



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Caracterización funcional de genes pertenecientes a la
familia snRK3 en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Francisco Javier Colina Ruiz
15 de julio de 2014



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Caracterización funcional de genes pertenecientes a la familia snRK3 en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Francisco Javier Colina Ruiz

Firma

Luis Valledor Gonzalez

M^a Jesús Cañal Villanueva

Firma

Firma

Abreviaturas

- ABA - Abscisc acid (ácido abscísico)
- AKIN11 - Arabidopsis kinase 11 (Arabidopsis quinasa 11)
- AMP - Adenosine monophosphate (Adenosin monofosfato)
- AMPK - Cyclic adenosine monophosphate dependent kinase (Quinasa dependiente de AMP cíclico)
- ATP - Adenosine triphosphate (Adenosin trifosfato)
- CBL - Calcineurin beta like (Homologo a la subunidad beta de la Calcineurina)
- CDPK - Calcium dependent protein kinase (Proteín quinasa dependiente de calcio)
- CDS - Coding sequence (Secuencia codificante)
- CKIN1 - Chlamydomonas snf-kinase 1 (Quinasa SNF de Chlamydomonas 1)
- CKIN2 - Chlamydomonas snf-kinase 2 (Quinasa SNF de Chlamydomonas 2)
- CRK - Calcium related kinase (Quinasa dependiente de calcio)
- dNTP – Deoxynucleotides triphosphate (Desoxinucleótidos trifosfato)
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinanesulfonic acid (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinanosulfónico)
- MAPK - Mitogen-activated protein kinases (Quinasas activadas por mitógeno)
- MCS - Multiple cloning site (Sitio de clonación múltiple)
- MIGS - mRNA induced gene silencing (silenciamiento génico por mRNA)
- OE – Overexpresión (Sobreexpresión)
- RBCS2 - Ribulose biphosphate carboxilase subunit 2 (Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad 2)
- RKIN1 - Rye kinase 1 (Quinasa de centeno 1)
- SKP - S-Phase kinase-associated protein (Quinasa asociada a fase S)
- SNF-1 - Sucrose non fermenting-1 (No fermentadora de Sacarosa 1)
- Snrk - Sucrose non fermenting related kinase (Quinasa relacionada con no fermentadora de sacarosa)
- SOS3 - Salt overly sensitive 3 (hipersensible a sal 3)
- TAP – Tris acetate phosphate (Tris Acetato Fosfato)
- TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris(hidroximetil)aminometano)
- UTR - Untranslated region (Región no transcrita)

Abstract

Since AMPK Discovery in animals, members of plant CDPK-Snrk superfamily have been linked to several processes in metabolism regulation and stress response. New proteins have been identified and characterized, especially in higher plants, with a large Snrk family containing the plant-exclusive Snrk 2 & 3 subfamilies. Aiming to characterize Snrks in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, an experimental model in the increasingly important microalgae-based biofuel production, [REDACTED], were identified through *in silico* procedures relying on homology search and domain identification. To further characterize them, expression profiles of these genes were studied under S, N and CO₂ deprivation conditions showing divergent and specific trends in some sequences that could be linked to specific stresses. The last objective of this work was focused on building *CKIN3* (induced by cold and low CO₂) overexpressed and silenced transformants, as this is the first step towards the functional characterization of this protein. The use of pChlamy_4 vector has proved as a suitable tool for algae transformation.

Resumen

Desde el descubrimiento de las AMPK en animales, los miembros de la superfamilia CDPK-Snrk se han asociado al control de procesos metabólicos y de respuesta al estrés en plantas. Se han descubierto nuevas Snrk, especialmente en plantas superiores, donde esta familia es numerosa y contiene dos subfamilias exclusivas (Snrk 2 y 3). Con el objeto de caracterizar la familia Snrk en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se realizó una identificación *in silico* de secuencias, basada en homología de secuencias y de dominios, con el hallazgo de secuencias pertenecientes [REDACTED]. Las secuencias localizadas fueron caracterizadas parcialmente mediante el estudio de su expresión frente a diferentes estreses, mostrando en muchos casos respuestas específicas, pudiendo en algunos casos asociarse a estreses particulares. El último objetivo del trabajo ha consistido en la construcción de líneas sobreexpresantes y silenciadas para *CKIN3*, constituyendo un primer paso para la caracterización funcional de esta proteína. El empleo de pChlamy_4 se muestra como una herramienta eficaz para la generación de transformantes en *C. reinhardtii*.

Introducción

Las Snrk (*Sucrose non fermenting related kinases*) forman parte de la superfamilia de quinasas vegetales CDPK-Snrk (*Calcium Dependent Protein Kinase-SNF related kinase*), conformada por proteínas caracterizadas un dominio serín treonín quinasa en cuya secuencia se basa la agrupación de sus componentes (Hanks & Hunter., 1995). Las primeras Snrk fueron descubiertas gracias a la homología que presentan con la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* SNF-1 (*Sucrose Non Fermenting 1*) de la que deriva su nombre y la AMPK (*AMP dependent kinase*) de animales, con las que comparten gran parte de su secuencia y algunas de sus funciones (Carling et al., 1994). Ambas quinasas están implicadas en la regulación de la actividad de enzimas clave en el metabolismo del carbono (Carling et al., 1987; Hardie et al., 1989; Carling et al., 1989.), actuando como un indicador del estado energético celular en base al balance ATP/AMP, y por tanto del grado de estrés al que está sometida la célula (Hardie et al., 1997) a través de la acción directa o indirecta del AMP sobre esta enzima. Estas quinasas actúan modo de eje central, conectando en animales y levaduras los mecanismos de señalización metabólicos y de estrés permitiendo la optimización del uso de recursos en diferentes situaciones. La primera Snrk en descubrirse fue un miembro de la subfamilia 1, RKIN1, en centeno, (Alderson et al., 1991), hallándose posteriormente en diferentes especies vegetales junto con sus subunidades regulatorias como β , γ , y $\beta\gamma$ análogas a las de los homólogos en animales y levaduras. Tras este descubrimiento pronto se observó una diferencia entre las familias SNF/AMPK y las Snrk de las plantas radicada en la existencia de otras dos subfamilias denominadas Snrk 2 y 3 (Halford & Hardie., 1998) que, a pesar de que muestran una menor similitud con AMPK y SNF-1, siguen manteniendo la estructura de dominios característica de esta familia formada por doce regiones conservadas divididas en dos bloques por una zona no conservada central. En *Arabidopsis thaliana* se han caracterizado 10 quinasas de la subfamilia tipo 2 y 25 de la 3 (Hrabak et al., 2003). Todas estas proteínas forman parte junto con las CDPK (*Calcium Dependent Protein Kinases*) y proteínas similares como las CRK (*Calcium Related Kinases*) de la superfamilia CDPK-Snrk aunque presentan diferencias en su secuencia, especialmente en la región C-terminal donde las CDPK cuentan con una secuencia autoinhibitoria o pseudosustrato (Harper et al., 1991) y un dominio de unión a calcio similar a la calmodulina (Zhang & Choi., 2001), mientras que la familia Snrk carece de dichos dominios de unión a calcio en esta región así como de dominios autoregadores en las Snrk 1 y 2, estando presentes únicamente en las Snrk 3 como dominios de reconocimiento de proteínas de unión a calcio como SOS3 o CBL (Albrecht et al., 2001).

