



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA DE 29 kDa
DE *Symbiodinium microadriaticum* CASSKB8 QUE SE FOSFORILA EN TREONINA
EN RESPUESTA A LUZ.**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA MARINA).**

**PRESENTA:
VIVIANA ANDREA URBAN SOSA.**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. MARCO ANTONIO VILLANUEVA MÉNDEZ.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. PATRICIA ELENA THOMÉ ORTIZ.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
DRA. TANIA TAYDE ISLAS FLORES.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. RAÚL ANTONIO LLERA HERRERA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.**

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, FEBRERO DE 2025



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.



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA DE 29 kDa
DE *Symbiodinium microadriaticum* CASSKB8 QUE SE FOSFORILA EN TREONINA
EN RESPUESTA A LUZ.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA MARINA).

PRESENTA:
VIVIANA ANDREA URBAN SOSA.

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MARCO ANTONIO VILLANUEVA MÉNDEZ.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.

COMITÉ TUTOR:
DRA. PATRICIA ELENA THOMÉ ORTIZ.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
DRA. TANIA TAYDE ISLAS FLORES.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
DR. RAÚL ANTONIO LLERA HERRERA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, FEBRERO DE 2025.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD
Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y
PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA DE 29 kDa DE Symbiodinium microadriaticum CASSKB8 QUE SE FOSFORILA EN TREONINA EN RESPUESTA A LUZ** que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Viviana Andrea Urban Sosa
Número de cuenta UNAM: 522013528

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo para asistir al XXX Congreso Nacional de Bioquímica.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo brindado 833034 durante el periodo 2022-2024.

Al Dr. Marco Villanueva por la dirección de esta tesis, y brindarme un espacio en su laboratorio.

A la Dra. Patricia Thomé por sus comentarios, correcciones, y tenerme la confianza para usar su equipo de laboratorio y reactivos.

Al Dr. Estuardo Vera por sus preguntas, comentarios y sugerencias para esta investigación.

A la Dra. Tania Islas por ayudarme a resolver problemas técnicos y teóricos durante la realización de mis experimentos.

Al Dr. Raúl Llera por sus recomendaciones y ayuda en la parte de análisis de datos.

A mis sobrinos José Armando y Víctor Alejandro 2 en 8 mil millones.

En el principio creó Dios los cielos y la tierra.
Y la tierra estaba vana y vacía, y había oscuridad
sobre la faz del abismo, y el espíritu de Dios se
cernía sobre la faz de las aguas.
Y Dios dijo: Haya luz, y hubo luz.
Y vio Dios la luz, que era buena; y separó Dios
la luz de la oscuridad.
Y llamo Dios a la luz día, y a la oscuridad llamó
noche. Y fue tarde y fue mañana: día uno.

Génesis

En memoria a mi abuelita Rosa (1936-2024) y mi abuelo Víctor (1934-2024).

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	15
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	15
Morfología y ciclo de vida de <i>Symbiodinium microadriaticum</i>	16
Fotosistema de Symbiodiniaceae	20
Vías de señalización celular	21
Fosforilación, un proceso fundamental en las células	22
OBJETIVO GENERAL	24
Objetivos particulares	24
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material biológico.....	25
Tratamientos físicos.....	25
Tratamientos químicos	26
Ensayo de viabilidad.....	27
Extracción de proteína.....	27
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	28
Electrotransferencia de proteínas	29

Western blot	29
Cromatografía de intercambio iónico	30
Separación de p29 por punto isoelectrico y peso molecular.....	31
Secuenciación de aminoácidos de p29 por LC/MS/MS	33
Amplificación por PCR, clonación y secuenciación de Psma, CPN21 y CutA	34
Análisis de secuencias de nucleótidos	39
RESULTADOS	40
Fosforilación en Thr de p29 a diferentes tiempos de exposición a luz en CassKB8..	40
La fosforilación en Thr de p29 es inducida a tres longitudes de onda diferentes	41
Los tratamientos de BAPTA - AM (50 μ M) y DCMU (10 μ M) no afectan la fosforilación en treonina de p29.....	43
Una proteína similar a p29 se fosforila con estímulos de luz en al menos dos especies más de Symbiodiniaceae.....	46
p29 no forma asociaciones proteicas a través de enlaces disulfuro	47
Enriquecimiento y localización de p29.....	49
Identificación de p29 por espectrometría de masas	51
DISCUSIÓN	54
Conclusiones y perspectivas	61
Anexo 1	63
REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *S. microadriaticum* en simbiosis y vida libre

Figura 2. *S. microadriaticum* en fase vegetativa y móvil.

Figura 3. Esquema del ciclo de vida de Symbiodiniaceae regulado por periodos de luz y oscuridad.

Figura 4. Inmunodetección por western blot con anti-pThr en células de CassKB8 tiempos cortos.

Figura 5. Inmunodetección por western blot con anti-pThr en CassKB8 con estímulos lumínicos con 4 longitudes de onda diferentes.

Figura 6. Inmunodetección por western blot con anti-pThr en CassKB8 con tratamientos de BAPTA - AM (50 μ M) y DCMU (10 μ M).

Figura 7. Inmunodetección por western blot con anti-pThr en 4 especies de Symbiodiniaceae estimuladas con luz.

Figura 8. Inmunodetección por western blot con anti-pThr en CassKB8 y fracción enriquecida (F.E.) de p29 en condiciones reductoras y no reductoras.

Figura 9. Inmunodetección por western blot con anti-pThr de fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico de muestras de CassKB8 estimuladas por luz.

Figura 10. Separación por electroforesis en dos dimensiones (2D) (Isoelectroenfoque + SDS-PAGE) de la fracción enriquecida de p29.

Gráfica 1. Viabilidad celular de CassKB8 tratadas con DCMU (10 μ M).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para *PsmA*, *CutA* y *CPN21*.

RESUMEN

El estudio de los procesos celulares y moleculares de la familia Symbiodiniaceae sigue siendo limitada. La relación de estos microorganismos con su entorno marino es compleja y los factores abióticos como la luz influyen sobre su dinámica celular. La fosforilación de proteínas en la familia Symbiodiniaceae es un mecanismo fundamental para la transducción de señales que no se ha descrito a detalle, por lo que el objetivo general de esta investigación se enfocó en identificar y caracterizar a p29, una proteína que se fosforila en residuos de treonina después de un estímulo lumínico en el modelo *Symbiodinium microadriaticum* CassKB8. Los objetivos particulares incluyeron identificar parámetros críticos que afectan su fosforilación, purificar la proteína mediante electroforesis de doble dimensión para su identificación mediante espectrometría de masas, y amplificar su secuencia de nucleótidos para compararla con el genoma de *S. microadriaticum*.

Los resultados mostraron que la fosforilación de p29 ocurre rápidamente tras la exposición a luz blanca alcanzando su máximo entre 30 segundos y 5 minutos, pero disminuyendo después de 30 minutos. Por otro lado, al exponer a las células a diferentes longitudes de onda, la fosforilación de p29 disminuye hasta un 40% en comparación con exposición a luz blanca. Adicionalmente, los resultados obtenidos de tratamientos con BAPTA-AM (10 μ M) sugieren que el calcio no influye sobre la fosforilación de p29, mientras que los resultados obtenidos con los tratamientos con DCMU (10 μ M) mostraron que la fosforilación de p29 disminuye a las 12 h después del tratamiento. Se demostró que esta disminución no se debió a la muerte celular, ya que los ensayos de viabilidad mostraron que la integridad de las células no se vio comprometida después de las 12 h

de tratamiento. Los tratamientos en condiciones reductoras y no reductoras revelaron que p29 no forma complejos proteicos mediante enlaces disulfuro, ya que su migración no varió en ninguna de las condiciones evaluadas. Asimismo, se observó que una proteína similar a p29 en otras especies de *Symbiodiniaceae* también se fosforiló en respuesta a estímulo de luz. Finalmente, mediante espectrometría de masas, se identificaron 32 proteínas de las cuales tres tienen un peso molecular cercano a p29, Psma, CPN21 y CutA. Los genes de estas proteínas fueron secuenciados; sin embargo, las secuencias obtenidas no coincidieron con secuencias anotadas en el genoma de *S. microadriaticum*, aunque mostraron similitud con proteínas de organismos evolutivamente distantes.

ABSTRACT

The study of the cellular and molecular processes of the Symbiodiniaceae family remains limited. The relationship of these microorganisms with their marine environment is complex and abiotic factors such as light influence their cell dynamics. Protein phosphorylation in the Symbiodiniaceae family is a fundamental mechanism for signal transduction that has not been described in detail, so the overall objective of this research focused on identifying and characterizing p29, a protein that phosphorylates on threonine residues after a light stimulus in the *Symbiodinium microadriaticum* CassKB8 model. Objectives included identifying critical parameters affecting its phosphorylation, purifying the protein by two-dimensional electrophoresis for identification by mass spectrometry, and amplifying its nucleotide sequence for comparison with the *S. microadriaticum* genome.

The results showed that p29 phosphorylation occurs rapidly after exposure to white light reaching a maximum between 30 seconds and 5 minutes but decreasing after 30 minutes. On the other hand, when cells were exposed to different wavelengths, p29 phosphorylation decreased by up to 40% compared to white light exposure. Additionally, results obtained from BAPTA-AM (10 μ M) treatments suggest that calcium does not influence p29 phosphorylation, while results obtained from DCMU (10 μ M) treatments showed that p29 phosphorylation decreases at 12 h after treatment.

It was shown that this decrease was not due to cell death, as viability assays showed that cell integrity was not compromised after 12 h of treatment. Treatments under reducing and non-reducing conditions revealed that p29 does not form protein complexes via disulfide bonds, since its migration did not vary under any of the conditions evaluated.

Furthermore, a protein similar to p29 in other Symbiodiniaceae species was also observed to be phosphorylated in response to light stimuli. Finally, by mass spectrometry, 32 proteins were identified of which three have a molecular weight close to p29, Psma, CPN21 and CutA. The genes of these proteins were sequenced; however, the sequences obtained did not coincide with sequences annotated in the genome of *S. microadriaticum*, although they showed similarity with proteins from evolutionary distant organisms.

INTRODUCCIÓN

Symbiodinium microadriaticum cepa CassKB8 (a partir de aquí denominado CassKB8) es un dinoflagelado fotosintético de la familia Symbiodiniaceae. Esta familia se caracteriza por establecer una relación endosimbiótica mutualista con diferentes especies de invertebrados marinos, aunque también pueden vivir de forma libre (Freudenthal, 1962; Muscatine, 1971; Barneah *et al.*, 2007; Schönberg *et al.*, 2007; Thornhill *et al.*, 2013; Mies, 2019). La importancia ecológica de esta familia radica en la relación endosimbiótica con corales formadores de arrecifes, los cuales desempeñan un papel crucial como refugio para un amplio número de especies marinas (Menard *et al.*, 2012), contribuyendo así a la biodiversidad y al equilibrio del ecosistema marino (Reaka-Kudla, 1997; Porter & Tougas, 2001; Knowlton *et al.*, 2010).

La relación entre CassKB8 de vida libre y su entorno marino es compleja. Dentro de esta interacción, los ciclos de luz y oscuridad se destacan como señales ambientales fundamentales que ejercen una influencia en su dinámica celular. No obstante, son los estímulos lumínicos los que desencadenan respuestas fisiológicas y moleculares en el organismo, a través de vías de señalización.

La fosforilación de proteínas, tanto en organismos unicelulares como pluricelulares, desempeña una función central en la regulación y sostenimiento de diversos procesos biológicos. La activación de las vías de señalización, mediada por la fosforilación, ejerce una influencia en los aspectos vitales tales como el metabolismo, la proliferación, la motilidad y la diferenciación (Hunter, 2000; Plattner & Bibb, 2012), entre otros.

Además de los procesos relacionados con la fotosíntesis y el ciclo celular, existe una escasez de información detallada sobre los mecanismos de la detección de luz y sus efectos a nivel bioquímico, molecular y celular en Symbiodiniaceae. Por esta razón, la comprensión del papel regulatorio de la fosforilación comienza con la identificación y caracterización de las fosfoproteínas.

En investigaciones previas, se identificó una proteína denominada SBiP1, con un peso molecular de 75 kDa, que se fosforila en treonina. Esta proteína se encontró en tres especies de Symbiodiniaceae, y su nivel de fosforilación disminuyó después de la exposición a luz, siguiendo un periodo de oscuridad (Castillo-Medina *et al.*, 2019; Castillo Medina, 2020; Castillo-Medina *et al.*, 2022). En contraste, se observó un aumento en la fosforilación de una proteína con un peso molecular aparente de 29 kDa, que se denominó p29, en *S. microadriaticum* CassKB8, después de 30 minutos de estimulación lumínica.

Este trabajo se enfocó en la identificación y caracterización de p29, una proteína que parece ser objetivo probable de cinasas y fosfatasas. Estas enzimas, en conjunto, desempeñan un papel crucial en las vías de señalización estimuladas por luz en CassKB8, lo que permitirá comprender mejor su regulación y su importancia en el contexto de la respuesta a luz.

ANTECEDENTES

Symbiodinium microadriaticum

Symbiodinium microadriaticum cepa CassKB8, es un dinoflagelado fotosintético que pertenece a la familia Symbiodiniaceae (Freudenthal, 1962). Esta familia puede existir en simbiosis con diversos metazoos y protistas (Freudenthal, 1962; Muscatine, 1971; Pawlowski *et al.*, 2001; Barneah *et al.*, 2007; Schönberg *et al.*, 2007; Thornhill *et al.*, 2013; Mies, 2019) como quiste vegetativo, proporcionando nutrientes esenciales a cambio de un ambiente protegido para su desarrollo y, en vida libre, como una zoospora planctónica móvil (Schönberg & Trench, 1980) (Figura 1).

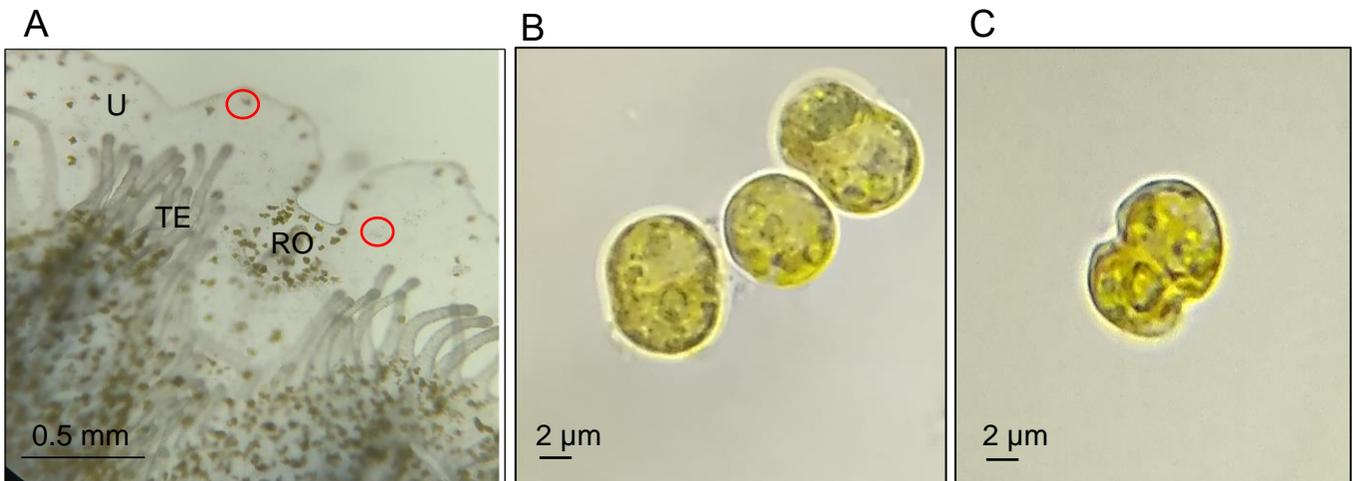


Figura 1. *S. microadriaticum* en simbiosis y vida libre. A) Imagen tomada con objetivo de 10X de *C. xamachana* en simbiosis. B) Imagen tomada con objetivo de 100X de un cultivo de CassKB8 en fase vegetativa. C) Imagen tomada con un objetivo de 100X de un cultivo de CassKB8 en fase móvil. TE (Tentáculos). U (Umbrella). RO (Ropalio). Los círculos rojos indican a CassKB8 en simbiosis. Imágenes tomadas y editadas por Viviana Urban.

Inicialmente esta especie era conocida como Zooxanthella (McLaughlin & Zahl, 1957) [zō(o)- ζῶον gr. 'ser vivo', 'animal' + xanth(o)- ξανθός gr. 'amarillo' + -ella(m) lat. 'pequeño'], no fue hasta 1962 que fue oficialmente descrita como un nuevo género y

especie (Freudenthal, 1962). A pesar de que inicialmente se referían a estos como una microalga, su taxonomía fue validada hasta el 2017 (LaJeunesse, 2017).

