIa y FIIIb, siendo la reacción claramente más intensa en la fracción FIIIb (Fig. 3 B, C).

A



B



C

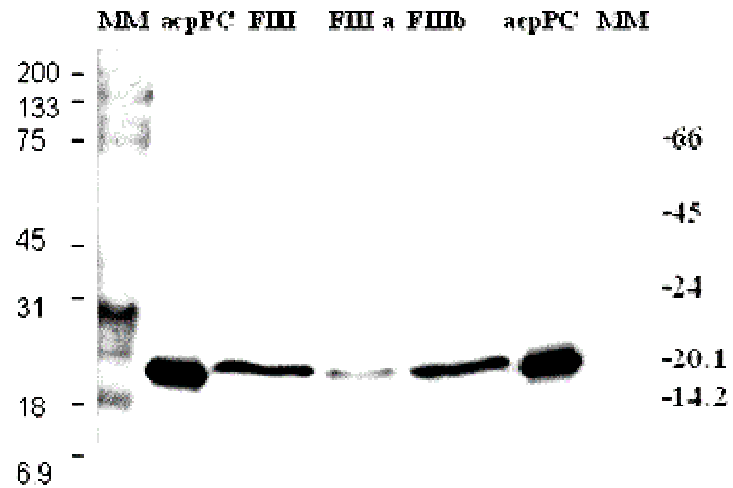


Figura 3. Electroforesis en gel de gradiente lineal de 12-18 % de poliacrilamida, (SDS-PAGE) de las proteínas asociadas a las fracciones FII, FIII, FIIIa y FIIIb (MM= Marcador Molecular), visualizadas con azul brillante de Comassie R-250. A. Gel de 1.5 mm de espesor, en los carriles se cargaron 5 μ g (F III, FIIIa y FIIIb) y 2 μ g (FII) de Clorofila a. B. Gel de 0.5mm de espesor, en los carriles se cargaron 2.5 μ g (F III, FIII a y FIII b) y 1 μ g (FII) de Clorofila a. C. Western Blot con anti-acpPC diluido 1: 10 000, de las fracciones FII, FIII, FIIIa y FIIIb (MM= Marcador Molecular).

8. Discusión.

En la presente investigación fueron aislados los componentes del Fotosistema I de los dinoflagelados simbiotes en las fracciones FIIIa y FIIIb. Las características descritas de la FIIIa muestran que esta fracción representa el FSI purificado unido a una parte del CCL, que estaba totalmente asociado al FSI en la fracción FIII. La fracción FIIIb tiene características que sugieren que es un CCL similar al acpPC que está asociado funcionalmente con el FSI. La FIIIb es muy parecida a uno de los CCLs obtenidos previamente utilizando Deriphat 160- SDS PAGE y que fue descrito como el P₇₀₀ unido a una antena compuesta por clorofilas *a* y *c*₂ y otros pigmentos accesorios (Boczar et al, 1987; Iglesias-Prieto 1996). El espectro diferencial de las fracciones FIIIa y FIIIb resulta en el espectro de un CCL asociado funcionalmente al FS I, el cual posee algunas características similares al acpPC (Jovine et al, 1995). Las comparaciones de la absorción y la transferencia de la excitación entre el acpPC y la FIIIb, muestran que la principal diferencia es que el acpPC posee una proporción mayor de pigmentos accesorios que la FIIIb. Esta diferencia es similar a la que ocurre en plantas y algas verdes, donde el CCL del FSII posee una mayor cantidad de pigmentos accesorios que el CCL del FSI (Bassi et al, 1987; 1992; Croce et al 2002). El modelo explicativo más reciente del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes interpreta que el acpPC, siendo el mayor CCL de los dinoflagelados simbiotes, está unido a los dos fotosistemas para mantener el equilibrio en la transferencia de excitación entre los centros de reacción (Iglesias-Prieto 1996). Los resultados de esta investigación demuestran que existe un complejo similar al acpPC que está asociado específicamente con el FSI de los dinoflagelados simbiotes como se propuso

