



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

**"CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CINASA C ACTIVA, RACK1 EN  
*Symbiodinium* sp."**

**T E S I S**

Que para optar por el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P r e s e n t a

**ESMERALDA PÉREZ CERVANTES**

Director de tesis

**DR. MARCO A. VILLANUEVA MÉNDEZ**

(Instituto de ciencias del mar y limnología, UNAM)

Comité tutorial

**DRA. PATRICIA E. THOMÉ ORTIZ** (Instituto de ciencias del mar y limnología, UNAM)

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO** (Facultad de medicina, UNAM)

**DR. JAVIER R. AMBROSIO HERNÁNDEZ** (Facultad de medicina, UNAM)

**DR. DAVID U. HERNÁNDEZ BECERRIL** (Instituto de ciencias del mar y limnología, UNAM)

México, DF, Diciembre 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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.

Esta tesis esta dedicada a mis abuelos:

Ángel (†) y Calixto.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia: A mis padres David y Quintina, por siempre impulsarme a poner mi mejor esfuerzo en todo y darme siempre su ayuda. A mis hermanos David e Iván, que a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes.

Agradezco al Dr. Marco A. Villanueva Méndez, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme todo el apoyo para realizar esta tesis. Además por toda su paciencia, enseñanzas y cariño que recibí en mi estancia.

Agradezco a los miembros del jurado:

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz, por todas las facilidades que me brindó en su laboratorio y cada una de sus correcciones que permitieron complementar este trabajo.

Dres. Edgar Zenteno Galindo, Javier R. Ambrosio Hernández y David U. Hernández Becerril, gracias por sus observaciones y correcciones.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio:

Dra. Tania Islas Flores, por ser mi maestra, mi guía, consejera y enseñarme cosas de la vida y del laboratorio. Además por toda su ayuda al realizar mis experimentos.

M. en C. Alma R. Almaral Mendivil por su asistencia técnica, que permitieron el desarrollo de muchos de los experimentos de esta tesis.

M. en C. Raúl E. Castillo Medina y M. en BE. Mario F. Ortiz Matamoros, por su amistad y por auxiliarme en cada uno de mis derrames industriales y experimentos. También agradezco todos los buenos momentos que vivimos fuera y dentro del laboratorio.

Biol. Inti Iván Sánchez Santamaría, mi compañero adoptivo de laboratorio, gracias por todo su apoyo y compañía.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, por todos esos momentos que contribuyeron a que pudiera realizar mi trabajo.

Agradezco a CONACyT, al programa de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, que permitieron el desarrollo de este trabajo.

La tesis fue realizada con el apoyo del proyecto CONACyT 175951.

## Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	4
1. <i>Symbiodinium</i> DESCRIPCIÓN Y CICLO DE VIDA.....	4
2. Transducción de señales .....	8
2.1 PROTEÍNAS ADAPTADORAS Y FAMILIA DE PROTEÍNAS WD-40 .....	8
a. ESTRUCTURA DE RACK1.....	9
b. RACK1 Y SUS FUNCIONES EN LA CÉLULA. ....	11
c. INTERACCIÓN DE RACK1 CON OTRAS PROTEÍNAS .....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVO.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
2. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE RACK1 EN <i>Symbiodinium</i> sp. CASSKB8, (SymRACK1), Y ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN. ....	16
2.1. OLIGONUCLEÓTIDOS .....	16
2.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>Symbiodinium</i> sp. CASSKB8.....	18
2.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>Symbiodinium</i> sp. CASSKB8.....	19
2.4 ELECTROFORESIS DE RNA Y DNA EN GELES DE AGAROSA.....	19
2.5 OBTENCIÓN DE cDNA.....	20
2.6 PCR PARA AMPLIFICAR A SymRACK1 .....	20
3'-RACE DE <i>SymRACK1</i> DE <i>Symbiodinium</i> .....	21
2.7 CLONACIÓN DEL cDNA DE SymRACK1 Y SU TRANSFORMACIÓN EN <i>E.</i> <i>coli</i> . 22	

2.8	Expresión de SymRACK1 .....	23
2.9	PURIFICACIÓN DE SymRACK1 .....	24
3	DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE SymRACK1 DE <i>Symbiodinium</i> sp. CASSKB8 DURANTE SU CRECIMIENTO.....	25
3.1	EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE <i>Symbiodinium</i> .....	25
3.2	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) Y DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE).....	25
3.3	INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).....	27
	RESULTADOS .....	29
1.	AMPLIFICACIÓN DEL cDNA Y DNA QUE CODIFICA A <i>SymRACK1</i> Y OBTENCIÓN DE SUS SECUENCIAS.....	29
a.	PORCENTAJES DE IDENTIDAD DE SymRACK1 CON RACK1 DE OTROS ORGANISMOS.....	33
b.	3'-RACE DE <i>SymRACK1</i> DE <i>Symbiodinium</i> KB8.....	36
2.	CLONACIÓN DEL cDNA DE <i>SymRACK1</i> , TRANSFORMACIÓN Y EXPRESIÓN EN <i>E. coli</i> .....	37
3.	WESTERN BLOT CON UN ANTICUERPO ANTI-RACK1 HETERÓLOGO EN EXTRACTOS DE <i>Symbiodinium</i> .....	42
4.	PATRONES DE EXPRESIÓN DE <i>SymRACK1</i> DE <i>Symbiodinium</i> DURANTE SU CRECIMIENTO Y CICLO CIRCADIANO.....	44
	DISCUSIÓN.....	47
	CONCLUSIÓN.....	52
	PERSPECTIVAS .....	53
	BIBLIOGRAFÍA.....	54
	ANEXOS.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

APAF1 apoptotic peptidase activating factor 1  
cDNA complementary Deoxyribonucleic acid  
DEPC Dietil pirocarbonato  
E1A Adenovirus early region 1,  
EST Expressed sequence tag  
GABA Gamma-aminobutyric acid  
GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
GPCRs, G protein-coupled receptors  
IL-3 Interleukin-3  
LB Luria Bertani  
MAPK Mitogen-activated protein kinase  
Nef Negative Regulatory Factor  
NHERF1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1  
NMDA N-methyl D-aspartate  
NR2B N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B  
Pck2 Phosphoenolpyruvate carboxykinase  
PCR Polymerase Chain Reaction  
PDE4D5 cAMP-specific phosphodiesterase-4D5  
PH Pleckstrin  
PKC Protein kinase C  
PTPn Protein tyrosine phosphatase n  
RACK1 Receptor for Activated C Kinase  
Ran1 Ras-related nuclear protein  
RBBP5 retinoblastoma binding protein 5  
Receptor IGF-1 Insulin-like growth factor 1



RNA Ribonucleic Acid

Rpm revoluciones por minuto

STAT1 Signal transducer and activators of transcription 1

VacA Vacuolating cytotoxin A

WD triptófano y ácido aspártico

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i> spp.....	5
Figura 2. Simbiosomas.....	7
Figura 3. Estructura de RACK1.....	9
Figura 4. Diagrama de flujo para identificación y caracterización de la proteína RACK1 en <i>Symbiodinium</i> sp.KB8.....	15
Figura 5. Secuencia de SymRACK1 a partir de una EST (Expressed Sequence Tag).....	17
Figura 6. Alineamiento de SymRACK con RACK1 de humano.....	28
Figura 7. Amplificación de <i>SymRACK1</i> de <i>Symbiodinium</i> sp. KB8 por RT-PCR y PCR.....	29
Figura 8. Amplificación de fragmentos de <i>SymRACK1</i> de <i>Symbiodinium</i> sp.....	31
Figura 9. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de SymRACK1.....	32
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de SymRACK1 de <i>Symbiodinium</i> KB8.....	32
Figura 11. 3'-RACE de <i>SymRACK1</i> .....	36
Figura 12. PCR de colonia, Miniprep y digestión de construcción pEXP5-CT/ <i>SymRACK1</i> .....	38
Figura 13. PCR de colonia de <i>E. coli</i> BL21 (D3) pLysS transformadas con pEXP5-CT/ <i>SymRACK1</i> .....	39
Figura 14. Gel de 12% acrilamida teñido con azul de coomassie, que muestra la expresión de la proteína recombinante SymRACK1.....	39
Figura 15. a. Expresión de la proteína recombinante de ~30 kDa, correspondiente a un fragmento de SymRACK1 y Western blot.....	40
Figura 16. Western blot con anticuerpo anti-hRACK1.....	41
Figura 17. Western blot con anti-hRACK1 en extractos de <i>Symbiodinium</i> sp.....	43
Figura 18. Patrones de expresión de SymRACK1 DE <i>Symbiodinium</i> KB8 durante su crecimiento y ciclo circadiano.....	48
Figura A. Western blot con anti-hRACK1 en extractos de <i>Symbiodinium</i> sp. KB8.....	63
Figura B. Gráfica de valores relativos del gel y Western blot para cuantificar a SymRACK1 en crecimiento.....	64
Figura C. Gráfica de valores relativos del gel y Western blot para cuantificar a SymRACK1 en ciclo circadiano.....	64

Tabla 1. Lista de proteínas con las que interacciona RACK1.....	10
Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificaciones de la secuencia de SymRACK1.....	17
Tabla 3. Fragmentos de las secuencias de SymRACK1.....	30
Tabla 4. Porcentaje de identidad de SymRACK1 a nivel de aminoácidos con RACK1.....	34
Tabla 5. Porcentaje de identidad de <i>SymRACK1</i> a nivel de nucleótidos con secuencias homólogas de RAKC1 de diferentes especies.....	35
Tabla A. Componentes del medio de cultivo ASP-8A.....	63

## RESUMEN

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* pueden encontrarse en vida libre y también en simbiosis con diversos organismos arrecifales. Los mecanismos que regulan la simbiosis, así como la fisiología del dinoflagelado, deben ser mediados por diversas vías de señalización. En estas vías participan proteínas adaptadoras que transducen y amplifican las señales. RACK1 (Receptor for Activated C Kinase; o receptor de la cinasa C activada 1), es una proteína adaptadora involucrada en vías de transducción de señales regulando procesos como simbiosis y parasitismo. Hasta el momento no se han identificado homólogos de RACK1 en *Symbiodinium*; por lo tanto, y debido a su importancia, el objetivo principal de este proyecto fue identificar y caracterizar al homólogo de RACK1. En este trabajo se utilizó a *Symbiodinium* sp. CassKB8, endosimbionte de la medusa invertida *Cassiopeia xamachana*, como modelo de estudio. Con base a una secuencia de EST (Expressed sequence tag) se amplificó, clonó y determinó la secuencia codificante del homólogo de esta proteína en esta especie de *Symbiodinium* al cual se le denominó SymRACK1. La secuencia de la proteína cuenta con 942 nucleótidos y 313 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 34.2 kDa, pI de 5.9 y presenta los 7 dominios WD-40 característicos de esta familia de proteínas. La secuencia de nucleótidos presentó una variación en la base 261 de citosina y timina; sin embargo, el codón traduce para treonina. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de SymRACK1 tienen identidades de 58 a 85% con RACK1 de vertebrados y plantas. El cDNA se clonó en un vector de expresión bacteriana para obtener proteína recombinante. Anticuerpos de conejo anti-RACK1 de humano reconocieron a SymRACK1 en condiciones nativas y desnaturalizantes. En otros modelos RACK1 participa en procesos de proliferación celular y ciclo circadiano, estudios de su expresión a nivel de proteínas durante el crecimiento en cultivo o durante el ciclo circadiano *Symbiodinium* sp. CassKB8 indican que SymRACK1 cambia durante ambos procesos. Finalmente SymRACK1 se encuentra presente en *Symbiodinium* sp. KB8 y podría regular mecanismos de transducción de señales y el proceso de simbiosis.

## INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son eucariontes unicelulares de agua dulce y marinos que pertenecen al superfilo Alveolata; filo Dinoflagellata; clase Dinophyceae. El género *Symbiodinium* es un grupo específico de dinoflagelados conocido también como zooxantelas, los cuales son simbioses intracelulares de invertebrados marinos como Cnidaria, Mollusca, Platelminata, Porifera y Foraminifera (Stat *et al.*, 2006). En ellos se ha calculado que el simbionte aporta el 90% de los requerimientos energéticos al hospedero (Muscatine & Porter, 1977) permitiéndoles vivir en ambientes con pocos nutrientes, y haciendo de la simbiosis mutualista una de las relaciones más importantes para los ecosistemas marinos oligotróficos (Davies, 1993). Actualmente, *Symbiodinium* se han clasificado en 9 clados (A-I) (Pochon & Gates, 2010). En este trabajo se utilizó el clado tipo A1 de *Symbiodinium* sp. CassKB8; este clado es el endosimbionte predominante en la medusa invertida *Cassiopeia xamachana*. Esta especie de medusa pertenece a la clase Scyphozoa de los cnidarios y se caracteriza por requerir que *Symbiodinium* se establezca para completar su ciclo de vida (Colley & Trench, 1983) el establecimiento de la simbiosis dependerá de las propiedades del simbionte y las interacciones celulares dentro del hospedero (McAuley *et al.*, 1982). Además en este simbionte se ha detectado la presencia de moléculas de señalización en cultivo y en simbiosis, lo que indica que el simbionte posiblemente secreta a estas moléculas de reconocimiento cuando se encuentra en el hospedero (Markell *et al.*, 2010). A partir de las secuencias de EST también se han identificado genes que se encuentran relacionados con el metabolismo del simbionte (Bayer *et al.*, 2012). *Symbiodinium* necesita responder a estímulos de su entorno a través de mecanismos de transducción de señales para poder realizar simbiosis y otras funciones que le permitan su supervivencia. Estos mecanismos han sido estudiados en estos organismos (Davy *et al.*, 2012) y requieren de una fina regulación por medio de interacciones proteína-proteína (Schenk & Snaar-Jagalska, 1999).

La proteína RACK1, ha sido descrita ampliamente en organismos eucariontes, ya que es un mediador clave de las diversas vías de transducción de señales y contribuye a numerosos aspectos de la función celular (Adams *et al.*, 2011). RACK1 ha sido relacionada con la adecuada formación de los simbiosomas en los nódulos de las raíces de *Phaseolus vulgaris* (Islas-Flores *et al.*, 2011) y con la regulación de procesos de infección en organismos alveolados (Kelly *et al.*, 2003; Regmi *et al.*, 2008). RACK1

pertenece a la familia de proteínas con dominios WD-40 (triptófano-aspartato), los cuales se pliegan en una estructura de  $\beta$ -propela con 7 aspas (Stebbins & Mochly-Rosen, 2001). Esta estructura facilita la unión a otras proteínas y permite el transporte alrededor de la célula (Paoli, 2001), además de ser una proteína de anclaje que permite la estabilización de la actividad de otras proteínas. Adicionalmente, se sabe que participa en la regulación de la maquinaria ribosómica, se ha encontrado que forma parte de la subunidad 40S y que además recluta a PKC (Protein kinase C) hacia el ribosoma (Ben-Shem *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2004). Se ha reportado que RACK1 interacciona con receptores de superficie celular (McCahill *et al.*, 2002) y con proteínas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la proteína de andamio 14-3-3 $\zeta$  en el núcleo (He *et al.*, 2010; Robles *et al.*, 2010). En este trabajo se identificó y caracterizó a la proteína SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. La caracterización de SymRACK1 es un primer paso para entender su posible función en la fisiología del simbiote y en procesos relacionados con la simbiosis, para lo cual que se requerirán estudios a nivel funcional en *Symbiodinium* y en sus hospederos.

# ANTECEDENTES

## 1. *Symbiodinium* Y SU CICLO DE VIDA.

*Symbiodinium* fue denominado originalmente como "zooxantela" y en la actualidad se sabe que las zooxantelas son microorganismos de color amarillo-marrón que incluyen a dinoflagelados, diatomeas, criptofitas, crisofitas (algas doradas) y rodofitas (algas rojas). *Symbiodinium* se encuentra comúnmente en simbiosis mutualista con una variedad de invertebrados y hospederos protistas. (Baker, 2011). Los dinoflagelados son microorganismos eucariotes, los cuales forman parte del plancton fotosintético y son responsables de gran parte de la producción primaria de los océanos, ríos y lagos. *Symbiodinium* pertenecen al reino Protista; superfilo alveolata; filo Dinoflagellata; clase Dinophyceae, y comparten un ancestro común con ciliados y apicomplexa (Leander & Keeling, 2003). La principal característica morfológica compartida entre ellos es la presencia de alveolos corticales que se encuentran en una capa continua de soporte en la membrana celular (Cavalier-Smith & Chao, 2004).

Los dinoflagelados se encuentran adaptados a hábitats bénticos y pelágicos de diversos cuerpos de agua. Se pueden identificar por su morfología celular, su movimiento, presencia de flagelos y por su presencia de clorofila a y c (Steidinger & Tangen, 1996). A la fecha se han identificado alrededor de 2000 especies de las cuales alrededor del 50% se consideran fotosintéticas (Not *et al.*, 2012), dentro de las que se encuentran las especies del género *Symbiodinium*. Estos organismos pertenecen al orden Suesiales, familia Symbiodiniaceae y se caracteriza por ser unicelular fototrófico, de color café-amarillento, con una etapa no móvil en forma de cocoide y también cuenta con una etapa móvil llamada mastigote (Trench & Blank, 1987). Aunque su ciclo de vida aún no es completamente conocido, se sabe que durante la propagación asexual a partir de una célula cocoide se producen 2 mastigotes por mitosis, los mastigotes sufren una rápida metamorfosis y forman cocoides (Fitt & Trench 1983). Se cree que una célula cocoide puede llevar a cabo 2 mitosis formando una célula conocida como tétrada (fase de 4 células) que al dividirse generará 4 células mastigotes. También se infiere que los mastigotes se pueden transformar en isogametos y propagarse sexualmente, proceso conocido como singamia o fecundación. En la fecundación los gametos se unen y forman una célula cocoide, la cual se divide meióticamente para producir la célula tétrada (Figura 1).

Ciclo de vida de *Symbiodinium* sp.

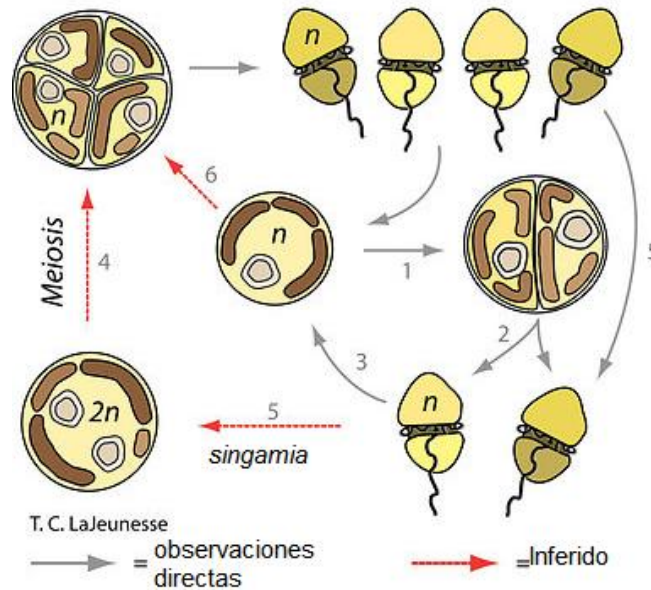


Figura 1. Ciclo de vida de *Symbiodinium* spp. Alternancia entre la fase de cocoides y fase móvil mastigote (1 a 3). A partir de la fase cocoide se producen 2 mastigotes por mitosis después de 1 o más días, y la división dependerá de la disponibilidad de nutrientes y de la especie (2). En la fase mastigote las células permanecen nadando durante varias horas, antes de transformarse a la etapa de cocoides (3). La fase de tetradas (4 células) se produce por la meiosis de células cocoides (4), también pueden producirse por la recombinación sexual de gametos isógamos (5), y a partir de dos rondas sucesivas de la mitosis durante la propagación asexual (6). Las fases del ciclo de vida observadas en cultivo también son observadas en hospederos. (Redibujado de (Fitt y Trench, 1983), tomada y modificada de <http://tolweb.org/Symbiodinium/126705>).