Debido al medio donde viven, la luz es una señal ambiental la cual desencadena una respuesta a conveniencia de la célula, como puede ser la simbiosis (Bollati *et al.*, 2022), fotosíntesis (Sorek & Levy, 2012a; 2012b; Sorek *et al.*, 2014), motilidad (Fitt *et al.*, 1981; Yacobovitch *et al.*, 2004), división celular (Fitt & Trench, 1983; Wang *et al.*, 2008), por mencionar algunos.

Morfología y ciclo de vida de Symbiodinium microadriaticum

La descripción del ciclo de vida que se presenta en este trabajo es aplicable a toda la familia Symbiodiniaceae. No obstante, la descripción morfológica se limita a CassKB8.

Morfología

S. microadriaticum exhibe dos etapas principales de vida durante su ciclo de vida: la fase no móvil, denominada vegetativa o cocoide, y la fase móvil, denominada zoospora o mastigote.

La fase vegetativa (Figura 2A) constituye la etapa predominante, caracterizada por su alta actividad metabólica y es observable tanto en la fase oscura como luminosa (Fitt & Trench, 1983). Se describe como una célula esférica a ampliamente elipsoidal, de un diámetro entre 8 – 11 μm , superficie celular lisa, pared celular continua y delgada y, de un tono ocre/verdoso (Freudenthal, 1962; Kevin *et al.*, 1969; Trench & Blank, 1987). Tiene un núcleo de 2 – 4 μm que representa aproximadamente el 10% del volumen celular, albergando 97 ± 2 cromosomas (Trench & Blank, 1987; Lajeunesse, 2017). Se observa la presencia de 3 ± 2 mitocondrias, que ocupan hasta el 2% del volumen celular

(Trench & Blank, 1987). Además, destaca la presencia de un cloroplasto multilobulado, ramificado y periférico que ocupa el 22% del volumen de la célula y presenta un arreglo tilacoidal en paralelo sin formación de granas (Freudenthal, 1962, Kevin *et al.*, 1969; Trench & Blank, 1987; LaJeunesse *et al.*, 2010). Así mismo, se identifica un pirenoide de dos tallos (Trench & Blank, 1987). Complementariamente, se distingue un cuerpo de asimilación de tonalidad naranja, junto con varias vesículas distribuidas de manera aleatoria en el citoplasma, cuya función aún se desconoce (Trench & Blank, 1987).

La fase móvil (Figura 2B) solo es observable durante la fase luminosa (Fitt & Trench, 1983). Se caracteriza por desarrollar una forma Gymnodinoide en el interior del quiste (Freudenthal, 1962), desarrollando sus flagelos, placas tecales, epicono e hipocono (Trench & Blank, 1987). Una vez liberado del quiste, su morfología externa cambia, presentando dos cuerpos, epicono e hipocono, de dimensiones casi idénticas (3 ± 0.33 y 3.31 ± 0.06 , respectivamente) (Trench & Blank, 1987), un flagelo longitudinal sin pelos flagelares, acompañado de un flagelo transversal (LaJeunesse, 2017). Faja ecuatorial sin desplazamiento ni superposición, surco recto y una ligera muesca surcal (Freudenthal, 1962). A pesar de estas transformaciones externas, los organelos internos se mantienen consistentes con los descritos en la etapa vegetativa.

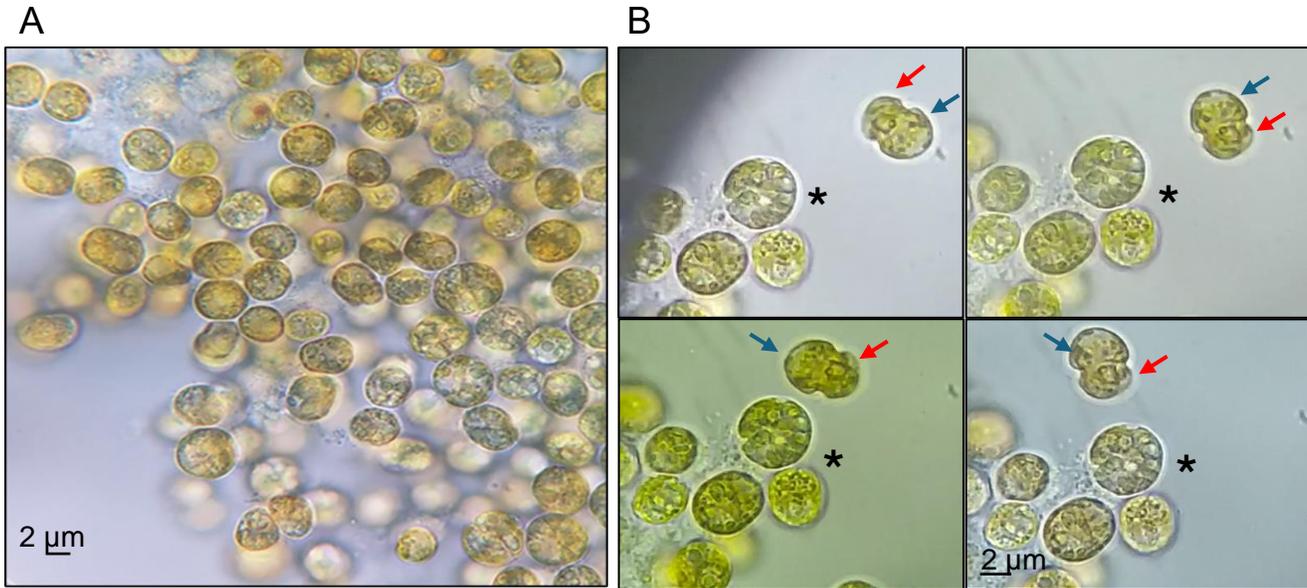


Figura 2. *S. microadriaticum* en fase vegetativa y móvil. A) Imagen tomada con objetivo de 100X de CassKB8 en diferentes estadios de la fase vegetativa. B) Imagen tomada con objetivo de 100X de un cultivo de CassKB8 en fase móvil. El asterisco señala la célula de referencia, la flecha azul señala el epicono y la roja el hipocono. Imágenes tomadas y editadas por Viviana Urban.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de Symbiodiniaceae es una secuencia de eventos en la que los periodos de luz y oscuridad son cruciales para su replicación (Yacobovitch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Este ciclo ha sido determinado a través de estudios *in vitro*, donde se han observado las células en diversos estadios, aunque algunos sean más predominantes que otros (Freudenthal, 1962; Fitt & Trench, 1983; Yacobovitch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008).

En el ciclo de vida de Symbiodiniaceae, existe una estrecha relación entre las fases del ciclo celular y los periodos de actividad celular (Figura 3). Durante la fase luminosa, la mayoría de las células son móviles (Fitt & Trench, 1983; Yacobovitch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). En esta fase, la mayoría de las células se encuentran en la

fase G1 del ciclo celular, alcanzando su máxima concentración aproximadamente cinco horas después del inicio de la fase luminosa (Wang *et al.*, 2008; Cato *et al.*, 2019; Maire *et al.*, 2021). Es importante resaltar que la motilidad solo es observable en esta fase y no se rige por un ritmo circadiano endógeno sino por un estímulo lumínico (Freudenthal, 1962; Fitt & Trench, 1983; Yacobovitch *et al.*, 2004), mientras que las otras fases del ciclo de vida pueden observarse en cualquier momento, aunque en concentraciones menores (Fitt & Trench, 1983).

En contraste, en las primeras horas de la fase oscura, se observa un cambio en la composición y morfología celular (Fitt & Trench, 1983; Yacobovitch *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). La concentración de células en fase G1 disminuye mientras comienzan a aparecer células en las fases S y G2 del ciclo celular (Cato *et al.*, 2019) como célula vegetativa. Conforme progresa la fase oscura, las células han completado la fase de mitosis y se preparan para regresar a la fase G1 del ciclo celular (Wang *et al.*, 2008; Cato *et al.*, 2019). Esta sincronización entre las fases del ciclo celular y las etapas del ciclo de vida de Symbiodiniaceae destaca la importancia de una regulación para coordinar la actividad celular con los requisitos energéticos y de crecimiento.

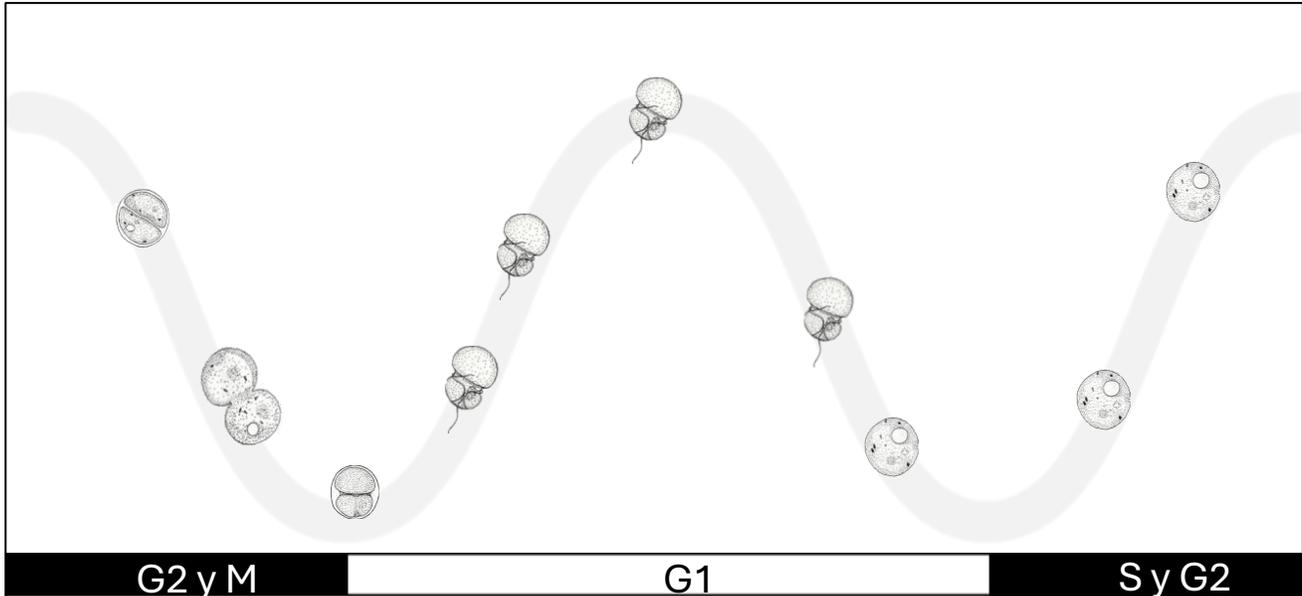


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de Symbiodiniaceae regulado por periodos de luz y oscuridad. Las barras grises indican el periodo de oscuridad. La barra blanca indica el periodo de luz. Las imágenes de los diferentes estadios fueron tomadas de (Freudenthal, 1962). Imagen por Viviana Urban.

Fotosistema de Symbiodiniaceae

El cloroplasto de los miembros de la familia *Symbiodiniaceae* presenta una estructura única y especializada. Es multilobulado, ramificado y periférico, con un arreglo tilacoidal en paralelo y sin formación de granas (Freudenthal, 1962; Kevin *et al.*, 1969; Trench & Blank, 1987; LaJeunesse *et al.*, 2010). A diferencia de las plantas, el fotosistema II de *Symbiodiniaceae* incluye una proteína de membrana *acpPC* y un complejo de proteína-clorofila denominado *PCP (Peridinin-Chlorophyll a-Protein)*, soluble en agua y con absorción en el rango de 450-550 nm. Esta adaptación mejora la eficiencia en la captura de luz en ambientes marinos profundos o sombreados (Iglesias-Prieto *et al.*, 1991; Iglesias-Prieto *et al.*, 1993; Iglesias-Prieto & Trench, 1997; Schulte *et al.*, 2010). Por otro lado, el fotosistema I está compuesto por un núcleo central y un sistema de antenas periféricas, que juntos forman un supercomplejo. El núcleo central

está compuesto por 13 subunidades y pigmentos como clorofila a, c y β -carotenos; mientras que el sistema de antenas periféricas está compuesto por 13 proteínas contiene pigmento como clorofila a y c2 y peridina (Zhao *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2024)

Vías de señalización celular

La capacidad de los organismos para percibir y responder a señales ambientales depende de la activación de vías de señalización. Estas se definen como la transducción de una señal inicial a una respuesta celular específica (Kramer, 2015). Esta transducción de la señal permite que las células detecten cambios en su entorno y respondan de manera apropiada a través de una comunicación altamente regulada, la cual permite que una red de proteínas y moléculas interactúen entre sí (P.van der Geer, 2013; Lim *et al.*, 2014).

En organismos unicelulares, como *CassKB8*, la transducción de la señal es una respuesta a las influencias del medio ambiente que les rodea (Renaud *et al.*, 2004). Las vías de señalización estimuladas por luz o cualquier otro factor, consisten en una serie de eventos concatenados, y consta de tres grandes etapas: recepción, transducción y respuesta (Lodish *et al.*, 2011). Durante la etapa de recepción, por ejemplo, la luz estimula uno o varios receptores específicos (Kim *et al.*, 2005; Rockwell *et al.*, 2006; Kodis *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018), donde la señal lumínica se convierte en una señal química. Por ejemplo, la rodopsina (un fotoreceptor presente en microalgas unicelulares relacionado con la fototaxis) cuando la parte no proteica de este receptor es estimulada por luz, la parte proteica (opsina) se estimula y sufre cambios en su estructura generando un cambio en el potencial de membrana y en la concentración

de calcio intracelular que generará una respuesta en el movimiento (Foster *et al.*, 1984). En la etapa de transducción, esta señal química genera una cascada de señalización donde las reacciones bioquímicas se amplifican a través de moléculas denominadas segundos mensajeros (Newton *et al.*, 2016; Pollard *et al.*, 2022); finalmente, en la etapa de respuesta, proteínas efectoras ejecutan acciones que pueden estar involucradas en la expresión génica, cambios en el metabolismo, división celular, cambios en la forma, movimiento, reproducción, fotosíntesis, etc. (Fitt *et al.*, 1981; Fitt *et al.*, 1983; Sorek & Levy, 2012a; 2012b; Sorek *et al.*, 2014; Rea *et al.*, 2018; Bollati *et al.*, 2022; Mantovani *et al.*, 2023).

Fosforilación, un proceso fundamental en las células

La fosforilación es un proceso bioquímico fundamental en la regulación de la actividad celular y, se define como la adición de un grupo fosfato (PO_3^-) a una molécula (Berg *et al.*, 2007). Este fenómeno, junto con su contraparte, la desfosforilación, son clave en los campos de la bioquímica y la biología molecular (Lodish *et al.*, 2011; Schulze, 2015; Wu, 2021), desempeñando un papel crucial en diversos procesos celulares. Entre ellos, destacan su participación en el metabolismo de la glucosa, el almacenamiento y liberación de energía, así como en la regulación de la actividad de proteínas (Lodish *et al.*, 2011; Montes *et al.*, 2018).

Fosforilación de proteínas

Después de su síntesis en el ribosoma, las proteínas experimentan modificaciones químicas que pueden alterar su actividad, vida media o localización celular (Matte *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 2011). Este proceso, desencadenado por señales celulares (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, etc.) y ambientales (luz,

temperatura, nutrientes, pH, etc.) (Plattner & Bibb, 2012), se conoce como modificación postraducciona (PTM, por sus siglas en inglés).

Una de las PTM es la adición de un grupo fosfato (PO_3^-) a una proteína, un mecanismo conservado evolutivamente (Bradley, 2022) que desempeña un papel crucial en la mayoría de los procesos celulares. Este proceso, es esencial para regular una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la transducción de señales, la regulación del ciclo celular y la modulación de la actividad enzimática, entre otros aspectos para el funcionamiento celular (Hunter, 2000; Plattner, 2012). Sin embargo, la adición y sustracción del grupo fosfato no ocurre de manera espontánea; requiere la acción de cinasas y fosfatasas, respectivamente.

Cinasas y fosfatasas

Las cinasas son enzimas pertenecientes a la familia de las fosfotransferasas, que poseen la capacidad de añadir un grupo fosfato (obtenido del ATP o GTP) a residuos de aminoácidos blanco mediante un enlace covalente con el grupo hidroxilo (OH^-) de aminoácidos específicos. Entre los aminoácidos fosforilados en organismos eucariotas se encuentran la serina (Ser), Tirosina (Tyr) y Treonina (Thr).

