



PAPEL DE LAS CASCADAS
DE LAS MAPKs
(*Mitogen Activated Protein Kinases*)
EN LA TRANSDUCCIÓN DE
SEÑALES DE ESTRÉS
AMBIENTAL EN
MACRÓFITOS
INTERMAREALES
Y ÁRTICOS

María López Parages
Tesis Doctoral
Septiembre 2012

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA




Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias
Departamento de
Ecología y Geología



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María López Parages

 <http://orcid.org/0000-0001-8294-6657>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización

pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)**

Tesis Doctoral

**Papel de las cascadas MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*)
en la transducción de señales de estrés ambiental en macrófitos
intermareales y árticos**

Director:

Carlos Jiménez Gámez
Catedrático de Ecología
Departamento de Ecología y Geología

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Departamento de Ecología y Geología
(Área de Ecología)
Málaga 2012



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



TRIBUNAL EVALUADOR

Presidente

Prof. Dr. F. Xavier Niell Castanera
Catedrático de Ecología
Departamento de Ecología y Geología
Universidad de Málaga

Secretario

Prof. Dr. Jose A. Fernández García
Catedrático de Fisiología Vegetal
Departamento de Biología Vegetal
Universidad de Málaga

Vocales

Prof. Dra. M^a Consolación Fernández González
Catedrática de Ecología
Departamento de Biología de Organismos y Sistemas
Universidad de Oviedo

Dr. Kai Bischof
Department of Marine Botany
University of Bremen

Dr. Benjamín Viñegla Pérez
Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología
Universidad de Jaén

Suplentes

Prof. Dr. Félix López Figueroa
Catedrático de Ecología
Departamento de Ecología y Geología
Universidad de Málaga

Dra. Sandra Heinrich
Department of Seaweed Ecology
Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI)
Bremerhaven

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

(Área de Ecología)

Visado en Málaga, Junio de 2012

El director

Fdo: Prof.Dr. Carlos Jiménez Gámez
Catedrático de Ecología
Universidad de Málaga

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Fdo: María López Parages

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)

La presente memoria: “PAPEL DE LAS CASCADAS MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE ESTRÉS AMBIENTAL EN MACRÓFITOS INTERMAREALES Y ÁRTICOS” presentada por D^a María López Parages para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Dr. CARLOS JIMÉNEZ GÁMEZ, Catedrático de Ecología de la Universidad de Málaga, quien suscribe y autoriza su presentación:

Fdo: Prof.Dr. Carlos Jiménez Gámez

Málaga, Junio 2012



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)

D. CARLOS JIMÉNEZ GÁMEZ, Director del Departamento de Ecología y Geología, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Málaga,

CERTIFICO:

Que el trabajo de investigación **“Papel de las cascadas MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) en la transducción de señales de estrés ambiental en macrófitos intermareales y árticos”**, llevada a cabo por D^a María López Parages, ha sido realizada en este Departamento.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Fdo: D. Carlos Jiménez Gámez
Málaga, Junio 2012

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas”*

(Mario Benedetti)

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de investigación CGL2005-01071/BOS del desaparecido Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y actual Ministerio de Economía y Competitividad, el proyecto ARCFAC026129-2009-147 del European Centre for Arctic Environmental Research in Ny-Ålesund (ARCFAC V) formando parte del Proyecto KOL 06 (Biology of Arctic benthic algae) del Alfred Wegener Institute-AWI de Bremerhaven, Alemania y por el “Grupo de Investigación de Ecología de Sistemas Acuáticos (P.A.I. RNM0176), del Departamento de Ecología y Geología de la Universidad de Málaga, incluido en el Plan Andaluz de Investigación (P.A.I.)”.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo nunca hubiese sido posible sin la colaboración, comprensión y apoyo de muchas personas. Me gustaría agradecer con estas palabras a todas aquellas que en algún momento se cruzaron en mi vida, ayudándome a crecer como persona y científica. A todas vosotras: gracias

Gracias en primer lugar a mi director de Tesis, Carlos Jiménez Gámez por darme la oportunidad de experimentar, de trabajar en lugares únicos y espectaculares, por aconsejarme, saber escuchar mis propuestas y saber convencerme, cuando no siendo tarea fácil, era necesario. Ha sido tanto lo que he aprendido al trabajar contigo....muchas gracias Jefe.

Gracias al Prof. Julio M. Azcurra y Juan M. Capasso, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por aceptarme en su laboratorio y facilitarme el trabajo. Fueron muchas y muy buenas las conversaciones sobre ciencia que se tuvieron en ese laboratorio de Biología Celular....

De todo corazón, gracias al Prof. Christian Wiencke, por abrirme su laboratorio, ayudarme en todo y hacerme sentir una más del grupo. Sin su ayuda nunca hubiese trabajado en el AWI ni en el Marine Lab, y no hubiese podido compartir momentos tan especiales con investigadores tan buenos. Jamás pensé recibir tanto calor en un lugar tan frío...y siempre con esa dulce sonrisa.....Sin duda, los más grandes son los más humildes.

Al departamento de Ecología y Geología de la Universidad de Málaga al completo, gracias. En todos vosotr@s siempre he encontrado amabilidad, respeto y un trato excelente. Sé que no es necesario nombraros, tod@s vosotr@s perfectamente sabéis la ayuda y el apoyo que me ofrecéis día a día cuando resolvéis mis dudas y cuando en ocasiones me “adoptáis” científicamente. Sois tantas las personas a las que admiro en este departamento, que únicamente puedo decir: Muchas gracias.

Gracias a tod@s los colegas que gracias a la ciencia se han cruzado en mi camino... Mariano, Mr. Western “sos un genio” y lo sabes, espero que Boston se entere de lo que vales!; Delfi mil gracias por todo, por tu ayuda, risas y esas *Quilmes* en Plaza Serrano. Sandra, gracias por dejarme trabajar contigo “codo con codo”, eres espectacular, no sé como se puede tener tanta energía y tanta fuerza, has sido un gran apoyo en esta aventura “*chica loca*”... al final todo se consigue...y si no: ¡*Schwund ist überall!* Desi, Mirko, Roi, Jon, Sonja, Sofía y Luisa....¿que puedo decir de vosotros? cada uno nos hemos conocido de manera diferente, y hemos compartido momentos únicos, habéis sido mis “grandes amigos” en mi aventura alemana, ¡os necesitaba tanto allí! Lo mejor de todo es que, como una gran amiga me dijo, “todo fluye”, lo sé y no me equivoco: sois amigos para toda la vida, ¡os adoro!

Muchas gracias al grupo de buceo del Instituto Alfred Wegener (AWI) encabezado por Max Schwanitz por la recolección de las algas, y a todo el personal de Kings Bay (Ny-Ålesund, Svalbard) por facilitarme el trabajo y por toda la ayuda prestada.

A Concha y a Malen ¡gracias por TODO! Siempre, me habéis ayudado, fuese lo que fuese lo que necesitara, ¡ay..... cuánto valéis! A tod@s mis compañer@s “de batalla” y habitantes de esa “sala de becari@s”, gracias. Día a día, desde los que partieron hasta los que siguen llegando, en las épocas buenas y en las no tan buenas sois tod@s capaces de aportar magníficas ideas y sobre todo trasmitirme una fuerza enorme para continuar en la brecha. Armando, Helen, Roberto, M^a Ángeles, Rocío, Mayte, María, Sonia, Pablo, Laura, Bea, Eu, Cris, Irene, me siento afortunada de haber compartido tantas horas con vosotr@s. Charo, Rakelita, Conchi y Celia..de una u otra forma sois las “peques”, jese airecito fresco y esa carga de pilas que tanto se necesita! Miriam, Rosa y Candela, sois mis amigas, os echaré mucho de menos, todas magníficas investigadoras y “currantas” natas, desde luego: ¡Que grandes mujeres tiene este Departamento de Ecología! Tere, Gema, Mar y Vito, fuimos y somos un equipo, cuando las cosas pintaban chungas ahí hemos estado, buscando soluciones y “entrando de nuevo a por la siguiente muestra”...¡gracias por tantos buenos momentos!

A todos los profesionales del SCAI, mi más sincero agradecimiento. Son muchos los favores que me habéis hecho, y siempre con una sonrisa. Gracias.

Gracias a mis niñas, Ana (diseñadora de esta magnífica portada...), Sara, Maca, Nadia (y ahora Berta) y Sarita, creo firmemente que los inicios marcan, y que la infancia es una etapa mágica. Son muchos los años que llevamos “creciendo” juntas, andando, tropezando y como no, continuando. Para mí, sois fundamentales. Tener algo capaz de hacernos desconectar y a la vez conectarnos con la realidad desde otros ámbitos es necesario, por suerte yo os tengo a vosotras. ¡Os adoro! A Mar, Rakel, Ali, Sue, Eva, Rosa y Nuri, sois mi válvula de escape, especialmente tú Nuria, has sido mi apoyo más cercano, durante estos años de Tesis, diariamente hemos compartido muchas cosas, gracias de corazón por todo y, sobre todo, por esas palabras que tanto he necesitado. Todas sois capaces de animarme cuando la situación lo requiere y de dejar que os anime, cuando es lo que necesito. Un vez más....Sólo puedo decir: ¡salud!