Por otra parte las Snrk 2 presentan en este extremo regiones abundantes en residuos ácidos (Halford et al., 2000). La variación de la región C-terminal resulta de especial importancia al determinar en estas proteínas su modo de regulación, la interacción con diferentes substratos, su localización celular y su función. A diferencia de la región C-terminal, la secuencia de la región N-terminal es más variable y su función aun poco conocida en las proteínas de esta superfamilia (Hrabak et al., 2003).

En la actualidad el estudio de las subfamilias Snrk2 y 3 suscita gran interés, debido a su implicación en la respuesta al estrés abiótico, actuando como nodos centrales en las vías de transducción de señales. En *A. thaliana* se ha implicado a estas quinasas en la respuesta directa a estreses como el producido por inundación (Snrk2.8) (Umezawa et al., 2004), hiperosmolaridad (Kobayashi et al., 2005), salinidad (ante la cual presentan diferente sensibilidad) y déficit de azufre (Snrk 2.1) (Gonzalez-Ballester et al., 2008) y de otros nutrientes (N, P, K); de hecho en este último caso se ha observado como la Snrk 2.8 fomenta la acumulación de biomasa (Shin et al., 2007). Recientemente se ha descrito la relación de algunos de los miembros de estas familias con las cascadas de señalización mediadas por ABA como en el caso de las Snrk 2.2, 2.3 y 2.6 (Fujii et al., 2009) o auxinas (Farras et al., 2001).

El modo de acción de estas quinasas está basado principalmente en cuatro mecanismos: a) fosforilando factores de transcripción, principalmente de la familia bzip, siendo esta familia encargada de activar vías completas de respuesta a estrés (Baena-González., 2010), b) formando parte de complejos de remodelación epigenética Snrk-Helicasa-XXX, donde XXX son proteínas de reconocimiento de secuencias de ADN más otras enzimas que pueden ser tanto modificadoras de histonas como complejos autorregulados quinasasa-fosfatasa encaminados a la remodelación de los factores de transcripción que actúan sobre un gen específico (Sarnowski et al., 2005), c) control directo de enzimas y proteínas transportadoras de membrana mediante fosforilación (Silva & Geros., 2009) y d) control de la remodelación del proteoma mediante la formación de complejos con SKP para la unión al proteasoma e interacciones con la vía de la autofagia (Farrás et al., 2001; Hey et al., 2010).

El descubrimiento del rol de esta familia en la respuesta a fitohormonas, así como su papel regulatorio de respuestas sistémicas al estrés, la ha convertido en una clara candidata para la comprensión y mejora de la respuesta al estrés en plantas. Teniendo una tremenda implicación el potencial traslado de este conocimiento a especies económicamente relevantes donde los estreses bióticos y abióticos representan el

principal factor causante de la disminución de su productividad (Vinocur & Altman., 2005; Jogaiah et al., 2013; Zhou et al., 2014).

En general, el mayor inconveniente que presenta esta familia a la hora de explotar su actividad desde una perspectiva biotecnológica es su alto número de miembros tanto en especies de cultivo como en forestales, y las capacidades compensatorias existentes entre miembros de las distintas subfamilias (Dale et al., 1995) Sin embargo, en organismos más sencillos como algas oleaginosas (para las que se presupone un número inferior debido su distancia evolutiva), la manipulación de esta familia se presenta como una alternativa más sencilla a corto plazo, puesto que además se conoce que algunos miembros median en los procesos de respuesta a estrés que conducen a la sobreacumulación de lípidos y azúcares, siendo este un proceso clave para la producción eficiente de biodiesel y bioetanol (Waclawovsky et al., 2010).

Chlamydomonas reinhardtii es una clorófito unicelular, biflagelada, haploide y dioica, considerándose especie modelo dentro de las microalgas eucariotas (Harris et al. 2009) gracias a su posibilidad de desarrollo autotrófico o mixotrófico manteniendo su aparato fotosintético (Harris et al., 2001; Merchant et al., 2007), su flexibilidad metabólica (Grossman et al., 2007) y el gran número de cepas y mutantes disponibles. Esta especie está secuenciada, encontrándose a medio camino entre animales y plantas superiores (Merchant et al. 2007) y presentando secuencias características de ambos en un genoma más simple, con menor número de genes y familias proteicas y rutas menos complejas. Su rápido crecimiento, flexibilidad metabólica, y similitud con *Chlorella* y *Dunaliella* han convertido también a esta especie en el alga modelo para la producción oleaginosa y de azúcares, pese a que su capacidad de almacenamiento de biomasa en forma de almidón y lípidos no es la más alta de la División Chlorophyta.

La mayoría de los ensayos encaminados a definir dianas potenciales para mejorar la eficiencia de la acumulación de lípidos o azúcares en microalgas han fracasado, obteniéndose solo aumentos de productividad marginales cuando se sobreexpresaron proteínas directamente implicadas en las rutas de síntesis de lípidos (Merchant et al., 2011) o almidón (Stark et al., 1992). Estudios muy recientes basados en biología de sistemas o el uso de ómicas (Gonzalez-Ballester et al., 2010; Lee et al., 2012; Valledor et al. 2013; Wase., et al 2014) han confirmado esta hipótesis, no encontrándose correlación entre la acumulación de lípidos y el aumento significativo de su ruta biosintética, sugiriendo que este proceso tiene implicaciones sistémicas, no pudiendo compartimentalizarse en las distintas rutas biosintéticas.