La fosforilación de la proteína blanco tendrá un cambio conformacional, generando su activación o inactivación (Matte *et al.*, 1998). Es una reacción endergónica y puede ser reversible mediante la hidrolisis de este enlace, con la ayuda de otras enzimas llamadas fosfatasas (Nestler & Greengard, 1999).

Finalmente, las cinasas están reguladas por fosfatasas. Su función consiste en revertir la fosforilación mediante la sustracción del grupo fosfato. Esta reacción se lleva a cabo rompiendo el enlace del grupo fosfato con el grupo hidroxilo del aminoácido

fosforilado. El producto de esta reacción es un ion fosfato y la proteína desfosforilada, regresando a su estado “natural” (Li *et al.*, 2013).

Además de los procesos involucrados en la fotosíntesis y el ciclo de vida, existe poca información detallada sobre los mecanismos de detección de luz y sus consecuencias a nivel celular en Symbiodiniaceae; por ello, la comprensión del papel regulador que desempeña la fosforilación comienza con el descubrimiento y la identificación de las fosfoproteínas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar e identificar a una proteína de 29 kDa de *S. microadriaticum* CassKB8 que se fosforila en residuos de treonina en respuesta a luz y encontrar información que nos permita sugerir qué papel juega a nivel celular en las vías de fototransducción.

Objetivos particulares

1. Identificar parámetros críticos de la fisiología de Symbiodiniaceae que afectan la fosforilación en treonina de p29 después del estímulo lumínico, con un anticuerpo comercial anti-fosfotreonina.
2. Purificar a la proteína en geles de doble dimensión para identificarla por secuenciación *de novo* de sus péptidos.
3. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar su ORF y obtener su secuencia de nucleótidos a fin de compararla con la anotación en el genoma de *S. microadriaticum* CassKB8.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué papel juega esta proteína y en qué proceso celular de la fototransducción estará involucrada en *S. microadriaticum* CassKB8 cuando entra a su fase de luz?

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cultivos de 6 a 12 días de células de *S. microadriaticum* CassKB8 originalmente aislado de la medusa simbiótica *Cassiopea xamachana*.

Las células se mantuvieron en medio ASP - 8A (427.7 mM NaCl, 9.38 mM KCl, 36.5 mM MgSO₄•7H₂O, 74.8 mM CaCl₂•2H₂O, 580 μM NaNO₃, 73.48 μM KH₂PO₄, 156 μM ácido nitrilotriacético [NTA], 8.5 mM Tris-base, 12.8 μM NH₂NO₃, pH 8.5) con fotoperiodos de 12 h/12 h, con una intensidad de luz de 80 - 120 μmol fotón m⁻² s⁻¹ a una de temperatura entre 25 - 26°C.

Tratamientos físicos

Un día antes de realizar los experimentos se prepararon alícuotas de las líneas celulares con una concentración de 5 - 8 x 10⁵ células por mililitro (cél/ml) y se suspendieron en medio ASP - 8A nuevo. Cada alícuota se cubrió con papel aluminio y se guardaron en una bolsa negra tipo ziploc para evitar la entrada de luz. Al día siguiente se realizó el tratamiento lumínico.

Para el control de oscuridad el tubo cubierto con aluminio se centrifugó directamente a 2,600 x g por 30 s y después se siguió el protocolo de extracción de proteína.

Tratamiento de tiempos cortos de luz

Se homogenizaron las alícuotas mediante agitación vigorosa para evitar que unas células sombrearan a otras y asegurar que las células estuvieran recibiendo el estímulo de luz de manera uniforme. Se retiró el papel aluminio y el tubo se colocó en la lámpara

de luz blanca durante intervalos de 30 s, 1, 5 o 30 min con agitación leve manual; el tiempo se controló usando un temporizador programable digital de 12 VDC. Una vez terminado el estímulo las células se centrifugaron a 2,600 x g durante 30 s y después se siguió el protocolo de extracción de proteína.

Tratamientos de luz (blanca, azul, roja y amarilla)

Se homogenizaron las alícuotas mediante agitación vigorosa para evitar que unas células sombrearan a otras y asegurar que las células estuvieran recibiendo el estímulo de luz de manera uniforme. Se retiró el papel aluminio y el tubo se colocó en la lámpara designada para cada longitud de onda durante 5 min con agitación leve manual (se usaron 2 módulos Backlight de 3 leds SMD 2835 de la marca siLED de cada longitud de onda, (ROJO (600 - 650 nm), AZUL (450 - 460 nm) Y AMARILLO (550 - 600 nm)). Una vez terminado el estímulo las células se centrifugaron a 2,600 x g durante 30 s y después se siguió el protocolo de extracción de proteína.

Tratamientos químicos

Un día antes de realizar el experimento se hicieron alícuotas de las líneas celulares con una concentración de $5 - 8 \times 10^5$ cél/ml y se resuspendieron en PBS. Cada alícuota se cubrió con papel aluminio y se guardaron en una bolsa negra tipo ziploc para evitar que entrara la luz. Al día siguiente se realizó el tratamiento lumínico.

Para el control de oscuridad el tubo cubierto con aluminio se centrifugó directamente a 2,600 x g por 30 s y después se siguió el protocolo de extracción de proteína.

Tratamiento con BAPTA - AM

BAPTA - AM es un quelante selectivo de Ca^{2+} permeable a la membrana. Con el fin de determinar si el Ca^{2+} es parte de la vía de señalización que fosforila p29 se hicieron tratamientos de 50 μM BAPTA - AM durante 2 y 12 h, antes del estímulo lumínico. Después del periodo de incubación se dio el tratamiento de luz durante 1 min, como se explica arriba.

Tratamiento con DCMU

DCMU bloquea el sitio de unión de la plastoquinona del fotosistema II interrumpiendo el paso de electrones del fotosistema II al fotosistema I, por lo que disminuye la producción de ATP y NADPH. Con el fin de determinar si la fosforilación de p29 es afectada por el bloqueo del paso de electrones se hicieron tratamientos de 10 μM DCMU durante 2 y 12 h, antes del estímulo lumínico. Después del periodo de incubación se dio el tratamiento de luz durante 1 min, como se explica arriba.

Ensayo de viabilidad

Un día antes de realizar el experimento se hicieron alícuotas de las líneas celulares con una concentración de $5 - 8 \times 10^5$ cél/ml y se resuspendieron en PBS. Cada alícuota se le dio el tratamiento con BAPTA – AM (50 μM) y DCMU (10 μM) como se describe arriba. Al día siguiente se realizó la tinción de las células como se describe en Morera & Villanueva (2009) y se realizó el conteo de células vivas y muertas.

Extracción de proteína

Después de centrifugar las células, la pastilla se resuspendió en 300 μl de buffer Laemmli 1X (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% (p/v) dodecilsulfato sódico, 10% (v/v) glicerol, 3% (v/v) β -mercaptoetanol, 0.02% de azul de bromofenol) y se colocaron en viales con

250 µl de perlas de vidrio (465 - 600 µm de diámetro). Posteriormente, se lisaron las células mediante agitación vigorosa y constante en un MINI-BEAD BEATER a 14,000 rpm durante 3 min. El lisado se colocó en un baño maría a 95°C durante 5 min y finalmente se centrifugaron a 14,000 x g durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante, se etiquetó y se almacenó inmediatamente a 4°C. El sobrenadante se usó posteriormente para separar las proteínas por su peso molecular bajo la influencia de un campo eléctrico (SDS-PAGE) y la posterior identificación de la proteína fosforilada (western blot).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Los extractos de proteínas se separaron en geles desnaturalizantes discontinuos (Laemmli, 1970), de 10 o 12 % de acrilamida, en la zona de separación [375 mM Tris-HCl, pH 8.8; 12 % (p/v) acrilamida/bis-acrilamida; 0.1 % (p/v) SDS; 0.1 % (p/v) persulfato de amonio (APS); 0.106 % (v/v) N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)], y de 4 % de acrilamida en la zona de apilamiento [125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4 % (p/v) acrilamida/bisacrilamida; 0.1 % (p/v) SDS; 0.1 % (p/v) APS; 0.066 % (v/v) TEMED]. Para la separación se utilizó un buffer de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS, pH 8.3). Las muestras de proteínas y el marcador de peso molecular se cargaron en los pozos del gel y se corrieron a 100 V, 12 mA y 35 min en la zona de apilamiento y 150 V, 20 mA y 3h en la zona de separación. Las corridas se detuvieron antes de que el colorante indicador del frente de proteínas saliera del gel. Las proteínas del gel se tiñeron con azul de coomassie, o se electrotransferieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para analizarse por western blot.

Electrotransferencia de proteínas

Las proteínas que se separaron por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF. Es una electro-transferencia húmeda, en donde el gel se colocó sobre la membrana de PVDF, reconstituida previamente en etanol 70 % e hidratada en buffer de transferencia gentil con el medio ambiente (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 10 % isopropanol, pH 8.3; Villanueva, 2008), con papeles filtros y esponjas tanto debajo de la membrana como encima del gel; posteriormente, se ensambló en el módulo de transferencia húmeda y se le aplicó una corriente de 350 mA durante 60 min.

Western blot

Las membranas de PVDF con las proteínas electrotransferidas se incubaron en una solución de 5 % (p/v) albúmina de suero de bovino en buffer de TBS (20 mM Tris-base, 150 mM NaCl, pH 7.5) durante 1 h a 4°C y agitación constante con la finalidad de bloquear los espacios vacíos y sitios inespecíficos en la membrana.

Las diluciones de los anticuerpos usados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios: fosfotreonina (anti-pThr) de Cayman Chemical Company, 1:10,000 y Abcam 1:500.

Anticuerpo secundario: Anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Termofisher) 1:2,500

Posterior al bloqueo, las membranas se lavaron con T-TBS (0.01% Tritón X-100 en TBS) y se incubaron con los anticuerpos primarios con las diluciones adecuadas en T-TBS según cada caso, durante toda la noche con agitación constante a 4°C.

Después se hicieron cinco lavados en T-TBS, 5 min cada uno con agitación constante. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios asociados a fosfatasa alcalina (anti-conejo), durante 2 h en agitación constante y a temperatura

ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces con T-TBS + inhibidores de fosfatasas y tres veces con T-TBS durante 5 min cada uno en agitación constante. Finalmente, se revelaron con soluciones comerciales de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) disueltas de acuerdo con el fabricante (Promega; Madison, WI) en buffer alcalino (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9).

Cromatografía de intercambio iónico

Se prepararon alícuotas de células de CassKB8 de 6 - 12 días de cultivo con una concentración de $5 - 8 \times 10^5$ cél/ml en un volumen final de 35 ml de medio ASP - 8A y se taparon con papel aluminio. Después de su periodo de oscuridad las células se disgregaron con ayuda del vórtex, y se realizó el tratamiento de luz en agitación constante durante 5 min, enseguida, se precipitaron las células por centrifugación a $2,600 \times g$ por 30 s. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió de 5 ml de buffer de lisis (PBS: 2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, 136.9 mM NaCl, pH 7.5; inhibidores de fosfatasas: 0.2 mM NaVO₃, 10 mM NaPPI; e inhibidores de proteasas: Complete® Roche Basel, Suiza) a 4°C. Las células se lisaron pasándolas 3 veces por la prensa French (SML- AMINCO French® pressure cell press) a 20,000 psi (libra por pulgada cuadrada), todo a 4°C. El lisado total se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante.

Cromatografía en una matriz de DEAE-SEPHACEL

Todo el ensayo se realizó a 4 °C. El sobrenadante obtenido se diluyó 7 veces con PB (2.79 mM NaH₂PO₄, 7.197 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) para obtener una concentración final de 0.02 mM de NaCl. Se preparó la columna Poly-prep® Chromatography Columns de Bio-Rad con 1 - 1.8 ml de matriz DEAE-SEPHACEL y se dejó asentar 10 min.

Posteriormente se lavó con 20 ml de NaCl a 0.02 mM en PB con un flujo de 22 ml/h impulsada con una bomba peristáltica (Pump-1 Pharmacia Biotech). Después se pasó la muestra diluida 7 veces (7X) por la columna a un flujo de 22 ml/h y el eluido se recuperó en un solo volumen. Para eliminar las proteínas que no se unieron a la matriz, la columna se lavó con 20 ml de NaCl a 0.02 mM en PB a un flujo de 22 ml/h y se recuperó en un solo volumen para su análisis posterior. Finalmente se realizó la elución con un gradiente de NaCl (0.02 mM - 0.3 M) en PB con un volumen final de 20 ml a flujo constante de 22 ml/h, y el eluido se recuperó en 20 fracciones de 1 ml.

Cada una de las fracciones se corrió por SDS-PAGE y posteriormente se realizó un western blot con anti-pThr (para saber en qué fracción se encuentra p29) como se describe arriba.

Enriquecimiento de p29

Con el fin de enriquecer p29 de las fracciones de la cromatografía, se usaron tubos de ultrafiltración de corte de 10 kDa. Se centrifugaron a 7,500 x g en periodos de 5 min, hasta obtener un volumen final de 400 a 500 µl.

Separación de p29 por punto isoeléctrico y peso molecular

Precipitación de proteína

Para separar p29 por punto isoeléctrico primero se eliminaron las sales de la muestra ya que las sales que provienen del organismo o de los buffers, pueden interferir en la correcta separación de proteínas mediante esta técnica. Por ello, los extractos enriquecidos de p29 se precipitaron con el kit Cleanup ReadyPrep® 2D (BioRad), según la metodología del fabricante. El precipitado de proteínas se suspendió en buffer de rehidratación [8 M urea, 2 % (p/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.2 % (v/v) anfolitos 3/10

BioLite® de BioRad y trazas de azul de bromofenol]. Las tiras IPG (gradiente de pH inmovilizado) fueron incubadas con el buffer de rehidratación que ya contiene la muestra. El volumen utilizado depende de la longitud de la tira IPG, 125 µl para tiras de 7cm y 300 µl para las de 17cm.

Isoelectroenfoque

Se utilizaron tiras IPG ReadyStrip® pH 4 - 7 (BioRad) de 7 y 17 cm. Las tiras se incubaron con la muestra en buffer de rehidratación a temperatura ambiente por 1 h en agitación constante; después la tira se cubrió con aceite mineral y se continuó incubando, pero a 18°C al menos durante 16 h en agitación constante. Después de la incubación, las tiras se colocaron en una PROTEAN i12 IEF cell® (BioRad), a una corriente programada de 250 V por 20 min, con un incremento gradual hasta 4,000 V por 2 h y a 4,000 V hasta cubrir 10,000 V-h, para la tira de 7 cm y 40,000 V-h, para la tira de 17 cm. Este paso es para que las proteínas se separen por punto isoeléctrico.

A continuación, para desnaturalizar las proteínas, la tira IPG se equilibró primero en 2 ml de Buffer I® (6 M urea, 2 % (p/v) SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 20 % (v/v) glicerol y 2 % (p/v) DTT; BioRad) por 15 min a temperatura ambiente y agitación constante y, después en Buffer II® (buffer I adicionado con 2.5 % (p/v) iodoacetamida; BioRad) durante 15 min en un volumen de 2 ml a temperatura ambiente y agitación constante. La tira se enjuagó brevemente en buffer de corrida y se cargaron sobre un gel de SDS-PAGE de 10 % o 12 % de acrilamida para continuar con la separación de las proteínas por peso molecular. Las proteínas del gel se tiñeron o se transfirieron a una membrana de PVDF para analizarlas por western blot con el anticuerpo Anti-pThr.

Secuenciación de aminoácidos de p29 por LC/MS/MS

Procesamiento de la muestra

Una vez identificado el punto fosforilado, se cortaron los puntos correspondientes de cinco geles teñidos. Las muestras fueron procesadas por el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM de la siguiente manera: Reducidas con Dithiothreitol (No. Catálogo D5545 Sigma-Aldrich), alquiladas con iodoacetamida (No. Catálogo I6125, Sigma-Aldrich) y digerida “*in gel*” con tripsina (No. Catálogo V5280, Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). En la digestión fue utilizada una solución de 25 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) e incubada por 18 h a 37°C. Los péptidos resultantes fueron desalados con Zip-Tips con 0.6 µL de resina de C18 (ZTC18S096 - Merck Millipore).

Espectrometría de masas (LS-MS/MS)

El análisis de la composición de las muestras fue realizado por una cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LS-MS/MS) en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM con un Orbitrap Velos Thermo Scientific y un 2-Ultimate UHPLC Thermo Scientific.

Análisis de secuencias

Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas por el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM con el programa Proteome Discoverer 1.4.1.14 (identidad de proteínas con motor de búsqueda Sequest HT) y - Scaffold 5.1.2 (visualizador de resultados).

Amplificación por PCR, clonación y secuenciación de Psma, CPN21 y CutA

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN es susceptible a ser degradado por ARNasa, por lo que todo el material que se usó durante la extracción de ARN fue tratado con Dietilpirocarbonato (DEPC), el cual funciona como un inhibidor de la actividad de las ARNasas.