A Guti, gracias por hoy, por esta mañana y por la de mañana, por tener la oportunidad de compartir mi vida con alguien tan especial, una persona bondadosa, tan trabajadora y con tantas ambiciones, que me valora y respeta como nadie. Nunca pensé estar dedicándote estas líneas y ahora no podría pensar en nadie más. ¡Qué maravilloso resulta lo inesperado! Te amo.

A mi familia. De nuevo, os he dejado para el final, porque el final es lo que queda y permanece. Os lo debo TODO, siempre generosos conmigo, sin vosotros no sería yo y sin duda no habría llegado hasta aquí. A mis padres Miguel y M^a José, todo un ejemplo a seguir, excelentes personas y profesionales, cariñosos y humildes, os quiero con locura. A Jorge y a Lucía, gracias de corazón, ¡ay hermanito! si supieras todo lo que aprendo contigo y todo ese cariño que de manera tan silenciosa y disimulada, me haces llegar cada día. A mi Abuelo, a Cris, Cohy, Ángel, Marina y Paula, gracias por ser comprensivos con mí ritmo de vida y por aceptar este frenético y descontrolado horario. A tod@s gracias, por hacerme cada día un poquito mejor persona y por hacerlo tan bien. A tod@s, os quiero y mucho.

A mi familia

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Summary	3
Introducción General	27
Justificación del Trabajo. Hipótesis y Objetivos	
Capítulo I. Un novedoso método de extracción de fosfoproteínas en macroalgas	71
Capítulo II. Fosforilación de proteínas tipo-MAPKs en macrófitos intermareales en respuesta a estrés ambiental	97
Capítulo III. Fosforilación de proteínas tipo-MAPKs en respuesta a aumento de temperatura y radiación UV en dos especies de Laminariales árticas	129
Discusión General	155
Conclusions	193
Conclusiones	197
Bibliografía	201

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



SUMMARY



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Introduction

Environmental stress: concept, mechanisms of abiotic stress, and environmental stressors

Normally, stress factors, whether of an abiotic or biotic nature, don't act independently; quite often they interact producing combined impacts, with significant effects on the distribution of the species and the functioning of the ecosystems (Breitburg et al. 1998, Frost et al. 1999, Schindler 2001). In this way, when it comes to studying the possible responses, it is crucial to determine if a set of stressors act in an antagonistic, synergistic or additive way, and what outcome may have the possible combined impact.

But, what do we consider stress? It is obvious to define the concept in terms of the response experienced by an individual, rather than the value of an environmental variable in particular. Thus, Grime in 1989 defined stress as “the external constraints limiting resource acquisition, growth or reproduction of organisms”. Other authors talk about “stressor” or “stressor factor” as “the variable either type biotic or abiotic (e.g., the introduction of exotic species) that goes beyond its normal variation range and which negatively affects the individual physiological performance of the population in a statistically significant way” (Barrett et al. 1976, Auerbach 1981). Thus, we could define it as the impact of any set of abiotic and biotic factors negatively affecting the performance individually, and eventually deteriorating the growth rate of the population through the reduction of individual survival, growth and reproduction (Grime 1989, Vinebrooke et al. 2004, Auerbach 1981).

According to Davison & Pearson (1996), we can differentiate between: non-stressful, limiting and disruptive factors. The first, "non-stressful factors", are those that don't affect in any way neither the survival, growth, or reproduction, nor individual or collective, of the population. "Limiting factors" include, for example, situations of low

irradiance, insufficient levels of nutrients, etc. In these cases the physiological response is limited. Finally, the "disruptive factors" are responsible for cellular damage caused by adverse conditions and are responsible for triggering the necessary mechanisms for preventing or repairing the cellular damage (for example, the response to desiccation, freezing, etc.). We must be aware that the classification of the stressors has been made according to the response that they promote at the individual, species or population level, and not from the values of the environmental variables themselves.

Intertidal organisms are regularly exposed to the air, experiencing a variety of environmental fluctuations potentially stressful, such as limitation of nutrients, high irradiance (PAR and UVR), high or low temperature, freezing, drying and osmotic stress. Except in the cases of damage and lethal effects associated with extreme environmental conditions, it is very difficult to assess the incidence and severity of the stress produced in natural populations. At organism level, the effect of the stress is normally perceived as a reduction in photosynthesis and growth, and it is associated with an alteration in the metabolism of carbon and nitrogen (Cornic & Massacci 1996, Mwanamwenge et al. 1999). The response of the plant is very complex, reflecting in space and time the integration of the underlying responses at all levels of organization (Blum 1996).

The main difference between desiccation-tolerant and desiccation-susceptible species is the extent at which the photosynthesis recovers once algae are submersed again in water after air exposure. All organisms react to external changes; if it's a type of change that happens often, the response acquires an adaptive character under natural selection (Margalef 2005). In a considered stressful environment, a variety of stressors may act. Due to all the above mentioned, it is necessary to understand the nature and the influence of stressors in an individualized manner, as well as the effects of their possible combinations. The implementation of currently available tools such as molecular biology and cellular biology could increase our understanding of the pathways involved.



***Mitogen Activated Protein Kinases. Role of MAPKs in the signalling stress response.
Structure of the cascades, components and pathways of the MAPKs.***

All living organisms, including plants, must be able to perceive the stimuli and external cellular signals and, consequently, to develop appropriate cellular responses that enable them to survive against environmental changes. Macroalgae, as well as vascular plants, are often exposed to changes in environmental conditions. To survive, they have developed a complex network of biochemical signals that allow them to perceive environmental changes and respond to them. This process leads to two exclusive possibilities, either the cells adapt to the new conditions, or they enter in a process leading to cell death. In general, external information is transmitted to the cell nucleus through a series of phosphorylations and dephosphorylations of certain proteins (kinases), which induce the activation or deactivation of specific genes (Kyriakis & Avruch 2001). There are increasing evidences showing that when the plants have to deal with a situation of stress, a complex network of phosphorylations and dephosphorylations of specific proteins called "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPKs) is activated.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are ubiquitous and highly conserved serine/threonine kinases, which have been extensively studied in organisms from yeast to humans as transducers of extracellular signals in a variety of cytoplasmic and nuclear events. Animals have three well-characterized MAPK cascades that participate in cellular responses to a wide variety of stress and cell division signals. These cascades consist of a series of protein kinases that are phosphorylated and activated in a sequential way, associated with the downstream protein kinase. In animals, the p38 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) cascades are responsible for stress adaptation, whereas the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade is involved in mitogenic stimuli and differentiation (Widmann et al. 1999). MAPKs may also be involved in the signal transduction of several environmental factors in plants (Hirt 1997, Tena & Renaudin 1998). These proteins participate in the response to a wide range of



extracellular stimuli, such as growth factors, drought, UV radiation, osmotic changes, temperature stress, etc., and are involved in the operation of several cell programs, such as cell proliferation, movement and cell death. MAPKs are ubiquitous (Jonak et al. 1999), and their sequences are very conservative, with serine/threonine residues in the active core (Kyriakis & Avruch 2001). These MAPKs, together with their activators (the so-called MAPK kinases - MAPKK and MAPK kinases kinases - MAPKKK) form a cascade. The organization of this functional unit or canonic tri-module is mediated by scaffolding proteins (Pawson & Scott 1997), which preserve the efficiency and selectivity of MAPK pathways by binding pathway components, thus maintaining pathway integrity and permitting the coordinated activation of MAPK components in response to specific stimuli.

All eukaryotic cells possess multiple MAPK pathways; to date, five distinct groups of MAPKs have been characterized in vertebrates: extracellular signal-regulated kinases (ERKs) 1 and 2; c-Jun amino-terminal kinases (JNKs) 1, 2, and 3; p38 isoforms α , β , γ , and δ ; ERKs 3 and 4; and ERK5, while the complete genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* indicates that six different MAPKs exist in these organisms. The most extensively studied groups of vertebrate MAPKs are the ERK1/2, JNKs, and p38 kinases, and in yeast the HOG-1 cascade (similar of the p38 of vertebrates) (Widmann et al. 1999). The Jun kinases were identified by their ability to specifically phosphorylate the transcription factor c-jun, mediating transcription of specific genes following exposure to ultraviolet radiation, proinflammatory cytokines and environmental stress. The p38 MAPKs are activated in response to endotoxin from Gram-negative bacteria, interleukin-1 and hyperosmolar stress, while the ERK cascade is solely involved in mitogenic stimuli and differentiation (Widmann et al. 1999). Therefore, among the members of the MAPK family, the mitogens and growth factors frequently activated the ERK1/2 route, while stress and inflammatory processes constitute the main trigger for the SAPK-JNK (Stress-Activated Protein Kinases, c-Jun N-terminal Kinases) and p38 cascades, sometimes referred to as "stress-activated protein kinases".