El género *Symbiodinium* se caracteriza por formar relaciones de simbiosis mutualista con una gran variedad de invertebrados marinos como cnidarios, platelmintos, esponjas y foraminíferos (Stat *et al.*, 2006). El estado simbiótico junto con su hospedero se denomina holobionte (Trench, 1987). En los arrecifes de coral predominan las asociaciones simbióticas entre invertebrados cnidarios y dinoflagelados del género *Symbiodinium*. (Trench, 1897). La presencia del dinoflagelado simbiote en el hospedero



implica ventajas para ambos, ya que provee de azúcares, aminoácidos, carbohidratos y pequeños péptidos al coral, mientras que el dinoflagelado obtiene amonio y fosfato que son producto de desecho del metabolismo del coral (Muscatine, 1990; Trench, 1987).

El simbiote se encuentra dentro de un simbiosoma, el cual es un compartimiento unido a la membrana de la célula huésped, que contiene uno o más simbiosomas (Roth *et al.*, 1988); ver Figura 2. El concepto de simbiosoma en la simbiosis de los cnidarios fue propuesto por primera vez en la simbiosis de *Chlorella-Hydra* (Neckelmann y Muscatine, 1983). Es definido como un organelo compuesto por múltiples membranas externas derivadas del hospedero y del simbiote, donde se encuentra albergado el *Symbiodinium* (Wakefield *et al.*, 2000). Los simbiosomas que se mantienen en cultivo durante varias generaciones carecen de simbiosomas (Trautman *et al.*, 2002). Cuando se pierde la relación simbiótica entre el dinoflagelado simbiote y el hospedero, y/o la pérdida en la pigmentación del dinoflagelado, se dice que ocurre un blanqueamiento que puede o no estar acompañado de la muerte del hospedero (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992; Fitt *et al.*, 2001; Stimson *et al.*, 2002). Los fenómenos de asociación simbiótica y pérdida del simbiote deben estar finamente regulados por el simbiote y el hospedero (Weis, 2008). Esta regulación es fundamental para la fisiología y desarrollo normal de estos microorganismos, tanto en su estadio endosimbionte, como en el de vida libre, y son necesarios para contender con el medio ambiente y poder responder a sus múltiples estímulos.

Dentro del phylum cnidaria se encuentran incluidas las clases Anthozoa (corales y anémonas), Hydrozoa (hidras) Cubozoa (cubomedusas) y Scyphozoa (medusas) (Barnes, 1974). En la clase Scyphozoa se encuentra la medusa invertida *Cassiopeia xamachana*, la cual se sabe que para estimular la estrobilación a partir de su etapa de pólipo (scyphistoma) es necesario que *Symbiodinium* sp. se establezca en ella. El pólipo al estrobilar dará origen a la etapa de medusa joven o éfira. Por lo tanto, la simbiosis es necesaria para que se complete el ciclo de vida de la medusa (Colley & Trench, 1983). En este trabajo se utilizó un cultivo de *Symbiodinium* sp. CassKB8, el cual es el endosimbionte de *Cassiopeia* spp. (Santos *et al.* 2002).

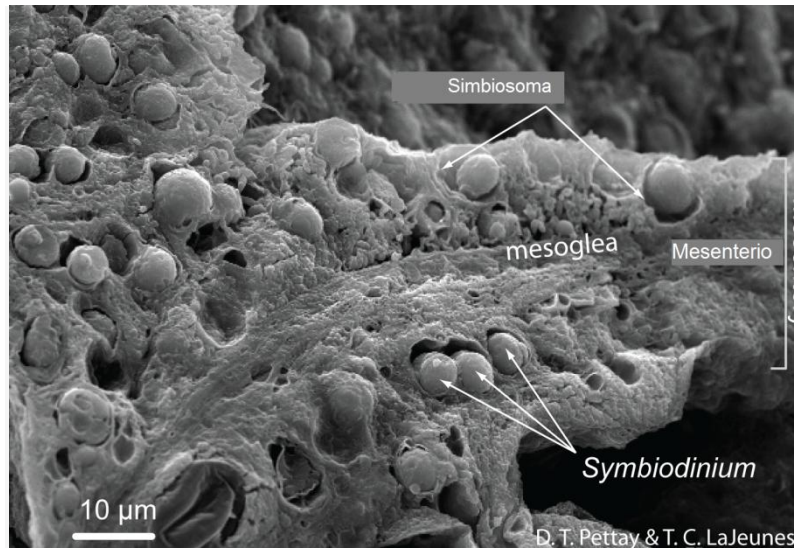


Figura 2. Simbiosomas, imagen tomada con un microscopio electrónico de barrido que muestra la distribución y la densidad de las células simbiotas en un pólipo de coral (*Porites porites*) (LaJeunesse *et al.*, 2012).

## 2. Transducción de señales

Las células reaccionan a los cambios ambientales que perciben a través de estímulos extracelulares. Estos estímulos pueden ser físicos (luz, temperatura, presión y energía eléctrica), químicos (nutrientes, hormonas y neurotransmisores) o por mecanismos de respuesta y regulación que se dan a través de las vías de transducción de señales. Para una adecuada señalización en el interior de la célula algunas de las proteínas que participan en vías de transducción requieren modificaciones post-traduccionales, cambios conformacionales, y/o una asociación con proteínas de andamiaje también llamadas proteínas adaptadoras (Kholodenko *et al.*, 2010). Pocos estudios se han llevado a cabo en *Symbiodinium* respecto a transducción de señales.

### 2.1 PROTEÍNAS ADAPTADORAS Y FAMILIA DE PROTEÍNAS WD-40

Las proteínas adaptadoras o de andamiaje, permiten transducir y amplificar las señales percibidas a través de acoplarse a varias proteínas efectoras al mismo tiempo, y llevarlas a sus sitios de acción (Pawson & Scott, 1997; Liu & Nie, 2009). Ejemplos bien conocidos de proteínas de andamiaje incluyen a las proteínas de la familia WD-40.

Las proteínas WD-40, llamadas así por tener motivos WD (triptófano y ácido aspártico respectivamente), forman parte de una antigua familia de proteínas muy conservadas que se encuentran en organismos procariotes y eucariotes. En estos organismos, la expresión de estas proteínas es regulada por una variedad de vías de señalización (Li & Roberts, 2001).

El criterio básico para catalogar a una proteína dentro de esta familia es la presencia de al menos cuatro motivos WD que se forman con secuencias de 44-60 aminoácidos, que terminan en el extremo carboxilo terminal con una marca del dipéptido WD. Los dominios adoptan una estructura de  $\beta$ -propela, donde la propela se caracteriza por tener las hojas dispuestas radialmente alrededor de un eje central (Neer, 1995; Wall *et al.*, 1995). Algunos ejemplos de estas proteínas son: la RBBP5 (retinoblastoma binding protein 5, proteína 5 de unión al retinoblastoma), la cual es uno de los reguladores de la transcripción (Dou *et al.*, 2006); APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1, factor

activador de proteasa apoptótica 1), proteína involucrada en la muerte celular programada (Cecconi *et al.*, 1998); la subunidad  $\beta$  de la proteína G heterotrimérica, iniciadora de las vías de transducción de señales intracelulares (Tuteja, 2009); y la proteína RACK1 (ver más adelante). Todas ellas juegan papeles fundamentales en la transducción de señales de las células eucariontes.

### a. ESTRUCTURA DE RACK1

RACK1 es una proteína de 36 kDa que tiene una estructura tipo  $\beta$ -propela con 7 dominios WD-40. Está conformada de tal manera que permite la unión de proteínas que participan en la transducción de señales en la célula (Figura 3 y Tabla 1). Dentro de la proteína en mamíferos se han reportado tres sitios de unión a PCK. Estos sitios de unión se localizan dentro de las secuencias: (99-RRFVGHTKDV-108), (234-DIINALCF-241) y (255-SIKIWD-260) (Ron *et al.*, 1994; Brandon *et al.*, 2002; Grosso *et al.*, 2008).

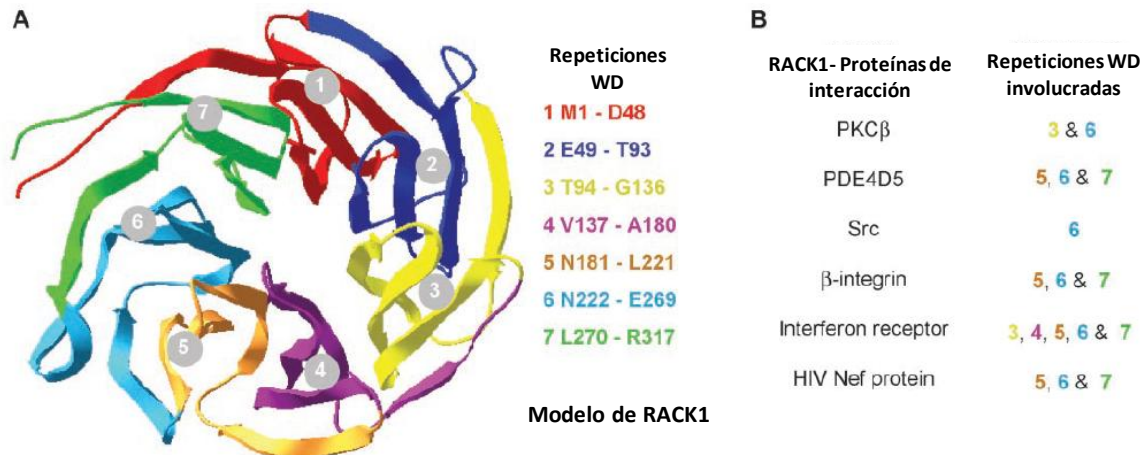


Figura 3. A. Estructura de RACK1, en donde se ilustra su estructura de  $\beta$ -propela con 7 aspas, las cuales le permiten interactuar con otras proteínas en organismos eucariotes. B. Proteínas que interaccionan con RACK1 y los sitios de unión correspondientes (tomada y modificada de McCahill *et al.*, 2002).

RACK1 forma tanto homodímeros como heterodímeros (Chen *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2004). En RACK1 de *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que los monómeros se entrelazan en la propela 4, formando un dímero. Cuando se encuentra como homodímero, permite aumentar el número de sus parejas de unión (Yatime *et al.*, 2011). Por ejemplo, permite la interacción simultánea de RACK1 con Fyn y con la subunidad NR2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B, receptor n-metil-D-aspartato subtipo 2B) del receptor de NMDA (N-methyl D-aspartate, n-metil-D-aspartato), regulando la actividad de los canales iónicos en el cerebro humano (Yaka *et al.*, 2002). RACK1 también forma un heterodímero con la proteína G<sub>β</sub> la cual se asocia con receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, G protein-coupled receptors). Estos complejos receptor-proteína G heterotrimérica son los que inician las cascadas de transducción de señales intracelulares (Schwindinger & Robishaw, 2001; Tuteja, 2009).

Tabla 1. Lista de proteínas con las que interacciona RACK1 (Tomada & modificada de McCahill *et al.*, 2002).

Proteínas que interaccionan con RACK1	Referencias
PKC $\beta$ (Protein kinase C, proteína cinasa C).	Ron <i>et al.</i> , 1994; Stebbins y Mochly-Rosen, 2001.
PDE4D5 (cAMP-specific phosphodiesterase-4D5, fosfodiesterasa-4D5 específica para AMPc).	Yarwood <i>et al.</i> , 1999; Steele <i>et al.</i> , 2001.
Familia de tirosina cinasas Src.	Chang <i>et al.</i> , 1998, 2001.
Región catalítica PTPn (Protein tyrosine phosphatase n, proteína tirosina fosfatasa n).	Mourton <i>et al.</i> , 2001.
IL-3 (Interleukin-3, interleucina-3), IL 5 (Interleukin-5, interleucina-5) y GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos).	Geijsen <i>et al.</i> , 1999.
Dominios PH (Pleckstrin domain, dominio Pleckstrina) de $\beta$ -espectrina, $\beta$ -dinamina y p120GAP (GTPase activating protein, proteína activadora de GTPasa).	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999; Koehler y Moran, 2001.
Receptor GABA (Gamma-aminobutyric acid, ácido gamma-aminobutírico) tipo A	Brandon <i>et al.</i> , 1999
$\beta$ -Integrina	Liliental y Chang, 1998; Besson <i>et al.</i> , 2002.
Receptor interferón tipo 1	Croze <i>et al.</i> , 2000.
Pat1 y Ran1 (Ras-related nuclear protein 1, proteína nuclear relacionada con Ras 1).	McLeod <i>et al.</i> , 2000.
Pck2 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, FONTE>fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2 )	Won <i>et al.</i> , 2001.

BZLF1 activador de virus Epstein-Barr	Baumann <i>et al.</i> , 2000.
M1 de virus de influenza	Reinhardt y Wolff, 2000.
P85	Kiely <i>et al.</i> , 2002.
Nef (Negative Regulatory Factor, factor de regulación negativa) de VIH (Virus de inmunodeficiencia humana).	Gallina <i>et al.</i> , 2001.
E1A (Adenovirus early region 1, región temprana de adenovirus 1).	Sang <i>et al.</i> , 2001.
Receptor interferón tipo I STAT1 (Signal transducer and activators of transcription 1, Activadores de transcripción y transducción de señales).	Usacheva <i>et al.</i> , 2001.
VacA (Vacuolating cytotoxin A, citotoxina vacuolizante A) de <i>Helicobacter pylori</i> .	Hennig <i>et al.</i> , 2001.
NR2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B, receptor n-metil-d-aspartato subtipo 2B) subunidad de receptor NMDA (N-methyl D-aspartate receptor, receptor n-metil-D-aspartato)	Yaka <i>et al.</i> , 2002.
NHERF1 (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1, factor regulatorio del intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ).	Liedtke <i>et al.</i> , 2002.
Receptor IGF-1 (Insulin-like growth factor 1, factor de crecimiento insulínico tipo 1).	Hermanto <i>et al.</i> , 2002; Kiely <i>et al.</i> , 2002

## b. RACK1 Y SUS FUNCIONES EN LA CÉLULA.

RACK1 es una proteína adaptadora intracelular que Guillemot *et al.*, (1989) caracterizaron y clonaron a partir de una biblioteca de cDNA de hígado de pollo y de la línea celular linfoblastoide B (B-LCL) como una proteína de unión a PKC (protein kinase C, proteína cinasa C). Dada la asociación de RACK1 con la conformación activa de PKC $\beta$ II, la proteína fue nombrada Receptor para cinasa C activada 1 o RACK1 (Ron *et al.*, 1994; Stebbins & Mochly-Rosen, 2001) (Figura 3).

Hoy en día se sabe que RACK1 interactúa con un gran número de proteínas (Tabla 1), ya sea directamente o como parte de un complejo mayor (McCahill *et al.*, 2002; Sklan *et al.*, 2006). Como una proteína de andamiaje, RACK1 integra aportes de distintas vías de señalización y es clave para las diversas actividades celulares fundamentales como la proliferación celular, la traducción de proteínas, así como diversas funciones neuronales. También está involucrada con la migración, la adhesión y la propagación celular (Kiely *et al.*, 2005; Kiely *et al.*, 2009).

La proteína RACK1 se encuentra relacionada con fenómenos de simbiosis y específicamente es necesaria para el desarrollo y la integridad del simbiosoma en el nódulo simbiótico, ya que estos se atrofian y degradan con el silenciamiento de su expresión (Islas-Flores *et al.*, 2011). También se le ha involucrado en la relación de parasitismo del género *Leishmania* (LmRACK1), donde es necesaria para infectar a su hospedero (Kelly *et al.*, 2003), y en *Trypanosoma brucei* (TbRACK1) como componente del ribosoma y en la división del parásito (Regmi *et al.*, 2008). Adicionalmente, está involucrada en múltiples procesos de transducción de señales. Por lo tanto, también es de esperarse que juegue un papel importante en la fisiología y desarrollo de *Symbiodinium*, así como en sus mecanismos de asociación simbiótica y ruptura de dicha asociación.

### **c. INTERACCIÓN DE RACK1 CON OTRAS PROTEÍNAS**

Se ha demostrado que RACK1 interacciona con el receptor de andrógenos (AR). La unión de RACK1 a AR regula la translocación al núcleo (Rigas *et al.*, 2003). Adicionalmente, en el núcleo se ha detectado a RACK1 como un componente integral del reloj circadiano de mamíferos donde esta y PKC $\alpha$  regulan la actividad transcripcional de CLOCK-BMAL1 (Brain and muscle Arnt-like protein-1, receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo; Robles *et al.*, 2010). También en núcleo regula la expresión de BDNF (brain-derived neurotrophic factor, factor neurotrófico derivado de cerebro), en donde probablemente tenga un papel importante en la proliferación neuronal (He *et al.*, 2010). Otros eventos en los que está involucrada RACK1 son la adhesión y la propagación celular en las que interviene interaccionando con las  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 integrinas y Src (Besson *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 1998, 2001). Recientemente, se ha detectado a la proteína de andamio 14-3-3 $\zeta$  como una pareja de unión de RACK1, a pesar de que ambas son proteínas de andamiaje multifuncionales (Neasta, 2012). Finalmente, se ha reportado que RACK1 interactúa con la isoforma de empalme de la acetilcolinesterasa inducida por el estrés (AChE-R), donde la interacción entre la AChE-R y RACK1 conduce a la unión de PKC $\beta$ II en las regiones del hipocampo CA1 y CA3 (Birikh *et al.* 2003). Esto promueve la hematopoyesis a través del incremento del número de leucocitos y plaquetas circulantes, lo cual promueve la expansión mielopoética y trombopoyesis producidas por estrés (Deutsch *et al.*, 2002)

## JUSTIFICACIÓN

*Symbiodinium* se encuentra generalmente como endosimbiontes de diferentes fila que incluyen a los cnidarios, moluscos, y platelmintos. Sin embargo, son también capaces de vivir en vida libre y cultivarse en el laboratorio *in vitro*. En la medusa invertida *Cassiopeia xamachana* se alberga *Symbiodinium* sp. CassKB8, el cual al establecerse en su hospedero dispara la metamorfosis de los pólipos (o scyphistomas) desdiferenciados. Llevando a cabo el proceso de simbiosis que permitirá completar su ciclo de vida. Debido a ello, ambos constituyen un modelo idóneo para estudiar su fisiología y entender mejor los mecanismos bioquímicos de respuesta a estímulos del entorno a través de los procesos de transducción de señales, en la que interactúan proteínas específicas. Entre las diferentes proteínas involucradas en procesos de transducción de señales, proteínas adaptadoras tales como RACK1, son fundamentales para llevar ligandos en proximidad, que juegan papeles claves en estos procesos. RACK1 ha sido identificada y caracterizada en diferentes organismos eucariotes, en donde se sabe que participa en distintos e importantes procesos celulares (control del ciclo celular, apoptosis, remodelación de citoesqueleto, entre otros), entre los que destaca la transducción de señales mediadas por PKC. En el contexto de la simbiosis, se ha reportado que RACK1 tiene un papel fundamental en el desarrollo e integridad del simbiosoma en el nódulo simbiótico de *Phaseolus vulgaris* (Islas-Flores *et al.*, 2011). Por otro lado, en el contexto de parasitismo, RACK1 del género *Leishmania* (LmRACK1), se ha reportado como necesaria para infectar a su hospedero (Kelly *et al.*, 2003), mecanismos que posiblemente comparta con *Symbiodinium* para realizar simbiosis. *Leishmania* y *Symbiodinium* tienen la característica de pertenecer al superfilo alveolata y por lo tanto comparten un ancestro común y posiblemente RACK1 este regulando las mismas funciones en ambos organismos. Caracterizar a RACK1 en *Symbiodinium* será un primer paso para conocer en que procesos fisiológicos esta involucrada esta proteína y determinar si participa de alguna manera en el proceso de simbiosis.