anteriormente (Iglesias Prieto et al, 1993; Iglesias-Prieto y Trench, 1997). Estos autores también sugieren que este complejo colector puede ser una parte del acpPC que permanece unida al núcleo del FSI después de la centrifugación en el gradiente de sacarosa (Iglesias-Prieto et al, 1993). En este estudio el análisis espectroscópico demuestra que el CCL del FSI de dinoflagelados simbiotes es diferente del acpPC. Así mismo, el análisis electroforético muestra que el polipéptido que representa al CCL asociado al FSI de los dinoflagelados simbiotes, aunque se encuentra dentro del rango molecular del acpPC tiene un peso molecular ligeramente mayor. Por otro lado, el análisis inmunológico demuestra que el CCL asociado al FSI de los dinoflagelados simbiotes, reacciona con el anticuerpo policlonal desarrollado para detectar el acpPC. El acpPC representado por el doblete de 19 a 20 kD, es un ensamblaje heterogéneo que puede incluir múltiples complejos asociados con diferentes apoproteínas, que provienen de un gen poliproteínico que codifica para 10 polipéptidos diferentes (Hiller et al, 1995). Los resultados inmunológicos de esta investigación sugieren que el polipéptido del CCL asociado al FSI de los dinoflagelados simbiotes, podría estar codificado por el mismo gen poliproteínico que codifica para el acpPC, pero con diferencias estructurales relativas a su asociación con el FSI como: diferencias en el ensamblaje de las apoproteínas y diferencias en la composición de los pigmentos asociados a estas apoproteínas. Esta propuesta es congruente con investigaciones anteriores que proponen que el acpPC puede expresarse diferencialmente en la forma de distintas holoproteínas con diferente contenido de pigmentos accesorios fotoprotectores, en dinoflagelados simbiotes con diferentes historias lumínicas (Iglesias-Prieto et al, 1997). Así mismo, estudios recientes apoyan esta propuesta al sugerir, que dos especies con diferente tolerancia al

estrés lumínico y térmico pueden expresar diferentes isoformas del acpPC (Takahashi et al. 2008). En estudios anteriores se ha sugerido que al igual que el acpPC, el CCL asociado al FSI puede incorporar clorofila *a*, aumentando su sección transversal óptica, en células aclimatadas a baja luz (Iglesias-Prieto et al, 1997). Los resultados del presente estudio permiten proponer un nuevo modelo del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes, que incorpora el CCL asociado específicamente al FSI. De los componentes que emiten fluorescencia de las células completas de dinoflagelados a temperaturas criogénicas, asignados anteriormente al FSI (698nm, 709nm y 724nm), la fluorescencia a 709nm puede ser asignada al CCL del FSI, dado que este componente ha sido reportado anteriormente en la misma Fracción III de donde se aisló el FSI para este estudio (Mimuro et al. 1990b, Iglesias-Prieto et al.1993). En este nuevo modelo, en el interior de la membrana el FSII está unido al acpPC, el FSI a su CCL y el PCP fuera de la membrana, unido al acpPC y/o al CCL del FSI en función de las condiciones lumínicas. Un modelo del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes con esta organización, supone características análogas con el aparato fotosintético de plantas y los otros grupos de algas. Un hecho que apoya esta analogía es que el acpPC posee similitudes con la región del amino terminal de la FCP (fucoxanthin-chlorophyll protein) que es el principal CCL en las diatomeas y con las proteínas CAB (chlorophyll *a/b*-binding proteins) que componen los CCLs en las plantas y algas verdes (Hiller et al, 1993). Además, se sabe que los dinoflagelados comparten con los demás grupos de algas y con las plantas, ocho sitios de unión para clorofilas por polipéptido como un rasgo ancestral en los CCLs, que les ha dado la flexibilidad para unir diferentes clorofilas y carotenoides (Grabowski et al. 2001). Más específicamente, se ha propuesto

que los genes que codifican para las proteínas del acpPC poseen afinidad filogenética con los plástidos de las algas rojas, por lo tanto, el CCL del FSI que aislamos en esta investigación podría haberse originado de este grupo (Durnford, et al., 1999). Así mismo, las algas rojas solo poseen clorofila *a* y algunos carotenoides en su CCL, el cual está asociado específicamente al FSI, al igual que el CCL del FSI de los dinoflagelados aislado en el presente estudio (Gantt et al, 2003). En esta investigación, el peso molecular del CCL del FSI es ligeramente mayor pero se encuentra dentro del rango del acpPC (19-20 kD) y de los polipéptidos del CCLI de las algas rojas que va de 19.5 a 23.5 kD (Iglesias-Prieto et al.1993, Gantt et al, 2003). También el espectro de absorción del CCL del FSI es muy similar al del CCLI de algas rojas (Gantt et al, 2003). Esto concuerda con la teoría de la endosimbiosis secundaria, que propone que todos los plástidos con clorofilas *a/c* como el de los dinoflagelados, se originaron de un alga roja endosimbionte y que el CCL ancestral era uno asociado al FSI, como el de algas rojas y el presentado en esta investigación (Green, 2003). Es probable que el complejo colector del FSI de los dinoflagelados descrito en este estudio, haya sido adquirido por endosimbiosis de un alga roja. Se requiere realizar más investigación para corroborar esta hipótesis. Por otro lado el modelo del aparato fotosintético de los dinoflagelados propuesto en esta investigación, también concuerda con estudios más recientes que sugieren que en dinoflagelados simbiotes adaptados a alta luz, los CCLs, interactúan en vías alternas de disipación de energía como el transporte cíclico de electrones, la cloro-respiración y la migración del PCP del FSII al FSI (Reynolds et al. 2008). Estos autores proponen, que este tipo de interacciones parecen no existir en dinoflagelados adaptados a baja luz, sin embargo se ha sugerido que en *Symbiodinium kawagutii*, cuando se presentan