Algunos de estos estudios sugieren la implicación de proteínas de la familia Snrk en los procesos de respuesta al estrés de un modo semejante al descrito en plantas como el estrés por ausencia de azufre en el medio (Gonzalez-Ballester et al., 2008; González-Ballester et al., 2010) o por bajas temperaturas (Valledor et al., 2013). Trabajos previos (Gonzalez-Ballester et al., 2008) han iniciado la definición de la familia Snrk en *C. reinhardtii*, localizándose una secuencia homóloga a la Snrk 1.1/AKIN10 (CKIN1) de *A. thaliana* cuya expresión disminuye con la exposición a bajas temperaturas. Además de esta se han encontrado más secuencias análogas a Snrk1.2/AKIN11 como CKIN2 y otras como CKIN3 cuyo comportamiento frente a diferentes estreses abióticos, junto con otras secuencias localizadas, se pretende evaluar en el trabajo. Además de las tres anteriores se han localizado por homología más secuencias de la familia Snrk 2 en *C. reinhardtii* (Gonzalez-Ballester et al., 2008) aunque salvo la implicación de Snrk 2.1 en el estrés por ausencia de azufre, aún se desconocen los procesos en los que se encuentran implicadas.

Pese a su potencial importancia en la industria de los biocombustibles, se consideran como uno de los interruptores metabólicos encargados de sobre acumular lípidos y azúcares, y el innegable interés básico que posee la regulación metabólica, no existe una definición, descripción, y caracterización funcional de todos los elementos de esta familia en *C. reinhardtii*, al contrario de lo que ocurre en otras especies modelo como *A. thaliana*.

Este Trabajo Fin de Master pretende llenar este vacío y se plantea como objetivo principal la definición y caracterización de la familia Snrk en *C. reinhardtii*. Para ello se establecen tres objetivos parciales:

- Definición de la superfamilia snRK en *C. reinhardtii* y determinación de los miembros de sus subfamilias.
- Caracterización funcional *in silico* de los miembros de esta superfamilia.
- Generación de líneas sobreexpresantes y silenciadas de CKIN3, una snRK de respuesta al frío.

Material y métodos

Definición de la superfamilia snRK en *C. reinhardtii*

La búsqueda de estas quinasas se ha realizado por homología entre el genoma de *C. reinhardtii* (v. 5.5, Joint Genome Institute, DOE; phytozome.jgi.doe.gov/) y secuencias proteicas previamente identificadas como Snrk en *A. thaliana* (Coello, Hey, & Halford, 2011) (Tabla S1) y la familia SNF de *S. Cerevisiae* considerando homólogas secuencias con e-valor inferior a $1e^{-35}$ en un BLASTP. Además, como vía alternativa se realizó una identificación de los dominios de las secuencias SnrKs mediante el software Inter Pro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) y Biomart (www.phytozome.net). Esto permitió incorporar nuevas secuencias a la familia y descartar aquellas homologías por BLAST que no presentaban todos los dominios característicos de esta familia.

A continuación, con la finalidad de distinguir entre las distintas subfamilias Snrk y eliminar posibles proteínas extrañas pertenecientes a la superfamilia CDPK-Snrk pero no a esta subfamilia, se realizó un árbol filogenético por el método *neighbor joining* con el conjunto de secuencias localizadas empleando el modelo *jukes-cantor* con una penalización de apertura de hueco de 12 y de extensión de 3. La filogenia se ha realizado empleando Geneious v 4.8.2 (Biomatters Inc) incluyéndose secuencias Snrk de las subfamilias 1,2,3 previamente caracterizadas en *Homo sapiens*, *S. cerevisiae*, y *A. thaliana*.

Caracterización funcional *in silico* de la superfamilia snRK en *C. reinhardtii*

Para la caracterización funcional de esta familia en *C. reinhardtii* se tomaron los valores de expresión génica disponibles en repositorios públicos y correspondientes a estudios de transcriptómica bajo las distintas situaciones de estrés ayuno de azufre (Toepel J et al., 2013), ayuno de nitrógeno (Miller et al., 2010) y deficiencia de CO₂ (Fang et al., 2012). El procedimiento seguido fue la búsqueda de las entradas correspondientes a cada miembro de la familia y la posterior comparación de su nivel de expresión en una situación de estrés respecto al control.

Clonación de *CKIN3*

Como background se ha empleado la cepa CC503 *cw92*, *nit1*, *nit2*, *agg1+*, *mt+* de *C. reinhardtii* procedente del Chlamydomonas Resource Center de la Universidad de Minesota (EEUU, www.chlamycollection.org). Esta cepa se deriva de una mutación espontánea de pérdida de pared de la estirpe silvestre CC125 (Voigt & Frank, 2003)

(Hyams & Davies, 1972). Su elección se basa en que es la cepa de *C. reinhardtii* que ha sido secuenciada.

Los cultivos se han realizado en un incubador bajo condiciones de 25°C, agitación de 120 rpm y fotoperiodo largo 16:8 h (día:noche) con una tasa de fluencia en el rango de 170-200 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ proporcionada por LEDs blancos en frascos aireados de 500 mL con un volumen líquido máximo de 250 mL. El medio de cultivo empleado es el medio TAP (Harris et al 2009) en el cual el TRIS se ha sustituido por HEPES y se ha suplementado con 10 mM de acetato de sodio como fuente alternativa de carbono (medio HAP). Para obtener células expresando *CKIN3* se cultivaron durante 3 días en las mismas condiciones que las descritas, pero a una temperatura de 4°C.

El RNA se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Valledor et al. (2014). A continuación se sintetizó el cDNA mediante transcripción reversa a partir de RNA previamente extraído. Cada reacción de transcripción reversa se ha realizado en un volumen final de 20,5 μL con los siguientes componentes; 1-3 ng RNA, 150 pmol hexámeros de secuencia degenerada, 1,5 μL Ribolock (Fermentas #E00381), 2 μL dNTPs (10Mm), 4 μL 5x Reaction buffer, 2 μL M.MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Cat. #EP0351) con actividad RNAsa H, agua destilada hasta 20,5 μL . la reacción requiere una desnaturalización a 65°C en presencia de los hexámeros durante 5 minutos en medio libre de RNAsas tras verificar previamente la calidad del RNA mediante electroforesis. El protocolo de reacción empleado fue: 25°C, 10 min; 45°C, 75 min; 80°C, 10 min y una incubación final a 8°C.