Para extraer ARN de CassKB8 se concentraron por centrifugación 500 ml de cultivo celular de 7 - 12 días a 2,600 x g durante 30 s. El precipitado total se transfirió a un vial con perlas de vidrio tratadas con DEPC y se resuspendió en 1 ml de una mezcla fenol ácido: buffer de extracción (100 mM de LiCl, 1 % de SDS, 100 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8) a 95 °C y 1 µl de RNase OUT. Las células se rompieron mediante agitación vigorosa y constante en un MINI-BEAD BEATER a 14,000 rpm durante 3 min. El tubo se incubó 2 min más a 95 °C y se centrifugó a 12,000 x g por 25 min a 4°C. Se recuperó la fase superior acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, teniendo cuidado de no tocar la interfase, y se lavó/precipitó con 1 ml de cloroformo frío, se agitó durante 30 s y, se volvió a centrifugar a 12,000 x g por 20 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se volvió a lavar con cloroformo frío. Después del segundo lavado/precipitado con cloroformo se recuperó la fase acuosa y se añadió 1/3 del volumen de LiCl 8M, se mezcló y se dejó precipitar el RNA a 4°C durante 24 h.

Al día siguiente se centrifugó a 12,000 x g por 25 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con etanol frío al 75% centrifugando a 12,000 x g por 5 min a 4°C en cada lavado, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 µl de acetato de sodio 0.3 M pH 5.2 y se añadieron 750 µl de etanol absoluto frío, se mezcló y se dejó precipitar a -20°C durante 2 h. La muestra se centrifugó

a 12,000 x g por 25 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y se lavó la pastilla dos veces con etanol frío al 75%, centrifugando a 12,000 x g por 5 min a 4°C en cada lavado. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 90 µl de buffer TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA).

Se cuantificó el ARN a 260/280 con un Eppendorf BioSpectrometer® basic

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT - PCR (Invitrogen, CA). Se sintetizaron 4 reacciones en un Eppendorf® Mastercycler® Nexus Thermal Cyclers. Se utilizaron 3 µg de ARN, 1 µl de oligo(dT), 1 µl de dNTP mix y el volumen suficiente de agua tratada con DEPC para aforar a 10 µl, la reacción se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente se colocó a 4°C al menos 1 min. Después a cada reacción se le añadió una mezcla de 1X de RT - buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 µl de RNase OUT (40 U/µl) y 1 µl de SuperScript® III RT (200 U/µl), se mezcló bien y se incubó de la siguiente manera en el termociclador: 25°C 10 min, 50°C 90 min, 85°C 5 min. Terminado este periodo las reacciones se guardaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente a cada reacción se le añadió 1 µl de RNase H y se incubaron a 37°C por 20 min. Finalmente se guardaron a -10°C hasta su uso.

Diseño de oligonucleótidos

Para realizar las amplificaciones de las secuencias de *CPN21*, *PsmA* y *CutA*, se diseñaron oligonucleótidos en Forward (FW) y Reverse (RV) en sentido 5'→3' (Tabla 1) de acuerdo con la base de datos NCBI y reefgenomics.com de los genes de estas 3 proteínas en OligoAnalyzer. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Se realizaron PCR para amplificar las secuencias de los genes de interés en un Eppendorf® Mastercycler® Nexus Thermal Cyclers.

Cada reacción contenía 1X de Dream Taq Buffer PCR (2 mM de MgCl₂), 0.2 mM de dNTP's, 0.2 µM de oligoReverse, 0.2 µM de oligoForward (u oligo DINOSL), 1.25 U/50 µl de DreamTaq, y ADNc, el volumen final dependió de cada experimento.

El programa para realizar la PCR fue de la siguiente manera, la única temperatura que se fue variando, dependiendo del experimento fue la T_m.

Primer paso	95 °C	3 min
Segundo paso (39 ciclos)	95 °C	30 s
	T _m 54 - 58°C	30 s
	72 °C	1 min
Tercer paso	72 °C	5 min

Los productos de PCR fueron analizados en geles de 1% de agarosa en 1X TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético) a 100 V, 85 mA durante 35 min. Se cortaron las bandas correspondientes del gel y se mantuvieron congeladas para su uso posterior.

Purificación de productos de PCR de *Psma*, *CPN21* y *CutA*

Los productos de PCR se purificaron de la agarosa con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo la metodología del proveedor. Se guardaron a 4°C hasta su uso posterior.

Clonación de *PsmA*, *CPN21* y *CutA* en el vector pGEM® T-easy.

La clonación de los productos de PCR purificados se insertó en el vector pGEM®T-easy, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se guardaron las muestras durante toda noche a 4°C.

Transformación de las clonas de *PsmA*, *CPN21* y *CutA* en *E. coli* DH5α

Una vez que se obtuvieron las clonas de interés, las células de *E. coli* DH5α se dejaron descongelar en frío (4°C) y después, en condiciones estériles se añadió el volumen de las reacciones de ligación a cada tubo con bacterias y se dejó incubar 15 min en hielo. Después se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 1 min y en seguida se pasaron a 4°C, se añadieron 900 µl de medio cultivo líquido LB (1% de bacto-triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 0.171 M de NaCl, pH 7.5) y se incubaron 1 h a 37°C con agitación constante. Una vez que las bacterias se recuperaron, se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo sólido LB (1% de bacto-triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 0.171 M de NaCl, 1.5 % de agar, pH 7.5) adicionado con X-Gal, IPTG y 100 µg/ml ampicilina; una vez realizada la siembra las cajas se cubrieron con aluminio y se dejaron incubar toda noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron 10 colonias de bacterias blancas, ya que las colonias azules son aquellas colonias donde el marco de lectura de la galactosidasa no se modificó; es decir, el amplicón no se insertó correctamente y por lo tanto se expresó la galactosidasa y se observa de color azul. Se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo sólido LB con ampicilina de manera estriada. Se cubrieron con aluminio y se dejaron incubando toda la noche a 37°C.

PCR en colonia

Para determinar si el vector pGEM®T-easy contiene el producto de PCR purificado y si las bacterias lograron introducir dicho vector, se realizó una PCR en colonia. Se amplificaron las secuencias de los genes de interés en un Eppendorf® Mastercycler® Nexus Thermal Cyclers.

Cada reacción contenía 1X de Dream Taq Buffer PCR (2 mM de MgCl₂), 0.2 mM de dNTP's, 0.2 µM de oligoReverse, 0.2 µM de oligo Forward, 1.25 U/50 µl de DreamTaq, y como templado se seleccionaron 5 colonias al azar, el volumen final de la reacción fue de 15 µl.

El programa para realizar la PCR fue de la siguiente manera:

Primer paso	98 °C	3 min
Segundo paso (39 ciclos)	95 °C	30 s
	56 °C	30 s
	72 °C	1 min
Tercer paso	72 °C	5 min

Los productos de la PCR fueron analizados en geles de 1% de agarosa en 1X TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético) a 100 V, 85 mA durante 35 min.

Propagación de plásmidos

Las colonias que amplificaron positivamente se seleccionaron y, en condiciones estériles se propagaron en 10 ml medio de cultivo líquido LB suplementado con ampicilina en tubos de vidrio durante toda la noche a 37°C en agitación vigorosa (200 rpm).

Purificación de plásmidos de *PsmA*, *CPN21* y *CutA*

Para la purificación del plásmido se utilizó el miniprep GeneJet plasmid kit de Thermo Scientific™, siguiendo las instrucciones del proveedor. Los eluidos finales se guardaron a -10°C hasta su uso posterior.

Cuantificación y secuenciación de los plásmidos de *Psma*, *CPN21* y *CutA*

Los purificados se cuantificaron en un Eppendorf BioSpectrometer® basic, se prepararon las muestras con sus oligonucleótidos correspondientes y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Análisis de secuencias de nucleótidos

Las herramientas utilizadas para realizar el análisis de las secuencias fueron las siguientes:

- Multalin (Corpet, 1988)
- NCBI (GCA_905221625.1)
- Reefgenomics (*Symbiodinium microadriaticum* gene models (Aranda *et al.*, 2016) y *Symbiodinium microadriaticum* genome (Aranda *et al.*, 2016)).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para *Psma*, *CutA* y *CPN21*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
SmicPsmaFW	atg gca ttt cgg gag gcc aag cgg
SmicPsmaFW2	gtg act tct ccg ctg gtg gat c
SmicPsmaRV1	tca gtc ctc tgc tga gga gga gtg
SmicPsmaRV2	ctt tcc agt gga cgt tgg aac cac
SmicCutAFW	atg gta atc aaa acg atg aag atg
SmicCutAFW1	acg gca ggg cag acg ctg gaa gaa gc
SmicCutARV	cta cag ctc tcc ggc atg tga ccg aat
SmicCPN21FW	atg ttg cgg cta gca caa ctg tgc
SmicCPN21FW2	gct ctg act tca gga ccg atc agc
SmicCPN21RV1	tta gga ctt cca ctt cgc cag gca ctc
SmicCPN21RV2	acg aac agt gtc tcc gac agc gag gtc c

RESULTADOS

Fosforilación en Thr de p29 a diferentes tiempos de exposición a luz en CassKB8

Con el objetivo de determinar el tiempo de respuesta de la fosforilación en treonina de p29, se expusieron células de CassKB8 a luz por diferentes tiempos (30 s, 1, 5 y 30 min), y se analizaron las proteínas fosforiladas por western blot (WB) con anticuerpos anti-pThr. Los resultados revelaron que la fosforilación de p29 en treonina ocurrió en un periodo relativamente rápido después del estímulo de luz (Figura 4A, carril 30 s), comparado con el control de oscuridad (Figura 4A, carril Osc). Interesantemente, después de 30 min de exposición de CassKB8 a la luz ya no se detectó a p29 fosforilada (Figura 4A, carril 30 min). Las bandas correspondientes a p29 fosforiladas fueron cuantificadas por densitometría y graficadas en función del tiempo; a pesar de no estar normalizada, la gráfica mostró una tendencia de aumento en la fosforilación en Thr de p29 entre 30 s y 5 min (Figura 4B, barras 30 s y 5 min). De igual manera, la gráfica mostró la tendencia de disminución en la fosforilación de p29 después de 30 min de exposición a la luz (Figura 4B, barra 30 min). Se incluyó un control positivo que consistió en células expuestas a la luz por 5 min debido a que bajo esas condiciones se observó previamente a p29 claramente fosforilada en Thr (Figura 4A, carril Luz; Figura 4B, barra Luz). En efecto, las bandas correspondientes a p29 fosforilada en Thr fueron similares en intensidad tanto en el control positivo como en la exposición a luz después de 5 min (Figura 4A, carriles Luz y 5 min); consistente con lo anterior, las barras de la gráfica de densitometría mostraron niveles similares para las mismas muestras (Figura 4B, barras Luz y 5 min).

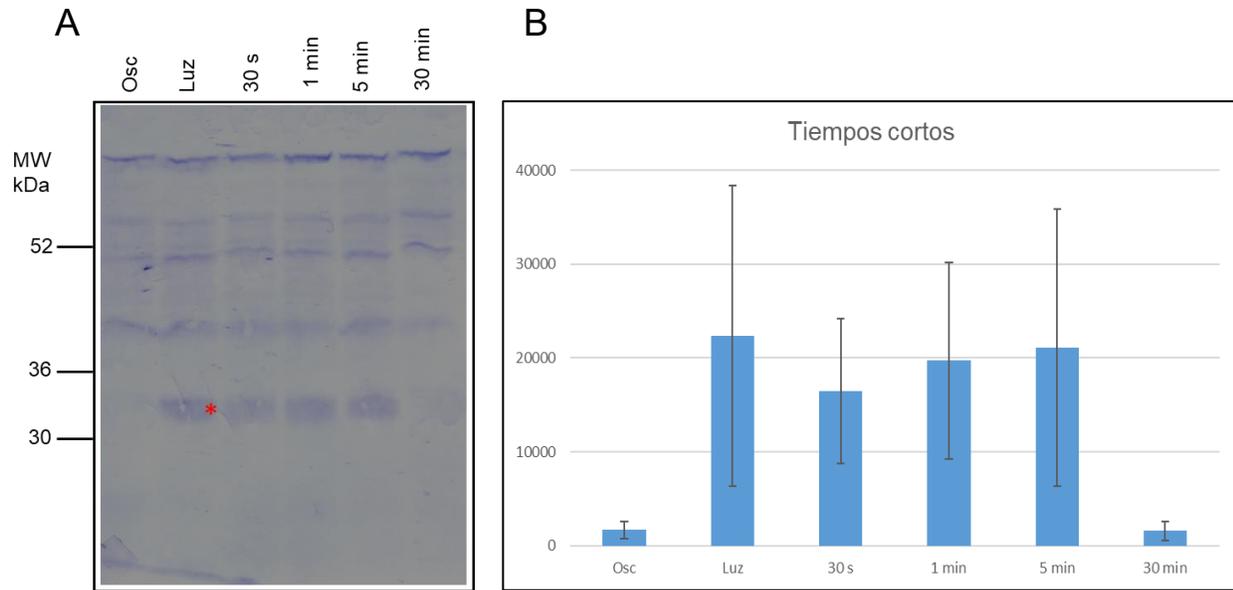


Figura 4. Exposición de CassKB8 a tiempos cortos de luz. A) Inmunodetección por WB con anti-pThr en células de CassKB8 estimuladas con luz blanca ($80 - 120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por .5 (30 s), 1 (1 min), 5 (5 min), y 30 (30 min) min; se incluyó un control de células CassKB8 incubadas en oscuridad por 12 h (Osc) y uno de luz con células expuestas por 5 min al estímulo de luz (Luz). B) Densitometría (promedio de $n=3$) de las bandas de p29 detectadas por WB correspondientes a los tratamientos, mediante el programa ImageJ. Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el asterisco rojo indica la posición de p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.

La fosforilación en Thr de p29 es inducida a tres longitudes de onda diferentes

Con el fin de conocer si la fosforilación de p29 depende de una longitud de onda electromagnética (λ) específica, células de CassKB8 fueron estimuladas con luz blanca (control positivo), y 3 λ que abarcan diferentes rangos del espectro visible: 450 - 460 nm (luz azul), 550 - 600 nm (luz amarilla) y 600 - 650 nm (luz roja). Se observó que la fosforilación en treonina de p29 ocurrió cuando las células fueron estimuladas con las tres λ seleccionadas. (Figura 5A, carriles Luz Az, Luz Am, Luz R, respectivamente), comparado con el control de oscuridad (Figura 5A, carril Osc). La respuesta de fosforilación de p29 fue similar a la observada en el tratamiento con luz blanca por 5 min (Figura 5A, carril Luz B). Las bandas correspondientes a p29 fosforiladas fueron

cuantificadas por densitometría y graficadas en función de la longitud de onda; a pesar de no estar normalizada, la gráfica mostró una tendencia hacia la disminución en la fosforilación en Thr en p29 para las tres longitudes de onda (Figura 5B, barras Luz Az, Luz Am y Luz R). Consistente con lo anterior, el nivel de fosforilación en células de CassKB8 estimuladas con luz blanca fue mayor (Figura 5B, barra Luz B), comparado con el de las células incubadas por 12 h en oscuridad (Figura 5A, carril Osc; Figura 5B, barra Osc).