condiciones de estrés lumínico o térmico, la producción de FSII-no reductores de QB puede ser una vía de redirigir la energía hacia el acpPC o a la PCP, para compensar la baja capacidad de incorporar pigmentos fotoprotectores en los CCLs que posee esta especie (Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto, 2005). Por otro lado el FSI contiene diferentes pigmentos accesorios atribuibles a un CCL asociado, como clorofila c_2 y peridinina, además de pigmentos fotoprotectores como β -caroteno, diatoxantina y diadinoxantina, lo que sugiere que en el CCL del FSI sí se podrían estar llevando a cabo mecanismos de fotoprotección (Iglesias-Prieto y Trench, 1997) ¿Como contribuye el CCL asociado al FSI de los dinoflagelados simbioses bajo estrés, al equilibrio en la transferencia de energía dentro del aparato fotosintético? Se ha propuesto que la expresión diferencial del gen poliproteínico que codifica para el acpPC y probablemente para el CCL del FSI, también podría traducirse en diferentes holoproteínas con diferente contenido de xantofilas fotoprotectoras o con diferentes proporciones de pigmentos accesorios (Iglesias-Prieto y Trench 1997). Esta expresión diferencial, podría estar determinado los límites de la capacidad de fotoprotección y/o de la tasa de fotosíntesis de los dinoflagelados adaptados a diferentes regímenes lumínicos (Iglesias-Prieto y Trench 1997). Por ejemplo: *Symbiodinium microadriaticum* aislado de la medusa *Cassiopea xamachana* adaptado a alta luz, puede incorporar una mayor cantidad de xantofilas fotoprotectoras bajo estrés lumínico, mientras que *Symbiodinium kawagutii* aislado del coral *Montipora verrucosa* adaptado a baja luz, tiene una pobre respuesta a altas irradiancias, pero bajo luz tenue genera altas tasas de fotosíntesis (Iglesias-Prieto y Trench, 1997). Por otro lado se ha propuesto que la tasa de inhibición de la síntesis de novo del acpPC y la abundancia de mRNA que codifica para diferentes isoformas del acpPC, determinan el patrón

de abundancia de este complejo bajo condiciones de estrés (Takahashi et al. 2008) ¿La abundancia del CCL del FSI en el aparato fotosintético podría estar también relacionada con la síntesis de novo del acpPC? Es necesario realizar más investigación alrededor de la unidad fotosintética de los dinoflagelados simbiotes, para responder a estas preguntas que quedan abiertas con esta investigación.

9. Conclusion

- ✓ El CCL del FSI de los dinoflagelados simbiotes es un complejo polipeptídico que tiene un peso molecular similar, aunque no idéntico al del acpPC y que proviene de la misma familia de genes o del mismo gen poliproteínico que el acpPC, sin embargo, posee una composición pigmentaria espectroscópicamente diferente de la del acpPC. Esta diferencia, principalmente en la cantidad y proporción de pigmentos accesorios, define su función de absorber energía y transferirla específicamente al centro de reacción del FSI, por lo tanto el CCL del FSI descrito en esta investigación es un CCL diferente del acpPC dentro del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes.