## HIPÓTESIS

RACK1 con dominios WD-40 es una proteína adaptadora que se considera ubicua en los organismos eucariontes. *Symbiodinium* es un organismo eucarionte; por lo tanto, tendrá homólogos de RACK1.

## OBJETIVO

- Identificación y caracterización de la proteína RACK1 en *Symbiodinium* sp. a nivel de secuencia y expresión del receptor de cinasa C activa, RACK1
  - A) Amplificar cDNA y DNA de *SymRACK1* e identificar intrones y/o isogenes
  - B) Clonar el cDNA de *SymRACK1* para producir proteína recombinante.
  - C) Determinar patrones de expresión se modifican con crecimiento y ciclo celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

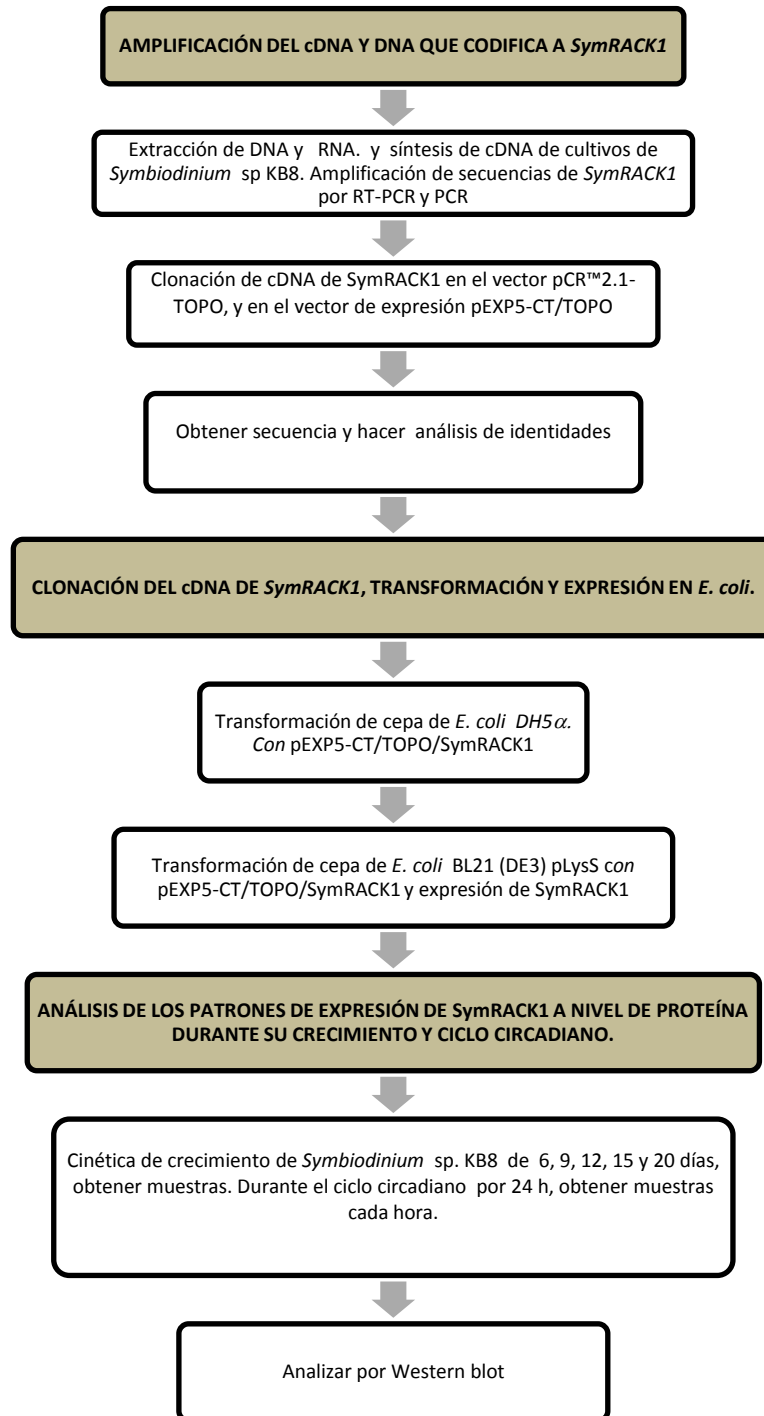


Figura 4. Diagrama de flujo para identificación y caracterización de la proteína RACK1 en *Symbiodinium* sp.KB8.

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron células de *Symbiodinium* sp. CassKB8 filotipo A1 (KB8), y de Mf 11.5b.1 filotipo B17 (Mf11), KB8 es clado A, subclado 1 (A1) y Mf 11.5b1 es clado B subclado 17. *Symbiodinium* sp. KB8 fue aislado originalmente en la bahía de Kaneohe, Hawaii por Robert Kinzie y donados generosamente por la Dra. Marialice Coffroth de State University of New York para la colección establecida en la Unidad Académica de Puerto Morelos por los Dres. Roberto Iglesias Prieto y Patricia Thomé Ortiz. Las células se obtuvieron de la colección y se mantuvieron en medio ASP-8A (McLaughlin & Zahl, 1966), en fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad a una intensidad de luz de 60-80  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y una temperatura de 25°C (Castillo-Medina *et al.*, 2013).

## 2. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE RACK1 EN *Symbiodinium* sp. CASSKB8, (SymRACK1), Y ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN.

### 2.1. OLIGONUCLEÓTIDOS

Para llevar a cabo amplificaciones de la secuencia de SymRACK1, se diseñaron oligonucleótidos en base a una secuencia detectada en la biblioteca de EST reportada para *Symbiodinium* sp. KB8 (FKB8-2, RKB8-1, FSymRACK1 y RSymRACK1) (ver Tabla 2 y Figura 5). La base de datos puede encontrarse en la página <http://sequoia.ucmerced.edu/SymBioSys/> y fue desarrollada por la Dra. Mónica Medina de la Universidad de California, Merced. Además, para determinar si había secuencias con timina (T) o citosina (C) en el nucleótido 261 se diseñaron oligonucleótidos que iniciaran o terminaran la secuencia con las dos variantes C y T (RCKT-F, RCKT-R, RCKC-F y RCKC-R) (ver Tabla 2). Estos oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de síntesis del instituto de biotecnología de la UNAM.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificaciones de la secuencia de SymRACK1, diseñados en el laboratorio y sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Clave	Temperatura de fusión (°C)	Secuencia
FKB8-2	68	(5'→3'): ATG GCA TCC GAG TCC CTC CAC
RKB8-1	60	(5'→3'): CTG CTC GCC CAC CCT GTA
FSymRACK1	72.8	(5'→3'): GAC ATG GCA TCC GAG TCC CTC CAD TATG
RSymRACK1	74	(5'→3'): CTG CTC GCC CAC CCT GTA CAC GTA GATG
RCKT-F	62	(5'→3'): CTGGCTCATGGGACAAGACT
RCKT-R	60	(5'→3'): CAAGTCCCACAGGCGCATA
RCKC-F	64	(5'→3'): CTGGCTCATGGGACAAGACC
RCKC-R	62	(5'→3'): CAAGTCCCACAGGCGCATG

```

5' GCCTCACTTA ACCATATACC GTACCGTAGG CTGCAGCCCC GCTACTGCGC
CTCATTCTTC AGACATGGCA TCCGAGTCCC TCCACTATGT TGGCACCCCTC
GAGGGCCACC GCAACTGGGT CACCGGCATC GCCAGCACCT TCGAGCAGAG
CAACCTGGTG GTCGTCTCT CTCTCGAGA CAAGACATTG ATGATTTGGG
AGCTCACCCC TGACAGCGAG AACCCCGGGT ATGCCCGAAG GTCACTGCAT
GGCCATGGTG AGTGTGTGGC CAGCTGCGTG CTGTCCTCCG ATGGCCAGTA
TGCCCTGTCT GGCTCATGGG ACAAGACTAT GCGCCTGTGG GACTTGAACA
CCGGGGCCAC CGTGCGAACC TTCAAGGGCC ACACGAAGGA TGTGAACAGC
GTGGCTTTCT CGGGCGACAA CCGCCAGATC GTGTCCGGGGC AGCCGTGACA
AGACGATC AAGCTGTGGAA CACGCTGGCT GAGTGCAAGT ACACGATCATG
GAGGACATGC ACACCGATTG GGTACGCTCG GTTGGCTTCT CCCCCTCTGC
CAAGATGCCG CTCATCGTCT CTGCCGGCTG GGACAGCTGG TGAAGGTCTG
GAACCTGACA ACTGCAAGCT TCGCACCAAC TTGGTGGGGC ACACCGGAGT
CGTTTACACC ACCACCGTGT CCCCCGATGG CTCCCTGTGC GCGTCAGGTG
GCAAGGATGG CACCGTGATG CTGTGGGACG TGAACGAGGG CAAGCACCTG
TACTCCCTGG ATGCTGGTGG CACCATCAAC GCCTTGACCT TCAGCCCAAG
GAATTACTGG CTGACCGCGG CCACCGACAC CACCATCCGC GTGTGGGACT
TGGAGAACAA GCAGATCTTG GAAGAGCTTA CCGCCATCAA CCCCCCAAG
AACGGCCTGC CTTGGTGTGT CTCCTTGTCC TGGAGCGCTG ATGGCAGCAC
CTTCTTCGCT GGTGCGACCG ACGGCAACAT CTACGTGTAC AGGGTGGGCG
AGCAGTAAGC AAAGAGGGCC AGTAGGGAGT CGCAAGGGAG TCGCAAGACC
CTGCTTCCGA CTGCCAGGGC CTTTGCATC AAGCAAGGGG TTGCTGGAGG
AATATCTGGGG CAGGCGCAGA CTCTTTAGAA AATGGAGCTACG GTGTTCTCGG-3'

```

Figura 5. Secuencia de SymRACK1 a partir de una EST (Expressed Sequence Tag) de *Symbiodinium* sp. KB8. (<http://sequoia.ucmerced.edu/SymBioSys/>, las flechas roja y azul muestran las secuencias que se usaron para el diseño de oligonucleótidos, sentido y antisentido.

## 2.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE CÉLULAS DE *Symbiodinium* sp. CASSKB8

Para la purificación de DNA genómico de *Symbiodinium*, se utilizó el método modificado de Murray y Thompson (1980). Para ello se precipitaron 50 ml de células de un cultivo de las cepas de KB8 y Mf11 de 15 días. El precipitado se resuspendió en 600  $\mu$ l de solución de extracción de DNA (1% sarcosil, 0.8 M cloruro de sodio, 0.22  $\mu$ M EDTA, 220  $\mu$ M Tris, 0.8% CTAB y 0.14 M manitol) a 65°C. La mezcla de células y solución se transfirieron a un tubo con perlas de vidrio estéril y se les añadió 1  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las células se rompieron durante 3 min en el Bead Beater a una velocidad de 4500 rpm. Enseguida, los tubos se transfirieron a 65°C y se añadieron 600  $\mu$ l de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (relación 24:1); el homogenado se resuspendió bien y se incubó durante 30 min a 65°C agitando manualmente durante la incubación. Seguidamente, se centrifugó a 14 000 rpm (revoluciones por minuto), en una centrifuga Eppendorf 5415c (factor de rotor F45-18-11 y diámetro de 14.6 cm), por 10 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa, a la cual se le añadió 1 volumen de Isopropanol frío, y 1:10 volúmenes de 3 M acetato de sodio, pH 5.2. Luego se agitó y se dejó durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min a 4°C, se tiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 75% de etanol frío. Después, se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ l de buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8) y se añadieron 2  $\mu$ l de 100 mg/ml RNAsa A y 25  $\mu$ l de 5 M NaCl. Se incubó 40 min a 37°C y se le añadió 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (relación 25:24:1) frío, se mezcló bien y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió 1 volumen de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (relación 24:1) frío y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó la fase superior acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de 75% etanol frío y 1:10 volúmenes de 3 M de acetato de sodio pH 5.2. A continuación, se incubó por 30 min a -20°C y se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min a 4°C. Se lavó el precipitado con 75% etanol frío 3 veces centrifugando a 14 000 rpm 5 min a 4°C. Finalmente, se dejó secar el precipitado por 5 min y se resuspendió en 50-100  $\mu$ l de agua libre de DNAsas.

### **2.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE CÉLULAS DE *Symbiodinium* sp. CASSKB8.**

Debido a la alta susceptibilidad del RNA (Ribonucleic Acid) a ser degradado por RNAsa, el material que se utilizó se esterilizó y trató con DEPC (dietil pirocarbonato); [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO]), agente inhibidor de la actividad de las RNAsas.

Para extraer RNA de las células de *Symbiodinium* sp., se sedimentaron 50 ml de células de un cultivo de 15 días de las cepas de KB8 y Mf11. El precipitado se resuspendió en 1 ml de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) por cada  $5-10 \times 10^6$  células. La mezcla se transfirió a un tubo con perlas de vidrio estéril. Las células se rompieron durante 3 min en el Bead Beater a una velocidad de 4 500 rpm y se siguieron las indicaciones del fabricante. El tubo se centrifugó para separar el RNA a 12 000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se dejó reposar por 5 min y se le adicionaron 0.3 ml de cloroformo por cada ml de TRI Reagent®. La muestra se agitó vigorosamente por 15 seg, y después se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C; la mezcla se separó en tres fases. La fase superior, en la cual se encuentra el RNA, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRI Reagent® usado y se incubó por 5 min. La solución se centrifugó a 12 000 rpm durante 8 min a 4°C, se removió el sobrenadante y lavó la pastilla con el precipitado de RNA con 75% etanol, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se re suspendió en 15 µl de agua-DEPC. El RNA se guardó a -20°C hasta la síntesis de cDNA.

### **2.4 ELECTROFORESIS DE RNA Y DNA EN GELES DE AGAROSA**

Los geles se prepararon con una concentración de 1% agarosa en 50 ml de buffer TAE con 0.01% de Gel Red (Biotium, Hayward, CA). Las muestras de DNA se prepararon con 2 µl de buffer de carga 6X Orange (Fermentas, St. Leon-Rot) por cada 5 µl de muestra. Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente manera: a 5 µl de RNA se le añadieron 2 µl de buffer de carga 6X Orange Loading Dye (Fermentas) y 6 µl de Formamida, luego se incubaron 5 min a 65°C e inmediatamente se pusieron en hielo. La corrida del gel se hizo a 80 V durante 1 h 20 min.

## 2.5 OBTENCIÓN DE cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA). Se utilizó un extracto de RNA que se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad, CA) y por cada 5 µg 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 0.1M DTT, se mezcló e incubó por 2 min a 25°C, se agregó 1 µl de super script II RT, 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 guardó a -20°C.

## 2.6 PCR PARA AMPLIFICAR A SymRACK1

Se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar la secuencia que codifica a SymRACK1 en una muestra de cDNA y otra de DNA genómico de KB8 y Mf11.

En las reacciones de PCR se probaron las combinaciones de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 1), y en cada reacción se usó 1 µl de 10 µM oligonucleótido. Para la reacción se utilizó el TopTaq Master Mix (Qiagen, CA). Las reacciones se prepararon de la siguiente manera:

2x TopTaq Master Mix,	25µl
Oligonucleótido sentido	1 µl
Oligonucleótido antisentido	1µl
DNA genómico/cDNA templado	Variable
Agua libre de RNasa	Variable con un volumen final de 30 µl

Se utilizó el siguiente programa:

- 1.- Desnaturalización inicial 3 min 94°C
- 2.- 35 ciclos

Desnaturalización	30 seg	94°C
Alineamiento	30 seg	60°C
Extensión	30 seg	72°C
- 3.- Extensión final 10 min 72°C

Las reacciones se analizaron en geles de 1% agarosa-0.01% Gel Red. Las reacciones de PCR en dónde se observó productos de ~1000 pb se purificarón y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **3'-RACE DE *SymRACK1* DE *Symbiodinium***

Para corroborar la secuencia de *SymRACK1* y obtener el 3'-UTR (*Por sus siglas en inglés: Untranslated Region*) se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR y se amplificó el extremo 3' utilizando la metodología de 3'-RACE (*Por sus siglas en inglés: Rapid Amplification of cDNA Ends*) con el kit 3'-RACE System (Invitrogen). Para la síntesis de cDNA se utilizó el siguiente oligonucleótido: 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT T-3' (UAP) ; y para llevar a cabo la amplificación específica de *SymRACK1* incluyendo su 3'-UTR se realizó un RT-PCR con los siguientes oligonucleótidos: 5'-GAC ATG GCA TCC GAG TCC CTC CAC TATG-3' (FSymRACK1; sentido), y 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (AUAP; antisentido). Se analizaron las reacciones en geles de 1% agarosa-0.01% Gel Red.



## **2.7 CLONACIÓN DEL cDNA DE SymRACK1 Y SU TRANSFORMACIÓN EN *E. coli*.**

Para llevar a cabo la clonación del cDNA de SymRACK1 se utilizó el kit de Expresión pEXP5-CT/TOPO ® (Invitrogen), vector que tiene una eficiencia de expresión del 95% y que adiciona 6 histidinas al carboxilo terminal de la proteína recombinante. Para ello se preparó una reacción con: 0.5-4 µl de la reacción de PCR purificada, la cual se purificó con el kit Marligen Biosciences, 1 µl de solución salina, 5 µl de agua y 1 µl de vector (pEXP5-CT/TOPO ®). Esta mezcla de reacción se incubó 30 min en hielo, después se añadieron 2 µl de la reacción de clonación a un vial de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes y el contenido se mezcló suavemente, se incubó en hielo durante 5-30 min, a continuación las células se colocaron por 30 seg a 42°C sin agitación para transformarlas. Inmediatamente, se transfirieron los tubos en hielo y se agregaron 250 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente, el tubo se agitó a 37° y 200 rpm durante 2 h. Se agregaron de 10-50 µl de células transformadas en una caja Petri que contenía medio de cultivo LB (Luria Bertani) con 50 µg /ml de ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37°C. La reacción fue eficiente y produjo cientos de colonias, de las cuales, se eligieron 9 colonias para el análisis. Para obtener la secuencia completa de SymRACK se clonó su cDNA en el vector pCR™2.1-TOPO y el vector pCR-T7/CT, para el cual se utilizó el mismo procedimiento anterior.

El análisis de las colonias positivas se realizó colocando 9 colonias en medio líquido de cultivo LB con 50 µg /ml de ampicilina. Posteriormente, se aisló el plásmido con el kit PureLink ® Quick Miniprep (Promega, CA). Para confirmar la presencia y orientación correcta del inserto, se analizaron los plásmidos mediante análisis de restricción con la enzima Bgl II que corta una vez en el vector y una vez en el inserto. Los fragmentos digeridos se analizaron en un gel de agarosa.