El primer paso de la transformación fue la construcción de los vectores de sobreexpresión y silenciamiento. Se empleó el vector comercial pChlamy_4 (Thermo Fisher Inc.) (fig. 1, A) que porta el fragmento 3' UTR del gen de la *RBCS2* (Cre02.g120150) tras la región MCS 2. El vector recombinante se ha construido por inserción de fragmentos conteniendo la secuencia CDS de *CKIN3* (Cre12.g528000) obtenida mediante PCR a partir del cDNA empleando una Taq polimerasa de alta fidelidad, Phusion® high fidelity DNA polimerase (Thermo Fischer Inc.) tal y como se describe a continuación:

Se realizaron dos construcciones, sobreexpresión (OE) (Figura 1B, abajo), y silenciamiento (MIGS) (Figura 1B, arriba) formado por un fragmento de *CKIN3* acoplado a la secuencia MIGs (De Felippes, Wang, & Weigel, 2012) en el caso de los vectores de silenciamiento (Figura 1b). En primer lugar, y mediante el empleo de cebadores específicos, se amplificó la CDS de *CKIN3*. Posteriormente, la secuencia de silenciamiento fue incorporada mediante reamplificación de la secuencia CDS de *CKIN3* empleando cebadores específicos (*CKIN3-F*, *CKIN3-R*) conteniendo la etiqueta MIGS

(CKIN3-F-KPN1 y CKIN3-R-Not1) (Tabla 1). En ambos casos, la inserción se realizó entre las dianas KpnI y NotI. Estos fragmentos se purificaron en columnas de sílice, y se digirieron con las enzimas KpnI y NotI (Thermo Fischer Inc.). Por otro lado, los 500 ng del vector se digirieron con las mismas enzimas, y posteriormente, se desfosforilaron mediante la adición de fosfatasa alcalina fastAP (Thermo Fisher Inc.). Tras la digestión y defosforilación, se ligó el plásmido abierto con insertos conteniendo la secuencia CDS de *CKIN3*, o la secuencia MIGs para *CKIN3*, empleando la ligasa del fago T4 (Thermo Fischer Inc.).

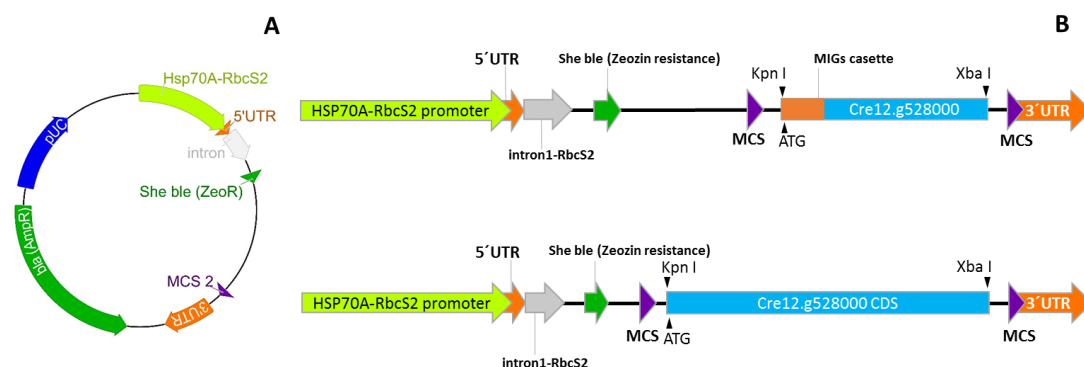


Figura 1. A), mapa del vector pChlamy_4 con inserción de la región 3'UTR RbcS2. B), regiones de inserción de los insertos de silenciamiento (MIG) (arriba) y sobreexpresión (OE) (abajo).

Tabla 1: Cebadores empleados en este trabajo, indicándose su nombre, secuencia y temperatura de anillamiento. Con * se marcan las temperaturas empleadas para la Phusion DNA-polimerasa.

Cebador	Secuencia	Tm
CKIN3-F	[Redacted]	[Redacted]
CKIN3-R	[Redacted]	[Redacted]
CKIN3-F-KpnI	[Redacted]	[Redacted]
CKIN3-R-NotI	[Redacted]	[Redacted]
CKIN3-Migs-F-KpnI	[Redacted]	[Redacted]

Las construcciones se amplificaron en Células de *Escherichia coli* competentes. La transformación de las bacterias se realizó mediante la aplicación por cada 50 μ L de bacteria de 10 ng de producto de ligación, tras lo cual el vector se incorporó en las bacterias mediante un choque térmico a 42°C durante 90 s. La selección de organismos transformados se realizó en placas Petri con medio LB semisólido suplementado con ampicilina (1 μ g/ml) como agente selector. De las colonias resultantes, tras 12 h de

cultivo a 37°C, se tomaron 5 por cada construcción que fueron inoculadas en medio LB líquido con ampicilina (1 µg/ml) y cultivadas 12 h a 37°C. Tras el periodo de incubación, los vectores se purificaron empleando el protocolo clásico de minipreps (Birnboim & Doly., 1979) y se garantizó la presencia del inserto mediante PCR, empleando cebadores específicos. En los casos positivos, los productos de la miniprep fueron cuantificados y secuenciados para garantizar la calidad del vector recombinante.

La transformación se realizó mediante un sistema basado en bolas de vidrio (Kindle, 1990). Se añadieron 2 µl de la construcción correspondiente (OE o MIGs) a 300 µl de suspensiones celulares a una densidad de 2×10^8 células/ml en tubos con 300 mg de bolas de vidrio. La transformación se realiza por agitación en vortex durante 30 segundos tras lo cual las suspensiones se extendieron sobre placas con medio HAP semisólido portando el agente de selección (ceocina, 20 µg/mL) manteniéndose las placas durante los siguientes días bajo condiciones estándar. Doce colonias fueron sembradas de forma individual en placas con medio HAP semisólido suplementado con ceocina y la presencia del transgén fue testada por PCR convencional empleando los cebadores utilizados para la síntesis inicial del cDNA.

Resultados

Identificación de secuencias de la familia Snrk en *C. reinhardtii*

La búsqueda por homología de los miembros de la familia Snrk en el genoma de *Chlamydomonas*, empleando *A. thaliana* como especie de referencia, permitió identificar 18 secuencias pertenecientes a esta familia. De entre ellas se han podido identificar las secuencias previamente identificadas como Snrks 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8 (Gonzalez-Ballester et al., 2008). Además se han identificado 7 nuevas secuencias de la subfamilia Snrk 2, denominadas temporalmente Snrk2 UK1-7, así como una secuencia homóloga de Snrk1/AKIN10 y análogos de la subunidad regulatoria beta y de la subunidad beta-gamma. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna secuencia similar a alguna de las Snrk de la subfamilia 3 de *Arabidopsis* empleadas como referencia. Estos resultados se confirmaron, y ampliaron en 3 genes. Tras realizar una búsqueda de los dominios no solo en las secuencias determinadas anteriormente, sino en todo el genoma de *C. reinhardtii*.