MAPKs in plants. Role of the MAPK cascades in stress signal transduction

Plants share with the rest of eukaryotes, and with certain prokaryotes, the ability to respond to a stressful situation. This response is generally mediated by the presence of cell signalling pathways. As it has been aforementioned, the signal transduction within the pathway is coordinated with the help of scaffold proteins that organize the kinases into protein complexes in whose core are the MAP kinases. The scaffold proteins, together with the MAPK and their upstream activators are organized into modules or functional units (Krauss 2008). It has been extensively described that in animal cells and in yeast these stress mechanisms involve the activation of a well-regulated signalling network, in which the central role is played by a specific group of cytoplasmic phosphoproteins called MAP kinases (Mitogen Activated Protein Kinases). In the last years the study of these pathways in plants has increased, and research on the functions of these components in plants has revealed that the MAPKs play a crucial role in the response to a vast variety of stressful stimuli, most of plant hormones, as well as various development processes. More recent studies have also demonstrated the presence of the MAPKs signalling cascades in other vascular plants such as *Arabidopsis*, tobacco or rice (Nakagami et al. 2005). However, while the three main subfamilies of the MAPKs are present in animal cells (ERK, JNK and p38), in plants all the coding genes for these kinases just belong to the ERK subfamily (Zhang et al. 2006).

More than 23 complete cDNAs of MAPK sequences have been obtained from a variety of plant species. Nine genes of *Arabidopsis*, 5 of tobacco, 4 of alfalfa and a single gene of pea, parsley and petunia have sequenced, as well as two representatives of individual species of monocotyledons such as oats and wheat. The bioinformatic analysis of the complete sequences of amino acids in the MAPKs of these plants showed a conserved structure, with similarity values ranging from 50 to 98 %.

To date, only a few components of the cascades of the MAPKs have been studied

in plants. The *Arabidopsis* genome contains about 110 genes coding for putative MAPK pathway components: 20 MAPKs, 10 MAPKKs and more than 80 MAPKKKs. But, so far, just a few MAPK cascade components have been studied in detail in plants, and only eight of the twenty MAPKs have been studied to various degrees (for review, see Nakagami et al. 2005). The best characterized plant MAPKs are MPK3, MPK4 and MPK6, all of which are activated by different stimuli including abiotic stresses, pathogens and oxidative stress. While MPK4 negatively regulates biotic stress signalling, MPK3 and MPK6 act as positive mediators in defence responses. In turn, tobacco has two MAPKs, SIPK and Ntf4 (MAPK Group 2002). The SIPK is mainly implicated in signalling various plant defence responses, with one specific role in the regulation of ethylene production in plants under stress (Kim et al. 2003, Liu & Zhang 2004). As mentioned, up to date, the variety of genes encoding MAPKs that have been identified in plants (e.g. alfalfa, *Arabidopsis*, parsley, pea, petunia, and tobacco), and all amino acid sequences of the presently known plant homologues, are most similar to ERK. ERK-like plant MAPK have been further divided into at least four distinct subgroups (Machida et al 1997, Ligterink 2000, Nakagami et al. 2005, Zhang et al. 2006). Subgroups I and II seem to be involved in environmental and hormonal response, while, according to Bögre et al. (1999, 2000), at least some of the MAPKs of subgroup III are involved in cell cycle regulation.

Most authors, according to the analysis of phylogeny and structural analysis of protein sequences, consider that all known plants MAPKs are most similar to ERKs (Yu and Tang 2004, Pitzschke et al. 2009), therefore, they have been named as plant extracellular-signal regulated kinases (PERK). Based on this phylogenetic analysis, it has suggested that the common ancestor of plant MAPKs was separated before the lineages of the SAPK of animals, and that the p38 evolved as a different subgroup.

Plants in general and algae in particular can survive in a permanently changing environment thanks to a complex metabolic network, through which they detect the stress signals ending in the appropriate response to adapt to the new conditions. Sensing



of stress signals and their transduction into appropriate responses are crucial for adaptation and survival of intertidal macrophytes. These response mechanisms to stress must be rapid as well as perfectly regulated in order they could sense the changes and survive; if not, they will die during the periods of low tides.

The presence of MAP kinase-like pathway components in algae has been previously described by Jiménez et al. (2004, 2007). These studies revealed that the microalga *Dunaliella viridis* possesses a 57-kDa protein (detected by cross-reactivity with mammalian p38 MAP kinase antibody and even more robustly with the antibody against the yeast homologue, HOG1), which is induced in response to increasing tonicity. Furthermore, exposure of *D. viridis* to hypertonicity was rapidly followed by phosphorylation of this 57-kDa protein, which was detected by a highly specific antibody raised against the phospho-p38 MAP kinase motif (T*GY*). In this study, the possibility that JNKs were also activated in *Dunaliella* by environmental stresses was also explored. In fact, a pattern of three protein bands similar to those found in mouse inner medullary collecting duct cells (Berl et al. 1997) using a highly specific antibody raised against the phospho JNK motif (T*PY*) could be detected. Finally, the presence of ERK1/2 in *D. viridis* was also detected, and their role in cell division control was stated. In addition, partial cloning of both ERK1/2 MAPKs indicated a high degree of homology with other previously described ERK1/2 from a wide variety of animal cells (Jiménez et al. 2007). Data also showed that specific inhibitors of the activity of these enzymes have deleterious effects on the ability of the algae to overcome hyperosmotic stress, or even impaired cell division (ERK inhibitor), thereby revealing their critical role in adaptation and survival of *Dunaliella* under such environmental conditions.

The intertidal system

The intertidal ecosystem is an extremely variable system, in which the meaning of the periodicity of the tides is different for the organisms according to the level in which they are located. It is a hostile environment, where organisms are stressed, although very well adapted to those conditions. The intertidal species have biochemical mechanisms that allow them to survive in these highly stressful conditions. The combination of environmental severity with the frequency of fluctuations govern the behavior of the system and select survival strategies.

The marine organisms that live in intertidal or shallow habitats are regularly exposed to strong water movement and are subjected to extreme fluctuations of temperature, radiation, pH, salinity, etc. The ability to withstand the emersion is a factor that determines if algae can or cannot inhabit the intertidal zone. Algae of the sublittoral zone are excluded due to their limited resistance to desiccation and freezing, in comparison with the intertidal species.

The Arctic coastal ecosystem

It is widely accepted that the Arctic is one of the regions of the world where changes in climate, hydrology and ecology, related to global warming are going to be more pronounced. We can observe that temperature rise as well as reduction of sea ice in the Arctic, together with the increased levels of atmospheric CO₂ on a global scale, are happening faster than expected (Stroeve et al. 2007). If there is an important feature of the current global change and its activity on the Arctic ecosystem is the speed at which it is taking place; for this reason, there is great concern for how these changes will affect the Arctic aquatic environment. As changes occur, the new conditions shall foster a few species more than others. If these changes persist, it is expected the alteration in the composition of species of the communities, and therefore also the trophic webs,



determining new structural patterns of flow of C in the ecosystem (Gordillo et al. 2006, Li et al. 2009). In addition, the amplitude of these fluctuations is greater than to climatic changes expected for the next few decades (Thomsen & Melzner 2010).

UV radiation is a source of potential stress for the majority of the organisms of polar systems (Bischof et al. 2006). These effects are more pronounced in Antarctica (Solomon et al. 2007), however, in recent years it has been developed a hole in the ozone layer in the Arctic (Manney et al. 2011), by which ultraviolet radiation (UVR) could adversely affect marine organisms in this region, reducing its production or even triggering changes in the structure of the communities. In addition, the Arctic is the region of the world in which a largest increase in temperature is expected (Zacher et al. 2011).

Recently, the sessile macrophytes (one of the type of affected aquatic organisms) have captured the attention of several research groups. The patterns of zonation in depth have been studied, as well as basic nutritional, photosynthetic characteristics and growth at temperatures near the freezing point (Gómez et al. 2011). In addition, structural and functional strategies allow polar algae to survive over long periods in darkness, as well as facing with excess light and limitation of nutrients in summer (Wiencke et al. 2011), and some of the effects of UVR.

Therefore, polar regions are very severe systems where the organisms have developed unique adaptation and acclimatization strategies, different to those already described for algae from temperate latitudes.