## 2.8 Expresión de SymRACK1

Para llevar a cabo la expresión de SymRACK1, se utilizó el vector purificado de una cepa de DH5 $\alpha$  transformada con la construcción pEXP5-CT-SymRACK1. Para ello, se descongeló un vial de la cepa de *E. coli* One Shot<sup>®</sup> BL21 (DE3) pLysS y se añadieron de 5 a 10 ng de vector pCRT7/CT-SymRACK1, el tubo se incubó por 30 min en hielo, seguido de incubación a 42°C por 30 seg e inmediatamente se transfirió a hielo. Después, se añadieron 250  $\mu$ l de medio S.O.C. a temperatura ambiente y se incubó por 1 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, se agregó la reacción de transformación completa a 10 ml de medio LB conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol y se dejó crecer durante la noche a 37°C con agitación.

Posteriormente, se realizó una expresión piloto en la que se agregaron 500  $\mu$ l del cultivo anterior a 10 ml de medio LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol, seguido de incubación a 37°C en agitación. Con ayuda de un espectrofotómetro se midió la densidad óptica del cultivo (OD<sub>600</sub>), y al llegar a 0.5-0.8 el cultivo se dividió en 2 partes de 5 ml y a una de ellas se le agregó IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión de la proteína recombinante. Se colectó una alícuota de 500  $\mu$ l de los cultivos cada hora por 6 h, se centrifugó y se congeló la pastilla a -20°C. Las pastillas de bacterias se descongelaron, se les agregaron 50  $\mu$ l de buffer de muestra desnaturizante de Laemmli y se hirvieron por 5 min. Para detectar a la proteína recombinante, las muestras se analizaron en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de coomassie y por western blot (secciones 3.2 y 3.3).

Una vez que se determinó que el inductor IPTG no cambia la expresión de SymRACK1, se preparó un cultivo para extraer a la proteína recombinante. A partir de 1 ml de un cultivo de BL21 (DE3) pLysS se inocularon 100 ml de medio LB de selección, y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C, la pastilla celular se re suspendió en 10 ml de buffer de lisis (50 mM fosfato de potasio pH 7.8, 400 mM cloruro de sodio, 100 mM cloruro de potasio, 10% glicerol y 0.5% Tritón X-100), la cual se congeló a -80°C y descongeló en baño maría a 42°C tres veces. Las bacterias lisadas fueron centrifugadas a 14 000 rpm a 4°C para separar la fase acuosa que contenía a la proteína recombinante soluble y la pastilla que contiene la proteína insoluble, la proteína soluble se utilizó para la purificación de SymRACK1.

## 2.9 PURIFICACIÓN DE SymRACK1

La purificación de la proteína SymRACK1 se hizo a partir del extracto soluble de la cepa BL21 (DE3) pLysS transformada con la construcción pEXP5-CT-SymRACK1. Para ello se colocaron 500  $\mu$ l de resina His-Select Nickel (Sigma) en un tubo Falcon. El tubo se centrifugó a 12 000 rpm, se retiró el sobrenadante, se agregó 1 ml de buffer de equilibrio (50 mM fosfato de sodio y 0.3 M cloruro de sodio pH 8), se centrifugó nuevamente y se le eliminó el sobrenadante. Al tubo anterior se le agregó el extracto soluble y se mantuvo en agitación constante por 2 h a 4°C, el tubo se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm a 4°C y se separó el sobrenadante. El buffer de equilibrio se utilizó como buffer de lavado y se agregaron 5 ml al tubo para eliminar a las proteínas que no se pegaron a la resina de níquel, el tubo se centrifugó 5 min a 12 000 rpm, 4°C, y se hicieron lavados hasta que la lectura en el espectrofotómetro a 280 nm, longitud de onda a la que se detectan las proteínas, fue cercana a 0. Posteriormente, se agregaron 5 ml de buffer de elución (50 mM fosfato de sodio, 0.3 M cloruro de sodio y 0.25 M imidazol pH 8) por 30 min, se centrifugó y se recuperó. Para concentrar a la muestra que se encuentra en el buffer de elución, se colocó en un centricon YM10 (Millipore, Bedford, MA). Los lavados y la muestra final se analizaron por SDS-PAGE en un gel de acrilamida teñido con azul de coomassie y por western blot.

### **3 DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE SymRACK1 DE *Symbiodinium* sp. CASSKB8 DURANTE SU CRECIMIENTO.**

#### **3.1 EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE *Symbiodinium*.**

Se colocaron 50 ml de células KB8 de un cultivo de 15 días en un tubo Falcon, se centrifugaron a 12 000 rpm, centrifuga Clay Adams Dynac (factor de rotor 0108-001-002 y diámetro de 17 cm), por 10 min, y se eliminó el sobrenadante. Para hacer el extracto de proteínas solubles, se agregaron 300 µl de PBS (2.8 mM fosfato monobásico de sodio, 7.2 mM fosfato dibásico de sodio y 137 mM cloruro de sodio, pH 7.4) adicionado con un coctel de inhibidor de proteasas (Complete™; Roche, Indianapolis, IN) (PBS-C), y se colocaron en tubos con perlas de vidrio; posteriormente se hizo el rompimiento de las células en un Bead Beater (BioSpec, Bartsville, OK) a 4 500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de buffer desnaturante de muestra de Laemmli 4x (60 mM Tris-HCl, pH 6.8; 1% (p/v) dodecil sulfato de sodio (SDS); 10% (v/v) glicerol, 3% (v/v) β-mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol) (Laemmli, 1970), se hirvió a 95°C por 5 min y se centrifugó a 12 000 rpm. a 4°C. Las muestras se analizaron inmediatamente en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis por sus siglas en inglés). Los extractos nativos se hicieron de la misma manera pero sin agregar SDS y β-mercaptoetanol al buffer de Laemmli, que son los agentes desnaturantes. Y también se hicieron extractos a diferentes días de crecimiento 6, 9, 12, 15 y 20 y cada hora por un día. La cantidad de proteínas presentes en cada muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford,1976).

#### **3.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) Y DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE).**

Las proteínas se separaron por el método de Laemmli (Laemmli, 1970) en minigeles discontinuos. Para condiciones desnaturantes el gel separador fue de pH 8.8 y 12% acrilamida [375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 12% (p/v) acrilamida; 0.413% (p/v) bis-acrilamida; 0.1% (p/v) SDS; 0.1% (p/v) persulfato de amonio (APS); 0.106% (v/v) TEMED]. El gel

concentrador de pH 6.8 y 4% de acrilamida [125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% acrilamida; 0.137% bisacrilamida; 0.1% SDS; 0.1% APS; 0.066% v/v TEMED]. Los geles nativos se prepararon con la zona de separación de pH 8.8, 8% y 6% acrilamida sin SDS, y la zona de apilamiento fue de pH 6.8 y 4% sin SDS.

El gel se cargó con las muestras de proteínas y marcador de peso molecular Novex (Invitrogen) y se colocó en una cámara de electroforesis, donde se llenó con solución tampón de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina y 0.1% SDS) (sin SDS para geles nativos), conectado a una fuente de poder (EC200p), en la que se utilizó un programa con una intensidad de corriente constante de 20 mA. La corriente se suspendió hasta que se observó un corrimiento a 0.5 cm antes de que el frente de proteínas, determinado por el colorante indicador, se salga de la matriz del gel.

Para visualizar las bandas de proteínas separadas en los geles corridos por SDS-PAGE, éstos se incubaron durante 1 h y con agitación en una solución de 0.1% azul de coomassie en agua: ácido acético glacial (19:1). Para desteñir los geles, éstos se incubaron en una solución de 40% etanol, 10% ácido acético, hasta que los carriles mostraron bandas de proteína bien definidas.

Para tinción con plata, el gel se sacó de la cámara de electroforesis y se dejó fijando toda la noche con 40% etanol y 10% ácido acético. Se retiró la solución y posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con 30% etanol, en agitación a 25 °C. Para sensibilizar al gel se agregaron: 63 µl de 10% Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (100 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  en 1 ml de agua DI, sólo permanece activo por una semana) en 50 ml de agua DI por un min y agitación a 25 °C. Se retiró lo anterior y se agregaron: 100 mg de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), 10 µl de 37% formaldehído, en 50 ml de agua DI, y se dejó en agitación a 25 °C por 30 min. Se eliminó el agua del gel y se incubó con 1.5 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 6.25 µl 10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 25 µl de 37% de formaldehído en 50 ml de agua DI, hasta que se observaron las bandas. Para detener la reacción se agregaron 0.25 g de glicina en 50 ml de agua DI, y finalmente se enjuagó con agua DI. En ambos casos los geles se secaron en celofán.

### 3.3 INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).

Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida desnaturalizantes y nativos, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El gel se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa (Inmobilon™, Sigma) hidratada previamente en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 10% isopropanol, 0.01% SDS) (Villanueva, 2008) con papeles filtro Whatman de 6 X 8.5 cm y esponjas tanto debajo de la membrana como encima del gel. Posteriormente, el sandwich se ensambló en el cartucho de una cámara de transferencia húmeda según instrucciones del fabricante (BioRad).

La cámara se llenó de buffer de transferencia, se tapó y se conectó a una fuente de poder por 1 h a 300 mA. Una vez terminado el tiempo, se detuvo la corriente y se separó la membrana con las proteínas electrotransferidas. Para verificar que se llevó a cabo una transferencia adecuada, a la membrana se le agregó rojo de Ponceau, colorante que tiñe a las proteínas de manera reversible y se puede eliminar con agua. Finalmente, la membrana se destiñó con 3 lavados de agua bajo agitación moderada. El agua se retiró y se agregó una solución de 3% albúmina sérica bovina, la cual sirve para bloquear los sitios libres de pegado a proteínas en la membrana. Esta se dejó por 3 h a 50°C en agitación constante. La membrana fue lavada ligeramente con PBST y se colocó en una caja Petri con anticuerpos primarios en las diluciones especificadas según cada anticuerpo (ver más adelante en anticuerpos primarios) y se dejó incubando toda la noche en agitación a 25° C.

Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con 5 ml de PBST. Posteriormente, se agregó proteína A conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma) 1/500. Se dejó incubando por 2 h en agitación, y al término del tiempo se retiró el anticuerpo. Se realizaron entonces 5 lavados de 5 min cada uno con 5 ml de PBST. Se retiró el PBST y se hizo un último lavado con PBS sin detergente. La membrana se reveló con una solución comercial de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) (Sigma) agregando el líquido con una pipeta de 1 ml hasta que fueron visibles las bandas. El reactivo tiene como sustrato a la fosfatasa alcalina que está conjugada al anticuerpo secundario y su producto forma un precipitado, revelando la banda a la que se pegó el anticuerpo con una coloración morado oscura. Se desechó el revelador de la membrana, se le agregaron 5 ml de agua y unas gotas de ácido acético

incubándose por 5 min para parar la reacción, se lavó con agua y se dejó secar al aire libre. Finalmente se realizó una cuantificación relativa de la expresión de la proteína con el gel teñido con azul de coomassie y el western blot usando el programa ImageJ2x.

### 3.3.1 ANTICUERPO PRIMARIO

Se utilizó un anticuerpo anti-RACK1 de humano H-187 (anti-hRACK1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), el cual es una IgG policlonal de conejo. Este fue preparado contra el epítipo correspondiente a los aminoácidos 131-317 (en el extremo C-terminal) de RACK1. El anticuerpo se usó a una dilución de 1:300. El antígeno usado para obtener anti-hRACK1 fue un fragmento de 187 aminoácidos (131-317) de RACK1 humana (del 131 al 312 marcados con azul; Figura 6), que tiene un porcentaje de identidad del 62% respecto a los aminoácidos de la secuencia de SymRACK1 (marcados con amarillo; Figura 6).

```

hRACK1    131 LWNTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWNLANCKLKTNHIG 190
           LWNTL CKYT+ ++ H++WVS V FSP++ P+IVS GWDKLVKVVWNL+NCKL+TN +G
SymRACK1  131 LWNTLAECKYTIMEDMHTDWWVSSVGFSPSAKMPLIVSAGWDKLVKVVWNLNSCKLRTNLVG 190

hRACK1    191 HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCA 250
           HTG + T TVSPDGLSCASGGKDG MLWD+NEGKHL+LD G INAL FSP YWL A
SymRACK1  191 HTGVVYTTTVSPDGLSCASGGKDGTVMLWDVNEGKHLVSLDAGGTINALTFSPRNYWLTA 250

hRACK1    251 ATGPSIKIWDLEGKIIVDELKQEVISTSSKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVW 310
           AT +I++WDLE K I++EL K P C SL+WSADG T FAG TD + V+
SymRACK1  251 ATDTTIRVWDLNKQILEEL--TAINPPKNGLPWCVLSWSADGSTFFAGATDGNIVVY 307

hRACK1    311 QV 312
           +V
SymRACK1  308 RV 309

```

Figura 6. Alineamiento de SymRACK1 (amarillo) con RACK1 de humano (azul). El epítipo contra el cual se hizo el anticuerpo anti-hRACK1, corresponde a los aminoácidos 131-317. Las secuencias tienen una identidad del 62% (hRACK1 No. Acc. NP\_006089.1).

También se utilizó el anticuerpo anti-histidina (Qiagen), el cual es una IgG1 monoclonal de ratón, el cual se utiliza para detectar las proteínas recombinantes que llevan etiquetas de 6 histidinas en el carboxilo terminal. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000.

## RESULTADOS

### 1. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA Y DNA QUE CODIFICA A *SymRACK1* Y OBTENCIÓN DE SUS SECUENCIAS.

El cDNA que codifica a *SymRACK1* de *Symbiodinium* sp. KB8 se obtuvo con reacciones de RT-PCR y PCR. De la reacción de RT-PCR con cDNA resultó un producto de aproximadamente 1000 pb con el par de oligonucleótidos FSymRACK1; sentido y RKB8-1; antisentido (Tabla 2); (Figura 7 A). En reacciones de PCR con DNA genómico, también se obtuvo un producto de ~1000 pb con los oligonucleótidos FKB8-2; sentido y RSymRACK1; antisentido (Tabla 2); (Figura 7 B). Los productos de PCR y RT-PCR se purificaron y se obtuvo la secuencia.

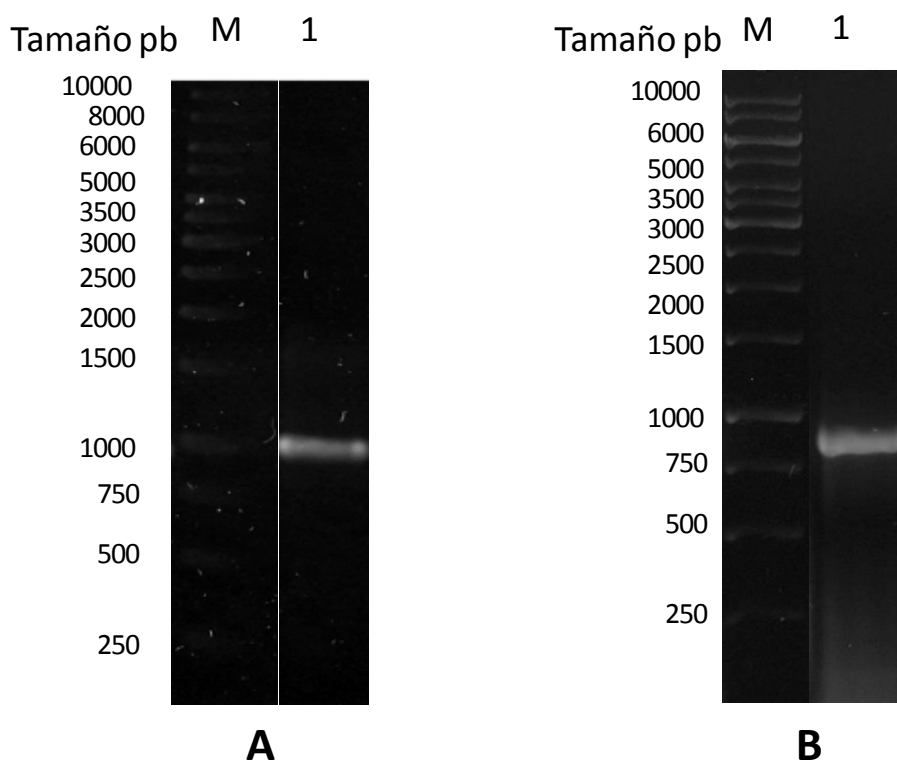


Figura 7. Amplificación de *SymRACK1* de *Symbiodinium* sp. KB8 por RT-PCR y PCR. A) RT-PCR. Carril 1, Producto amplificado con los oligonucleotidos RKB8-1 y FSymRACK1. B) PCR genómico. Carril 1, producto amplificado con los oligonucleótidos RSymRACK1y FKB8-2. M, 1 Kb DNA Ladder. Geles de 1% agarosa teñidos con Gel-Red.



Además de secuenciar los fragmentos amplificados a partir de RT-PCR y PCR genómico, el cDNA se clonó en el vector pCR™2.1-TOPO, y en el vector de expresión pEXP5-CT/TOPO, los que se enviaron a secuenciar para verificar sus correctas inserciones en los plásmidos y obtener la secuencia completa de SymRACK1 (Figura 7).

Tabla 3. Fragmentos de las secuencias de SymRACK1. Se observa el nucleótido 261 en subrayado, el cual es timina (T) en una de las secuencias de EST (KB8-1), en la de PCR, y en la de 3'-RACE de SymRACK1. Por el contrario, en esta posición se encuentra una citosina (C) en otra de las secuencias de EST (KB8-2), en la de RT-PCR, en la de pCR™2.1-TOPO 2.2, y en la de pCR-T7/CT de SymRACK1.

Secuencia obtenida de:	Secuencias que muestran diferencia en el nucleótido 261 de timina (T) o citosina (C).
EST KB8 (KB8-1)	254-ACAAGACT <u>T</u> ATGCGCCTGT-271
PCR SymRACK1	254-ACAAGACT <u>T</u> ATGCGCCTGT-271
3'RACE SymRACK1	254-ACAAGACT <u>T</u> ATGCGCCTGT-271
EST KB8 (KB8-2)	254-ACAAGACC <u>C</u> ATGCGCCTGT-271
RT-PCR SymRACK1	254-ACAAGACC <u>C</u> ATGCGCCTGT-271
pCR™2.1-TOPO 2.2-SymRACK1	254-ACAAGACC <u>C</u> ATGCGCCTGT-271
pCR-T7/CT-SymRACK1	254-ACAAGACC <u>C</u> ATGCGCCTGT-271

La secuencia codificante de *SymRACK1* comprende 942 nucleótidos, entre los cuales se presenta una sola diferencia de una sustitución de timina por citosina en el nucleótido 261 (Tabla 3). Se obtuvieron las dos secuencias consistentemente de varias reacciones de amplificación o vectores independientes. La misma variación fue detectada en dos EST's de la base de datos de *Symbiodinium* sp. KB8 (Tabla 3).