Estas búsquedas obtuvieron un grupo de secuencias entre las que se encontraban todas las identificadas previamente por homología en otros trabajos, además de 11 secuencias noveles. Sorprendentemente no se encontró ninguna secuencia homóloga a la subfamilia Snrk 3. Con el objetivo de localizar secuencias de esta subfamilia se realizó una tercera estrategia basada en una nueva búsqueda por homología, empleando en este caso una secuencia Snrk 3 previamente localizada en *Chlorella variabilis*, CBL-interacting protein kinase 01 (<http://www.uniprot.org/uniprot/C4P7Q5>), pero tampoco se localizaron secuencias análogas.

Como resultado de la identificación de dominios (Tabla 3), se observó la presencia en la mayor parte de los casos del dominio serin treonin quinasa (PTHR24343), común a los miembros de la superfamilia, y dominios más específicos como, Snrk2D (PTHR24343:SF99) y Snrk2C (PTHR24343:SF55), encontrado únicamente en *C. reinhardtii*. Por otra parte el análisis de dominios entre las secuencias identificadas permitió la identificación y eliminación de proteínas homólogas a las CDPK de *A. thaliana*, que muestran una considerable analogía con las Snrk y su dominio Ser/Thr quinasa.

Las distintas quinzas de esta familia se han agrupado filogenéticamente (Fig. 2), añadiendo como grupo externo secuencias de *C. reinhardtii* análogas a CDPK de *A. thaliana*. Este árbol, en el cual también se introdujeron secuencias representativas de las

distintas subfamilias Snrk de especies perfectamente caracterizadas, permitió la diferenciación de 6 grupos principales. Entre ellos, destaca el formado por las secuencias identificadas previamente como Snrk 2 en *Arabidopsis* y *Chlamydomonas*. Este se divide en dos subgrupos, de los cuales uno contiene las Snrk2 de *A. thaliana* junto con las Snrk2 previamente identificadas por homología en *C. reinhardtii* y Snrk2 UK5, conteniendo el grupo acompañante las diferentes Snrk identificadas por homología. Otros de los grupos de interés son los conformados por Snrk 1 y sus análogos en humanos (AMPK) y levadura (SNF-1) y los dos grupos conformados por las subunidades reguladoras beta y gamma, encontrándose en este último CKIN3, análoga en *C. reinhardtii* a la subunidad gamma y una secuencia análoga a la subunidad beta-gamma de *A. thaliana*.

Caracterización funcional *in silico* de los miembros de esta superfamilia.

Entre las ■■ secuencias Snrk identificadas ■■ presentan algún tipo de variación en sus niveles de expresión, analizados mediante RNAseq, ante diferentes situaciones estresantes. La magnitud de la variación es heterogénea y el comportamiento de las secuencias variable en función del tipo de estrés aplicado con lo que se identifican perfiles de expresión concretos de las diferentes secuencias ante las diferentes situaciones de ayuno de azufre, nitrógeno o deficiencia de CO₂.

Generación de líneas sobreexpresantes y silenciadas CKIN3

La construcción de las líneas mutantes ha requerido la amplificación de la secuencia *CKIN3* a partir de cDNA de *Chlamydomonas* (CC503) empleando cebadores específicos para la amplificación del inserto, así como un cebador delantero para la misma secuencia incorporando la etiqueta MIGs. A partir de los cebadores de amplificación de la secuencia *CKIN3*, se obtuvo un producto de 1200 meros conteniendo la secuencia CDS del gen *CKIN3* (Cre12.g528000) mientras que, usando el cebador delantero con la etiqueta MIGs y el trasero para la secuencia se obtiene una secuencia de 500 meros (Figura 4), coincidiendo estos valores con los teóricos esperados teniendo en cuenta la secuencia de dicho gen.

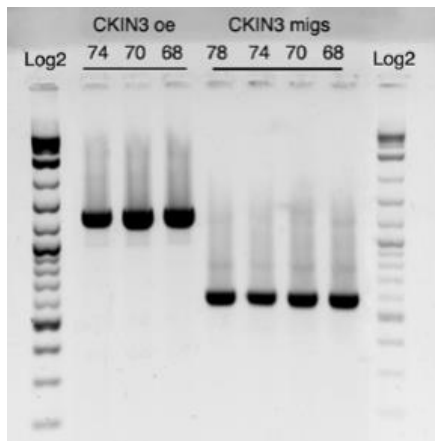


Figura 4. Imagen mostrando los productos de amplificación de cDNA de *C. reinhardtii* con distintas temperaturas. Se muestran tres calles correspondientes al fragmento de sobreexpresión con la secuencia CDS para *CKIN3* y cuatro bandas con el fragmento formado por una región de la secuencia CDS de *CKIN3* asociado a la etiqueta MIGS.

La reamplificación de las bandas con los cebadores, incluyendo las dianas de restricción para el clonaje, resultó en una imagen similar. Esta amplificación fue purificada, digerida y ligada al vector pChlamy_4 y tras la transformación de *E. Coli* se seleccionaron 5 colonias aisladas para cada uno de los grupos control, OE y Migs. Se purificaron sus plásmidos y, mediante PCR, se comprobó que portaban la construcción de interés (Figura 5a). Las construcciones que mostraron una banda del fragmento esperado OE2 y M2 se enviaron a un servicio externo de secuenciación para verificar su secuencia (Figura 5b).