Chapter I: A novel method for phosphoprotein extraction from macroalgae

The extraction of proteins from macroalgae is a general problem because of their high internal levels of polysaccharides and polyphenols. Protein extraction from macroalgae has evolved from early methods, which involved the grinding of the thalli, either deep-frozen or not, in cold phosphate buffer, 0.1 M pH 6.5, followed by a medium-speed centrifugation step ($19,000 \times g$) at 4 °C, with further protein concentration and determination in the supernatant. Samples were then prepared for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Laemmli 1970) after denaturalization with SDS and β -mercaptoethanol.

However, the success of these methods was highly dependent on the particular algal group. Protein kinases are a group of key regulatory enzymes of cell functions, which modify the chemical structure of other proteins through the addition of phosphate groups. This phosphorylation results in structural and functional changes in the proteins that modify their activity level, subcellular localization or both and thus elicit other downstream metabolic processes. More than 500 protein kinases have been described, and they are particularly important in cell signal transduction from receptors to gene activation. In most cases, phosphorylation implies the transfer of the γ -phosphoryl group from a donor ATP molecule to any of the three canonic amino acids with free hydroxyl radicals: threonine, serine or tyrosine.

In previous reports, Jiménez et al. (2004, 2007) described the presence of MAPK components of the three above-mentioned pathways in the unicellular microalga *Dunaliella viridis* Teodoresco. In these studies, protein extraction was performed as described by Capasso et al. (2001a) for mammalian cell cultures. However, the method proved to be extremely inefficient for the extraction of MAP kinases from macroalgae.

In this chapter it is described a novel method that yields high quality protein extracts from macroalgae, which allows detection of the actual phosphorylation state of MAP kinases. The method is based on the ability of some commercial kits to selectively bind RNA, allowing the separation of protein extracts that are appropriate for further protein characterization. The method has been successfully applied for the extraction of phosphorylated MAPKs in macroalgae belonging to all three main groups of seaweeds: chlorophytes, rhodophytes and heterokontophytes.

Several macroalgal species belonging to the chlorophytes (*Ulva rigida* C. Agardh and *Ulva compressa* Linnaeus), heterokontophytes (*Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss and *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux) and rhodophytes (*Corallina elongata* J. Ellis et Sollander and *Jania rubens* (Linnaeus) J.V. Lamouroux) were collected from different intertidal systems in Southern Spain. The red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia was a gift from Prof. M. Pedersén of Uppsala University (Sweden).

Macrophytes were cleaned of epiphytes and cultivated for three days in filtered seawater enriched with half-strength Provasoli (1968) medium. For each sample, 4-5 g of material was placed in 1 L transparent polycarbonate cylinders containing the medium, under continuous air bubbling. Thalli were kept for 3-4 days for acclimation. After the acclimation period, thalli of each species were exposed to high irradiance (500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) for 30 min, rapidly frozen in liquid N_2 and stored at -80°C until further analysis.

In this chapter, several methods for protein extraction from macroalgae were tested. The first was proposed by Hadlung et al. (1992) for *Gracilaria tenuistipitata* CF Chang et BM Xia. However, no signal was obtained in the Western blot analysis (Figure 1, Chapter I).

As previous works on MAPKs in algae (Jiménez et al. 2004, 2007) involved the single-celled Chlorophyte *Dunaliella viridis*, this research was focused on macroalgae of the same group, such as *Ulva rigida* and *U. compressa*. For microalgae, the procedure described by Wojtaszek et al. (1998) and Capasso et al. (2001a) for mammalian cells was used. Again, this method was very inefficient to obtain some good protein extracts. As shown in Figure 2 (Chapter I), very faint protein bands were present in the gels, which indicated that either an efficient protein extraction was not performed or that the proteins did not properly enter the separation gel because of interactions with other macromolecules.

The results after application of the two methods described previously indicated that most of the proteins might be bound to polyphenols and polysaccharides and perhaps to RNA, which has density and binding properties similar to those of polyphenols and polysaccharides. As the goal was to release the proteins from any component that might interfere with its separation by PAGE and to preserve their phosphorylation state, we introduced a further modification to the previously described method by changing the extraction procedure. TRIzol is a well-known reagent for preparing high quality, intact RNA. The use of TRIzol necessitates further phase separation, which is performed by the addition chloroform and precipitation of the proteins in the aqueous phase with isopropanol. No satisfactory results were achieved for macroalgae when TRIzol was used, as demonstrated by Coomassie blue staining after PAGE (Figure 3, Chapter I), although a normal protein pattern was clearly visible in *Dunaliella* samples, used as control.

The use of TRIzol was not fully abandoned at this point, and another precipitation step, either with acetone or methanol, was introduced after extraction of the proteins with TRIzol. In addition, glycine was replaced by tricine in the electrophoresis gel buffers to obtain a sharper definition of protein bands and better detection of small MW proteins. As shown (Figure 4 A, Chapter I), acetone precipitation did not improve the protein pattern in *Ulva rigida*. However, methanol precipitation greatly increased the

number of bands detected by PAGE in this species. Nevertheless, results with this method applied to other taxa were not satisfactory, particularly for heterokontophytes (Figure 4B, Chapter I). In addition, immunodetection using specific antibodies against the phosphorylated forms of the p-38 and JNK MAPKs was still poor (Figure 4C, Chapter I).

After this improvement, it was introduced the use of a cryogenic mill. TRIzol was discarded, and was introduced the use of commercial kits designed for RNA purification, namely Qiagen RNeasy Mini Kit for total RNA and Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. These kits are designed to selectively retain RNA in a silica membrane, and they contain guanidine (as TRIzol). As it was needed to effectively separate proteins from the rest of the soluble compounds in the extracts, it was used this ability to separate proteins from RNA, which were discarded. The RNeasy Mini Kit did not produce good quality protein extracts, but the specific Plant Mini Kit gave much better preparations than all other methods tested. The specific Plant Mini Kit includes two different selective columns, the QIAshredder spin column for homogenizing and filtering viscous plant lysates, and the RNeasy spin column for purifying up to 100 μ g of RNA using silica membranes.

Once the presence of phosphorylated MAPK-like proteins in the macroalgae was confirmed, it was tested both the RLT and RLC extraction buffers included in the commercial kit. The main difference between the two buffers resides in the guanidine salt; the RLT buffer contains guanidine thiocyanate, whereas RLC contains guanidine hydrochloride. As shown in Figure 7 (Chapter I), RLT buffer performed much better than RLC, thus RLT was chosen for the extraction method.

In conclusion, high-quality protein extracts, including phosphoproteins, were obtained from all groups of macroalgae using this new method proposed in this chapter. This method may prove to be useful in the study of macroalgal genomes in the dynamic of phosphoproteins.

Chapter II: Intertidal macrophytes phosphorylate MAPK-like proteins in response to environmental stress

Algal growth, development and production are crucially affected by changes in temperature, humidity, salinity, irradiance (both PAR and UV) as well as nutrient availability. Among algal communities, intertidal macrophytes are permanently exposed to a highly fluctuating and stressing environment. In addition, intertidal systems are very variable, and are divided in different zones according to the degree of exposure to the air. It is a very harsh environment in which organisms have to be very well adapted to the severe conditions. Then, natural selection has pushed intertidal macrophytes to the acquisition of defence mechanisms to face dehydration, high irradiation, high UV, etc.

In this chapter, it was developed a new procedure to detect the presence of MAPK homologues in several species of macrophytes of the Chlorophytes, Rhodophytes and Heterokontophytes (Chapter I). According to previous results, it was hypothesized that intertidal macrophytes might cyclically phosphorylate and de-phosphorylate p38-like and c-Jun-like MAP kinases in response to tidal movements and changing irradiance. In this work it has been demonstrated the presence of homologues of the p38 and JNK MAPK cascades in the intertidal macrophytes *Ulva rigida*, *Chaetomorpha aerea*, *Dictyota dichotoma*, *Dilophus spiralis*, *Jania rubens* and *Corallina elongata*, and it was shown the phosphorylation/dephosphorylation of several kinases, recognized by highly specific antibodies rose against the phosphorylated forms of the MAPKs, in response to environmental stress imposed at low tide and high irradiance.

The selected algae were collected from the intertidal system of Punta Carnero (Algeciras, Strait of Gibraltar, Southern Spain). On the shores bordering Mediterranean and Atlantic coasts, tides are semidiurnal, then a tidal semiperiod lasts between 6 and 7 hours. In the area of the Strait of Gibraltar, tide amplitude is around 1 m, which gives an idea about the long emersion periods tolerated by the macrophytes.

Frozen thalli were ground by using a Retsch MM400 mixer mill and the proteins were extracted following the method presented in Chapter I. Dot blots were carried out by means of a Schleider and Schnell Dot Blot equipment. PVDF membranes were pre-wet with 100% methanol for 15 s, and washed with ddH₂O for 5 min. Then they were kept for 3-5 min in PBS 1X, after which 200 µl of each protein extract containing 200 µg of protein were loaded in the wells. A vacuum pressure of 400 mbar was applied, and then the membranes were blocked and treated as in any western blot. Gel electrophoresis, immunoblot and phosphorylated MAPKs detection were also performed according to Chapter I. Radiation data were collected by means of a multifilter NILU UV-6 radiometer.