10. Referencias

- Allen, J. F. 2003. Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* 8: 15–19
- Arnon, D. I. 1971. The Light Reactions of Photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68: 2883-2892.
- Ballottari, M.; Osto, L.D.; Morosinotto, T. and Bassi, R. 2007. Contrasting Behavior of Higher Plant Photosystem I and II Antenna Systems during Acclimation. *J. Biol. Chem.* 282: 8947-8958.
- Bassi, R.; Soen, S. Y.; Frank, G.; Zuber, H. and Rochaix, J. D. 1992. Characterization of chlorophyll a/b proteins of Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 267: 25714–25721
- Bassi, R.; Hansen, G. H.; Barbato, R.; Giacometti, G. M. and Simpson, D. J. 1987. Chlorophyll-Proteins of the Photosystem II Antenna System. *J Biol. Chem.* 262:13333-13341.
- Bengis, C. and Nelson, N. 1975. Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 250:2783-2788.
- Bengis, C. and Nelson, N. 1977. Subunit structure of the photosystem I reaction center. *J. Biol. Chem.* 252:4564-4569.
- Boczar, B.A.; Prezelin, B.B.; Marckwell, J.P.; Thornber, J.P. 1980. A chlorophyll c-containing pigment-protein complex from the marine dinoflagellate, *Glenodinium* sp. *FEBS Lett.* 120: 243-247.
- Bruce, B.D. and Malkin, R. 1988a. Subunit stoichiometry of the chloroplast Photosystem I complex. *J Biol Chem.* 263: 7302–7308.

- Clayton, R.A. 1965. The Biophysical Problems of Photosynthesis. *Science*. 149:1346-1354.
- Durnford, D.G.; Deane, J.A.; Tan, S.; McFadden, G. I.; Gantt, E. and Green, B.R. 1999. A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.* 48:59-68.
- Friedman, A. L. and Alberte, R. S. 1984 A diatom light-harvesting pigment-protein complex. Purification and characterization. *Plant Physiol* 76: 483-489.
- Gantt, E.; Grabowski, B. and Cunningham, F. X. 2003. **Antenna Systems of Red Algae: Phycobilisomes with photosystem II and chlorophyll Complexes with photosystem I.** Chapter 10. In: Light Harvesting Antennas in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 307-322.
- Govindjee, O.; Wong, D.; Prézelin, B.B. and Sweeney, B.M. 1979 Chlorophyll a fluorescence of *Gonyaulax polyedra* grown on a light-dark cycle after transfer from constant light. *Photochem. Photobiol.* 30: 405-411.
- Grabowski, B.; Cunningham, F. X.; Gantt, E.; 2001. Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 2911-2916.
- Green, B.R. 2003. **The Evolution of Light-harvesting Antenas.** Chapter 4. In: Light Harvesting Antennas in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 129-168.
- Hennige, S. J.; Suggett, D. J.; Warner, M. E.; McDougall, K. E.; Smith, D. J. 2009. Photobiology of Symbiodinium revisited: bio-physical and bio-optical signatures. *Coral Reefs*. Springer Verlag. 1-17.
- Hiller, R.G.; Wrench, P.M.; Gooley, A.P.; Shoebridge, G. and Breton, J. 1993 The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: Characterization and relation to other light-harvesting proteins. *Photochem Photobiol* 57:125-131.

- Hiller, R.G.; Wrench, P.M.; Sharples, F.P. 1995. The light-harvesting chlorophyll a-c binding protein of dinophlagellates: a putative polyprotein. *FEBS Lett* 363: 175-178.
- Hofmann, E.; Wrench, P.M.; Sharples, F.P.; Hiller, R.G.; Welte, W.; Diederichs, K. 1996. Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science*. 272: 1788-17991.
- Iglesias-Prieto, R.; Govind, N.S.; Trench, R.K. 1991. Apoprotein composition and spectroscopic characterization of the water-soluble peridin-chlorophyll a-proteins from three symbiotic dinoflagellates. *Proc R Soc Lond (Ser B)* 246: 275-283.
- Iglesias-Prieto, R.; Govind, N.S.; Trench, R.K. 1993. Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil Trans R Soc (Ser B)* 340: 381-392
- Iglesias-Prieto, R. and 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. & Trench, R. K. 1997a Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Responses of chlorophyll protein complexes to different light regimes. *Mar. Biol.* 130, 23–33.
- Iglesias-Prieto, R. 1996. **Biochemical and spectroscopic properties of the Light-harvesting apparatus of dinoflagellates.** In: *Citology. Genetic and Molecular Biology of Algae*. Edited by B. R. Chaudhary and S.B Agrawal. SPB Academic Publishing, Amsterdam. The Netherlands. pp. 301-322.
- Jeffrey, S.W.; Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol P* 167: 91-194.
- Kargul, J.; Nield, J.; Barber, J. 2003. Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga