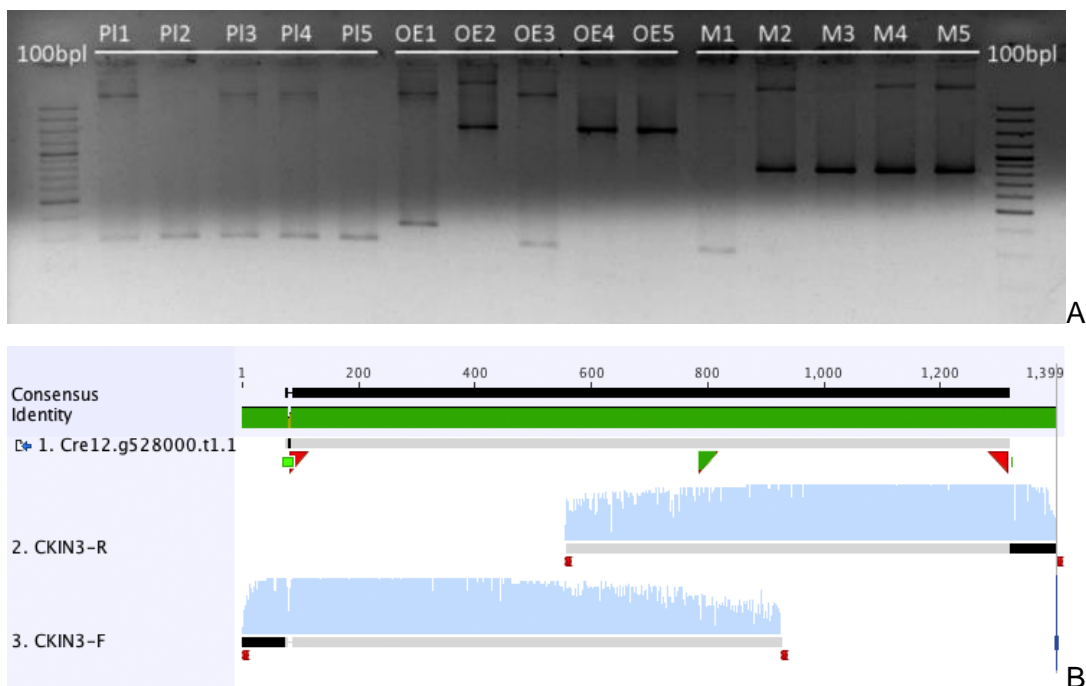


Figura 5. A) PCR sobre los productos de amplificación de las minipreps realizadas sobre colonias transformadas de *E. coli*; en la parte superior de cada calle se indica la colonia de la que procede cada construcción. B) Alineamiento de la secuencia clonada correspondiente a los CDS de *CKIN3* frente a la secuencia disponible en el genoma de *Chlamydomonas* (Cre12.g528000.t1). Triángulos rojos indican la localización de los cebadores CDS CKIN, y verde la localización de CKIN3-MIGS-F.

Tras comprobar que las secuencias de estos vectores eran correctas, se transformaron tres cultivos de *Chlamydomonas*, obteniéndose colonias aisladas tras 7 días de cultivo. De estas, se aislaron 5 colonias potencialmente transformadas con la construcción MIGS y 7 con la construcción OE (Figura 6, A). Se ha tomado material de todas estas colonias para confirmar mediante PCR la presencia de las construcciones de interés en su genoma. cuyos tamaños se indican (Figura 6, B y C). Cada una de las 5 colonias transformadas con la construcción MIGS:CKIN3 han incorporado el inserto (Figura 6, B), observándose para cada una dos bandas, una superior más intensa (a) correspondiente al DNA genómico y otra inferior (b) que corresponde a la secuencia del inserto introducido. En el caso de las colonias transformadas con la construcción de sobreexpresión, todas excepto la 2 y la 4 han incorporado los insertos de interés (Figura 6, C), observándose una doble banda superior (a) que corresponde al DNA genómico con dos alelos y una banda inferior (b) más intensa con el inserto de sobreexpresión.

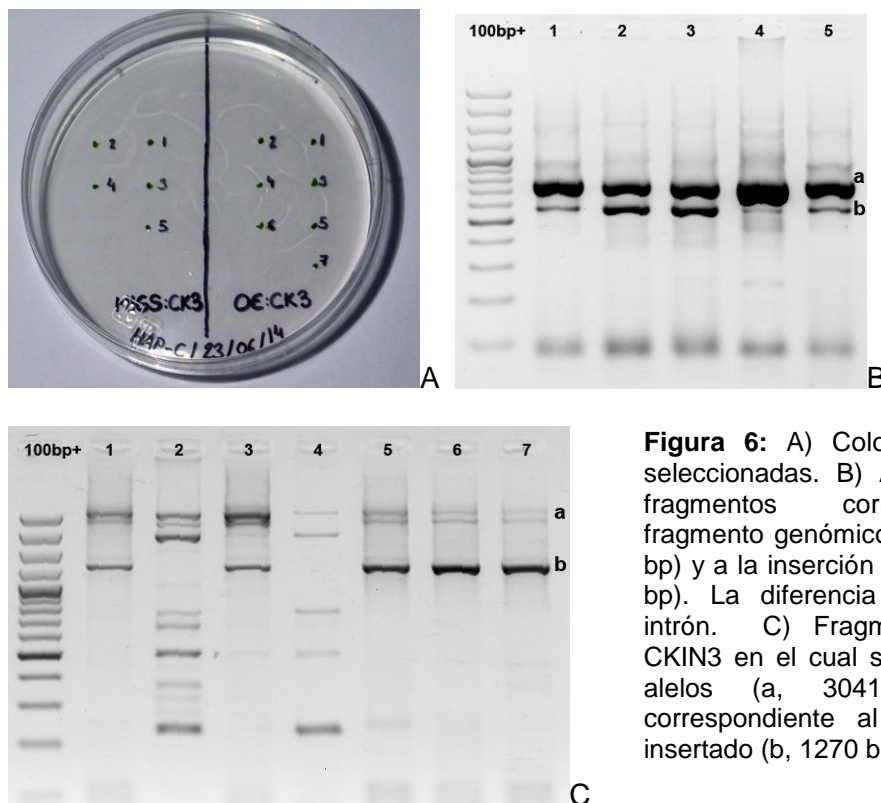


Figura 6: A) Colonias transformantes seleccionadas. B) Amplificación de los fragmentos correspondientes al fragmento genómico equivalente (a, 700 bp) y a la inserción CKIN3-MIGS (b, 530 bp). La diferencia entre ellos es un intrón. C) Fragmento genómico de CKIN3 en el cual se distinguen los dos alelos (a, 3041 bp), y banda correspondiente al CDS de CKIN 3 insertado (b, 1270 bp).