Para corroborar que existen dos secuencias de *SymRACK1*, una que presenta timina, y otra citosina en el nucleótido 261, se hicieron reacciones de RT-PCR con un oligonucleótido en sentido, que presenta una T y otro que presenta una C. En ambos casos, se obtuvieron los productos esperados de ~682 pb (Carriles 1 y 3, respectivamente, Figura 8). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos RCKT-F y RCKC-F; sentido y RKB8-1; antisentido (Tabla 2), para los productos con el nucleótido T o C inicial. Paralelamente, se hicieron reacciones de RT-PCR con un oligonucleótido en antisentido, que presenta una T y otro que presenta una C. En ambos casos, se obtuvieron los productos esperados de ~261 pb (Carriles 2 y 4, respectivamente, Figura 8). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos FSymRACK1; sentido y RCKT-R y RCKC-R; antisentido (Tabla 2). El cambio de nucleótido representa una substitución silenciosa ya que ambos son parte de codones que codifican para el mismo aminoácido treonina (Figura 9). Además, ambas secuencias se traducen en una sola de 313 aminoácidos (Figura 10). La proteína “*in silico*” presenta un peso molecular teórico de 34.2 kDa y un punto isoelectrico teórico de 5.9 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

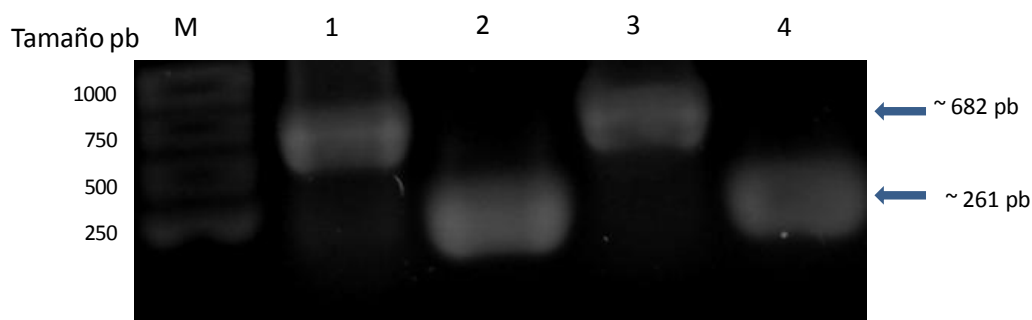


Figura 8. Amplificación de fragmentos de *SymRACK1* de *Symbiodinium* sp. KB8 con oligonucleótidos específicos para corroborar la existencia de citosina o timina en el nucleótido 261. Carril 1. Producto amplificado con los oligonucleótidos RCKT-F y RKB8-1. Carril 2 FSymRACK1 y RCKT-R. Carril 3. Producto amplificado con los oligonucleótidos RCKC-F y RKB8-1. Carril 4 FSymRACK1 y RCKC-R. M, 1 Kb DNA

La secuencia de aminoácidos de *SymRACK1* presenta los 7 dominios WD-40 altamente conservados, característicos de proteínas de la familia WD-40. Los dominios WD-40 que presenta son: 1 L12-L46, 2 L60-T101, 3 F102-N134, 4 E145-N188, 5 L189-S320, 6 I237-E250 y 7 L271-Y308. Además de lo anterior, la secuencia presenta tres sitios de unión a PKC también altamente conservados (Figura 10).

```

1 atggcatccgagtcctccactatgttggcaccctcgagggccaccgcaactgggtcaccggcatcgccagcaccttcgagcagagcaac
M A S E S L H Y V G T L E G H R N W V T G I A S T F E Q S N
91 ctgggtgtctcctctctcgagacaagacattgatgatttgggagctcaccctgacagcgagaaccccggtatgccgaaggctcactg
L V V S S S R D K T L M I W E L T P D S E N P G Y A R R S L
181 catggccatggtagtggtgtggccagctgctgtctcctccgatggcagtatgcctgtctggtcatgggacaag act/c atggcctg
H G H G E C V A S C V L S S D G Q Y A L S G S W D K T M R L
271 tgggacttgaacaccggggccaccgtgcaaacctcaaggggccacacgaaggatggaacagcgtggctttctcgggcgaacccgag
W D L N T G A T V R T F K G H T K D V N S V A F S G D N R Q
361 atcgtgtcgggcagccgtgacaagacgatcaagctgtggaacacgctggctgagtgcaagtacacgatcatggaggacatgcacaccgat
I V S G S R D K T I K L W N T L A E C K Y T I M E D M H T D
451 tgggtcagctcgggttggcttctcccctctgccaagatgcccgtcctctctgcccggctgggacaagctggtgaaggtctggaacctg
W V S S V G F S P S A K M P L I V S A G W D K L V K V W N L
541 agcaactgcaagcttcgcaccaacttgggtggccacaccggagctgtttacaccaccacccgtgtccccgatggctccctgtgctgctca
S N C K L R T N L V G H T G V V Y T T T V S P D G S L C A S
631 ggtggcaaggatggcaccgtgatgctgtgggacgtgaacgagggcaagcacctgtactcctggatgctggtggcaccatcaacgcttg
G G K D G T V M L W D V N E G K H L Y S L D A G G T I N A L
721 accttcagccaaggaattactggctgaccgcccaccgacaccaccatccgctgtgggacttggagaacaagcagatcttggaaagag
T F S P R N Y W L T A A T D T T I R V W D L E N K Q I L E E
811 cttaccgccatcaaccccccaagaacggcctgccttgggtgtctccttgcctggagcgtgatggcagcaccttctcgtggtgctg
L T A I N P P K N G L P W C V S L S W S A D G S T F F A G A
901 accgacggcaacatctacgtgtacaggggtggcgagcagtaa 942
T D G N I Y V Y R V G E Q *

```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de SymRACK1. La secuencia presenta timina (t) o citosina (c) en el nucleótido 261, en donde para ambos nucleótidos el aminoácido que se traduce del codón correspondiente es treonina, enmarcado en rojo.



Figura 10. Secuencia de aminoácidos de SymRACK1 de *Symbiodinium* KB8. En colores a la derecha se muestran los 7 dominios WD-40 con sus aminoácidos correspondientes. Los sitios conservados de unión a PKC están subrayados.

**a. PORCENTAJES DE IDENTIDAD DE SymRACK1 CON RACK1 DE OTROS ORGANISMOS**

Se llevó a cabo un análisis de identidades, a partir de un alineamiento múltiple con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de SymRACK1 y homólogos de RACK1 de distintas especies (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este análisis reveló que SymRACK1 a nivel de aminoácidos tiene un 80% de identidad con RACK1 de *Heterocapsa triquetra*; 77% con *Alexandrium tamarense*; 68% con *Perkinsus marinus* y con RACK1 de *Toxoplasma gondii*; 66% de identidad con RACK1 de *Mya arenaria*; 63% con *Chlamydomonas reinhardtii* y *Danio rerio*; 62% de identidad con *Homo sapiens* y *Mus musculus*; 61% con *Xenopus laevis* y 58% con *Phaseolus vulgaris* (Tabla 4).

A nivel de nucleótidos *SymRACK1* tiene un 85% de identidad con *RACK1* de *Heterocapsa triquetra*; 80% con *Alexandrium tamarense*; 76% de identidad con RACK1 de *Toxoplasma gondii*; 72% de identidad con *Chlamydomonas reinhardtii*; 70% de identidad con RACK1 de *Homo sapiens* y *Mus musculus*; 69% con *Perkinsus marinus* y *Danio rerio*; 67% con *Xenopus laevis* y *Phaseolus vulgaris* y 66% de identidad con RACK1 de *Mya arenaria*. (Tabla 5). En ambos análisis las especies se encuentran ordenadas de mayor a menor porcentaje de identidad de SymRACK1 con RACK1.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de SymRACK1 a nivel de aminoácidos con RACK1 de *Heterocapsa triquetra* (No. Acc. DT386143.1), *Alexandrium tamarense* (No. Acc. GAI101024168.1) *Perkinsus marinus* (No. Acc. XP\_002776949.1), *Toxoplasma gondii* (No. Acc. AAT11121.1), *Mya arenaria* (No. Acc. CAL48986.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (Acc. No EDO99650.1), *Danio rerio* (No. Acc. NP\_571519.1), *Homo sapiens* (No. Acc. NP\_006089.1), *Mus musculus* (No. Acc. NP\_032169.1), *Xenopus laevis* (No. Acc. AAD42045.1) y *Phaseolus vulgaris* (No. Acc. ACJ24167.1).

<b>Especie</b>	<b>% Identidad</b>
<u><i>Heterocapsa triquetra</i></u>	80
<u><i>Alexandrium tamarense</i></u>	77
<u><i>Perkinsus marinus</i></u>	68
<u><i>Toxoplasma gondii</i></u>	68
<u><i>Mya arenaria</i></u>	66
<u><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></u>	63
<u><i>Danio rerio</i></u>	63
<u><i>Homo sapiens</i></u>	62
<u><i>Mus musculus</i></u>	62
<u><i>Xenopus laevis</i></u>	61
<u><i>Phaseolus vulgaris</i></u>	58

Tabla 5. Porcentaje de identidad de *SymRACK1* a nivel de nucleótidos con secuencias homólogas de RAKC1 de diferentes especies: *Heterocapsa triquetra* (No. Acc. DT386143.1), *Alexandrium tamarense* (No. Acc. GAll01024168.1) *Toxoplasma gondii* (No. Acc. AY547291.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (No. Acc. XM\_001698013.1), *Homo sapiens* (No. Acc. NM\_006098.4), *Mus musculus* (No. Acc. NM\_008143.3), *Perkinsus marinus* (No. Acc. XM\_002776903.1), *Danio rerio* (No. Acc. NM\_131444.1), *Phaseolus vulgaris* (No. Acc. EU906910.1), *Xenopus laevis* (No. Acc. AF105259.1), *Mya arenaria* (No. Acc. AM404081.1).

<b>Especie</b>	<b>% Identidad</b>
<u><i>Heterocapsa triquetra</i></u>	85
<u><i>Alexandrium tamarense</i></u>	80
<u><i>Toxoplasma gondii</i></u>	76
<u><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></u>	72
<u><i>Homo sapiens</i></u>	70
<u><i>Mus musculus</i></u>	70
<u><i>Perkinsus marinus</i></u>	69
<u><i>Danio rerio</i></u>	69
<u><i>Xenopus laevis</i></u>	67
<u><i>Phaseolus vulgaris</i></u>	67
<u><i>Mya arenaria</i></u>	66

### b. 3'-RACE DE *SymRACK1* DE *Symbiodinium* KB8

La reacción de RT-PCR de los oligonucleótidos FSymRACK1; sentido (Tabla 2 y UAP (Universal Adaptor Primer)) y AUAP (Abridged Universal Adaptor Primer); antisentido, resultó en la amplificación de un fragmento mayor a 1000 pb's (Carril 1 y 2; Figura 11). La banda fue cortada y purificada y el cDNA se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de la secuencia reveló que esta correspondía a *SymRACK1*, excepto en la parte correspondiente a la región 3'-UTR.

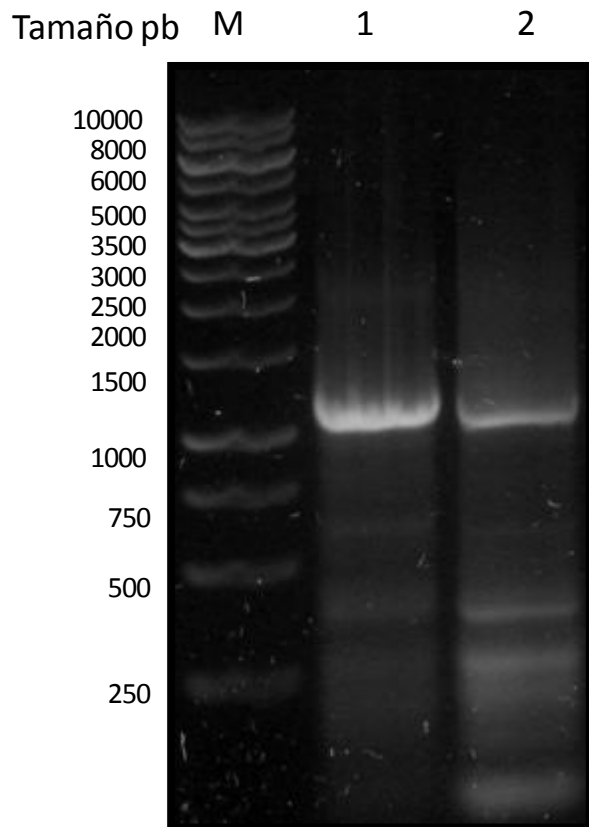


Figura 11. 3'-RACE de *SymRACK1*. Carril 1, Producto de PCR con los oligonucleótidos FSymRACK1 y UAP. Carril 2, Producto de PCR con los oligonucleótidos FSymRACK1 y AUAP. M, 1 Kb DNA Ladder. Gel de 1% agarosa teñido con GelRed.

## 2. CLONACIÓN DEL cDNA DE *SymRACK1*, TRANSFORMACIÓN Y EXPRESIÓN EN *E. coli*.

Para la clonación y expresión de *SymRACK1* de *Symbiodinium* KB8, el cDNA codificante de *SymRACK1* se insertó en el vector pEXP5-CT/TOPO y se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . De las colonias transformadas se eligieron 9 para inocular medio LB adicionado con 100 $\mu$ g/ml de ampicilina. A estas colonias se les hizo PCR en colonia y se identificaron 2 colonias que amplificaron el producto esperado, indicando la presencia de *SymRACK1* (Figura 12 A; carriles 2 y 7). Algunos cultivos tenían pocas células al momento de hacer la PCR en colonia, por lo que se dejaron crecer toda la noche y se purificó plásmido a partir de 5 colonias por Miniprep. Se analizó el plásmido de cada colonia en un gel de 1% agarosa para verificar que tuvieran aproximadamente 4000 pb, lo que indicó que el cDNA de *SymRACK1* se insertó en el vector (2826 pb del vector más 942 pb de *SymRACK1*). Todas las colonias mostraron plásmidos con el peso esperado de ~400 pb, excepto la colonia 5 (Figura 12 B; carriles 1-5, colonias 2, 5, 6, 7 y 8 respectivamente). Se realizó una digestión de los vectores con la enzima de restricción Bgl II, lo anterior para confirmar que el inserto de *SymRACK1* se encontraba en fase (esto es, que esté correctamente orientado para que se lleve a cabo la traducción). La enzima corta en el sitio correspondiente a la base 2666 del vector y en el 797 de *SymRACK1*, lo que da como resultado dos fragmentos de ~2826 y ~850 pb, en los vectores que tienen el inserto en fase. Las digestiones se analizaron en un gel de 1% agarosa y se observó que las colonias 2, 6 y 7 tuvieron el inserto en fase (Figura 12 C; carriles 1, 3 y 4). La colonia 5, como se había visto no contiene inserto por lo cual sólo se linealizó el vector (Figura 12 C; carril 2). Por otro lado, la colonia 8 tuvo el inserto en anti-sentido (Figura 12 C; carril 5). Los vectores que tuvieron el inserto de *SymRACK1* en fase se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Después de la transformación se obtuvieron 7 colonias, a las cuales, para verificar que tuvieran el vector, se les hizo PCR en colonia. En las colonias 2, 3, 4, 5 y 7 se amplificó un fragmento de ~1000 pb (Figura 13), lo que indicó la presencia de pEXP5-CT/*SymRACK1*.



Las colonias positivas se crecieron en medio de selección LB adicionado con 100µg/ml de ampicilina y se les agregó 1mM de IPTG, como inductor de expresión. Extractos analizados por SDS-PAGE cada hora por 6 h, demostraron que la expresión no cambió después de agregar el inductor (Figura 14).

Se realizó un análisis por Western blot a los extractos de las diferentes colonias a 1 h de inducción con IPTG, con el anticuerpo anti-hRACK1. Los resultados mostraron que todas las colonias que contienen la construcción pEXP5-CT/SymRACK1 expresaron una proteína de ~30 kDa que no se observó en un control negativo (BL21 (DE3) pLysS) sin transformar, y que fue reconocida específicamente por los anticuerpos anti-hRACK1. La Figura 15 b muestra la colonia que se utilizó para la purificación de SymRACK1.

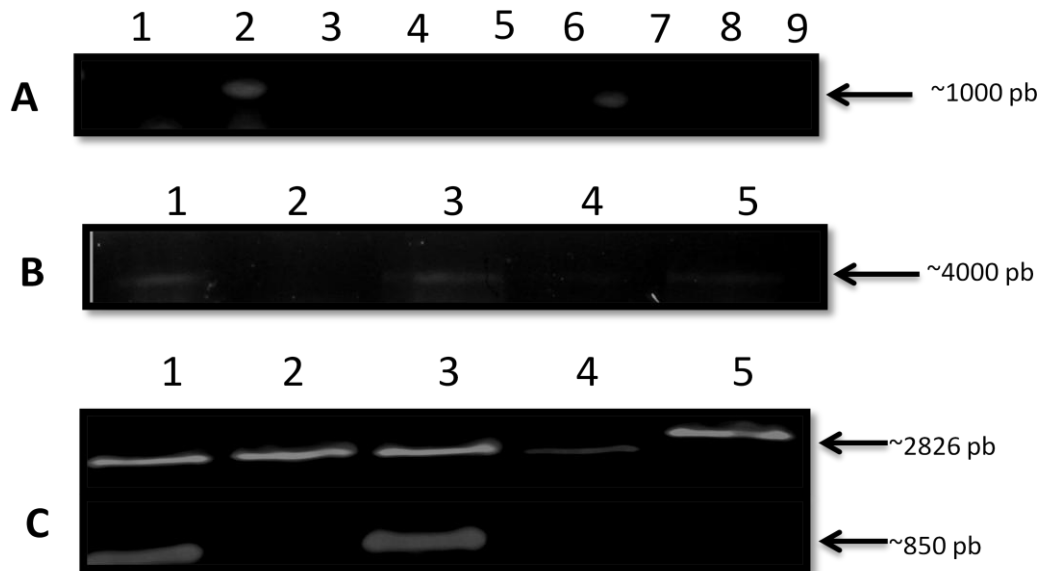


Figura 12. PCR de colonia, Miniprep y digestión de construcción pEXP5-CT/SymRACK1. A) PCR de las colonias 1-9 de *E. coli* DH5α. B) Vectores purificados por Miniprep de las colonias 2, 5, 6, 7 y 8 (carriles 1, 2, 3, 4 y 5). C) Digestión de vectores pEXP5-CT/SymRACK1 provenientes de varias colonias, con la enzima Bgl II. Colonias 2, 5, 6, 7 y 8 (carriles 1, 2, 3, 4 y 5). M, 1 Kb DNA Ladder. Las flechas a la derecha indican el tamaño de los productos correspondientes a las bandas de cada gel. Geles de 1% agarosa teñidos con GelRed.

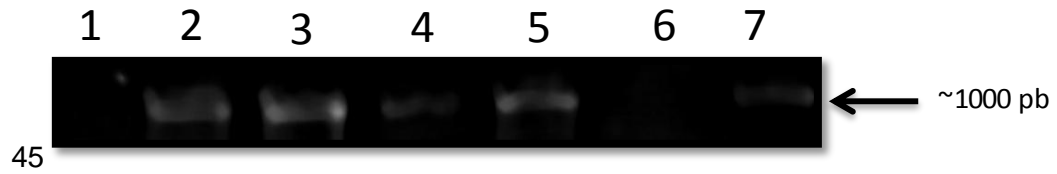


Figura 13. PCR de colonia de *E. coli* BL21 (D3) pLysS transformadas con pEXP5-CT/*SymRACK1*. Colonias 1-7 corresponden a los mismos carriles. M, 1 Kb DNA Ladder. Gel 1% Agarosa teñido con Gel-Red.