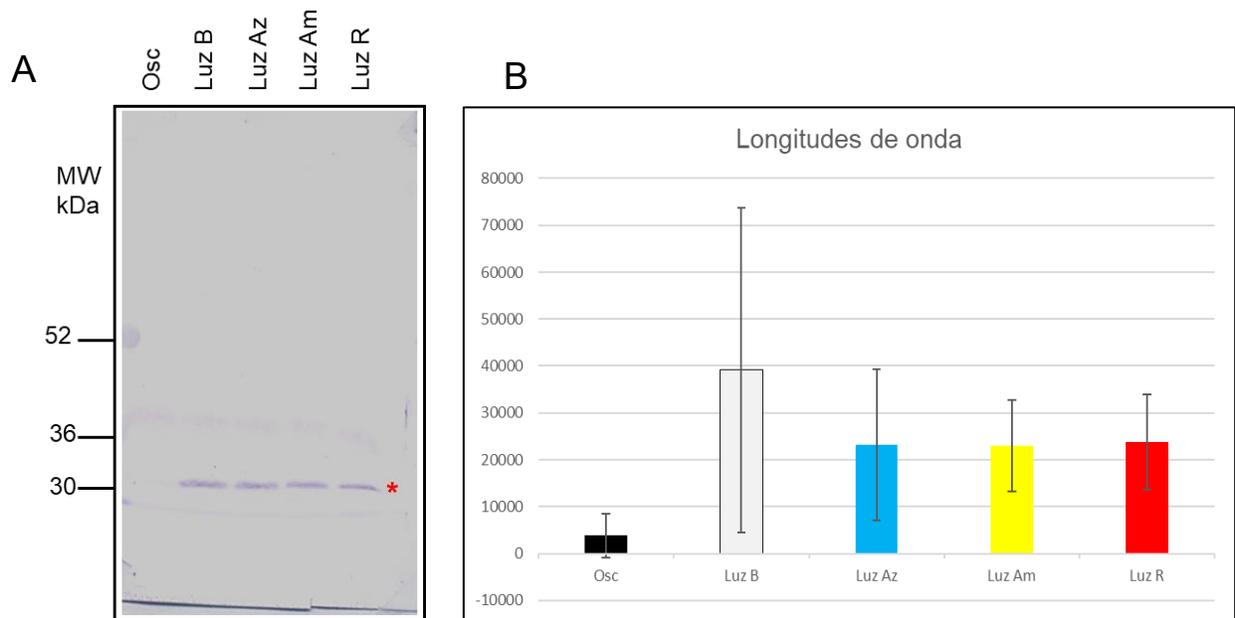


Figura 5. Exposición de CassKB8 a 3 longitudes de onda. A) Inmunodetección por WB con anti-pThr en CassKB8 estimuladas con luz azul a $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz Az), luz amarilla a $120 - 145 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz Am) y luz roja a $39 - 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz R); se incluyó un control de células CassKB8 incubadas en oscuridad por 12 h (Osc) y uno de luz con células expuestas por 5 min al estímulo de luz blanca de $80 - 120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz B). B) Densitometría (promedio de $n=3$) de las bandas de p29 detectadas por WB correspondientes a los tratamientos, mediante el programa de ImageJ. Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el asterisco rojo indica la posición de p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.

Los tratamientos de BAPTA - AM (50 μ M) y DCMU (10 μ M) no afectan la fosforilación en treonina de p29

Con el fin de conocer si en la vía de señalización en la que p29 es fosforilada, el calcio actúa como segundo mensajero, células de CassKB8 fueron tratadas con 50 μ M BAPTA - AM, un agente quelante selectivo a Ca^{2+} que tiene la propiedad de ser permeable a las membranas celulares. Se observó que en las células incubadas durante 2 y 12 h con BAPTA – AM, los anticuerpos anti-pThr detectaron a p29 fosforilada después del estímulo lumínico (Figura 6, carriles BAPTA 2 h y BAPTA 12 h respectivamente), mientras que las células tratadas durante 12 h con BAPTA - AM sin estímulo de luz no se detectó fosforilación (Figura 6, carril BAPTA). Adicionalmente, para conocer si la inhibición de la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis tiene efectos sobre la fosforilación de p29, se hicieron incubaciones en presencia de 10 μ M DCMU (inhibidor del paso de electrones desde la plastoquinona al citocromo) en células de CassKB8. Similar a lo que ocurrió en las células tratadas con BAPTA – AM, se observó a p29 fosforilada en Thr en las células incubadas durante 2 h con DCMU después del estímulo de luz (Figura 6, carril DCMU 2 h). Sin embargo, en las células incubadas durante 12 h con DCMU después del estímulo de luz, se observó una disminución aparente de la fosforilación en p29 (Figura 6, carril DCMU 12 h). No se observó la fosforilación de p29 en las células incubadas durante 12 h con DCMU sin estímulo lumínico (Figura 6, carril DCMU). El control positivo de células de CassKB8 libres de reactivo estimuladas con luz blanca, mostró la fosforilación en Thr de p29 (Figura 6, carril Luz), en comparación con las células incubadas por 12 h en oscuridad sin ningún tratamiento (Figura 6, carril Osc). Finalmente, para descartar que el vehículo (DMSO) de los reactivos hubiera afectado la

fosforilación de p29, células de CassKB8 fueron incubadas con DMSO y expuestas a luz seguido de extracción y análisis por western blot con anticuerpos anti-pThr. El análisis demostró que bajo estas condiciones ocurrió la fosforilación de p29 (Figura 6, carril DMSO), indicando que el vehículo no causó ningún efecto en el proceso.

Por otro lado, para determinar si la disminución aparente de la fosforilación de p29 de CassKB8 estimulada por luz después de 12 h en presencia de DCMU (Figura 6, carril DCMU 12 h) fue debida a una disminución en la viabilidad celular, esta se cuantificó con el colorante vital Azul de Evans (Morera & Villanueva, 2009). Usando los mismos periodos de incubación descritos anteriormente, se observó que la exposición con DCMU durante 12 h no provocó muerte celular significativa en CassKB8 (Gráfica 1, barra naranja, DCMU 12 h) comparada con el tratamiento control (Gráfica 1, barra naranja, CTRL). El total de células vivas después de los tratamientos fue igual para todos los tratamientos (Gráfica 1, barras azules CTRL, DMSO, DCMU, 12 h y DCMU, 2 h).

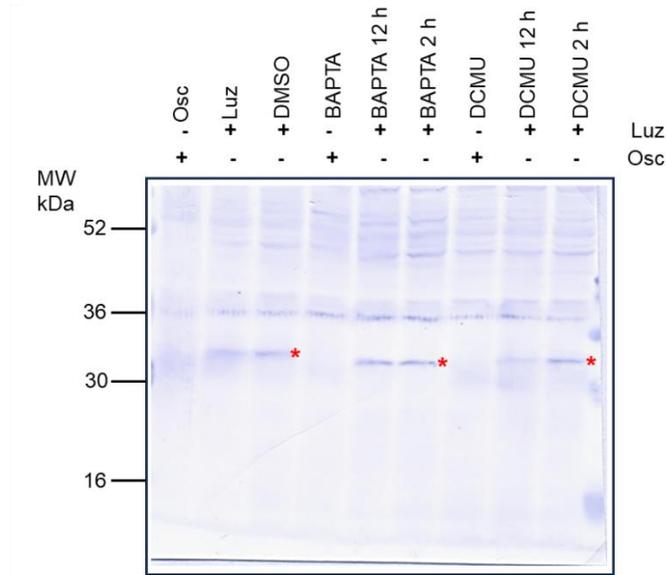
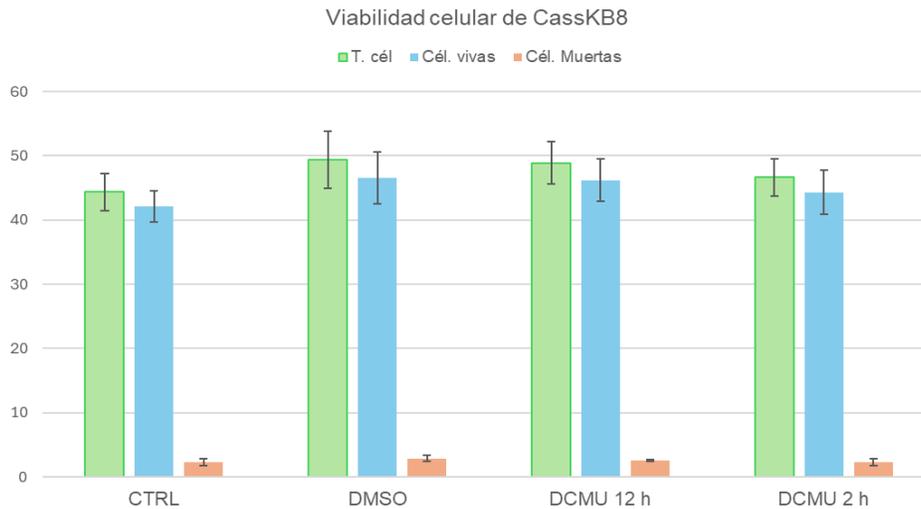


Figura 6. Inmunodetección por WB con anti-pThr en células de CassKB8 tratadas con BAPTA - AM (50 μM) y DCMU (10 μM) estimuladas con luz blanca a 80 - 120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se incluyeron controles de células CassKB8 incubadas en oscuridad con 50 μM de BAPTA - AM y 10 μM de DCMU (BAPTA y DCMU). Se incluyó un control de células incubadas sin tratamiento alguno en oscuridad por 12 h (Osc) y uno de células expuestas por 5 min al estímulo de luz blanca a 80-120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz). Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el asterisco rojo indica la posición de p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.



Gráfica 1. Viabilidad celular de CassKB8 tratadas con 10 μM DCMU. Se realizó el conteo de células de CassKB8 teñidas con Azul de Evans (0.008%), que corresponden a las células muertas (barras anaranjadas), así como el conteo de las células que no se tiñeron con el colorante de Azul de Evans (barras azules). Las barras verdes representan la suma de las células muertas y vivas. Las líneas negras representan la desviación estándar. Los valores del eje Y es el número de células por 10⁴.

Una proteína similar a p29 se fosforila con estímulos de luz en al menos dos especies más de Symbiodiniaceae

Para determinar si el anticuerpo anti-pThr reconoce proteínas posiblemente homólogas en Symbiodiniaceae que se fosforilan en respuesta a la luz, tres especies más de dicha familia fueron expuestas a estímulos de luz después de su fotoperiodo de oscuridad. Se ensayó la fosforilación en treonina estimulada por luz en células de *B. psygmophilum*, y se observó que el anticuerpo anti-pThr reconoció una proteína con una movilidad similar a p29 de CassKB8 (Figura 7, carril *B. psygmophilum*, Luz), pero que no se detectó en las células de la misma especie incubadas 12 h en oscuridad (Figura 7, carril *B. psygmophilum*, Osc). Por otro lado, en células de *F. kawagutii* expuestas a luz seguido del análisis por western blot con anticuerpos anti-pThr, se inmunodetectó una proteína con una movilidad ligeramente menor a p29 de CassKB8 (Figura 7, carril *F. kawagutii*, Luz). En contraste y como se esperaba, no se observó alguna proteína fosforilada en la misma región del blot de células de la misma especie incubadas 12 h en oscuridad (Figura 7, carril *F. kawagutii*, Osc). Finalmente, en células de la tercera especie, *S. pulchrorum* expuestas a luz, no se detectó fosforilación de alguna proteína similar a las observadas en las dos especies anteriores (Figura 7, carril *S. pulchrorum*, Luz). De manera similar, en las células incubadas 12 h en oscuridad tampoco se observó fosforilación en la región de p29 (Figura 7, carril *S. pulchrorum*, Osc). En todos los casos, se usaron células de CassKB8 estimuladas con luz por 5 min después de su fotoperiodo de oscuridad o solamente incubadas 12 h en oscuridad como controles positivo y negativo, respectivamente (Figura 7, carril CassKB8, Luz y Osc, respectivamente).

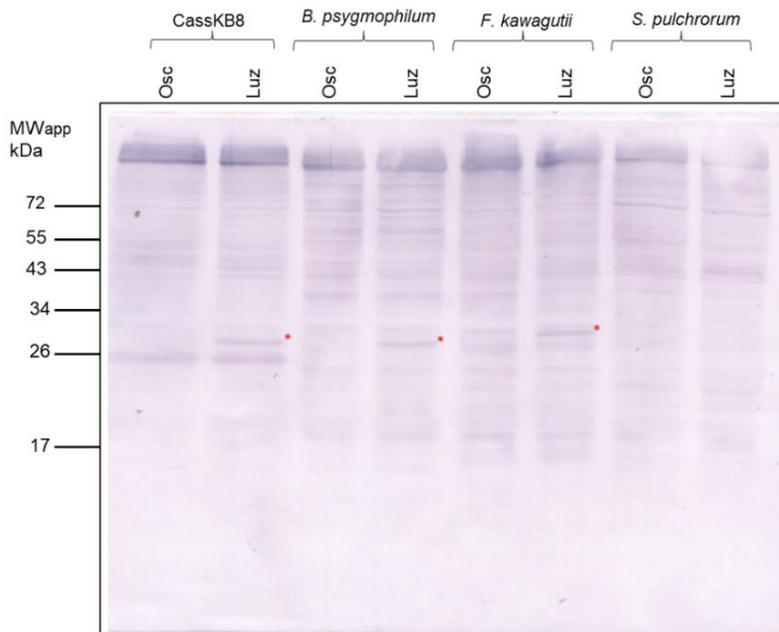


Figura 7. Inmunodetección por WB con anti-pThr en células de cuatro especies de la familia Symbiodiniaceae estimuladas con luz blanca a $80 - 120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el asterisco rojo indica la posición de p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.

p29 no forma asociaciones proteicas a través de enlaces disulfuro

Con el objetivo de conocer si p29 formaba asociaciones con otras proteínas a través de enlaces disulfuro, extractos totales de células de CassKB8 y la fracción enriquecida (F.E.) de p29 fueron tratadas bajo condiciones reductoras y no reductoras. Se observó que el extracto de proteínas en condiciones no reductoras (NR) de células de CassKB8 después del estímulo de luz, la migración de p29 fosforilada no se vio modificada (Figura 8, carril CassKB8, Luz, NR), en comparación con los extractos de proteínas en condiciones reductoras (R) (Figura 8, carril CassKB8, Luz, R). Como se esperaba, en el extracto de proteínas en condiciones reductoras de células de CassKB8 incubadas 12 h en oscuridad, no se observó a p29 fosforilada (Figura 8, carril CassKB8,

Osc, R). Por otro lado, en la fracción enriquecida de p29 (F.E.) bajo condiciones no reductoras se observó que la migración de p29 fosforilada tampoco se modificó (Figura 8, carril F.E. (p29) NR) con respecto a la migración de p29 en condiciones reductoras (Figura 8, carril F.E. (p29) R). Estos resultados indicaron que p29 no forma complejos covalentes a través de enlaces disulfuro consigo misma o con otras proteínas.

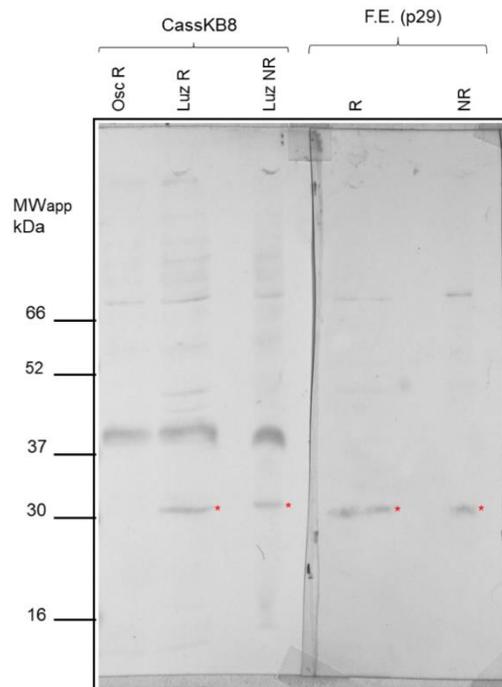


Figura 8. Inmunodetección por WB con anti-pThr de p29 en condiciones reductoras y no reductoras. El extracto total de células de CassKB8 se extrajo en condiciones reductoras (Luz R) y no reductoras (Luz NR) después de ser expuestas durante 5 min a $80-120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca. Se incluyó un control de extracto total en condiciones reductoras de células CassKB8 incubadas en oscuridad por 12 h (Osc R). La F.E. que contiene a p29 fue tratada bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR), como se describe en los métodos. Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el asterisco rojo indica la posición de p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.

Enriquecimiento y localización de p29

Para enriquecer a p29 fosforilada de un cultivo de células de CassKB8, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en donde todas aquellas proteínas con carga negativa se pegan en la fase inmóvil de la cromatografía. Se observó que p29 fosforilada se encontraba entre la fracción 11 y la 15 (Figura 9, carriles 11, 12, 13, 14 y 15). Se incluyó un control positivo de células de CassKB8 expuestas a luz para la identificación de p29 fosforilada (Figura 9, carril Luz) así como un control negativo donde células de CassKB8 fueron incubadas 12 h en oscuridad (Figura 9, carril Osc).

Para obtener a p29 fosforilada lo más pura posible, las fracciones 11 a la 15 se concentraron en un volumen menor como se describe en los métodos. Para localizarla y posteriormente aislarla, se emplearon técnicas de separación con base a las características fisicoquímicas de las proteínas. Primero se realizó una separación por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque o IEF) y después por peso molecular (SDS-PAGE). Se identificó a p29 fosforilada mediante WB con un punto isoeléctrico aparente de 4.8 (Figura 10A, círculo rojo). También se observó el patrón de distribución de todas las proteínas contenidas en la F.E. con una tinción de azul de coomassie (Figura 10B). Con el fin de determinar cuál de los tres puntos posibles que están dentro del rango del punto isoeléctrico y peso molecular que corresponde a p29 (Figura 10B, recuadro rojo), se realizó un WB para estos tres puntos y uno como control negativo que tiene características de peso molecular y punto isoeléctrico diferente (Figura 11A, puntos 2, 3, 4 y 1, respectivamente). Se observó que el único punto que dio positivo al anticuerpo anti-pThr, fue el número dos (Figura 11B, recuadro 2 círculo rojo).