Discusión

El uso de herramientas informáticas ha permitido la identificación de secuencias que forman parte de la familia Snrk en *C. reinhardtii* y que se encuentran potencialmente implicadas en los mecanismos de respuesta al estrés en esta especie gracias a la homología que presentan con secuencias de diferentes Snrk ya identificadas y caracterizadas en *A. thaliana* (Coello et al., 2011). Esta aproximación metodológica ha mostrado ampliamente su eficacia y utilidad, habiéndose usado previamente para la caracterización de, por ejemplo, las familias MAPK en humanos (Matsuda et al., 2007) o bZIP en *Arabidopsis* (Jakoby et al., 2002). Específicamente en esta familia, y en *C. reinhardtii*, existen experiencias previas de búsqueda por homología de secuencias (Gonzalez-Ballester et al., 2008) igualmente a partir de secuencias ya caracterizadas en *A. thaliana*. El empleo de estas secuencias ya caracterizadas, junto con proteínas análogas de otras especies vegetales, y el uso de la última versión del genoma de *C. reinhardtii* sirvieron de base para los estudios de homología presentados en este trabajo. Nuestro estudio concuerda con los trabajos previos (Gonzalez-Ballester et al., 2008), complementándolo de forma significativa aumentando el número de quinasas pertenecientes en la subfamilia 2 [REDACTED]. Esta mejora se ha sido posible debido a la combinación de los estudios de homología de secuencias y de análisis de dominios, principalmente de la secuencia del dominio serin/treonin quinasa definitoria de esta familia (Hanks & Hunter., 1995).

Puesto que la secuencia aislada del dominio catalítico por sí misma no fue suficientemente específica, este estudio se complementó con el empleo de las secuencias proteicas completas de quinasas Snrk identificadas en *A. thaliana*, usando secuencias correspondientes a proteínas y no a genes, dada la menor variabilidad de las mismas. Pese a no tener el mismo objetivo que las búsquedas por homología a nivel de secuencia, el empleo de bases de datos de dominios resultó una eficaz alternativa a la búsqueda por homología. La búsqueda de dominios permitió nuevamente la identificación de las secuencias ya identificadas por homología, además del hallazgo tres secuencias nuevas y la selección y eliminación eficaz de secuencias homólogas a CDPK gracias a la identificación de sus característicos dominios de unión a Calcio. Dado que presentan dominios quinasa homólogos a los de las Snrk, estas secuencias no son diferenciadas por homología.

Frente a la identificación de dominios y la búsqueda por homología realizada, el estudio de la distribución de los intrones dentro de cada secuencia no solo podría permitirnos una aproximación evolutiva sino que también podría permitirnos distinguir entre subfamilias

(Hrabak et al., 2003), si bien esta aproximación es compleja y se ha descartado para este TFM.

[REDACTED]

La existencia de complejos SNF/SKP1/ubiquitin ligasa (Farras et al., 2001) supone otra posible explicación, aunque hasta el momento solo hayan sido localizados en plantas superiores, levaduras y animales y estas quinasas pertenezcan solamente a la subfamilia 1. Estos complejos permiten la intervención de la Snrk 1 en múltiples funciones, además de las descritas inicialmente, como la respuesta a hormonas, azúcares y diferentes estreses, como el causado por bajas temperaturas. Estos complejos podrían suplir en *C. reinhardtii* la falta de elementos de la familia 3.

[REDACTED]

Los datos transcriptómicos han aportado información sobre los perfiles de expresión de las diferentes secuencias ante los tres estreses aplicados. Es destacable ante la ausencia de azufre en el medio el [REDACTED] y las [REDACTED] [REDACTED], que en este último caso ya había sido descrita (Gonzalez-Ballester et al., 2010), así como la disminución en la expresión de secuencias como [REDACTED] que fueron identificadas en el presente trabajo. [REDACTED] presenta un comportamiento análogo, con el aumento de su expresión como consecuencia del estrés por deficiencia de CO₂ y por baja temperatura (Valledor et al., 2013) lo cual pone en evidencia la posible

existencia de similitudes entre las características de ambos estreses y los mecanismos de respuesta frente a ellos. En ambos estreses la disponibilidad de CO₂ disminuye, en el primero por su eliminación controlada, en el segundo probablemente por la disminución de su disponibilidad al desplazarse hacia el ácido carbónico su equilibrio en solución. Esta posibilidad está apoyada por el aumento en los niveles de anhidrasa carbónica en *C. reinhardtii* (Valledor et al., 2013) durante la aplicación de bajas temperaturas que podría indicar una mayor dificultad para la incorporación del carbono presente en el medio.

En la transformación de *C. reinhardtii* se ha optado por la inserción aleatoria de secuencias codificantes de interés en el genoma del alga, (Kindle, 1990) en vez del uso de la mutagénesis insercional (Gonzalez-Ballester, D et al., 2005) y el posterior cribado, como forma de obtener mutantes de interés para cada secuencia. El procedimiento empleado es posible al conocerse la secuencia de interés (*CKIN3*) permitiendo disminuir considerablemente el tiempo y la metodología necesarios. En las construcciones empleadas la secuencia del inserto se acompaña de un promotor que permite altos niveles de expresión así como una secuencia intrónica y el extremo 3'UTR del gen de la RuBisCO permitiendo ambos el correcto procesamiento del transcrito. En los insertos de silenciamiento se ha incorporado además la etiqueta MIGs (de Felippes, 2012) que permite una reducción en los niveles de expresión del gen *CKIN3* endógeno al inducir la degradación de sus transcritos, si bien no se consigue la destrucción de todos los transcritos con lo que la eficacia de este silenciamiento dependerá de la abundancia habitual en la célula de *CKIN3*. En ambos casos la inserción del fragmento es aleatoria variando igualmente el número de copias, esto puede afectar a los niveles de expresión de la construcción dado a que existe la posibilidad de que se inserte en regiones heterocromáticas o bien se produzcan numerosas inserciones que induzcan una inhibición de su expresión o alteren otras secuencias al insertarse en ellas. Los organismos transformados permitirán a través de su estudio fenotípico durante su exposición a estreses concretos la evaluación del papel concreto de *CKIN3* en la gestión de la respuesta ante estos, sin embargo previamente y a pesar de la identificación inicial de los insertos de interés en los transformantes será necesario realizar una mayor caracterización con el objeto de conocer el número de inserciones mediante southern blot, las regiones de inserción en el genoma, las características fenotípicas de los transformantes bajo diferentes condiciones de cultivo y la sobreexpresión y silenciamiento mediante Q-PCR resultando especialmente relevante la confirmación del silenciamiento puesto a que no existen evidencias previas del funcionamiento de la etiqueta MIGs en algas unicelulares como *C. reinhardtii*.

Conclusiones

1. El empleo de una estrategia basada en la búsqueda por homología de secuencias y de dominios ha permitido identificar numerosas secuencias pertenecientes a la familia Snrk en *Chlamydomonas reinhardtii*, siendo esta la descripción más extensa hasta la fecha de esta familia.