The first step in this research was to determine the presence of MAPK-like proteins in selected intertidal macrophytes from the working area. For this purpose, dot blots of protein extracts of *C. elongata*, *D. dichotoma*, *D. spiralis*, *U. compressa*, *J. rubens* and *U. rigida* were carried out, and the proteins detected by the antibodies against the phosphorylated forms of both p38 and JNK from mammalian cells. There were significant differences between species; the highest dot intensity was found in *U. compressa*, and the smallest in *C. elongata*.

To depict the behavior of p38- and JNK-like phosphorylation in the six selected macrophytes, the information was presented in two separate parts, firstly when low tide occurred approximately at midday, and secondly, when midday coincided with the moment of the highest tide. In Figure 4 (Chapter II) it is shown the response of the p38- and the JNK-like proteins detected by specific antibodies in the Chlorophyte *C. aerea* during a semitidal cycle. In each panel it is shown the evolution of PAR, UV-A and UV-B radiation and protein band intensity (top), the revealed bands after immunodetection both in the presence and absence of the specific blocking peptides (middle), as well as the height of the tides (bottom). As it can be seen, low tide was around 11 am, and maximal radiation was achieved between noon and 2 pm. Very low phosphorylation of either the p38 (Figure 4A, Chapter II) or the JNK (Figure 4B, Chapter II) was detected during the first

hours of the morning, however one and a half hour after the onset of the exposure of *C. aerea* to the air at low tide (exposure began between 9 and 9.30 am), a very patent phosphorylation of a 40 KDa protein was revealed by the use of the antibody raised against the phosphorylated form of the p38 MAPK (Figure 4A, Chapter II). The use of a specific blocking peptide of the phospho-p38 indicated that this protein was, in fact, similar to mammalian phospho-p38.

Chaetomorpha protein extracts were also analyzed to detect the presence of JNK-like MAPKs. As shown in Figure 4B (Chapter II), a conspicuous band of 42 KDa detected by the phospho-JNK antibody transiently developed during low tide. The presence of the phosphorylated form of the protein was very low during high tide, and it was highly phosphorylated from the lowest tide to 1 h later. However, phosphorylation of this JNK did not peak at the same time than the p38 (see above), but one hour later. Similar results were obtained with the brown macrophyte *D. spiralis* (Figure 5, Chapter II) and the red *J. rubens* (Figure 6, Chapter II), however, the peaks of maximal phosphorylation did not coincide in all species. *J. rubens* showed a behavior most similar to *Chaetomorpha* than to *Dilophus* (Figure 5, Chapter II). Ph-p38-like MAPK showed a dramatic increase before maximal low tide occurred, peaking at around 10 am (Figure 6A, Chapter II). The level of phosphorylation of this p38 of 40 KDa progressively decreased to undetectable levels after the described sharp peak.

Data obtained when low tides occurred at approximately midday (Figures 4, 5, 6 Chapter II) were completed when the reverse behavior occurred, that is, when high tide coincided with midday hours. Different species were used, due to population dynamics in the intertidal system throughout the year. In the case of the Chlorophytes, *U. rigida* was selected. Figure 7 (Chapter II) shows the response of both p38 and JNK in the natural environment during a semidiurnal tidal cycle. In the case of the p38 (Figure 7A, Chapter II), three transient phosphorylation periods were detected. The first one, at 10 am, coincided with the last hours of emersion of the thalli; the second one, between 1 and 5

pm (peaking at 2 pm) paralleled with the time of maximal irradiance, while the last one, peaking at 8 pm was the result of a second emersion period. A similar behavior was found for the JNK (Figure 5B, Chapter II), however, the afternoon peak of phosphorylation was delayed in comparison with the p38 one (as occurred before during low tides).

The second species used for the “high tide” experiments was the heterokontophyte *Dictyota dichotoma*. A clear peak of phosphorylation of a 40 KDa protein was detected by the Ph-p38 antibody at the beginning of the emersion period (Figure 8A, Chapter II), that was reinforced by the high irradiance impinging during that part of the day. Some phosphorylation was still detected, but with a much lower intensity, during the rest of the day, until a second peak of phosphorylation appeared during the second emersion period, at 9 pm, at late sunset. This cycling response was more patent when the Ph-JNK antibody was used (Figure 8B, Chapter II). A patent peak of phosphorylation of a 42 KDa protein was detected at the end of the morning emersion period; a second intense peak was detected 2 hours after maximal irradiance was achieved, decreasing afterwards; finally, the new emersion period in the late afternoon revealed a new phosphorylation of the protein.

The last species to complete the high-tide study was the red macrophyte *Corallina elongata*. No phosphorylation of any protein was detected by the Ph-p38 antibody during the first hours of the study, however two clear transient peaks of phosphorylation of a 40 KDa protein were found later on during the day, a small one coinciding with the moment of maximal irradiance in submersed macrophytes (Figure 9A, Chapter II) and a larger one at the onset of the evening emersion period. As for the JNK (Figure 9B, Chapter II), a similar behavior was found; no phosphorylation occurred during the morning, and just a small increase was detected at the time of maximal irradiance. However, as in the case of the p38, a sharp and transient increase in phosphorylation of a 42 KDa protein occurred at the onset of the emersion period that took place in the evening, when nearly no incident irradiance was detected.

In all previous cases, intensity of the bands was very significantly reduced in the presence of their specific blocking peptides.

Chapter III: MAP kinase-like proteins are phosphorylated in response to increased temperature and UV radiation in two species of Arctic kelps

All living organisms have to face changes in their environment, and have to respond to them in order to survive. Macroalgae, as well as higher plants, are frequently exposed to unfavorable environmental conditions. To survive, they have developed a complex signalling network that senses and protects them in an ever-changing environment.

Although the MAPK in plants has been described to be involved in various forms of biotic and abiotic stress responses, and not only in cell proliferation and division control like in animal cells, the study of signal transduction in algae is very recent. Works with both macro- and microalgae (Jiménez et al. 2004, 2007; Chapter I) has clearly shown the presence of p38-like, JNK-like and ERK-like components in algae, as well as their crucial role in acclimation to stress and in cell division (Jiménez et al. 2004, 2007; Camarena et al. unpublished data).

The main goal of this chapter was to determine the presence of MAPK-like components in selected polar macroalgae, and its activation in response to temperature increase, activation under UV radiation and detection of interactive effect of both stressors.

Young sporophytes of approximately 7-9 cm in length of *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders and *Laminaria solidungula* J. Agardh were collected by scuba divers in Kongsfjorden at Hansneset, Blomstrand Island (Blomstrandhalvøya), Svalbard, Norwegian Arctic (78°39'N, 11°57'E).



For the experiments, thalli were placed in shallow (13 cm deep) rectangular containers (50 cm long, 15 cm wide) under continuous air bubbling and irradiated with a combination of Osram-Biolux L36W/965 and Q-Panel UVA-340 at the doses detailed in Table 1 (Chapter III). Each container was covered with different cut-off filters to obtain the three desired radiation treatments; Photosynthetically active radiation (PAR), PAR+UVA and PAR+UVA+UVB. It was referred to these treatments as P, PA and PAB, respectively. Two temperatures were tested, namely 2° C and 7° C. Physiological fitness of five independent replicates of both macrophytes was followed by measuring the photosynthetic efficiency through PAM-fluorometry.

Initial F_v/F_m values were slightly, but significantly ($p < 0.05$), higher in *L. solidungula* (0.68) than in *S. latissima* (0.56) (Figure 4, Chapter III). Temperature increase under P for 1 h did not induce significant differences between 2 and 7° C in any species however exposure to UV radiation induced a clear and significant decrease of the efficiency of PSII reaction centers. Drop of F_v/F_m was more patent at 2 than at 7° C in both species, accounting for 25 to 30 % at 2° C, but only 15 to 20 % at 7° C, without significant differences between PA and PAB treatments in any species.

In the case of the phospho-p38 antibody, a band of 42 KDa was detected in *S. latissima*, while a band of 40 KDa was found in *L. solidungula*, both under UV stress (Figure 5A, Chapter III). Phospho-JNK antibody equally cross-reacted with two main bands of 40 and 36 KDa in *S. latissima* and of 42 and 36 KDa in *L. solidungula* exposed to UV (Figure 5B, Chapter III).

In Figure 6 (Chapter III) were presented the results of the effect of UV and temperature stress on phospho-JNK in *L. solidungula*. In this case, two slightly phosphorylated bands of 36 and 42 KDa were detected under PAR, both at 2 and 7° C, indicating that the JNK cascade was active in all cases.