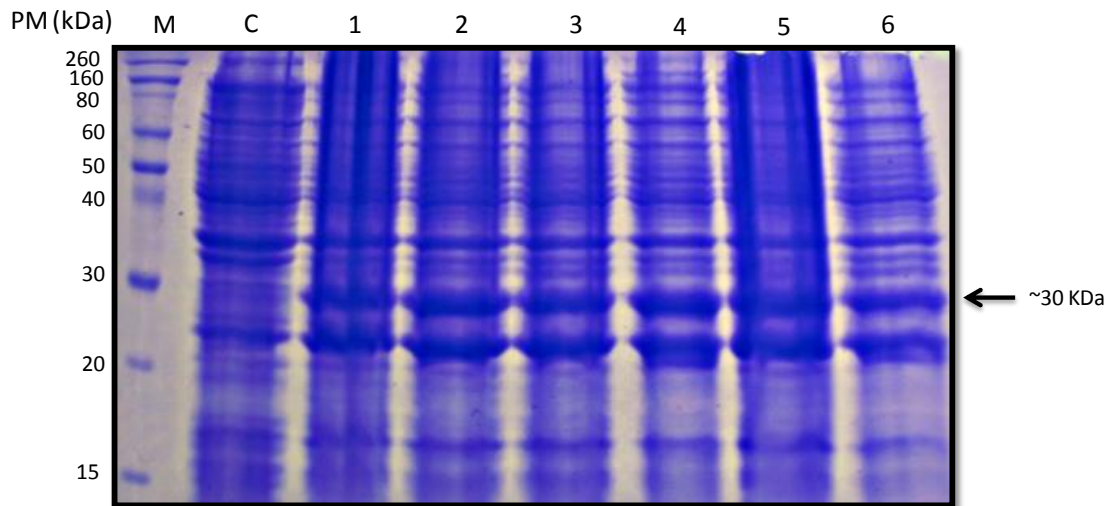


Figura 14. Gel de 12% acrilamida teñido con azul de coomassie, muestra la expresión de la proteína recombinante *SymRACK1*. Carril C, extracto proteico de *E. coli* BL21 (D3) pLysS sin vector. Carriles 1-6, Extractos proteico de colonias *E. coli* BL21 (D3) pLysS con el vector pEXP5-CT/TOPO-*SymRACK1* (40  $\mu$ g de proteína). Flecha de la derecha muestra a *SymRACK* de ~30 kDa.

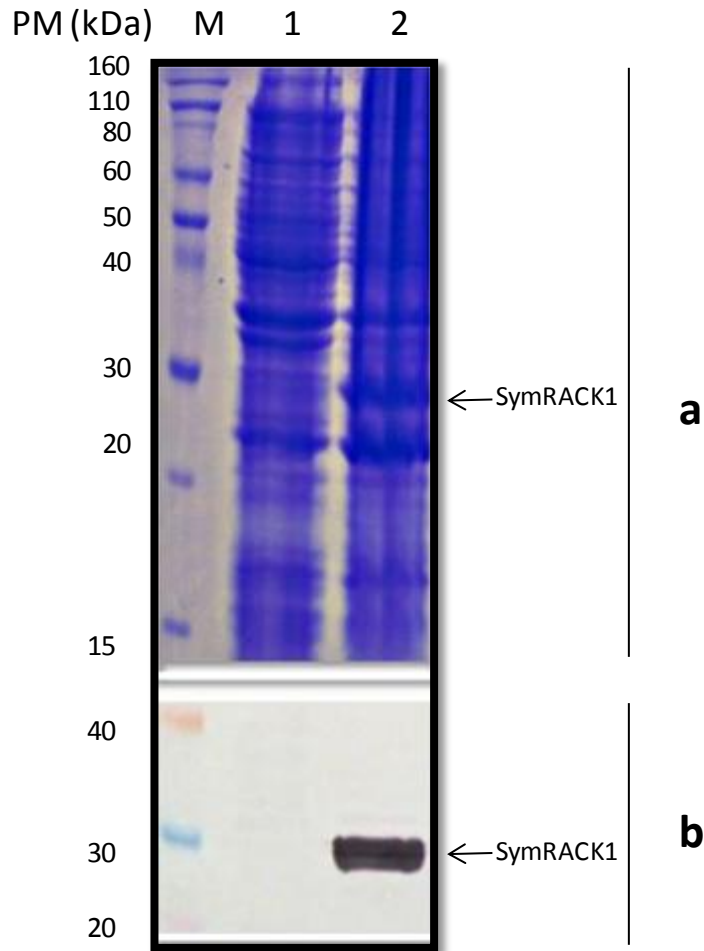


Figura 15. a. Expresión de la proteína recombinante SymRACK1 de ~30 kDa, **a.** Gel de 12% de teñido con azul de Coomassie. Carril 1 extracto proteico de *E. coli* BL21 (D3) pLysS sin vector (40 µg de proteína). Carril 2 extracto de la colonia de *E. coli* BL21 (D3) pLysS transformada con el vector pEXP5-CT/SymRACK1 expresando SymRACK1 (40 µg de proteína). **b.** Western blot con anti-hRACK1. M, Marcador de peso molecular (Novex). La flecha a la derecha muestra a SymRACK1 de ~30 kDa.

Se esperaba que la proteína SymRACK1 recombinante tuviera seis histidinas. Sin embargo, esta no se logró purificar con una columna de níquel. Esto sugirió que la colonia de *E. coli* BL21 (D3) pLysS transformada con el vector pEXP5-CT/SymRACK1 no expresaba correctamente a SymRACK1 y excluyó las 6 histidinas que el vector agrega en el carboxilo terminal de la proteína. Para corroborar la ausencia de histidinas en SymRACK1 se llevo a cabo un Western blot con anticuerpos anti-histidina y anti-hRACK1. El anticuerpo anti-hRACK1 reconoce una banda de ~32 kDa en una muestra de proteína de hígado de pollo, que se utilizó como control positivo, que corresponde a RACK1 (Figura 16, carril 1). Además en la colonia de *E. coli* BL21 (D3) pLysS que expresa a SymRACK1 el anticuerpo anti-hRACK1 reconoce a la proteína recombinante, la cual presenta aparentemente un peso molecular de ~35 kDa (Figura 16, carril 2) y ~32 kDa y ~30 kDa, las bandas de menor peso molecular corresponden a la proteína SymRACK1 degradada. Para probar el anticuerpo anti-histidinas se utilizo la misma muestra de proteína de la colonia de *E. coli* BL21 (D3) pLysS, el anticuerpo reacciona con las histidinas de SymRACK1 y de sus fragmentos, ya que reconoce bandas de los mismos pesos moleculares que se observan con el anticuerpo anti-hRACK1 (Figura 16, carril 3).

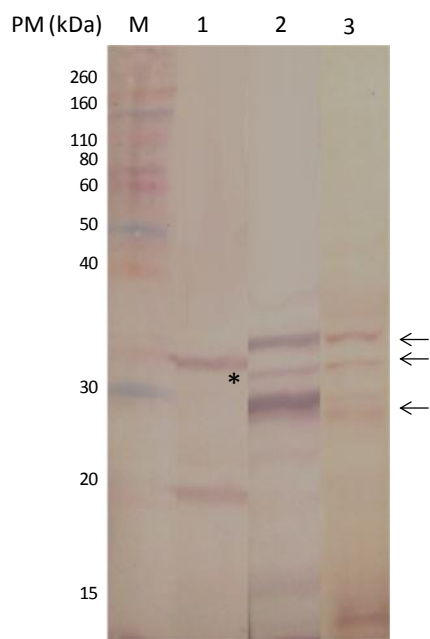


Figura 16. Western blot con anticuerpo anti-hRACK1 y anti- Histidina. Anti-hRACK1 probado en carril 1 y 2 y anti-Histidina probado en el carril 3. Carril 1. RACK1 de hígado de pollo. Asterisco (\*) muestra una proteína de ~32 kDa. Carril 2 SymRACK1 de *E. coli* BL21 (D3) pLysS transformada con el vector pEXP5-CT/SymRACK1. Carril 3 Histidina de SymRACK1. M marcador de peso molecular. Las flechas muestran a SymRACK1 y a las histidinas ~35, ~32 y ~30 kDa.

### 3. WESTERN BLOT CON UN ANTICUERPO ANTI-RACK1 HETERÓLOGO EN EXTRACTOS DE *Symbiodinium*.

Para identificar a SymRACK1, la capacidad de un anticuerpo heterólogo levantado contra RACK1 de origen humano (anti-hRACK1; ver método) de reconocer al posible homólogo de RACK1 de *Symbiodinium* KB8 y Mf11, fue probado por western blot en extractos de proteínas totales de estos organismos, con el fin de poder ser utilizado en otros experimentos. El anticuerpo anti-hRACK1 reconoce una banda de aproximadamente 35 KDa (correspondiente al peso molecular de SymRACK1), con una señal específica en ambos extractos.

Extractos de proteínas de *Symbiodinium* KB8 y Mf11 con 15 días crecimiento en cultivo se usaron para hacer Western blot con anti-hRACK1 a una concentración de 1:300. El resultado muestra que en los extractos de *Symbiodinium* realizados en condiciones desnaturalizantes los anticuerpos reconocen específicamente una proteína de ~36 kDa (Figura 17 A), lo que indica que anti-hRACK1 es adecuado para identificar por Western blot a SymRACK1 de *Symbiodinium* KB8 y Mf11. Extractos proteicos nativos de *Symbiodinium* se corrieron en geles nativos de 8 y 6% de acrilamida seguido de un Western blot con anti-hRACK1. En este análisis se observó que los anticuerpos anti-hRACK1 reaccionaron con extractos de *Symbiodinium* KB8 y Mf11 (Figura 17 B; carriles 2 y 3, respectivamente) en geles de 8% de acrilamida, la imagen no presenta claramente la reacción por la calidad de la fotografía, cuando se hizo el experimento era más claro; para mejorar la visibilidad de la reacción extractos de *Symbiodinium* sp. KB8 se analizaron en un gel de 6% de poliacrilamida, se muestra una banda que corresponde a SymRACK1 nativa (Figura 17 B; carril 4).

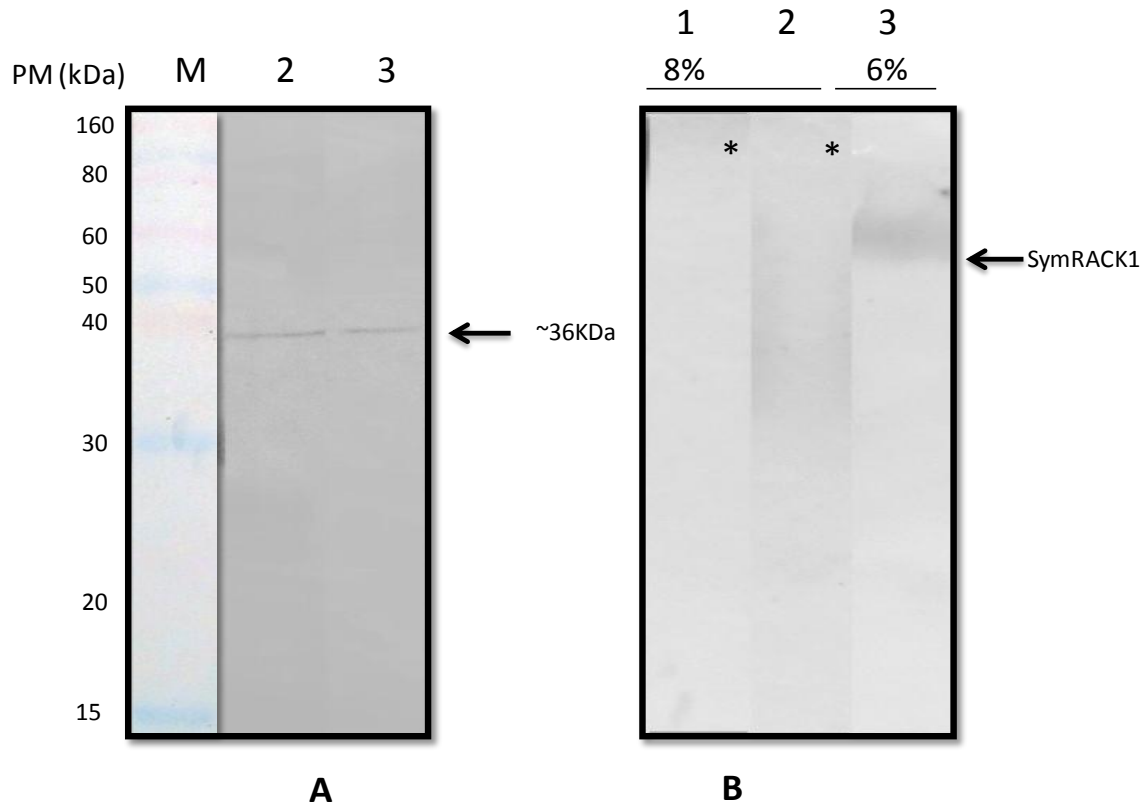


Figura 17. Western blot con anticuerpo anti-hRACK1. **A)** Carril 1, SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8 y Carril 2, SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. Mf11. M, Marcador de peso molecular (Novex). La flecha muestra a SymRACK1 de ~36 kDa en condiciones desnaturizantes. **B)** Western blot nativo. Carril 1 y 3 SymRACK de *Symbiodinium* sp. KB8 usando gel de 8 y 6% respectivamente. Carril 2, SymRACK1 de *Symbiodinium* Mf11; Asteriscos (\*) y la flecha muestran a SymRACK1 en condiciones nativas.

#### 4. PATRONES DE EXPRESIÓN DE SymRACK1 DE *Symbiodinium* DURANTE SU CRECIMIENTO Y CICLO CIRCADIANO

Antes de iniciar con los experimentos de expresión de SymRACK1, durante los experimentos en el laboratorio se observó que el anticuerpo anti-hRACK1 dejaba de reconocer a SymRACK1 cuando no se usaban muestras frescas de extractos proteicos de *Symbiodinium* sp. KB8, y éstos eran conservados a 4°C. Por lo tanto, se hicieron extractos y se guardaron por 24 y 6 h a 4°C, y se analizaron por Western blot, junto con una muestra recién extraída. El Western blot mostró que el anticuerpo disminuyó su reconocimiento hacia la proteína en las muestras almacenadas por 24 y 6 h, a diferencia de la muestra recién extraída en la cual se observa un reconocimiento mayor (Figura A). Por lo tanto en los experimentos posteriores se utilizaron extractos de *Symbiodinium* sp. KB8 frescos.

Para determinar si cambia la expresión a nivel de proteína de SymRACK1 durante el crecimiento de un cultivo de *Symbiodinium* sp. KB8, se llevó a cabo una cinética de acumulación de SymRACK1 mediante un análisis por Western blot utilizando el anticuerpo anti-hRACK1. Para ello, se colectaron los cultivos después de 6, 9, 12, 15 y 20 días de crecimiento, se extrajeron, y se analizaron inmediatamente por Western blot. Para tener la misma cantidad de proteínas en los carriles del gel, estas se cuantificaron por el método de Bradford. Con el método anterior se pudo calcular la cantidad de carga para de cada una de las muestras que fue de 10 µg por carril. El gel se tiñó con azul de coomassie y se corroboró que había la misma carga en cada uno de los carriles (Figura 18 A a). Se utilizaron las mismas cargas que en el gel anterior para un análisis por Western blot con anti-hRACK1. Se inmunodetectó a la banda de ~36 kDa en todos los puntos analizados. Además se realizó una cuantificación relativa respecto al día 6 de crecimiento del cultivo por medio del programa ImageJ2x y se observó que SymRACK1 aumenta para el día 9, 12, 15 y 20 de cultivo; 1.8, 2, 3.3 y 4.2 veces respecto a día 6 (Figura 18 A b). Ver Figura B de anexos para observar gráfica de los valores relativos de gel y Western blot que se utilizaron para la cuantificación.

El patrón de expresión de SymRACK1 aparentemente cambia durante el crecimiento de un cultivo de *Symbiodinium* sp. KB8. Sin embargo, las muestras de este experimento fueron tomadas entre la 1 y las 3 pm, y se ha reportado que la expresión de la proteína también podría cambiar con respecto al ciclo circadiano del cultivo tal como se ha reportado en otros sistemas (Robles *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, se llevó a cabo una cinética para observar si el nivel de expresión de SymRACK1 podría cambiar a lo largo del ciclo circadiano de *Symbiodinium* sp. KB8. Para ello se tomaron muestras cada hora por 24 horas y se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-hRACK1. Se obtuvieron 24 muestras (1-24) de un cultivo de 20 días de *Symbiodinium* sp KB8, las cuales se iniciaron a coleccionar a las 6 am y se terminaron de coleccionar a las 5 am del día siguiente. Con las muestras anteriores se realizaron extractos proteicos y estos se cargaron con una cantidad uniforme de proteína por carril de 10 µg, la cual se corroboró mediante análisis en un gel de 12% acrilamida, seguido de SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie (Figura 18 B a). Las muestras se analizaron entonces por Western blot con anti-hRACK1 y muestran una banda de ~36 kDa en las 24 muestras analizadas. Se realizó una cuantificación relativa respecto a las 10:00 am, cuando inicia las 12 horas de luz del cultivo, por medio del programa ImageJ2x. Lo anterior nos indicó que SymRACK1 disminuía conforme pasaban las horas de luz, alcanzando el valor mínimo a las 3:00 pm de 0.1 (5 h de luz) y aumenta después de 8 h de oscuridad con valor de 1.8 a las 6:00 am (Figura 18 B b. Ver Figura C de anexos para observar gráfica de los valores relativos de gel y Western blot que se utilizaron para la cuantificación de SymRACK1 presente en ciclo circadiano).