2. [REDACTED]

3. La caracterización parcial de los genes identificados mediante la revisión de estudios transcriptómicos ha permitido determinar la expresión diferencial de los mismos bajo distintas situaciones de estrés, posibilitando la asociación a estreses específicos de algunos de los genes recién descubiertos.

4. El empleo del vector pChlamy_4 se muestra como una estrategia efectiva para la transformación de esta especie. La obtención de líneas transformantes para *CKIN3*, objeto del presente trabajo, permitirá la caracterización completa de esta proteína reguladora.

Bibliografía

- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. *The EMBO Journal*. 2001. 20(5):1051–63.
- Alderson, A., Sabelli, P., Dickinson, J. R., et al. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *PNAS*. 1991. 88(19):8602–5.
- Baena-González E. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol Plant*. 2010. 3(2):300-13.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979. 7(6):1513-23.
- Carling, D., Aguan, K., Woods, A., et al. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem*. 1994. 269:11442-11448.
- Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A., et al. Purification and characterisation of the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem*. 1989. 186:129–136.
- Carling, D., Zammit, V. A., Hardie, D. G. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*. 1987. 223:217–222.
- Coello, P., Hey, S. J., & Halford, N. G. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of Experimental Botany*. 2011. 62(3):883–93.
- Dale, S., Wilson, W. A., Edelman, A. M. et al. Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett*. 1995. 361:191–195.
- De Felippes, F.F., Wang, J., & Weigel, D. MIGS: miRNA-induced gene silencing. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*. 2012. 70(3):541–7.
- Farrás, R., Ferrando, A., Ján, Jásik., et al. SKP1–SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J*. 2001. 20(11): 2742–2756.
- Fang, W., Si, Y., Douglass, S., et al. Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO₂-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1. *The Plant Cell*. 2012. 24(5):1876–93.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., et al. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*. 2009. 462:660–664.

- González-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., et al. RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *The Plant Cell*. 2010. 22(6):2058–84.
- Gonzalez-Ballester, D., Pollock, S. V, Pootakham, W., et al. The central role of a SNRK2 kinase in sulfur deprivation responses. *Plant Physiology*. 2008. 147(1):216–27.
- Gonzalez-Ballester, D., de Montaigu, A., Higuer, J. J., et al. Functional Genomics of the Regulation of the NitrateAssimilation Pathway in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*. 2005. 137:522–533.
- Grossman, A. R. In the grip of algal genomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007. 616:54–76.
- Halford, N. G., & Hardie, D. G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology*. 1998. 37(5):735–48.
- Halford, N. G., Bouly, J. P., & Thomas, M. SNF1-related protein kinase (SnRKs)-Regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning In *Plant Protein Kinases*. *Advances in Botanical Research*. 2000. 32:405–428.
- Hamel, L. P., Sheen, J., & Séguin, A. Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in Plant Science*. 2013. 4:1-11.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily : (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 1995. 9:576-596.
- Hardie, D. G., & Carling, D. The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem*. 1997. 246:259–273.
- Hardie, D. G., Carling, D., Sim, A. T. R. The AMP-activated protein kinase—a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci*. 1989. 14:20-23.
- Harper, J. F., Sussman, M. R., Schaller, G. E., et al. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science*. 1991. 252:951–954.
- Harris E.H. *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*: Academic Press; 2009.
- Harris, E.H. *Chlamydomonas as a model organism*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001. 52:363-406.
- Hey, S.J., Byrne, E., & Halford N.G. The interface between metabolic and stress signaling. *Annals of Botany*. 2009. 105(2):197-203.
- Hrabak, E.M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant physiology*. (2003). 132(2):666–680
- Hyams, J., & Davies D.R. The induction and characterisation of cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. *Mut. Res*. 1972; 14: 381-389.
- Jogaiah, S., Govind, R & Tran, L. S. System biology-based approaches towards understanding drought tolerance in food crops. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2012. 33:323-329.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., et al. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 7(3):106-111

- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., et al. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 2005. 44:939–949.
- Kindle, K. L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS.* 1990. 87(3):1228–32.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene.* 2003. 22, 3307–3318.
- Merchant, S. S., Kropat, J., Liu, B., et al. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 2007. 318(5848):245–250.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiology.* 2010. 154(4):1737–52.
- Sarnowski, T. J., Ríos, G., Jasik, Jan., et al. SWI3 Subunits of Putative SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes Play Distinct Roles during Arabidopsis Development. *The Plant Cell.* 2005. 17(9): 2454-72.
- Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., et al. Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *PNAS.* 2007. 104:6460–6465.
- Silva, P. & Gerós, H. Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant Signal Behav.* 2009. 4(8):718-26.
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., et al. Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science.* 1992. 258(5080):287-292
- Toepel, J., Illmer-Kephalides, M., Jaenicke, S., et al. New insights into *Chlamydomonas reinhardtii* hydrogen production processes by combined microarray/RNA-seq transcriptomics. *Plant Biotechnology Journal.* 2013. 1–17.
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., et al. SRK2C. A SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 2004. 101:17306-17311.
- Valledor, L., Furuhashi, T., Hanak, A., et al. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2013. 12(8):2032-47.
- Valledor, L., Escandón, M., Meijón, M., et al. A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. *The plant journal.* 2014. 79(1):173-180.

- Vinocur, B., & Altman, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005. 16(2):123–32.
- Voigt, J., Frank, R., & Wöstemeyer J. The chaotrope-soluble glycoprotein GP1 is a constituent of the insoluble glycoprotein framework of the *Chlamydomonas* cell wall. *FEMS Microbiology Letters*. 2003. 291(2):209–215.
- Waclawovsky, A. J., Sato, P. M., Lembke, C. G., et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal*. 2010. 8(3):263–76.
- Wase, N., Paul, N., Black, P.N., et al. Integrated Quantitative Analysis of Nitrogen Stress Response in *Chlamydomonas reinhardtii* Using Metabolite and Protein Profiling. *J. Proteome Res.* 2014. 13(3):1373–1396.
- Zhang, X. S., & Choi, J.H. Molecular evolution of calmodulin- like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J. Mol. Evol.* 2001. 53:214–224.

Anexo

Tabla S1: Secuencias de *A. thaliana* empleadas como referencia en la búsqueda por homología de secuencias de *C. reinhardtii* se indica el nombre dado a cada quinasa así como el identificador de referencia del mismo.

Nombre	Referencia	Nombre	Referencia	Nombre	Referencia
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]