The intensity of the detected phosphorylation was reduced at 2° C as compared with 7° C (Figure 6A, 6B, Chapter III). However, UV treatment highly increased the degree of phosphorylation as detected by the intensity of the bands. In all cases band intensity was greater under PA than under P alone and under PAB than under PA.

As for the p38-like MAPK (Figure 7, Chapter III), slight phosphorylation of a 40 KDa protein was detected in *L. solidungula* in P, both at 2 and 7° C. Again, as in the case of JNK-like MAPKs, UV illumination induced further activation of the p38-like MAPK. This phosphorylation was much more pronounced at 7 than at 2° C both under PA and PAB.

S. latissima showed, in some aspects, a different behavior. Basal JNK and p38 phosphorylation was also found in P (Figures 8 and 9, Chapter III), and as before, no further induction of any of them occurred at 7° C under PAR, indicating that the basal phosphorylation state was sufficient to signal and to lead the response to the new temperature. As in *L. solidungula*, a clear increase of JNK phosphorylation was found under UV radiation. Phosphorylation of the p38-like MAPK (Figure 9) was also highly induced by UVR in *S. latissima*, and, again, activation was much higher at 2 than at 7° C. UVR represents a source of potential stress for most organisms in natural environments (Bischof et al. 2006). The current trend of stratospheric ozone depletion concurring with enhanced UVR at the Earth's surface represents a threat for many sessile organisms, especially in Antarctica (Solomon et al. 2007). However, in the last years a stratospheric Arctic ozone hole has developed (Manney et al. 2011).

In this work it was detected, for the first time in macrophytes from polar regions, the presence of two MAPK-like proteins, similar to p38 and JNK of mammalian cells, which are phosphorylated both in *S. latissima* and *L. solidungula* in response to environmental stress, namely increased UV radiation and temperature.

In conclusion, activation of MAPKs in the arctic kelps *S. latissima* and *L. solidungula* closely reflects acclimation to changing environmental conditions mimicking global climate changes. Both species have shown JNK and p38 MAPK-like activities. Phosphorylation of these MAPKs-like proteins occurs under environmental stress imposed by UV radiation and temperature. In general, UVB radiation was responsible for a higher induction of these kinases, while the effect of temperature was only patent in light treatments different than PAR. Both macrophytes seem to be able to cope with the temperature change imposed in this study, without further activation of the MAPK pathways, when UVR was cut-off. These results have been considered to contribute to the better understanding of the complicate metabolic reactions implicated in the response to stress in these organisms. Further experiments will help to clarify the relation cause-effect between MAPK phosphorylation in these kelps and acclimation to stress (as it have been already proved in other micro and macroalgae), as well as to determine their range of tolerance to environmental changes, in order to gather information on the possible changes in the structure of the kelp communities dominated by these species in a future scenario of temperature and UVR increase.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



INTRODUCCIÓN GENERAL
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Introducción

1. *Estrés ambiental: concepto, mecanismos de estrés abiótico, y factores ambientales estresantes*

A pesar de su reconocida influencia como modulador de la respuesta metabólica y fisiológica de los seres vivos, el estrés sigue siendo un concepto polémico. Considerar un factor como estresante o no depende en muchos casos del organismo de destino, de la intensidad, duración y recurrencia del estrés, y sobre todo de las diversas interacciones entre “estresores” o factores estresantes. Normalmente los factores estresantes, ya sean de carácter abiótico ó biótico, no actúan de forma independiente, sino que con bastante frecuencia interactúan, produciendo impactos combinados sobre los organismos, la distribución de las especies y el funcionamiento de los ecosistemas (Breitburg et al. 1998, Frost et al. 1999, Schindler 2001). De esta manera, a la hora de estudiar las posibles respuestas, es crucial determinar si un conjunto de estresores actúa de manera aditiva, antagonista o sinérgica, y qué repercusión tiene el posible impacto combinado.

Pero, ¿qué consideramos como estrés?. Resulta evidente que se defina el concepto en términos de la *respuesta* experimentada por un determinado individuo, en lugar del *valor* de una variable ambiental en particular. De este modo, Grime en 1989 define el estrés como el “*conjunto de restricciones externas que limitan la adquisición de recursos, el crecimiento o la reproducción de los organismos*”. Otros autores hablan de “estresor” o factor estresante como aquella “*variable ya sea de tipo biótico o abiótico (por ejemplo, la introducción de especies exóticas) que supera su rango de variación normal y que afecta negativamente al rendimiento fisiológico individual o de la población de manera estadísticamente significativa*” (Barrett et al. 1976, Auerbach 1981). Podríamos definir por tanto el estrés como “*el impacto de cualquier conjunto de factores abióticos y bióticos que afecta negativamente el rendimiento individual y finalmente deteriora la tasa de crecimiento de la población a través de la reducción de la*

supervivencia individual, el crecimiento y la reproducción” (Grime 1989, Vinebrooke et al. 2004).

Si nos centramos en la reducción de la tasa de crecimiento, inherente a la situación de estrés, según Davison & Pearson (1996), podemos diferenciar entre: factores no estresantes, limitantes y disruptivos. Los primeros, “los factores no estresantes”, son aquellos que no afectan de ningún modo ni a la supervivencia, ni al crecimiento, ni a la reproducción, ya sea de manera individual o colectiva, de la población. En los “factores limitantes” se incluyen, por ejemplo, las situaciones de baja irradiancia, niveles insuficientes de nutrientes, etc. En estos casos la respuesta fisiológica se ve limitada. Por último, los “factores disruptivos” son los responsables de los daños celulares provocados por las condiciones adversas y son los responsables de desencadenar los mecanismos necesarios para la prevención y/o reparación de dichos daños celulares (por ejemplo, la respuesta frente a la desecación, congelación, etc.). Hemos de ser conscientes de que en todos los casos se han definido los factores estresantes según la respuesta provocada en el individuo, especie o población y no por la variable ambiental en sí.

Existe cierta superposición entre la definición de “*estrés disruptivo*” propuesta por Davison & Pearson (1996) y la definición de Grime (1989) de “*perturbación*” (*mecanismos que limitan la biomasa de la planta, causando su destrucción total o parcial*). Podemos encontrar casos en los que aparezcan de manera simultánea situaciones de estrés disruptivo y perturbación; un ejemplo de ello sería la pérdida de tejido en *Laminaria* debido a heladas. Sin embargo, los daños debidos al ramoneo de *Littorina* constituyen una perturbación, pero no un estrés disruptivo, mientras que una reducción en el crecimiento debido a una situación de desecación severa, a pesar de no ocasionar daños físicos aparentes, resulta particularmente significativa, al poder influir en el resultado de la competencia interespecífica, y como tal, constituye un estrés disruptivo.

La capacidad general de un organismo para hacer frente a condiciones adversas (comúnmente denominada *resistencia al estrés*) es una función de la tolerancia al estrés a nivel celular y/o de la presencia de mecanismos de evasión que impiden que el estrés afecte y dañe a las células. La gran mayoría de las investigaciones sobre el estrés se han centrado en factores estresantes de tipo disruptivo tales como alta irradiancia, alta temperatura, congelación y desecación.

Las algas, al igual que otros tipos de organismos intermareales, quedan periódicamente expuestos al aire, por lo que experimentan una variedad de fluctuaciones ambientales potencialmente estresantes, como son limitación de nutrientes, alta irradiancia PAR y UV, alta o baja temperatura, congelación, desecación y estrés osmótico. Excepto daños y efectos letales asociados a condiciones ambientales extremas, resulta muy difícil evaluar la incidencia y gravedad del estrés producido en poblaciones naturales. A nivel de organismo, el efecto del estrés normalmente se percibe como una disminución de la fotosíntesis y del crecimiento, y se asocia a una alteración en el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Cornic & Massacci 1996, Mwanamwenge et al. 1999). La respuesta de la planta es muy compleja, reflejando en el espacio y en el tiempo la integración tanto de los efectos del estrés como de las respuestas subyacentes en todos los niveles de organización (Blum 1996).