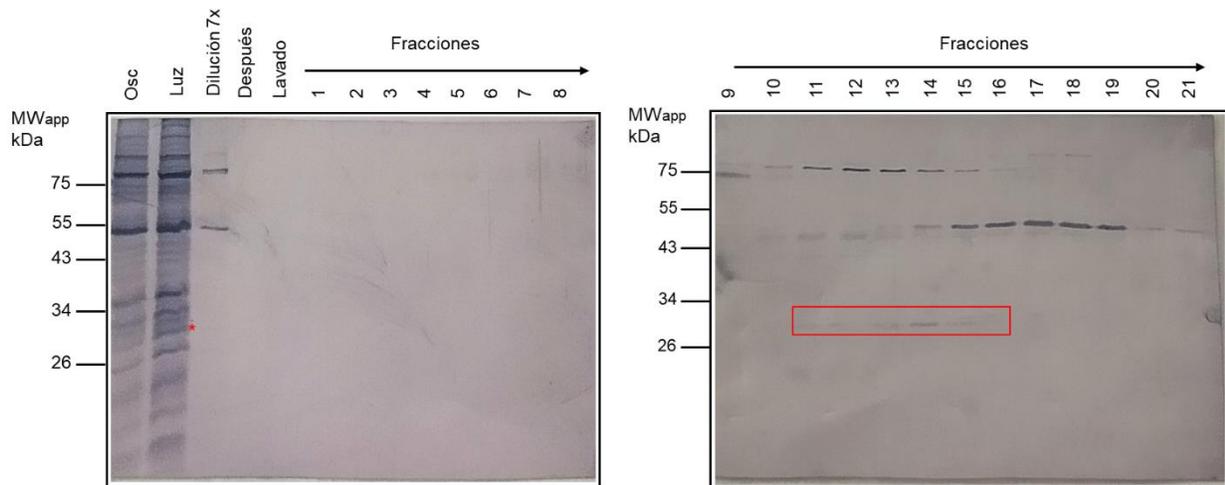


Figura 9. Inmunodetección de p29 por WB con anti-pThr en fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico de un lisado total de células de CassKB8 expuestas a $80 - 120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca. Se incluyó un control de CassKB8 incubadas en oscuridad por 12 h (Osc), un extracto total de células de CassKB8 expuestas a luz (Luz), una muestra de el extracto total diluido 7 veces (Dilución 7X), la fase móvil que corresponde a todo aquello que no se pegó a la fase inmóvil (Después), y del lavado antes de la elución (Lavado). Las fracciones se obtuvieron mediante una elución en gradiente de NaCl de 0.02 a 0.3 M. Se muestran a la izquierda del WB la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa, y el recuadro rojo indica las fracciones en donde se encuentra p29. El WB representa uno de los experimentos llevados a cabo por triplicado.

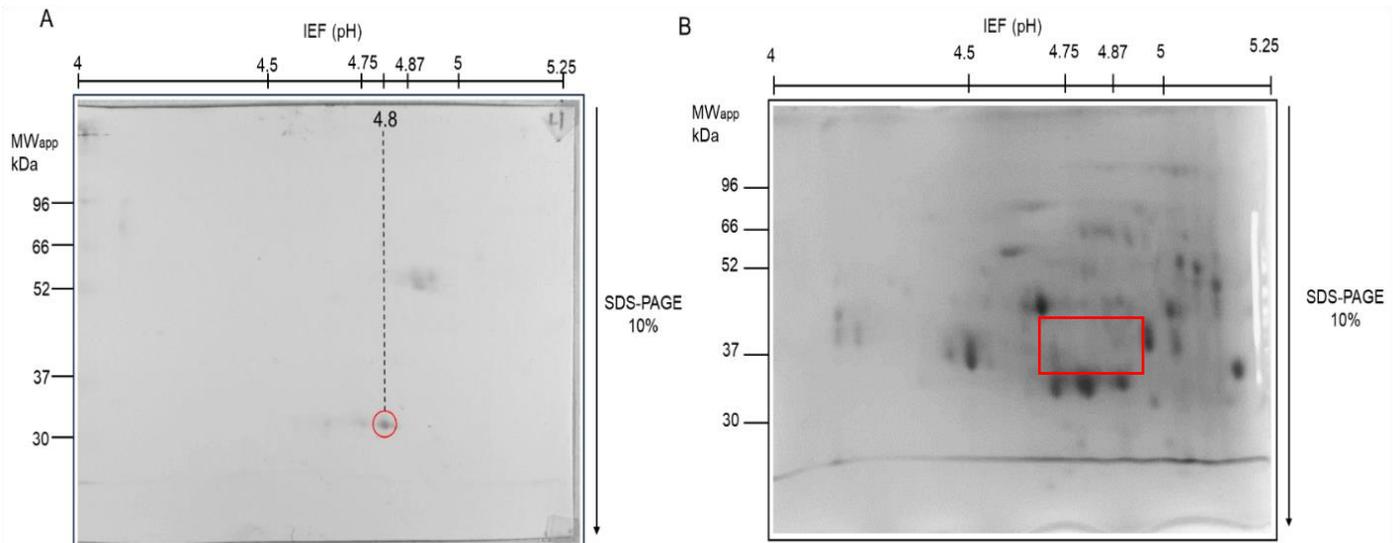


Figura 10. Separación de p29 a partir de la F.E. mediante IEF y SDS-PAGE. **A)** Inmunodetección de p29 por WB con anti-pThr de la F.E. **B)** Gel teñido con azul de coomassie de todo el proteoma de la F.E. Se muestran a la izquierda del WB y del gel la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa y en la parte superior se observa el gradiente lineal de pH. La línea punteada indica el pI aparente de p29. El círculo rojo indica la localización de p29. El recuadro rojo señala las proteínas que podrían corresponder a p29.

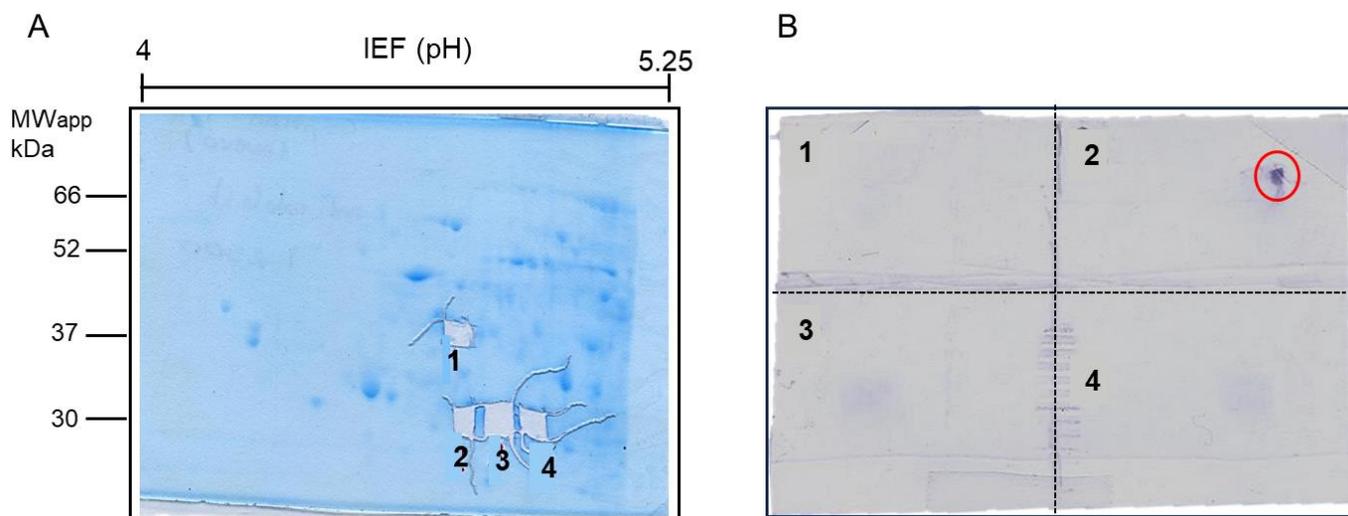


Figura 11. Identificación de p29 para su secuenciación. **A)** Extracción de puntos de un gel de doble dimensión teñido con azul de coomassie de la F.E. **B)** Inmunodetección de p29 por WB con anti-pThr de los cuatro puntos seleccionados. Se muestran a la izquierda del WB y del gel la posición de migración de los marcadores de peso molecular en kDa y en la parte superior se observa el gradiente lineal de pH. Los números 1, 2, 3 y 4 representan la posición de los puntos cortados y transferido a PVDF. El círculo rojo indica la localización de p29.

Identificación de p29 por espectrometría de masas

Se enviaron a secuenciar los puntos identificados como posible p29 fosforilada de cinco geles de doble dimensión (Figura 11A, punto 2). Las secuencias obtenidas por espectrometría de masas se analizaron mediante una herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) en una base de datos (Uniprot) existente de *S. microadriaticum* por el Laboratorio Universitario de Proteómica del IBT, UNAM.

Las proteínas identificadas por la base de datos de acuerdo con las secuencias que se obtuvieron fueron 32. De las cuales 4 son proteínas sin caracterizar con peso molecular desde 66 hasta 112 kDa; 7 pertenecientes a grupos de ambigüedad de proteínas con pesos moleculares desde 63 hasta 649 kDa; 2 proteínas con secuencia de aminoácidos consecutivos indefinidos con peso molecular desde 64 hasta 388 kDa; 16

con alto peso molecular desde 44 hasta 443 kDa; y 3 proteínas con pesos moleculares cercano a p29 (Figura 12) (Anexo1).

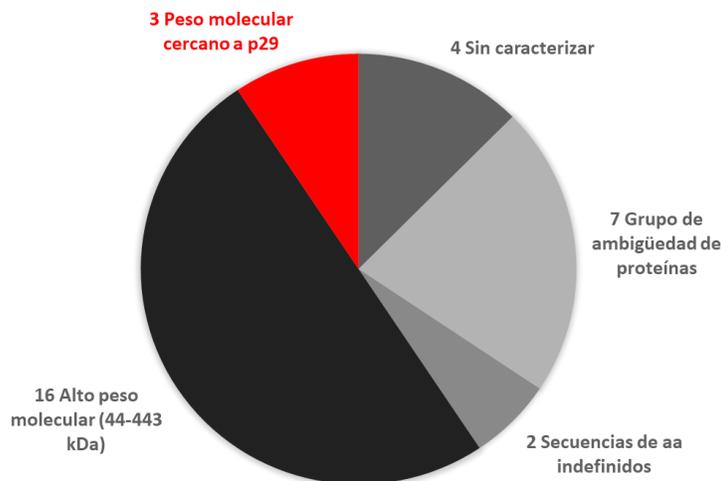


Figura 12. Total de proteínas identificadas por espectrometría de masas de los puntos obtenidos por isoelectroenfoque y SDS-PAGE.

Estas tres últimas proteínas fueron seleccionadas como posibles p29: Chaperonina cloroplástica de 20 kDa (CPN21) con un peso de 33 kDa, subunidad alfa del proteosoma (PsmA5) con un peso de 36 kDa, y proteína tolerante a cationes divalentes (CutA) con un peso de 25 kDa.

Amplificación y clonación de CPN21, CutA y PsmA5

Ya para finalizar, con el objetivo de comparar la secuencia de nucleótidos de los genes para *CPN21*, *PsmA5* y *CutA*, con el genoma existente de *CassKB8*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para los respectivos genes, los cuales fueron diseñados para amplificar diferentes regiones de cada gen. Se realizaron reacciones de PCR, donde algunos fragmentos se insertaron en vectores para su posterior clonación y análisis, mientras que otros productos de PCR se purificaron para su secuenciación directa.

Adicionalmente para asegurar la especificidad de las amplificaciones se utilizó un oligonucleótido denominado DinoSL el cual reconoce una región conservada en los ARNm de los dinoflagelados (Zhang *et al.*, 2007; Islas-Flores *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron sometidos a un análisis por BLAST para identificar las posibles proteínas correspondientes a las secuencias y compararlas con la base de datos, pero éstas no coincidieron con las proteínas anteriormente identificadas por espectrometría de masas como posible p29. Sin embargo, estas secuencias tuvieron identidad con otras proteínas no identificadas de *S. microadriaticum*, así como, de otras especies alejadas evolutivamente como algunas bacterias. Por otro lado, hubo secuencias que, aunque tuvieron una cobertura importante, no arrojaron coincidencias en la base de datos (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de análisis de secuencias obtenidas de NCBI mediante BLAST

Muestra	Especie	Proteína identificada	Identidad	nt
DinoCPN21	<i>S. microadriaticum</i>	Proteína hipotética	98%	587
DinoCutA	<i>S. microadriaticum</i>	Proteína putativa de 149 kDa	94%	262
DinopGEMCPN21	Sin coincidencias			28
DinoPsm5	<i>S. microadriaticum</i>	Reversa transcriptasa parecida a LINE-1	99%	676
pGEMCPN21	<i>P. minimum</i>		100%	940
pGEMPsm5	<i>P. ovalecurtisi</i>		98%	976
CPN21 (700pb)	Sin coincidencias			655
CutA (500 pb) FW	<i>Labrenzia sp</i>	Proteína hipotética	94%	638
CutA (500pb) RV	<i>G. chilikensis</i>	Cinasa serina/treonina	89%	224
CutA (1000pb) FW	<i>Labrenzia sp</i>	proteína hipotética	76%	977
Psm5 (250pb) FW	<i>Labrenzia sp</i>	Módulo de translocación y ensamble	81%	278
Psm5 (250pb) RV	<i>Leclercia sp</i>		100%	26
Psm5 (500pb)	Sin coincidencias			614
Psm5 (750pb)	<i>Labrenzia sp</i>	Proteína putativa de exportación a multidrogas con unión a ATP	96%	492

DISCUSIÓN

El estudio de los procesos celulares y moleculares de *Symbiodinium microadriaticum* sigue siendo limitada. La relación de este microorganismo con su entorno marino es compleja y los factores abióticos como la luz influyen sobre su dinámica celular. Las vías de señalización activadas por luz no han sido descritas a detalle en la familia Symbiodiniaceae, por lo que CassKB8 ha sido nuestro modelo de estudio para dilucidar los procesos celulares que son activados por la exposición a luz.

Los eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas son parte de las vías de señalización y modulan gran parte de los eventos celulares (Cohen, 2002), y las células de CassKB8 no son la excepción. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que tras la exposición prolongada a un estímulo lumínico en células de CassKB8, la fosforilación en treonina de p29 no es observada. Inicialmente, la exposición a luz durante 30 s, 1 y 5 min propició un incremento gradual en el nivel de fosforilación en treonina de p29 (Figura 4A, carriles 30 s, 1 min y 5 min), lo que sugiere una rápida activación de la vía de señalización. Sin embargo, una exposición continua de las células a la luz durante 30 min reveló que el nivel de fosforilación en treonina de p29 disminuyó hasta el grado de ya no ser inmunodetectada la banda correspondiente (Figura 4A, carril 30 min). Esto sugiere que en la vía de fototransducción, la parte responsable de la fosforilación de p29 se desactiva o atenúa, probablemente mediante mecanismos de desensibilización. La desensibilización es un mecanismo reversible al que las células recurren para desactivar o modular las vías de señalización ante un estímulo continuo (Ali *et al.*, 2020; Veres *et al.*, 2024), que en este caso es la luz. Por otro lado, el control de oscuridad (Figura 4A, carril Osc) confirmó que la fosforilación en treonina de p29 es

inducida por la luz y depende de este estímulo, lo que respalda la hipótesis de que la desensibilización es por la exposición prolongada a luz y no por un efecto inespecífico.

Por otro lado, con el fin de conocer si la fosforilación de p29 depende de una longitud de onda electromagnética (λ) específica, células de CassKB8 fueron estimuladas con 3 λ diferentes que abarcan diferentes rangos del espectro visible: 450 - 460 nm (luz azul), 550 - 600 nm (luz amarilla) y, 600 - 650 nm (luz roja). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, los resultados sugieren que, aunque estas tres longitudes de onda pudieron inducir la fosforilación de p29 (Figura 5A, carriles Luz Az, Luz Am, Luz R, respectivamente), el nivel alcanzado fue aproximadamente 40% menos en comparación con las células expuestas a luz blanca (Figura 5B, barras Luz Az, Luz Am y Luz R). Esto podría indicar que la exposición a todas las longitudes de onda que abarca la luz blanca tiene un efecto aditivo sobre la activación de la fosforilación de p29 en CassKB8. Esto también sugeriría la existencia de varios receptores o distintas vías de señalización que convergen en la vía de activación de procesos celulares en los que p29 está involucrada en células de CassKB8. Desde un punto de vista más ecológico, en aguas poco profundas la disponibilidad de luz blanca es mayor en comparación a aguas profundas donde solo ciertas longitudes de onda predominan (Duntley, 1963). Estas condiciones podrían haber propiciado una adaptación a responder a varias longitudes de onda de luz en las diferentes profundidades en las que se pueden encontrar Symbiodiniaceae tanto en vida libre como en simbiosis. Más aún, en simbiosis, la luz debe atravesar el tejido del hospedero (Dustan, 1982; Chow *et al.*, 2019; Castillo-Medina *et al.*, 2023).