- Chlamydomonas reinhardtii*. Insights into light harvesting for PSI. *J. Biol. Chem.* 278:16135–41.
- Kok, B. 1957. Absorption changes induced by the photochemical reaction of photosynthesis. *Nature* 179:583–84
- Kung, S. D. and Thornber, J.P. 1971. Photosystem I and II chlorophyll–protein complexes of higher plant chloroplasts. *Biochim BiophysActa* 253: 285–289
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Melis, A. 1989. Spectroscopic methods in photosynthesis: Photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Phil Trans R Soc (Ser B)*. 323: 397-409.
- Mimuro, M.; Tamai, N.; Ishimaru, T. and Yamazaki, I. 1990a. Characteristic fluorescence components in photosynthetic pigment systems of a marine dinoflagellate, *Protogonyaulax tamarensis*, an excitation energy flow among them. Studies by means of steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1016, 280-287.
- Morosinotto, T.; Ballottari, M.; Klimmek, F.; Jansson, S.; Bassi, R. 2005. The association of antenna system to photosystem I in higher plants: Cooperative interactions stabilizes the supramolecular complex and enhance red-shifted spectral forms. *J. Biol. Chem.* 280:31050–58.
- Mullet, J.E.; Burke, J.J.; Arntzen, C.J. 1980 Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65:814-822.
- Munekage, Y.; Hashimoto, M.; Miyake, C.; Tomizawa, K.; Endo, T. 2004. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429:579–582.
- Munekage, Y.; Shikanai, T. 2005. Cyclic electron transport through photosystem I. Review. *Plant Biotechnology* 22: 361–369.

- Muscatine, L. and Weis, V. 1992. **Productivity of zooxanthllae and biogeochemical cycles**. In: Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea. Falkowski, P.G. and Woodhead, A.D. (eds.). New York: Plenum Press. pp.381-402
- Nelson, N. and Bengis, C. 1975. **Reaction center P700 from chloroplasts**. In: Proceedings III International Congress on Photosynthesis Research, Rehovot, Israel. Avron M (ed). Elsevier, Amsterdam Vol I, pp 609–620.
- Nelson, N. and Notsani, B. 1977 **Function and organization of individual polypeptides in chloroplast Photosystem I reaction center**. In: Bioenergetics of Membranes. Packer, L. et al. (eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp 233–238.
- Nelson, N.; Deters, D.W.; Nelson, H. and Racker, E. 1973. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIII. Properties of isolated subunits of coupling factor I from spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 248: 2049–2055
- Nelson, N. and Ben-Shem, A. 2004. The Complex Arquithecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 971-982.
- Prezelin, B.B. and Alberte, R.S. 1978. Photosynthetic characteristics and organization of chlorophyll in marine dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1801-1804.
- Prézelin, B.B. 1987. **Photosynthetic physiology of dinoflagellates**. In: The Biology of Dinoflagellates. Taylor, M. ed. Blackwell, London, pp 174-223.
- Rodriguez-Roman, A.; Iglesias-Prieto, R. 2005. Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Mar Biol.* 146:1063–1073.
- Reynolds, J.M.; Bruns, B.U.; Fitt, W.; Schmidt, G.W. 2008. Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13674–13678.

- Shiozawa, J.A.; Alberte, R.S. and Thornber, P.J. 1974. The P700 chlorophyll *a* – protein. Isolation and some characteristics of the complex in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 338-397.
- Takahashi, S.; Whitney, S.; Itoh, S; Maruyama, T.; Badger, M. 2008. Heat stress causes inhibition of the de novo synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4203–4208.
- Taylor, F.J.R. 1987. **General group characteristics. Special features of interest: Short history of dinoflagellate study.** In: The biology of dinoflagellates. Taylor, F.J.R. (ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford. Vol. 12, pp. 1-23.
- Thornber, J.P.; Morishige, D.T.; Anandan, S. and Peter, G.F. 1991. **Chlorophyll-carotenoid-proteins of higher plant thylakoids.** In: The Chlorophylls. Scheer, H. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp 549–585.
- Thornber, J.P. 1975. Chlorophyll proteins: light harvesting and reaction center components of plants. *Annu Rev Plant Physiol* 26: 127-158
- Towbin, H. T.; Staehelin, J. G. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Trench, R. K. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobiosis. Cell Res.* 9: 135-175.
- Trench, R.K. and Blank, R.J. 1987. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. goreauii*, sp. nov., *S. kawagutti*, sp. nov., and *S pilosum*, sp. nov.: Gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates., *J. Phycol.* 23, 269-481.
- Vierling, E. and Alberte, R.S. 1983. P700 Chlorophyll *a*-Protein'. Purification, characterization, and antibody preparation. *Plant Physiol.* 72, 625-633.