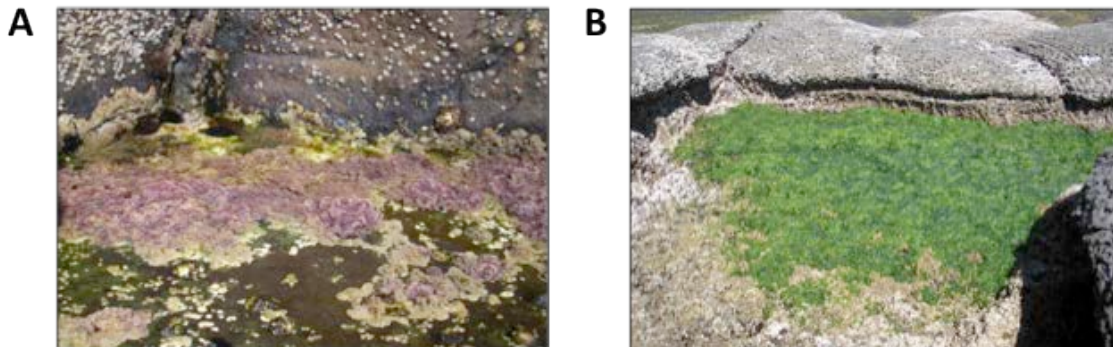
Como se puede observar en la Fotografía 1, la situación de emersión expone a los organismos a un entorno muy diferente al que se encuentran cuando están sumergidos (temperatura, fuente de carbono, salinidad, etc.) y los aísla de la fuente de nutrientes esenciales tales como nitrógeno y fósforo. Ante este panorama, la respuesta no es simplemente cuestión de tolerar la situación de estrés disruptivo, sino que los organismos sean capaces de lograr altas tasas de fotosíntesis en el aire.



Fotografía 1. Macrófitos intermareales en el nivel superior de la zona litoral de Punta Carnero (Algeciras).

Picture 1. Intertidal macrophytes at the upper level of the littoral zone of Punta Carnero (Algeciras).

La capacidad para resistir ante esa situación de exposición al aire determina la posibilidad del alga de ocupar la zona intermareal; las algas sublitorales se encuentran excluidas, al presentar una limitada resistencia a la desecación y congelación en comparación con especies intermareales (Dring & Brown 1982, Davison et al. 1989) (Fotografía 2).



Fotografía 2. Poblaciones de macrófitos totalmente expuestas durante el período de emersión. Punta Carnero (Algeciras). A: *Corallina elongata*, B: *Ulva rigida*.

Picture 2. Macrophyte populations fully exposed during the period of emersion; Punta Carnero (Algeciras). A: *Corallina elongata*, B: *Ulva rigida*.

La resistencia a la desecación de ciertas algas carnosas (“sacked”) como *Colpomenia* y *Halosaccion* se basa en la estrategia de retener agua en los sacos centrales, evitando de este modo la deshidratación celular (Oates 1985, 1986, 1988). Por el contrario, la resistencia a la desecación en especies del nivel superior de la zona litoral, como *Fucus spiralis*, depende de la capacidad de recuperación ante un considerable grado de deshidratación celular (Dring & Brown 1982, Madsen & Maberly 1990). Con excepción de talos jóvenes de las especies carnosas citadas anteriormente, el grado de resistencia de la mayoría de algas intermareales ante una situación de estrés físico depende de la tolerancia celular al estrés que presenten. La diferencia entre especies resistentes a la desecación y especies sensibles no está relacionada con la tasa de pérdida de agua durante la emersión (Dromgoole et al. 1980, Dring & Brown 1982, Lipkin et al. 1993). Asimismo, la existencia de especies resistentes y especies susceptibles a la congelación indica que la resistencia se basa en la tolerancia celular, en lugar de en un mecanismo de “evasión” (Pearson & Davison 1993).

La principal diferencia entre las especies tolerantes y susceptibles a la desecación está en la medida en que la fotosíntesis se recupera una vez que las algas se sumergen de nuevo en el agua. Por ejemplo, el porcentaje de pérdida de agua tolerable (aquel que permite la recuperación completa de la fotosíntesis) aumenta de un 55% en *Laminaria digitata* de la franja sublitoral a un 90% en especies como *Pelvetia canaliculata* y *Fucus spiralis* de la zona alta del litoral (Dring & Brown 1982). La fotosíntesis, en la mayoría de los casos, se inhibe de manera significativa inmediatamente tras la exposición al aire, no obstante, transcurridas apenas 2 horas en inmersión, la recuperación es casi completa. A pesar de contar con una extensa literatura sobre mecanismos de tolerancia relacionados con la desecación, metabolismo fotosintético, alta irradiancia, elevada temperatura, etc., tenemos una limitada comprensión de dichos mecanismos a nivel celular y molecular, y de los procesos que modulan y que son responsables del control de dicha tolerancia.

Numerosos estudios ponen de manifiesto la importancia de considerar el efecto de los cambios estacionales en los factores ambientales en la ecología de las especies. A



pesar de la relevancia del tema, se siguen planteando numerosos interrogantes sobre los mecanismos básicos de tolerancia al estrés en algas de ambientes fluctuantes. Sin duda, un organismo reacciona a los cambios externos; si se trata de un tipo de cambio que acontece frecuentemente, la respuesta adquiere un carácter adaptativo en virtud de la selección natural (Margalef 2005). En un medio ambiente considerado como estresante actúan de manera simultánea una variedad de estresores. Debido a esto y a todo lo anteriormente expuesto, es necesario comprender la naturaleza y la influencia de factores estresantes de manera individualizada así como los efectos de sus posibles combinaciones. La aplicación de herramientas actualmente disponibles tales como la biología molecular y la biología celular podrían aumentar nuestra comprensión sobre las vías involucradas.

2. Mitogen Activated Protein Kinases. Papel de las MAPKs en la señalización de la respuesta al estrés. Estructura de las cascadas, componentes y vías de las MAPKs

Las plantas, como cualquier otro organismo vivo, han de ser capaces de percibir los estímulos y señales externas y, consecuentemente, elaborar respuestas celulares apropiadas que les permitan sobrevivir frente a los cambios ambientales. Todos los organismos comparten la capacidad dinámica de coordinar constantemente sus actividades con los cambios del medioambiente. La comunicación con el medio ambiente se logra a través de una serie de vías o caminos que reciben y procesan las señales procedentes desde el ambiente externo, de otras células del propio organismo o incluso de diferentes zonas dentro de la misma célula.

Las macroalgas, al igual que las plantas vasculares, están frecuentemente expuestas a cambios en las condiciones ambientales. Para sobrevivir, han desarrollado una compleja red de señales bioquímicas que les permiten percibir los cambios ambientales y responder ante los mismos. Este proceso lleva a dos posibilidades excluyentes, bien las células se adaptan (o aclimatan) a las nuevas condiciones, o bien entran en un proceso que conduce a la muerte celular. En general, la información externa es transmitida hasta el núcleo celular a través de una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones de determinadas proteínas (quinasas), que llevan a la activación o desactivación de grupos de genes específicos (Kyriakis & Avruch 2001). Cada vez hay más evidencias que demuestran que cuando las plantas han de enfrentarse a una situación de estrés se pone en marcha una compleja red de fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas específicas denominadas “quinasas de proteínas activadas por mitógenos” (Mitogen Activated Protein Kinases-MAPK). Estas proteínas se agrupan en módulos canónicos que constituyen tres cascadas, bien descritas en células de mamíferos, y de forma muy pobre aún en plantas. La importancia fisiológica de esta disposición modular de las cascadas de las MAPKs es un tema que suscita mucho interés entre los investigadores dedicados al estudio de los mecanismos de respuesta al estrés y su



regulación. Esta disposición característica en módulos tricanónicos (que se explican con más detalle a continuación) sin duda posibilita la amplificación de una determinada señal de entrada y la posterior ramificación o diafonía entre las vías de señalización, al tiempo que ejerce un estricto control sobre el sistema de respuesta.

Sintéticamente, esta red metabólica está constituida por cinco componentes: sensores/receptores, quinasas de proteínas, fosfatasas de proteínas, factores de transcripción y enzimas/proteínas estructurales. Las MAPKs constituyen un importante mecanismo de control en los procesos de señalización celular en todos los organismos eucariotas. Atendiendo a la gran variedad de estímulos y señales externas que llegan a la célula, estas proteínas citosólicas son las responsables de la puesta en marcha de respuestas celulares adecuadas. Las vías de las MAPKs comparten una organización común: tres quinasas se activan de forma secuencial en una cascada. La quinasa en la parte superior de la cascada (denominada MAPK quinasa quinasa, MAPKKK) recibe una señal del activador, y la quinasa en el extremo terminal de la cascada (la MAPK) proporciona una señal a los factores de transcripción u otras quinasas de proteínas. En la Figura 1 se representa cómo la transducción de señales dentro de la cascada se coordina con la ayuda de proteínas de andamiaje, que organizan las quinasas en un complejo multiproteico (llámados módulos ó unidades funcionales) en cuyo núcleo central se sitúan las tres quinasas (Krauss 2008). Las “scaffold proteins” o proteínas de andamiaje cumplen un papel fundamental, ya que preservan la eficiencia y la selectividad de las vías de las MAPKs, manteniendo la integridad de las mismas y permitiendo la activación y coordinación de los componentes de las cascadas a la hora de elaborar la respuesta adecuada frente a los estímulos específicos.