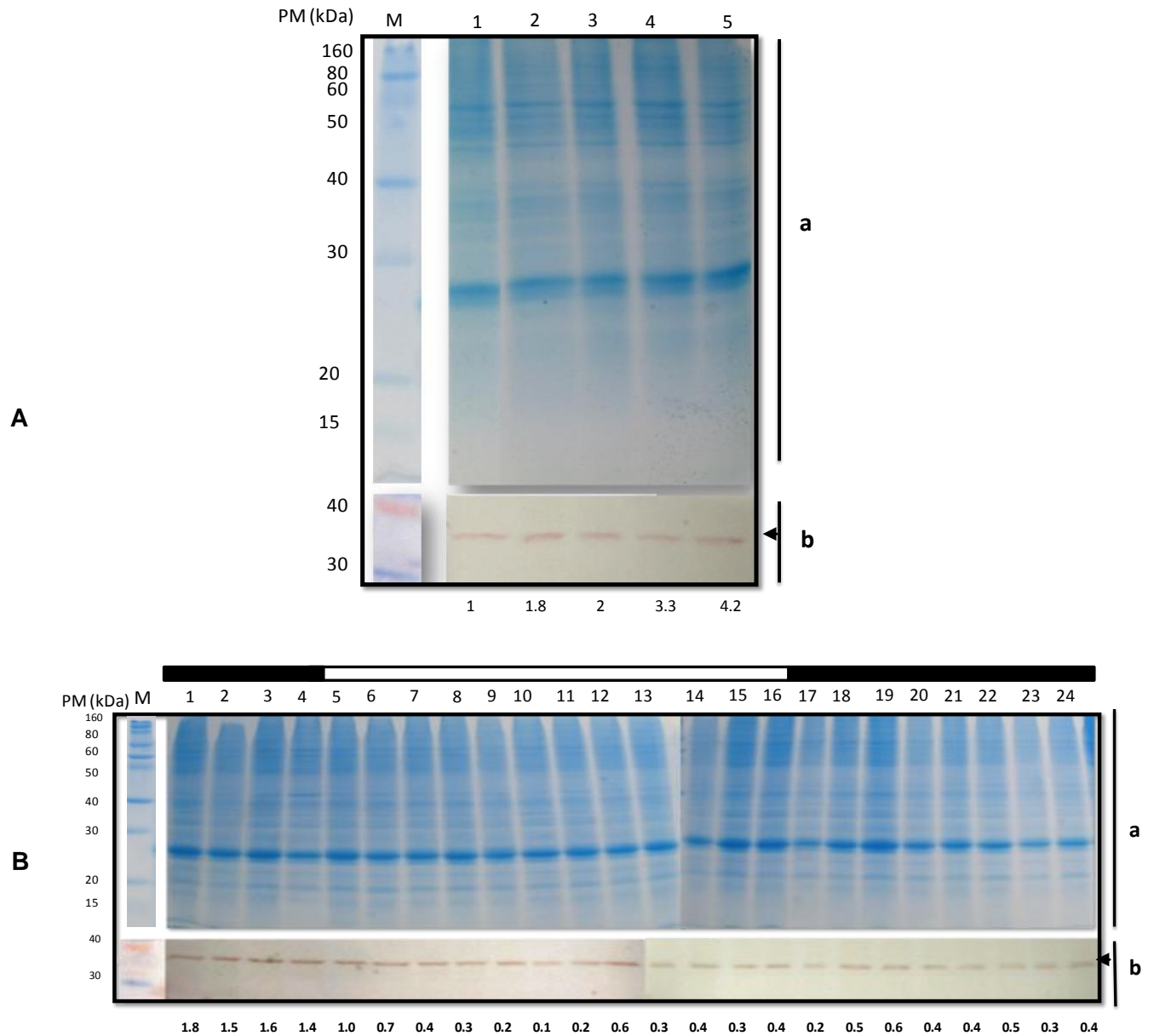


Figura 18. Patrones de expresión de SymRACK1 DE *Symbiodinium* KB8 (10  $\mu$ g de proteína) durante su crecimiento y ciclo circadiano. **A.** Patrones de expresión de SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8 analizados después de 6, 9, 12, 15 y 20 días de crecimiento (carriles 1, 2, 3, 4 y 5). a) Gel teñido con azul de coomassie. b) Western blot con anti-hRACK1. **B.** Patrón de expresión de SymRACK1 durante el ciclo circadiano iniciando a las 6:00 am (carril 1) cada hora hasta las 5:00 am (carril 24) a) Gel teñido con azul de coomassie. b) Western blot con anti-hRACK1. M marcador de peso molecular, 30 y 40 kDa, las flechas de la derecha muestran a SymRACK1 y los valores de cuantificación relativa se encuentran en la parte inferior.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se identificó, caracterizó y secuenció a SymRACK1 en *Symbiodinium* sp. KB8. Esta proteína que no había sido estudiada anteriormente en estos organismos dinoflagelados fotosintéticos es de gran importancia ecológica ya que son capaces de establecerse como endosimbiontes de organismos arrecifales (Stat *et al.*, 2006). Debido a ello, son responsables de una parte de la producción primaria de los océanos (Muscatine *et al.*, 1981). RACK1 es una proteína que participa en múltiples vías de transducción de señales, y pertenece a una clase de proteínas receptoras intracelulares que se unen a distintas isoformas de la PKC (Ron *et al.*, 1994), así como a muchas otras proteínas. Estas interacciones son la base de las vías de señalización que desembocan en diversas funciones celulares como la proliferación celular, la transcripción de proteínas, funciones neuronales y migración, la adhesión y la propagación celular (Kiely *et al.*, 2005; Kiely *et al.*, 2009). Con oligonucleótidos diseñados en base a un contig que contiene toda la secuencia codificante de *SymRACK1*, y que se obtuvo a través de una búsqueda de secuencias homólogas en una base de datos de EST de *Symbiodinium* sp. KB8, se logró obtener la secuencia completa de *SymRACK1* a partir de RT-PCR, PCR y vectores con el inserto. Esta comprende 942 nucleótidos que se traducen en 313 aminoácidos (Figuras 9 y 10) y con un peso molecular calculado “*in silico*” de 34.2 kDa. Su peso molecular (~ 35 kDa) y secuencia son consistentes con RACK1 de otras especies. Así, SymRACK1 tiene un peso molecular menor comparada con la RACK1 de humanos (hRACK1), ya que en humanos el gen de RACK1 tiene un marco de lectura abierto de 1142 nucleótidos que codifican para una proteína de 317 aminoácidos con un peso molecular aparente de 36 kDa (SwissProt No. Acc. [P25388](#)) (Adams *et al.*, 2011).

Aparentemente el gen que codifica a la proteína SymRACK1 en *Symbiodinium* sp. KB8 no presenta intrones, ya que las secuencias de cDNA y DNA genómico presentan la misma cantidad de nucleótidos (~1000 pb), de presentarlos la secuencia sería de mayor cantidad de nucleótidos dependiendo la cantidad de intrones. A diferencia de SymRACK1, hRACK1 presenta un gen de 8 exones y 7 intrones, en donde el cDNA tiene una secuencia de 1122 pb y el genómico 6970 pb (Wang *et al.*, 2003).

*SymRACK1* presenta dos secuencias a nivel de nucleótidos, las cuales difirieron únicamente en una base la cual probablemente representa una substitución verdadera producto de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP o single nucleotide polymorphism). Esta se manifestó en el nucleótido 261, donde se pudo detectar consistentemente citosina o timina (Figura 8 y Tabla 3). Lo anterior sugiere la presencia de secuencias *SymRACK1* en *Symbiodinium* sp. KB8. Será necesario hacer otras pruebas para corroborar si se trata de dos isogenes de *SymRACK1*, mediante la obtención de las secuencias de las regiones no traducidas 5' y 3' de ambos genes.

*SymRACK1* además presentó en su secuencia proteica de 7 dominios WD, dominios característicos de proteínas de la familia WD-40. Estos dominios han sido implicados en las interacciones proteína-proteína (Neer *et al.*, 1994). Por ejemplo, la unión de PDE4D5 a WD5-WD7 de la hRACK1 (Steele *et al.*, 2001), PKC- $\beta$  interactúa con WD3 y WD5, la PKC- $\epsilon$  con WD6 (Brandon *et al.*, 2002; Grosso *et al.*, 2008),  $\beta$ -integrina con WD5-WD7 (Liliental y Chang, 1998; Besson *et al.*, 2002), y la proteína Nef del virus de inmunodeficiencia humana con WD5-WD7 (Gallina *et al.*, 2001). En *SymRACK1* se identificaron los tres sitios de unión a PKC (<sub>100-RTFKGHTKDVN-109, 136</sub>GTINALTFS-<sub>143, y 259-VWDLEN-264</sub>) (Figura 10), lo que sugiere que esta proteína ligando de RACK1 también podría encontrarse en *Symbiodinium*. Mediante ensayos de pull-down, así como de doble híbrido se podrían identificar a PKC así como a otras proteínas que interaccionen con *SymRACK1* (Einarson y Orlinick, 2002). Se ha reportado la interacción de RACK1 con un número creciente de proteínas, lo que sugiere que RACK1 coordina múltiples funciones dentro de la célula, ya que actúa como una proteína de andamiaje que integra una gran cantidad de estímulos extracelulares (Adams *et al.*, 2011)

La secuencia de *SymRACK1* a nivel de aminoácidos y nucleótidos fue comparada utilizando la base de datos del GenBank y BLAST con secuencias de RACK1 de *Heterocapsa triquetra*, *Alexandrium tamarense*, *Perkinsus marinus*, *Toxoplasma gondii*, *Mya arenaria*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Phaseolus vulgaris* (Tablas 4 y 5). Esta comparación reveló que *SymRACK1* a nivel de nucleótidos tiene un porcentaje de identidad entre 66-85% y a nivel de aminoácidos entre 58-80%, teniendo mayores porcentajes de identidad con organismos alveolados. Esto era de esperarse debido a que todos ellos se encuentran dentro del superphylum Alveolata, donde se encuentran los organismos filogenéticamente más cercanos a *Symbiodinium*: *Heterocapsa triquetra*, *Alexandrium tamarense*, *Perkinsus*

*marinus* y *Toxoplasma gondii* (Litaker *et al.*, 1999). Las secuencias de RACK1 están altamente conservadas en los organismos eucariotes, incluyendo plantas, hongos, levaduras, insectos, vertebrados y mamíferos. Su conservación a lo largo de la evolución es consistente con el papel de RACK1 en un número elevado de funciones biológicas importantes (Neer *et al.*, 1994).

Los resultados indican que se obtuvo a la proteína SymRACK1 recombinante de la cepa de *E. coli* (BL21 (DE3) pLysS), que al momento de ser purificada esta se degradaba y perdía las histidinas que le pegaba el vector pEXP5-CT/TOPO en el carboxilo terminal de la proteína, ya que se observaba en el Western blot una proteína con migración relativa de 30 kDa correspondiente a una proteína de menor peso molecular que el calculado de 34 kDa para SymRACK1 (Figura 15). Por lo anterior la proteína no podía pegarse a la columna de Ni. La presencia de histidinas en SymRACK1 se corroboró con ayuda de un anticuerpo anti-histidinas, sin embargo también se encuentra en mayor cantidad degradada y podría estar perdiendo a las histidinas que le permiten pegarse a la columna (Figura 16). La proteína expresada a pesar de no estar completa todavía se puede utilizar para levantar anticuerpos específicos contra SymRACK1. De requerir a la proteína completa para futuros experimentos se podría implementar su expresión en un sistema eucariótico (Schmidt, 2004). Alternativamente, se podría intentar expresar a la proteína con alguna otra adición que pudiera permitir su purificación tal como FLAG o c-Myc, y variando la adición hacia el amino terminal.

El anticuerpo anti-hRACK1, anticuerpo policlonal, reconoce específicamente a SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8, tanto nativa como desnaturalizada, lo que indica que presentaba epítomos secuenciales y conformacionales, por lo que pudo ser utilizado para otros análisis de SymRACK1.

Se ha reportado que RACK1 interacciona con el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), dicha interacción se conoce como una mediadora de la proliferación celular en células de humano (Hermanto *et al.*, 2002). Por lo anterior, se esperaba que la expresión de SymRACK1 de KB8 se modificara a lo largo de su crecimiento en cultivo, los patrones de expresión proteica de SymRACK1 en *Symbiodinium* sp. KB8 aparentemente aumentan, teniendo los valores relativos más altos a los 20 días de crecimiento. RACK1 también ha sido reportada como una moduladora del ciclo circadiano en mamíferos, en donde junto con PKC $\alpha$  regulan CLOCK-BMAL1 (Robles *et al.*, 2010). Al igual que con la

cinética de crecimiento, se esperaba un cambio en el nivel de proteína de SymRACK1, en donde aparentemente disminuye SymRACK1 al iniciar las horas de luz. Estos datos fueron difíciles de corroborar ya que como se mencionó, la manipulación es difícil pues los anticuerpos dejan de reconocer a la proteína en los extractos a medida que pasa el tiempo de almacenaje. Por ello, para poder corroborar los cambios en la expresión de SymRACK1 en crecimiento y ciclo de circadiano será necesario, también llevar a cabo experimentos semicuantitativos o cuantitativos nivel del transcrito de *SymRACK1*. Detectar las variaciones de SymRACK1 en alguna de las etapas de crecimiento o de ciclo circadiano, en conjunto con los estudios de SymRACK1 y sus parejas de unión, sin duda ayudarán a definir con mayor precisión el papel que desempeña SymRACK1 en la regulación de las funciones de *Symbiodinium* sp.

Existen estudios en los que RACK1 está involucrada en la regulación de procesos de infección en organismos apicomplexa (*Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*) filogenéticamente cercanos a *Symbiodinium* (Kelly *et al.*, 2003; Regmi *et al.*, 2008). Los apicomplexa son un grupo bien conocido de parásitos, que comparten con *Symbiodinium* una maquinaria celular y numerosos genes asociados al estilo de vida de parásitos (Malcolm & April, 2012). *Leishmania major* es un parásito, en donde LACK (homólogo de RACK1) se ha demostrado claramente que es esencial para la viabilidad del parásito y para su establecimientos en el huésped. Mutantes de *Leishmania* con los niveles disminuidos de la proteína LACK no desarrollan lesiones en ratones susceptibles y redujeron la capacidad de reproducir en los macrófagos *in vitro* (Kelly *et al.*, 2003). En *Leishmania mexicana* se sugiere que LACK se une al plasminógeno *in vivo* y promueve la formación de plasmina, esta unión podría contribuir a la invasividad del parásito a su hospedero (Gómez-Arreaza, 2011) En *Trypanosoma brucei*, se requiere que el homólogo RACK1 para la citocinesis (Rothberg, 2006).

En otros organismos que al igual que *Symbiodinium* llevan a cabo relaciones simbióticas, como por ejemplo *Rhizobium-Phaseolus vulgaris*, se ha reportado que PvRACK1 es importante para el desarrollo e integridad del simbiosoma en el nódulo simbiótico, para ello se realizó un análisis de silenciamiento (RNA de interferencia) y sobre-expresión de la proteína en raíces transgénicas de la planta, en donde la nodulación es en el silenciamiento de SymRACK1 es inhibida en un 24-50% y en la sobre-expresión en un 80%, además de que los nódulos eran de menor tamaño que los

controles en un 80% en las raíces silenciadas y 60% en las sobre-expresadas. (Islas-Flores *et al.*, 2011).

Adicionalmente, en la anémona *Aiptasia pulchella* se ha involucrado a la proteína Ap-Rab11 en el proceso de simbiosis que ocurre con *Symbiodinium*, la cual junto con Rab4 funcionan como controladores de reciclaje de la membrana endosomal (Chen *et al.*, 2005). Por otro lado, en *C. elegans* se ha identificado a Rab11 como una de las proteínas que interactúan con RACK1 (Ai *et al.*, 2009), por lo que homólogos de Rab11 pudieran interactuar con RACK1 en el simbiote y/o su medusa hospedera, y también participar en procesos de simbiosis. Es evidente que los procesos de parasitismo y simbiosis involucran una serie de mecanismos de transducción de señales en los que se ha demostrado que RACK1 es una proteína fundamental. Por lo anterior, caracterizar a SymRACK1 es uno de los primeros pasos que permitirá conocer más en detalle los mecanismos de transducción de señales que ocurren en *Symbiodinium*, y en procesos relacionados con la simbiosis. Para poder lograr lo anterior se requerirán hacer estudios más profundos en *Symbiodinium* y en sus hospederos.

## CONCLUSIÓN

- La secuencia de SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8, comprende 942 nucleótidos que se traducen en 313 aminoácidos con un peso molecular calculado de 34.2 kDa y un pI de 5.9.
- La secuencia de nucleótidos presentó una variante en la base 261 que corresponde a una sustitución silenciosa de C/T que no se traduce en un cambio a nivel de aminoácidos.
- La secuencia de aminoácidos presentó 7 dominios característicos de proteínas de la familia WD-40 y 3 sitios conservados de unión a PKC.
- La construcción pEXP5-CT/TOPO/SymRACK1 fue exitosa para expresar un fragmento de ~30 KDa de SymRACK1 que puede ser utilizada para hacer anticuerpos específicos.
- Los anticuerpos anti-hRACK1 reconocieron a SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8 y Mf11 en condiciones nativas y desnaturizantes.
- SymRACK1 no presentó cambios en la disminución o acumulación de proteína durante 20 días de crecimiento en cultivo, aunque posiblemente pudieran haber cambios a lo largo del ciclo circadiano.

## **PERSPECTIVAS**

Con la proteína recombinante mandar a producir un anticuerpo y hacer ensayos de pull-down o columnas de afinidad y detectar ligandos de SymRACK1.

Cambios en expresión de proteínas pueden ser detectados a nivel de mRNA de manera más sensible. Por lo que pudieran implementarse las mismas cinéticas para corroborar las variaciones de SymRACK1 en crecimiento y ciclo circadiano por medio de Northern blot o PCR semicuantitativo o cuantitativo.



## BIBLIOGRAFÍA

Adams D. R., Ron D. & Kiely P. A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal*, 9(1):22.

Ai E., Poole D. S. & Skop A. R. (2009). RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 20(6):1629-1638.

Baker A. C. (2011). Zooxanthellae. *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: structure, form and process*, 1190:11-92.

Barnes R. D. (1974). Invertebrate zoology. W. B. Saunders Company, 3th ed, 5:89-136.

Baumann M., Gires O., Kolch W., Mischak H., Zeidler R., Pich D. & Hammerschmidt W. (2000). The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur J Biochem*, 267:3891–3901.

Bayer T., Aranda M., Sunagawa S., Yum L.K., DeSalvo M.K., Lindquist E., Coffroth M. A., Voolstra C. R. & Medina M. (2012). *Symbiodinium* Transcriptomes: genome insights into the dinoflagellate symbionts of reef-building corals. *PLoS ONE*, 7(4):e35269.

Ben-Shem A., Jenner L., Yusupova G. & Yusupov M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330(6008):1203-1209.

Besson A., Wilson T. L. & Yong V. W. (2002). The anchoring protein RACK1 links protein kinase C epsilon to integrin beta chains: requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem*, 277:22073-22084.

Birikh K. R., Sklan E. H., Shoham S. & Soreq H. (2003). Interaction of “readthrough” acetylcholinesterase with RACK1 and PKC $\beta$ II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc Natl Acad Sci*, 100(1): 283-288.

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

Brandon N. J., Jovanovic J. N., Smart T. G. & Moss S. J. (2002). Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J Neurosci*, 22(15): 6353-6361.

Brandon N. J., Uren J. M., Kittler J. T., Wang H., Olsen R., Parker P. J. & Moss S. J. (1999). Subunit-specific association of protein kinase C and the receptor for activated C kinase with GABA type A receptors. *J Neurosci*, 19:9228-9234.

Castillo-Medina R. E., Islas-Flores T., Thomé P. E., Iglesias-Prieto R., Lin S., Zhang H. & Villanueva, M. A. (2013). The PsbO homolog from *Symbiodinium kawagutii* (Dinophyceae) characterized using biochemical and molecular methods. *Photosynthesis research*, 115:167-168.

Cavalier-Smith T. & Chao E. E. (2004). Protalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.). *Eur J Protistol*, 40: 185–212.

Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A., & Gruss P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*, 94(6): 727-737.

Chang B. Y., Chiang M. & Cartwright C. A. (2001). The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem*, 276:20346-20356.

Chang B. Y., Conroy K. B., Machleder E. M. & Cartwright C. A. (1998). RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, 18:3245-3256.

Chen M. C., Hong M. C., Huang Y. S., Liu M. C., Cheng Y. M. & Fang L. S. (2005). ApRab11, a cnidarian homologue of the recycling regulatory protein Rab11, is involved in the establishment and maintenance of the *Aiptasia*–*Symbiodinium* endosymbiosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(3):1607-1616.

Chen S., Dell E. J., Lin F., Sai J. & Hamm H. E. (2004). RACK1 regulates specific functions of Gbetagamma. *J Biol Chem*, 279:17861-17868.

Colley N. J. & Trench R. K. (1983). Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma stage of the jellyfish *Cassiopeia xamachana*. *Proc R Soc A*, 61-82.

Croze E., Usacheva A., Asarnow D., Minshall R. D., Perez H. D. & Colamonici O. (2000). Receptor for activated C-kinase (RACK-1), a WD motif-containing protein, specifically associates with the human type I IFN receptor. *J Immunol*, 165:5127-5132.

Davies P. S. (1993). Endosymbiosis in marine cnidarians. D.M. John, S.J. Hawkins, J.H. Price (Eds.), *Plant Animal Interactions in the Marine Benthos*, Clarendon, Oxford, 511-540.

Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2), 229-261.

Deutsch V. R., Pick M., Perry C., Grisaru D., Hemo Y., Golan-Hadari D. & Soreq H. (2002). The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34 hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp Hematol*, 30(10):1153-1161.