En este trabajo también se investigó la posible participación del calcio. El calcio es un segundo mensajero que participa en varias vías de señalización regulando diversos procesos celulares (Lodish *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Weston *et al.*, 2015). Las concentraciones de calcio en el citoplasma son bajas (Carafoli & Crompton, 1978), y un aumento en su concentración desencadena diversas vías de señalización que permiten la activación de proteínas cinasas y fosfatasas (Lodish *et al.*, 2011). Los resultados del ensayo donde se secuestró el calcio intracelular con la molécula BAPTA - AM demostraron que, a pesar del tratamiento a una concentración de 10 μ M con dicho compuesto durante 2 y 12 h, la fosforilación de p29 estimulada por luz siguió ocurriendo (Figura 6, carriles BAPTA 2 h y BAPTA 12 h). Esto sugiere que, aunque el calcio juega un papel importante como segundo mensajero en vías de señalización, en el caso del estímulo de luz sobre CassKB8, este catión no es necesario para activar la vía de señalización que fosforila a p29. Extrapolando el resultado al fenómeno de fosforilación, se podría sugerir que la o las cinasas responsables de fosforilar a p29 no son dependientes de calcio.

Por otro lado, se exploró si la inhibición de la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis también podría inhibir los mecanismos que activan la fosforilación de p29 estimulada por luz. Para ello, se utilizó el inhibidor DCMU que bloquea el transporte de electrones entre la plastoquinona y el citocromo y por lo tanto la fotosíntesis (Somova, 2015; Wang *et al.*, 2017). Los resultados demostraron que en células de CassKB8 incubadas durante 2 h con DCMU, la fosforilación de p29 ocurrió de manera usual después del estímulo lumínico. Sin embargo, en células incubadas durante 12 h con DCMU y después estimuladas con luz, se observó una disminución aparente en la

fosforilación en Thr de p29 (Figura 7, carriles DCMU 2 h y DCMU 12 h, respectivamente). Se sabe que el bloqueo prolongado del transporte de electrones provoca una reducción en la producción de ATP (Gower *et al.*, 1979). Indirectamente, esta baja en el ATP disponible podría incidir en la disminución de la fosforilación de p29. Esta idea es apoyada por los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad, ya que la disminución de la fosforilación de p29 no se debió a la muerte de las células de CassKB8 después de una incubación prolongada con DCMU (Gráfica 1). Finalmente, para descartar un posible efecto del vehículo del inhibidor, los tratamientos llevados a cabo únicamente con el diluyente DMSO demostraron que los resultados obtenidos sobre la fosforilación de p29 estimulada por luz en presencia tanto de BAPTA – AM, como de DCMU, no se debieron al vehículo (Figura 7, carril DMSO).

Con la finalidad de explorar si en otras especies de la familia Symbiodiniaceae se observan proteínas fosforiladas en treonina después de un estímulo lumínico, tres especies más de esta familia fueron expuestas a luz después de su fotoperiodo de oscuridad. Lo que se observó fue que, al menos dos especies más de esta familia comparten una proteína homóloga a p29 que se fosforila en Thr después de ser expuestas a luz (Figura 7, carriles *B. psygmophilum*, Luz; *F. kawagutii*, Luz), lo que podría sugerir que comparten una vía de señalización que conlleva a esta fosforilación. Este patrón de fosforilación/desfosforilación previamente ha sido observado también en *F. kawagutii* y *B. psygmophilum*, pero para una proteína de 75 kDa que se fosforila en Thr en oscuridad denominada SBiP (Castillo-Medina *et al.*, 2019; Castillo Medina, 2020; Castillo-Medina *et al.*, 2022).

En este trabajo también se evaluó si p29 formaba complejos de varios monómeros consigo misma o con otras proteínas a través de enlaces disulfuro covalentes. Para ello se analizó la migración de la proteína por western blot después de correrla por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. Los enlaces disulfuro cumplen un papel fundamental en la estabilización de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y esta estabilización se da entre residuos de cisteína (Bulaj, 2005; Lodish *et al.*, 2011). En condiciones reductoras estos enlaces se rompen generando un cambio en el plegamiento de las proteínas. Los resultados obtenidos después del análisis demostraron que la migración de p29 fue similar en ambas condiciones reductoras y no reductoras, tanto en la proteína inmunodetectada en el lisado total de CassKB8, como en la fracción enriquecida de p29 (Figura 8). Estos resultados indicaron que p29 no forma complejos proteicos dependiente de enlaces disulfuro. Sin embargo, debido a que la desnaturalización de las proteínas llevada a cabo durante el proceso de análisis rompe otros tipos de enlaces no covalentes, no se puede descartar de que p29 forme complejos mediante estos otros tipos de enlaces de manera transitoria con otras proteínas.

El último paso de este trabajo fue identificar a la proteína p29 y asignarle un papel hipotético mediante su naturaleza y analogía de participación en vías de señalización en otros sistemas. Para ello se aisló la proteína por electroforesis de segunda dimensión para enviarla a secuenciar *de novo*. El aislamiento por electroforesis de doble dimensión se logra con base a dos propiedades fisicoquímicas de las proteínas: punto isoeléctrico y peso molecular (Primo Yúfera, 1995; Lodish *et al.*, 2011). El seguimiento de separación y enriquecimiento se llevó a cabo mediante western blot con el anticuerpo anti-pThr. Separar proteínas por su carga intrínseca mediante una cromatografía de intercambio

iónico, permitió eliminar proteínas que no eran de interés y en este caso enriquecer a p29 (Figura 9A). La separación por pI (isoelectroenfoque) de la F.E., seguida por una segunda separación (2D) por peso molecular (SDS-PAGE), permitió obtener de forma separada a las proteínas de la fracción dentro del rango de pH usado en la primera dimensión. Se rastreó entonces la p29 fosforilada por western blot (Figura 10A). Sin embargo, en los geles paralelos al western blots teñidos con azul de coomassie, se observaron varias proteínas con peso molecular aparente de 29 kDa, pero con diferente pI (Figura 10B). En este punto se pudo comprobar que a pesar de todo el tratamiento experimental de purificación que resulta siempre en una disminución en la cantidad de proteína de interés, la estabilidad de la fosforilación en Thr en la proteína se mantuvo. Para poder determinar cuál de las tres proteínas con peso de p29 (Figura 10B, recuadro rojo) tenía mayor probabilidad de ser p29, se cortaron los puntos (Figura 11A) y se transfirieron a una membrana de PVDF seguido de un WB con el anticuerpo anti-pThr (Figura 11B). De esta manera se logró identificar el punto correspondiente a p29 y después de obtener varios puntos de varios geles de doble dimensión, se mandaron a secuenciar. Los resultados de la secuenciación arrojaron 32 proteínas identificadas; sin embargo, solo tres se identificaron como posibles candidatas a ser p29: CutA, CPN21 y Psma5. Estas proteínas ya han sido identificadas en otros organismos superiores y existen reportes sobre su participación en diversos procesos celulares. Por ejemplo, *CPN21* está involucrada en el desarrollo de semillas de uva y el silenciamiento del gen conduce al aborto de la semilla (Hanania *et al.*, 2007), *Psma5* está involucrada en la degradación de proteínas y también está asociada al proceso tumorigénico del cáncer (Fu *et al.*, 2019) y, finalmente, *CutA* es una proteína de unión al cobre que se localiza en

el cloroplasto de *A. thaliana* pero su función no se ha descrito a detalle (Burkhead *et al.*, 2003). Por otro lado, ninguna de ellas se ha descrito en un contexto de fosforilación mediada por luz.

Para el objetivo de obtener la secuencia de nucleótidos a fin de compararla con la anotación en el genoma de *S. microadriaticum* CassKB8 se llevó a cabo un esfuerzo importante pero la complejidad de la muestra no permitió cumplirlo con éxito. Distinto a lo que se esperaba, las secuencias obtenidas a partir de los productos amplificadas por PCR no coincidieron con ninguna de las secuencias de péptidos a partir del punto del gel de doble dimensión. Sin embargo, tres secuencias, las cuales fueron amplificadas con DinoSL, mostraron 94 - 99% de identidad (Tabla 2, DinoCPN21; DinoCutA; DINO P_{sma5}) con proteínas no identificadas de *S. microadriaticum*. Los resultados no concluyentes podrían deberse a que las secuencias anotadas en la base de datos del genoma de *S. microadriaticum* no están completamente curadas, lo que conlleva a una mala interpretación de las coincidencias que arrojan las búsquedas en las bases de datos. Este problema se ha observado previamente cuando se analizaron las secuencias homólogas de *SBiP1* usando dicho genoma como referencia (Castillo-Medina *et al.*, 2019; 2023).

Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo de Maestría revelaron diversos temas a estudiar para comprender mejor la biología de *Symbiodinium microadriaticum* CassKB8 en el contexto de la regulación de sus procesos celulares mediado por luz. La primera conclusión es que la luz es el factor clave que desencadena la fosforilación de p29. En segundo, la importancia de la calidad de la luz, la cual se refiere a la distribución del espectro visible dentro del rango de los 400 - 700 nm (Blanco-Valdés, 2019), la observación de diferentes niveles de fosforilación de p29 inducida bajo las varias longitudes de onda ensayadas sugieren que a futuro los estudios podrían centrarse en identificar receptores o vías de señalización responsables de esta variación de la fosforilación bajo condiciones lumínicas distintas. Esto también abarca los contextos de la simbiosis y la fisiología misma del simbiote en cuanto a su capacidad de adaptación. Tercero, aunque el calcio cumple un papel de segundo mensajero en vías de señalización ya descritas en organismos superiores, en la vía de señalización que fosforila a p29 no fue un componente crucial, lo que sugiere que componentes o la(s) misma(s) cinasa(s) responsable(s) de su fosforilación no son dependientes del calcio. Futuras investigaciones, podrían enfocarse en conocer mejor el papel del calcio en la fisiología de *S. microadriaticum*. Cuarto, el funcionamiento óptimo de la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis pareció influir en los niveles de fosforilación de p29 estimula por luz. Este efecto podría ser el resultado de una baja en la producción de ATP propiciada por el tratamiento con el inhibidor DCMU. En el futuro nuevos estudios podrían enfocarse en entender los mecanismos moleculares por los cuales la inhibición prolongada de la fotosíntesis por el DCMU afecta la señalización que lleva a la

fosforilación de p29 estimulada por luz. Quinta, p29 no forma complejos proteicos mediante enlaces disulfuro covalentes; sin embargo, también será importante analizar a p29 en condiciones nativas a fin de saber si se forma otro tipo de complejos por enlaces no covalentes, y otros ensayos que permitan seguir con la caracterización de esta proteína. Sexta, los resultados del análisis de las secuencias obtenidas por PCR con oligonucleótidos diseñados específicamente para tres proteínas identificadas por secuenciación de péptidos fueron inesperados; por ello se requieren estudios para identificar el origen de estas secuencias, así como para mejorar las condiciones de las amplificaciones y clonación para obtener secuencias más precisas. Finalmente, el uso del método de purificación de p29 fosforilada después del estímulo lumínico es relativamente sencillo y reproducible, lo que facilitará la continuación del estudio de esta proteína y su participación en la vía de señalización dentro del fenómeno de la fototransducción que conlleva a su fosforilación.

Anexo 1

Lista de proteínas identificadas por el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM con el programa Proteome Discover

Proteínas identificadas	Peso molecular	Número de acceso (Uniprot)	Observaciones
Uncharacterized protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene5944 PE=4 SV=1	81 kDa	A0A1Q9ESH7	Proteína no caracterizada
Uncharacterized protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene7990 PE=4 SV=1	112 kDa	A0A1Q9EM83	Proteína no caracterizada
Uncharacterized protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene35463 PE=4 SV=1	93 kDa	A0A1Q9CLE6	Proteína no caracterizada
Uncharacterized protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene10456 PE=4 SV=1	66 kDa	A0A1Q9EFR2	Proteína no caracterizada
Heat shock 70 kDa protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene39393 PE=4 SV=1	302 kDa	A0A1Q9CBC6	Grupo de ambigüedad
ribulose-bisphosphate carboxylase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=rbcL PE=3 SV=1	649 kDa	A0A1Q9DR79	Grupo de ambigüedad
Chaperone protein dnaK2 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=dnaK2 PE=4 SV=1	278 kDa	A0A1Q9CV29	Grupo de ambigüedad
Chaperone protein dnaK2 (Fragment) OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=dnaK2 PE=4 SV=1	86 kDa	A0A1Q9CJK1	Grupo de ambigüedad
Chaperone protein DnaK OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=dnaK PE=3 SV=1	63 kDa	A0A1Q9DYJ8	Grupo de ambigüedad
Heat shock protein 90 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=HSP90 PE=3 SV=1	392 kDa	A0A1Q9CRD2	Grupo de ambigüedad
Phosphoglycerate kinase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=pgk-1 PE=3 SV=1	112 kDa	A0A1Q9CTU6	Grupo de ambigüedad
L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=APX1 PE=3 SV=1	64 kDa	A0A1Q9F3G2	Secuencia de aminoácidos consecutivos indefinidos
Phosphodiesterase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=dnc PE=3 SV=1	388 kDa	A0A1Q9ENT8	Secuencia de aminoácidos consecutivos indefinidos

Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-4 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=Cnga4 PE=4 SV=1	132 kDa	A0A1Q9DP90	Alto peso molecular
Superoxide dismutase [Fe] OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=sodA PE=3 SV=1	137 kDa	A0A1Q9DV13	Alto peso molecular
Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94 (Fragment) OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene42830 PE=4 SV=1	375 kDa	A0A1Q9C2I9	Alto peso molecular
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=UGP1 PE=3 SV=1	244 kDa	A0A1Q9D068	Alto peso molecular
Nipped-B-like protein B OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=nipblb PE=4 SV=1	154 kDa	A0A1Q9E3Y9	Alto peso molecular
fructose-bisphosphatase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene15322 PE=3 SV=1	44 kDa	A0A1Q9E398	Alto peso molecular
Peroxisomal membrane protein PMP34 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=SLC25A17 PE=3 SV=1	396 kDa	A0A1Q9DVJ7	Alto peso molecular
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA-like OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=clpC PE=4 SV=1	443 kDa	A0A1Q9DZX8	Alto peso molecular
Putative hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin- binding protein 3 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene1285 PE=4 SV=1	100 kDa	A0A1Q9F4F6	Alto peso molecular
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=EIF2AK4 PE=4 SV=1	57 kDa	A0A1Q9CRW4	Alto peso molecular
ribose-5-phosphate isomerase OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=RPI3 PE=3 SV=1	126 kDa	A0A1Q9CQI8	Alto peso molecular
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene5743 PE=3 SV=1	64 kDa	A0A1Q9ESZ4	Alto peso molecular
CSD domain-containing protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=AK812_SmicGene30550 PE=4 SV=1	64 kDa	A0A1Q9CZ26	Alto peso molecular
Intraflagellar transport protein 172-like OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=Ift172 PE=3 SV=1	116 kDa	A0A1Q9DKE1	Alto peso molecular
Chloramphenicol resistance protein OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=cmlA PE=3 SV=1	250 kDa	A0A1Q9EY43	Alto peso molecular
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA-like OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=clpC PE=3 SV=1	256 kDa	A0A1Q9D2W3	Alto peso molecular

Proteasome subunit alpha type-5 OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=Psm5 PE=3 SV=1	36 kDa	A0A1Q9E9J7	Posible p29
20 kDa chaperonin, chloroplastic OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=CPN21 PE=3 SV=1	33 kDa	A0A1Q9C5U7	Posible p29
Divalent-cation tolerance protein CutA OS=Symbiodinium microadriaticum OX=2951 GN=cutA PE=3 SV=1	25 kDa	A0A1Q9E9J6	Posible p29

GO ID	GO Term	# Proteínas involucradas
Proceso biológico		
GO:0006457	Plegamiento de proteínas	6
GO:0005975	Proceso metabólico de los carbohidratos	5
GO:0006508	Proteólisis	4
GO:0034605	Respuesta celular al calor	3
GO:0055085	Transporte transmembrana	3
GO:0006096	Proceso glucolítico	2
GO:0007165	Transducción de señales	2
Componente celular		
GO:0016020	Membrana	13
GO:0005737	Citoplasma	11
GO:0009507	Cloroplasto	7
GO:0005829	Citosol	5
GO:0005739	Mitocondria	4
GO:0005634	Núcleo	2
GO:0000502	Complejo LUBAC y del proteoma	2
Función molecular		
GO:0005524	Fijación de ATP	10
GO:0046872	Unión de iones metálicos	7
GO:0140662	Chaperona de plegamiento de proteínas dependiente de ATP	5
GO:0016787	Actividad hidrolasa	3
GO:0051082	Unión a proteínas no plegadas	3
GO:0016301	Actividad cinasa	3
GO:0016887	Actividad de hidrólisis de ATP	3
GO:0022857	Actividad de transporte transmembrana	4
GO:0003824	Actividad catalítica	2
GO:0016853	Actividad de Isomerasa	2
GO:0008233	Actividad Peptidasa	2
GO:0003676	Unión a ácidos nucleicos	2
GO:0004751	Actividad de isomerasa	2
GO:0044183	Chaperona de plegamiento de proteínas	1

REFERENCIAS

Ali, A., Pardo, J. M., & Yun, D. J. (2020). Desensitization of ABA-signaling: the swing from activation to degradation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 379.

Aranda, M., Li, Y., Liew, Y.J., Baumgarten, S., Simakov, O., Wilson, M.C., Piel, J., Ashoor, H., Bougouffa, S., Bajic, V.B., Ryu, T., Ravasi, T., Bayer, T., Micklem, G., Kim, H., Bhak, J., LaJeunesse, T.C., & Voolstra, C.R. (2016). Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Scientific Reports*, 6(1), 39734.

Barneah, O., Brickner, I., Hooge, M., Weis, V. M., LaJeunesse, T. C., & Benayahu, Y. (2007). Three party symbiosis: acoelomorph worms, corals, and unicellular algal symbionts in Eilat (Red Sea). *Marine Biology*, 151, 1215-1223.

Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2007). Bioquímica. *Reverté*.

Blanco-Valdés, Y. (2019). Importancia de la calidad de la luz entre las plantas arvenses-cultivo. *Cultivos tropicales*, 40(4). e09.

Bollati, E., Lyndby, N. H., D'Angelo, C., Kühl, M., Wiedenmann, J., & Wangpraseurt, D. (2022). Green fluorescent protein-like pigments optimise the internal light environment in symbiotic reef-building corals. *eLife*, 11, e73521.

Bradley, D. (2022). The evolution of post-translational modifications. *Current Opinion in Genetics and Development*, 76, 101956.

Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology Advances*, 23(1), 87-92.

Burkhead, J. L., Abdel-Ghany, S. E., Morrill, J. M., Pilon-Smits, E. A., & Pilon, M. (2003). The *Arabidopsis thaliana* *CUTA* gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. *The Plant Journal*, 34(6), 856-867.

Carafoli, E., & Crompton, M. (1978). The regulation of intracellular calcium. In *Current Topics in Membranes and Transport*. 10. 151-216.

Castillo Medina, R. E. (2020). Caracterización del estado de fosforilación de una proteína tipo HSP70 de *Symbiodinium* sp. KB8 a diferentes condiciones de luz y temperatura (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Castillo-Medina, R. E., Islas-Flores, T., Morales-Ruiz, E., & Villanueva, M. A. (2023). Biochemical and molecular characterization of the SBiP1 chaperone from *Symbiodinium microadriaticum* CassKB8 and light parameters that modulate its phosphorylation. *PLoS ONE*, 18(10), e0293299.

Castillo-Medina, R. E., Islas-Flores, T., & Villanueva, M. A. (2019). Phosphorylation/dephosphorylation response to light stimuli of *Symbiodinium* proteins: specific light-induced dephosphorylation of an HSP-like 75 kDa protein from *S. microadriaticum*. *PeerJ*, 7, e7406.

Castillo-Medina, R. E., Islas-Flores, T., & Villanueva, M. A. (2022). Light-stimulated dephosphorylation of the BiP-like protein, SmicHSP75 (SBiP1) from *Symbiodinium microadriaticum* is inhibited by elevated but not low temperature and suggests regulation of the chaperone function. *Acta Biochimica Polonica*, 69(1), 155-164.

Cato, M. L., Jester, H. D., Lavertu, A., Lyman, A., Tallent, L. M., & Mitchell, G. C. (2019). Genome-wide analysis of cell cycle-regulating genes in the symbiotic dinoflagellate *Breviolum minutum*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(11), 3843-3853.

Chen, J. C., Castillo, A. B., & Jacobs, C. R. (2013). Cellular and molecular mechanotransduction in bone. *Osteoporosis*. Chapter 20. 453-475.

Chow, G. S., Chan, Y. S., Jain, S. S., & Huang, D. (2019). Light limitation selects for depth generalists in urbanised reef coral communities. *Marine Environmental Research*, 147, 101-112.

Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4, E127E130.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881-10890.

Duntley, S. Q. (1963). Light in the sea. *Journal of the Optical Society of America*, 53(2), 214-233.

Dustan, P. (1982). Depth-dependent photoadaptation by zooxanthellae of the reef coral *Montastraea annularis*. *Marine Biology*, 68, 253-264.

Fitt, W. K., Chang, S. S., & Trench, R. K. (1981). Motility patterns of different strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium*(=*Gymnodinium*) *microadriaticum* (Freudenthal) in culture. *Bulletin of Marine Science*, 31(2), 436-443.

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 Phytologist*, 94(3), 421-432.

Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T., & Nakanishi, K. (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311(5988), 756-759.

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

Fu, Z., Lu, C., Zhang, C., & Qiao, B. (2019). PSMA5 promotes the tumorigenic process of prostate cancer and is related to bortezomib resistance. *Anti-Cancer Drugs*, 30(7), 722-730.

Gower, R. A., & Posner, H. B. (1979). Effects of light and 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea on levels of ATP in *Lemna paucicostata* 6746 and a photosynthetic mutant with abnormal flowering responses. *Plant Physiology*, 63(3), 548-551.

Hanania, U., Velcheva, M., Or, E., Flaishman, M., Sahar, N., & Perl, A. (2007). Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. *Transgenic Research*, 16, 515-525.

Hunter, T. (2000). Signaling - 2000 and beyond. *Cell*, 100(1), 113-127.

Iglesias-Prieto, R., Govind, N. S., & Trench, R. K. (1991). Apoprotein composition and spectroscopic characterization of the water-soluble peridinin—Chlorophyll a—Proteins from three symbiotic dinoflagellates. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 246(1317), 275-283.

Iglesias-Prieto, R., Govind, N. S., & Trench, R. K. (1993). Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four

dinoflagellate species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 340 (1294), 381-392.

Iglesias-Prieto, R., & Trench, R. K. (1997). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll–protein complexes to different photon-flux densities. *Marine Biology*, 130, 23-33.

Islas-Flores, T., Galán-Vásquez, E., & Villanueva, M. A. (2021). Screening a spliced leader-based *Symbiodinium microadriaticum* cDNA library using the yeast-two hybrid system reveals a hemerythrin-like protein as a putative SmicRACK1 ligand. *Microorganisms*, 9(4), 791.

Kevin, M. J., Hall, W. T., McLaughlin, J. J., & Zahl, P. A. (1969). *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, a revised taxonomic description, ultrastructure. *Journal of Phycology*, 5(4), 341-350.

Kim, J. I., Park, J. E., Zarate, X., & Song, P. S. (2005). Phytochrome phosphorylation in plant light signaling. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(9), 681-687.

Knowlton, N., Brainard, R. E., Fisher, R., Moews, M., Plaisance, L., & Caley, M. J. (2010). Coral reef biodiversity. *Life in the world's oceans: Diversity distribution and abundance*, 65-74.

Kodis, E. J., Smindak, R. J., Kefauver, J. M., Heffner, D. L., Aschenbach, K. L., Brennan, E. R., Chan, K., Gamage, K. K., Lambeth, P. S., Lawler, J. R., Sikora, A. K., Vercruyse, N. R., & Deppmann, C. D. (2012). *First Messengers*. eLS. 1st edn. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Kramer, I. M. (2015). An introduction to signal transduction. *Signal Transduction* (Third Edition). Academic Press. Chapter 2.

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

LaJeunesse, T. C. (2017). Validation and description of *Symbiodinium microadriaticum*, the type species of *Symbiodinium* (Dinophyta). *Journal of Phycology*, 53(5), 1109-1114.

LaJeunesse, T. C., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (2010). The reticulated chloroplasts of zooxanthellae (*Symbiodinium*) and differences in chlorophyll localization among life cycle stages. *Coral Reefs*, 29, 627.

Li, X., Wilmanns, M., Thornton, J., & Köhn, M. (2013). Elucidating human phosphatase-substrate networks. *Science Signaling*, 6(275), rs10.

Li, X., Li, Z., Wang, F., Zhao, S., Xu, C., Mao, Z., & Wang, W. (2024). Structures and organizations of PSI–AcpPCI supercomplexes from red tidal and coral symbiotic photosynthetic dinoflagellates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(7), e2315476121.

Lim, W., Mayer, B., & Pawson, T. (2014). Cell signaling. *Garland Science*.

Lin, S., Wu, S., He, J., Wang, X., & Grossman, A. R. (2024). Shining light on dinoflagellate photosystem I. *Nature communications*, 15(1), 3337.

Liu, Q., Wang, Q., Deng, W., Wang, X., Piao, M., Cai, D., Lin, C. (2017). Molecular basis for blue light dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Nature Communications*, 8(1), 1-12.

Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. L., Amon, A. (2011). *Biología Celular y Molecular. Panamericana*. Capítulo 4.

Maire, J., Girvan, S. K., Barkla, S. E., Perez-Gonzalez, A., Suggett, D. J., Blackall, L. L., & van Oppen, M. J. (2021). Intracellular bacteria are common and taxonomically diverse in cultured and *in hospite* algal endosymbionts of coral reefs. *The ISME Journal*, 15(7), 2028-2042.

Mantovani, O., Haffner, M., Selim, K. A., Hagemann, M., & Forchhammer, K. (2023). Roles of second messengers in the regulation of cyanobacterial physiology: The carbon-concentrating mechanism and beyond. *MicroLife*, 4, uqad008.

Matte, A., Tari, L. W., & Delbaere, L. T. (1998). How do kinases transfer phosphoryl groups? *Structure*, 6(4), 413-419.

McLaughlin, J. J., & Zahl, P. A. (1957). Studies in marine biology. II. *In vitro* culture of zooxanthellae. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 95(1), 115-120.

Menard, A., Turgeon, K., Roche, D. G., Binning, S. A., & Kramer, D. L. (2012). Shelters and their use by fishes on fringing coral reefs. *PLoS ONE*, 7(6), e38450.

Mies, M. (2019). Evolution, diversity, distribution and the endangered future of the giant clam–Symbiodiniaceae association. *Coral Reefs*, 38(6), 1067-1084.

Montes, F. M., Vázquez, J. P. P., & Rosas, H. R. (2018). Bioquímica de Laguna y Piña. *Editorial El Manual Moderno*.

Morera, C., & Villanueva, M. A. (2009). Heat treatment and viability assessment by Evans blue in cultured *Symbiodinium kawagutii* cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1125-1128.

Muscatine, L. (1971). Experiments on green algae coexistent with zooxanthellae in sea anemones. *Pacific Science*, 25(1), 13-21.

Nestler, E. J., & Greengard, P. (1999). Protein phosphorylation is of fundamental importance in biological regulation. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition.

Newton, A. C., Bootman, M. D., Scott, J. D., (2016). Second messengers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a005926.

P. van der Geer. (2013). Signal Transduction. Encyclopedia of Genetics (Second Edition), *Academic Press*. Pages 436-439.

Pawlowski, J. A. N., Holzmann, M., Fahrni, J. F., Pochon, X., & Lee, J. J. (2001). Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(3), 368-373.

Plattner, F., & Bibb, J. A. (2012). Serine and threonine phosphorylation. *In Basic Neurochemistry*. *Academic Press*, 467-492.

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. (2022). Cell Biology E-book. *Elsevier Health Sciences*. Chapter 26.

Porter, J. W., & Tougas, J. I. (2001). Reef ecosystems: threats to their biodiversity. *Encyclopedia of Biodiversity*, 73-95.

Primo Yúfera, E. (1995). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. vol 2. España: Reverté.

Rea, G., Antonacci, A., Lambreva, M. D., & Mattoo, A. K. (2018). Features of cues and processes during chloroplast-mediated retrograde signaling in the alga *Chlamydomonas*. *Plant Science*, 272, 193-206.

Renaud, F. L., De Ondarza, J., Luporini, P., Marino, M. J., & Van Houten, J. (2004). Signal transduction mechanisms in protozoa. *Cell Signalling in Prokaryotes and Lower Metazoa*. Chapter 3. 73-90.

Reaka-Kudla, M. L. (1997). The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*, 2, 551.

Rockwell, N. C., Su, Y. S., & Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 837-858.

Schönberg, C. H., & Suwa, R. (2007). Why bioeroding sponges may be better hosts for symbiotic dinoflagellates than many corals. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Museu Nacional Rio de Janeiro, 569-580.

Schönenberg, D. A., & Trench, R. K. (1980). Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum*. *Biological Sciences*, 207(1169), 405-427.

Schulze, W. X. (2015). Plant Phosphoproteomics: Methods and Protocols. *Humana Press*.

Schulte, T., Johanning, S., & Hofmann, E. (2010). Structure and function of native and refolded peridinin-chlorophyll-proteins from dinoflagellates. *European journal of cell biology*, 89(12), 990-997.

Somova, E. L. (2015). *Effects of perturbation on photosystem redox state in three species of octocorals*. *Northern Illinois University Dissertations and Theses*. 1599715.

Sorek, M., Díaz-Almeyda, E. M., Medina, M., & Levy, O. (2014). Circadian clocks in symbiotic corals: the duet between *Symbiodinium* algae and their coral host. *Marine Genomics*, 14, 47-57.

Sorek, M., & Levy, O. (2012) a. The effect of temperature compensation on the circadian rhythmicity of photosynthesis in *Symbiodinium*, coral-symbiotic alga. *Scientific Reports*, 2(1), 1-8.

Sorek, M., & Levy, O. (2012) b. Influence of the quantity and quality of light on photosynthetic periodicity in coral endosymbiotic algae. *PLoS ONE*, 7(8), e43264.

Thornhill, D. J., Xiang, Y., Pettay, D. T., Zhong, M., & Santos, S. R. (2013). Population genetic data of a model symbiotic cnidarian system reveal remarkable symbiotic specificity and vectored introductions across ocean basins. *Molecular Ecology*, 22(17), 4499-4515.

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 1. *Journal of Phycology*, 23(3), 469-481.

Veres, T., Kerestély, M., Kovács, B. M., Keresztes, D., Schulc, K., Seitz, E., & Csermely, P. (2024). Cellular forgetting, desensitisation, stress and ageing in signalling networks. When do cells refuse to learn more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81(1), 97.

Villanueva, M.A. (2008). Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly, methanol-free transfer buffer. *Analytical Biochemistry*, 373, 377–379.

Wang, J. T., Keshavmurthy, S., Chu, T. Y., & Chen, C. A. (2017). Diverse responses of *Symbiodinium* types to menthol and DCMU treatment. *PeerJ*, 5, e3843.

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

Wang, Q., Liu, Q., Wang, X., Zuo, Z., Oka, Y., & Lin, C. (2018). New insights into the mechanisms of phytochrome-cryptochrome coaction. *New Phytologist*, 217(2), 547–551.

Weston, A. J., Dunlap, W. C., Beltran, V. H., Starcevic, A., Hranueli, D., Ward, M., & Long, P. F. (2015). Proteomics links the redox state to calcium signaling during bleaching of the scleractinian coral *Acropora microphthalma* on exposure to high solar irradiance and thermal stress. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(3), 585-595.

Wu, X. N. (2021). Plant phosphoproteomics: Methods and Protocols. *Humana Press*.

Yacobovitch, T., Benayahu, Y., & Weis, V. M. (2004). Motility of zooxanthellae isolated from the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens* (Cnidaria). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 298(1), 35-48.

Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L., Campbell, D. A., Sturm, N. R., Gaasterland, T., & Lin, S. (2007). Spliced leader RNA trans-splicing in dinoflagellates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4618-4623.

Zhao, L. S., Wang, N., Li, K., Li, C. Y., Guo, J. P., He, F. Y., ... & Zhang, Y. Z. (2024). Architecture of symbiotic dinoflagellate photosystem I–light-harvesting supercomplex in *Symbiodinium*. *Nature Communications*, 15(1), 2392.