- Dou Y., Milne T. A., Ruthenburg A. J., Lee S., Lee J. W., Verdine G. L. & Roeder R. G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*, 13(8):713-719.
- Einarson M.B. & Orlicki J.R. (2002). Identification of protein-protein interactions with glutathione s-transferase fusion proteins. in protein-protein interactions: *A Molecular Cloning Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 37-57.
- Fitt W. K. & Trench R. K. (1983). The relation of diel patterns of cell division to diel patterns of motility in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal in culture. *New Phytol*, 94:421-432.
- Fitt W. K., Brown B. E., Warner M. E. & Dunne R. P. (2001). Coral bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal threshold in tropical corals. *Coral Reefs*, 20:51-65.
- Gallina A., Rossi F. & Milanese G. (2001). RACK1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology*, 283:7-18.
- Geijsen N., Spaargaren M., Raaijmakers J. A., Lammers J. W., Koenderman L. & Coffers P. J. (1999). Association of RACK1 and PKC $\beta$  with the common  $\beta$ -chain of the IL-5/IL-3/GM-CSF receptor. *Oncogene*, 18:5126-5130.
- Grosso S., Volta V., Sala L., Vietri M., Marchisio P., Ron D. & Biffo S. (2008). PKC $\beta$  II modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *Biochem J*, 415: 77-85.
- Guillemot F., Billault A. & Auffray C. (1989). Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci*, 86:4594-4598.
- He D. Y., Neasta J. & Ron, D. (2010). Epigenetic regulation of BDNF expression via the scaffolding protein RACK1. *J Biol Chem*, 285(25):19043-19050.
- Hennig E. E., Butruk E. & Ostrowski J. (2001). RACK1 protein interacts with *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: the yeast two-hybrid approach. *Biochem Biophys Res Commun*, 289:103-110.
- Hermanto U., Zong C. S., Li W. & Wang L. H. (2002). RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol*, 22:2345-2365.
- Iglesias-Prieto R., Matta J. L., Robins W. A. & Trench R. K., (1992). The photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Natl Acad Sci*, 89:10302-10305.

Islas-Flores T., Guillén G., Alvarado-Affantranger X. D., Lara M., Sánchez F. & Villanueva M. A. (2011). PvRACK1 loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Mol Plant Microbe Interact*, 24:819-826.

Kelly B. L., Stetson D. B. & Locksley R. M. (2003). *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med*, 198:1689-1698.

Kholodenko B. N., Hancock J. F. & Kolch W. (2010). Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(6):414-426.

Kiely P. A., Baillie G. S., Barrett R., Buckley D. A., Adams D. R., Houslay M. D. & O'Connor R. (2009). Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 284:20263-20274.

Kiely P. A., Leahy M., O'Gorman D. & O'Connor R. (2005). RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF-I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251. *J Biol Chem*, 280:7624-7633.

Kiely P. A., Sant A. & O'Connor R. (2002). RACK1 is an IGF-1 Receptor interacting protein that can regulate IGF-1-mediated Akt activation and protection from cell death. *J Biol Chem*, 277:22581-22589.

Koehler J. A. & Moran M. F. (2001). RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP. *Biochem Biophys Res Commun*, 283:888–895.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LaJeunesse T., Parkinson J. E. & Trench R. K. (2012). *Symbiodinium*. Versión 4 de julio 2012. <http://tolweb.org/Symbiodinium/126705/2012.07.04> en *The tree of life web project*, <http://tolweb.org/>

Leander B. S. & Keeling P. J. (2003). Morphostasis in alveolate evolution. *Trends Ecol Evol*, 18:395-402.

Li D. & Roberts R. (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58:2085-2097.

Liedtke CM, Yun CH, Kyle N & Wang D (2002). PKC-epsilon dependent regulation of CFTR involves binding to RACK1, a receptor for activated C kinase and RACK1 binding to NHERF1. *J Biol Chem*, 277:22925-22933.

Liliental J. & Chang D. D. (1998). RACK1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem*, 273:2379–2383.

- Litaker, R. W., Tester, P. A., Colorni, A., Levy, M. G. & Noga, E. J. (1999). The phylogenetic relationship of *Pfiesteria piscicida*, *Cryptoperidiniopsis* sp. *Amyloodinium ocellatum* and a *Pfiesteria* dinoflagellate to other dinoflagellates and apicomplexans. *J Phycol*, 35(6):1379-1389.
- Liu X. & Nie Q. (2009). Spatially-localized scaffold proteins may facilitate to transmit long-range signals. *Acta Math Sci*, 29(6):1657-1669.
- Malcolm H., & April, H. (2012). The magnesium inhibition and arrested phagosome hypotheses: new perspectives on the evolution and ecology of Symbiodinium symbioses. *Biological Reviews*, 87(4), 804-821.
- Markell D. A., & Wood-Charlson, E. M. (2010). Immunocytochemical evidence that symbiotic algae secrete potential recognition signal molecules in hospite. *Marine biology*, 157(5), 1105-1111.
- McAuley, P. J., & Smith, D. C. (1982). The green hydra symbiosis. V. Stages in the intracellular recognition of algal symbionts by digestive cells. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, 216(1202), 7-23.
- McCahill A., Warwicker J., Bolger G. B., Houslay M. D. & Yarwood, S. J. (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol*, 62(6):1261-1273.
- McLaughlin J. J. A. & Zahl P. A. (1966). Endozoic algae. In: Henry S. M., ed. *Symbiosis*, Vol. 1 (Associations of microorganisms, plants, and marine organisms). New York, NY: *Academic Press*, 257–297.
- McLeod M., Shor B., Caporaso A., Wang W., Chen H. & Hu L. (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol Cell Biol*, 20:4016–4027.
- Mourton T., Hellberg C. B., Burden-Gulley S. M., Hinman J., Rhee A. & Brady-Kalnay S. M. (2001). The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts. *J Biol Chem*, 276:14896-14901.
- Murray H. G. & Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Res*, 8:4321-4325.
- Muscantine L. & Porter J. W. (1977). Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient poor environments. *BioScience*, 27:454-460.
- Muscantine L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Coral Reefs, Ecosystem of the world*, 25:75-87.

- Muscatine L., McCloskey L. R. & Marian R. E (1981). Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol Oceanogr*, 26:601–611.
- Neasta J., Kiely P. A., He D. Y., Adams D. R., O'Connor, R. & Ron D. (2012). Direct interaction between scaffolding proteins RACK1 and 14-3-3 $\zeta$  regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcription. *J Biol Chem*, 287(1):322-336.
- Neckelmann N. & Muscatine L. (1983). Regulatory mechanisms maintaining the *Hydra-Chlorella* symbiosis. *Proc R Soc A Series B. Biological Sciences*, 219:193-210.
- Neer E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80:249-257.
- Neer E. J., Schmidt C. J., Nambudripad R. & Smith T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371, 22.
- Nilsson J., Sengupta J., Frank J. & Nissen P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO reports*, 5(12):1137-1141.
- Not F., Siano R., Kooistra W. H., Simon N., Vaultot D., Probert I. & Piganeau G. (2012). 1 Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton *Adv Ecol Res*, 64:1-53.
- Paoli M. (2001). Protein folds propelled by diversity. *Prog Biophys Mol Biol*, 76:103-130.
- Pawson T. & Scott J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278 (5346):2075-2080.
- Pochon X. & Gates R. D. (2010). A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawaii. *Mol Phylogenet Evol*, 56(1):492-497.
- Regmi S., Rothberg K. G., Hubbard J. G. & Ruben L. (2008). The RACK1 signal anchor protein from *Trypanosoma brucei* associates with eukaryotic elongation factor 1A: a role for translational control in cytokinesis. *Mol Microbiol*, 70(3):724-745.
- Reinhardt J. & Wolff T. (2000). The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. *Vet Microbiol* 74:87-100.
- Rigas A. C., Ozanne D. M., Neal D. E. & Robson C. N. (2003). The scaffolding protein RACK1 interacts with androgen receptor and promotes cross-talk through a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem*, 278:46087-46093.
- Robles M. S., Boyault C., Knutti D., Padmanabhan K. & Weitz, C. J. (2010). Identification of RACK1 and Protein Kinase C as integral components of the mammalian circadian clock. *Sci Signal*, 327: 463-466.

Rodriguez M. M., Ron D., Touhara K., Chen C. H. & Mochly-Rosen D (1999). RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains *in vitro*. *Biochemistry* 38:13787-13794.

Ron D., Chen C. H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E. & Mochly-Rosen D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 91:839-843.

Roth E., Jeon K. & Stacey G. (1988). Homology in endosymbiotic systems: the term 'symbiosome'. *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Proceedings of the 4th International Symposium of Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 220-225.

Rothberg K. G., Burdette D. L., Pfannstiel J., Jetton N., Singh R. & Ruben L. (2006). The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. *J Biol Chem*, 281(14), 9781-9790.

Sang N., Severino A., Russo P., Baldi A., Giordano A., Mileo A. M., Paggi M. G. & De Luca A. (2001). RACK1 interacts with E1A and rescues E1A-induced yeast growth inhibition and mammalian cell apoptosis. *J Biol Chem*, 276:27026-27033.

Santos S. R., Taylor D. J., Kinzie R. A., Hidaka M., Sakai K. & Coffroth M. A. (2002). Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 23(2):97-111.

Schenk P. W. & Snaar-Jagalska B. E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1449(1): 1-24.

Schmidt F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(4): 363-372.

Schwindinger W. F. & Robishaw J. D. (2001). Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, 20:1653-1660.

Sklan E. H., Podoly E. & Soreq H. (2006). RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 78:117-134.

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

Stebbins E. G. & Mochly-Rosen D. (2001). Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J Biol Chem*, 276:29644-29650.

Steele M. R., McCahill A., Thompson D. S., MacKenzie C., Isaacs N. W., Houslay M. D. & Bolger G. B. (2001). Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal*, 13:507-513.

- Steidinger K. A. & Tangen K. (1996). Chapter 3 – Dinoflagellates. *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, 387-584.
- Stimson J., Sakai K. & Sembali H. (2002). Interspecific comparison of the symbiotic relationship in corals with high and low rates of bleaching-induces mortality. *Coral Reefs*, 21:409-421.
- Thornton C., Tang K. C., Phamluong K., Luong K., Vagts A., Nikanjam D., Yaka R. & Ron D. (2004). Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization. *J Biol Chem*, 279:31357-31364.
- Trautman D.A., Hinde R., Cole L., Grant A. & Quinnell R. (2002). Visualisation of the symbiosome membrane surrounding cnidarian algal cells. *Symbiosis*, 32:133-145.
- Trench R. K. & Blank R. J. (1987). *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. goreauii* sp. nov., *S. kawagutii* sp. nov. and *S. pilosum* sp. nov.: Gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *J Phycol*, 23:469-481.
- Trench R. K. (1987). Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. The biology of Dinoflagellates, *Ed. Blackwell, Oxford*, 530-570.
- Tuteja N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*, 4:942-947.
- Usacheva A., Smith R., Minshall R., Baida G., Seng S., Croze E. & Colamonici O. (2001). The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J Biol Chem*, 276:22948-22953.
- Villanueva M. A. (2008). Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly metanol-free transfer buffer. *Anal Biochem*, 373:377-379.
- Wakefield T. S., Farmer M. A. & Kempf S. C. (2000). Revised description of the fine structure of in situ “zooxanthellae” genus *Symbiodinium*. *Biol Bull*, 199:76-84.
- Wall M. A., Coleman D. E., Lee E., Iniguez-Lluhi J. A., Posner B. A., Gilman A. G. & Sprang S. R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*, 83:1047-1058.
- Wang S., Chen J. Z., Zhang Z., Gu S., Ji C., Tang R., Ying K., Xie Y. & Mao Y. (2003). Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Mol Biol Rep*, 30:53-60.
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Bio*. 211(19), 3059-3066.



Won M., Park S. K., Hoe K. L., Jang Y. J., Chung K. S., Kim D. U., Kim H. B. & Yoo H. S. (2001). Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 282:10-15.

Yaka R., Thornton C., Vagts A. J., Phamluong K., Bonci A. & Ron D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc Natl Acad Sci*, 99:5710-5715.

Yarwood S. J. & Woodgett J. R. (2001). Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc Natl Acad Sci*, 98(8):4472-4477.

Yatime L., Hein K. L., Nilsson J. & Nissen P. (2011). Structure of the RACK1 dimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 411:486-498.

## ANEXOS

Tabla A. Componentes del medio de cultivo ASP-8A.

Componentes	Sol. Stock	1 L
NaCl	---	25 g
KCl	35g / 500mL	10 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	450g / L	20 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	55g / 500mL	10 mL
NaNO <sub>3</sub>	2.5g / 50mL	1 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g / 50mL	1mL
NTA	1.5g / 50mL	1 mL
Tris Base (pH 9.0)	100g / L	10 mL
PII Metal Mix	(separate)	10 mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.05g / 50ml	1 mL
8A Vitamin Mix (x2)	(separate)	.25 mL
Vitamin B <sub>12</sub>	10ug / 1mL	0.1 mL
{GeO <sub>2</sub> }	50 mg / 50m	2.5 mL

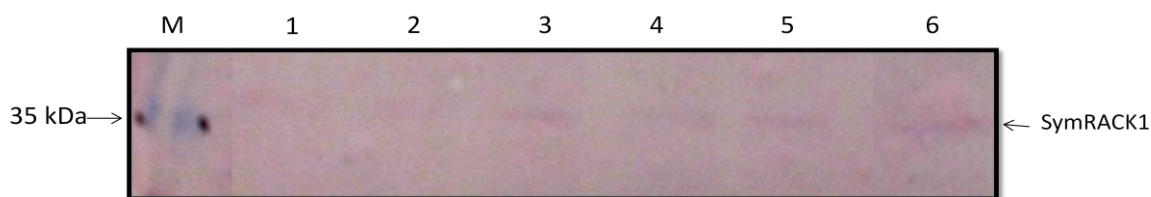


Figura A. Western blot con anti-hRACK1 en extractos de *Symbiodinium* sp. KB8 conservados a 4°C por 24 h (carril 1 y 2), por 6 h (carril 3, 4 y 5), y analizados inmediatamente después de la extracción (carril 6). La flecha de la derecha indica la posición de migración correspondiente a SymRACK1 y la de la izquierda la posición de migración correspondiente al marcador de peso molecular de 35 kDa.

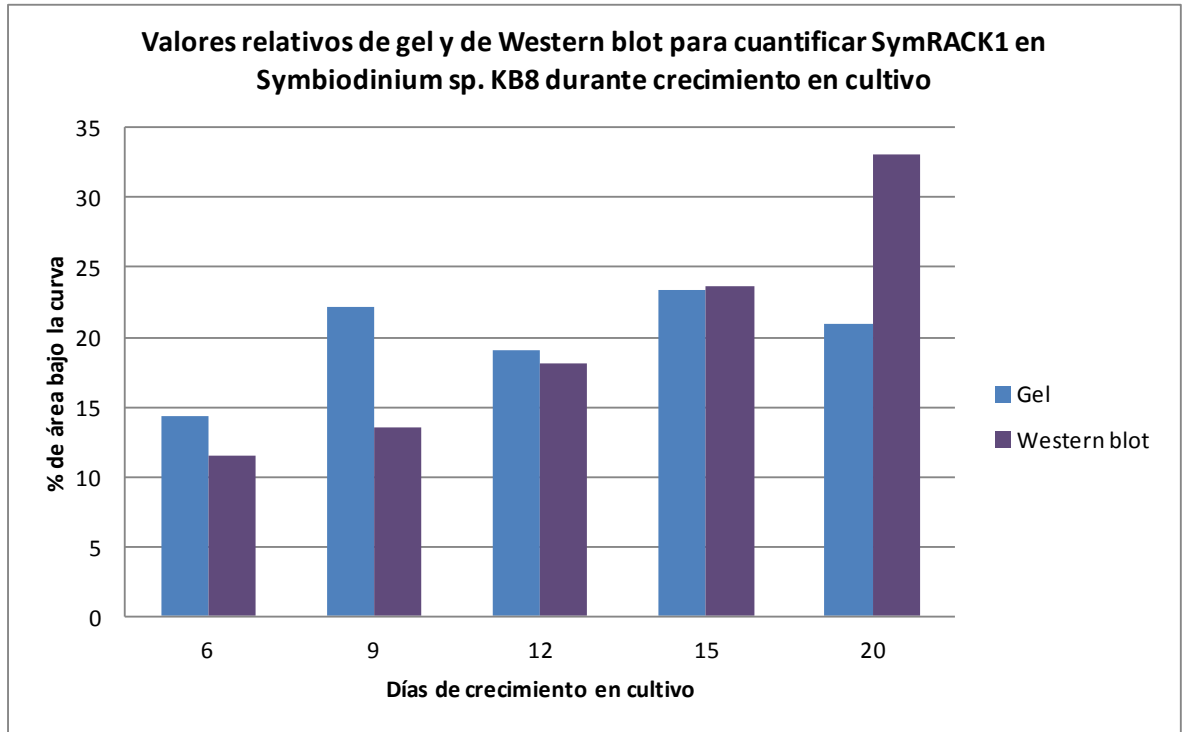


Figura B. Gráfica de valores relativos del gel y Western blot para cuantificar a SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8 en crecimiento. Diferentes días de cultivo 6, 9, 12, 15 y 20.

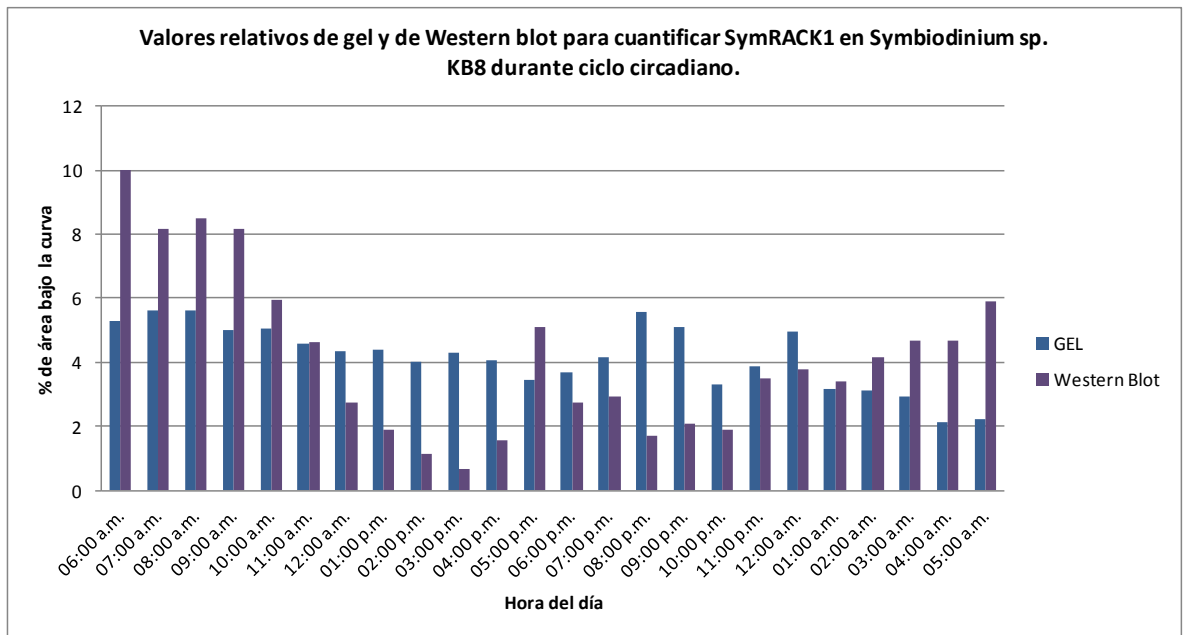


Figura C. Gráfica de valores relativos del gel y Western blot para cuantificar a SymRACK1 de *Symbiodinium* sp. KB8 en ciclo circadiano. De 6:00 am a 5:00 am de día.