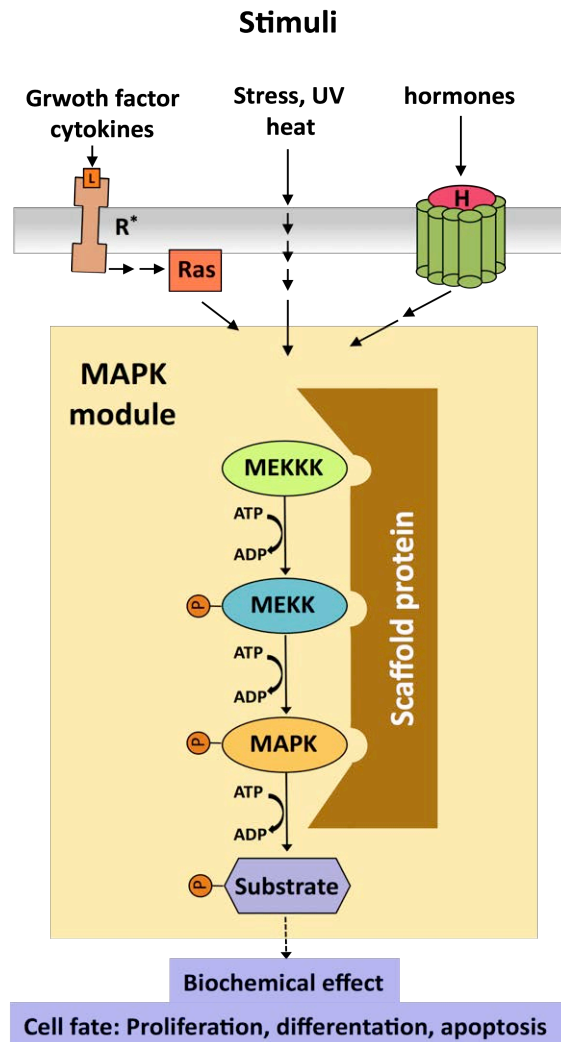


Figura 1. Principio de transducción de señales intracelulares a través de un módulo funcional de una vía MAPK (Redibujado de Krauss 2008).

Figure 1. Principle of signal transduction through a functional module of a MAPK pathway (Redrawn from Krauss 2008).

Las MAPKs regulan el destino de procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación, en respuesta a una serie de estímulos (Pearson et al. 2001). Son ubicuas, y tienen residuos muy conservados de serina y de treonina en su centro activo (Kyriakis & Avruch 2001). Los miembros de la familia de las MAPKs se activan por distintos estímulos; así los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y procesos inflamatorios

constituyen el principal desencadenante de las cascadas SAPK-JNK (Stress-Activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases) y p38, algunas veces denominadas como “quinasas de proteínas activadas por estrés”. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias y otras agresiones frecuentemente asociadas con mecanismos de supervivencia y/o apoptosis (Nebreda & Porras 2000).

Las MAPKs pertenecen al grupo de las quinasas denominadas CMGC, que incluye a los subgrupos de quinasas dependientes de ciclina (CDK), las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), las quinasas de la glucógeno sintetasa (GSK-3) y la caseína quinasa II (CKII). La primera MAPK fue descubierta gracias a su capacidad de fosforilar los microtúbulos asociados a la proteína 2 (MAP2: Microtubule-associated protein 2), y se la denominó por tanto MAP2 quinasa (Ray & Sturgill 1987). Esta MAP2 resultó ser idéntica a una proteína de 42 kDa que anteriormente había sido identificada y que, ante la estimulación mitogénica de las células, presentaba fosforilación en residuos de tirosina (Cooper et al. 1982, Rossomando et al. 1989). Por tanto esta proteína fue renombrada como “Quinasa de Proteína Activada por Mitógenos” (Rossomando et al. 1989). Posteriormente se observó que el gen clonado presentaba una alta homología con las quinasas de levaduras Fus3 y KSS1 aisladas previamente (Courchesne et al. 1989, Elion et al. 1990) y que esta familia de quinasas no sólo era activada por mitógenos, sino también por otros estímulos de carácter extracelular. Fue entonces cuando en 1990, Boulton reconoció la ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinase). Los términos MAPK y ERK fueron empleados indistintamente, hasta que posteriormente el nombre de ERK se destinó a un subgrupo particular de isoformas dentro de la familia de las MAPKs (Seger & Krebs 1995).

Poco tiempo después de la identificación de las MAPKs fue descrito un activador de las mismas (Ahn et al. 1991) capaz de fosforilarlas. Se trataba de la MEK (de MAPK/ERK quinasa). Este activador fue clonado en 1992 y se descubrió que también se activaba mediante fosforilación (Gómez & Cohen 1991, Ahn et al. 1993). El proto-oncogen Raf-1

fue el primer activador MEK identificado (Kyriakis et al. 1992), siendo posteriormente aislados otros como MEKK1 y c-Mos (Lange-Carter et al. 1993, Posada et al. 1993). El alto grado de homología de MEK y MEKK1 con las quinasas de proteínas de levaduras Fus3 y KSS1 “corriente arriba” (upstream), fueron los primeros indicios sobre la estructura tan conservada evolutivamente que presentan todas las cascadas de las MAPKs.

Las MAPKs, junto con sus activadores, las MAPK quinasas (MAPKK) y las MAPK quinasas quinasas (MAPKKK) constituyen, como ya se ha mencionado anteriormente, una cascada. Como se representa en la Figura 2, estas cascadas de señalización se organizan en módulos individuales, cuya actividad se inicia por la acción de estímulos extracelulares que son percibidos por distintos receptores y mediadores. Normalmente, las señales externas son “re-transmitidas” a la vía MAPK a través de receptores de factores de crecimiento y estaciones centrales de conmutación (switching) en la membrana celular, tales como las proteínas Ras y Rac. Las MAPKs son capaces de autorregular su propia expresión, y pueden inhibir o amplificar la señal mediante el establecimiento de bucles de retroalimentación cuando genes que codifican para proteínas inhibidoras o activadoras son activados a través de factores de transcripción, que a su vez son sustratos de las MAPKs (Figura 3).

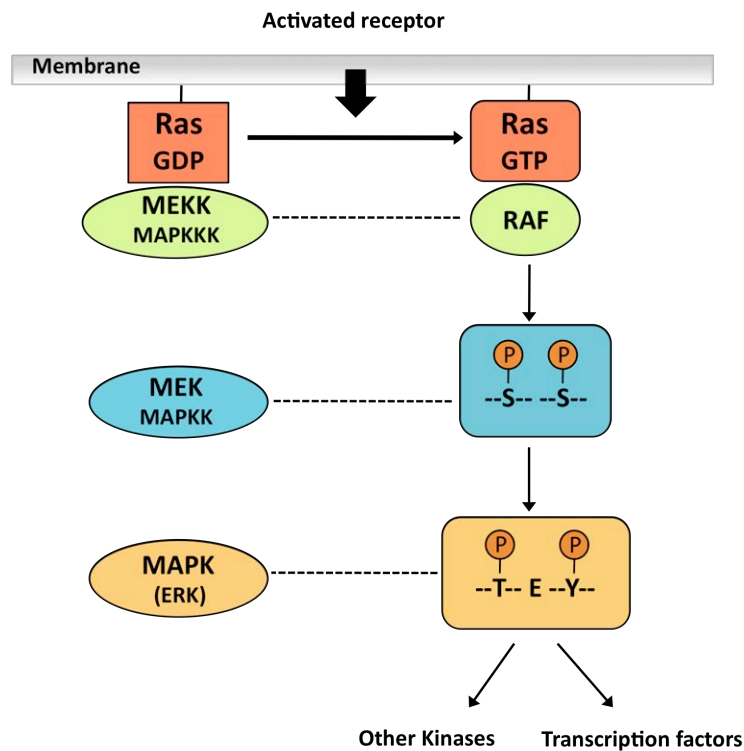


Figura 2. Componentes y activación de la vía ERK (Redibujado de Krauss 2008).

Figure 2. Components and activation of the ERK pathway (Redrawn from Krauss 2008).

La activación de una MAPK se consigue a través de una cascada lineal de señalización en la cual signalosomas asociados a membrana activan una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), que fosforila y activan una MAPK quinasa (MAPKK). Esto se traduce en una fosforilación dual de las MAPKs en un dominio conservado de tres aminoácidos, Thr-X-Tyr (siendo “X” cualquier aminoácido), y en un incremento en la actividad catalítica de la MAPK (Figura 2). Las MAPKs fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos por una prolina de sustratos nucleares y citosólicos, que incluyen factores de transcripción y diferentes efectores. Estos, entonces, activan el programa genético celular o el control de la proliferación, como es el caso del módulo ERK, sobre apoptosis o diferenciación (como es a menudo el caso de las rutas de JNK y p38), y sobre otras funciones, que incluyen migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas de determinadas vías metabólicas, etc. (Shi et al. 2006).

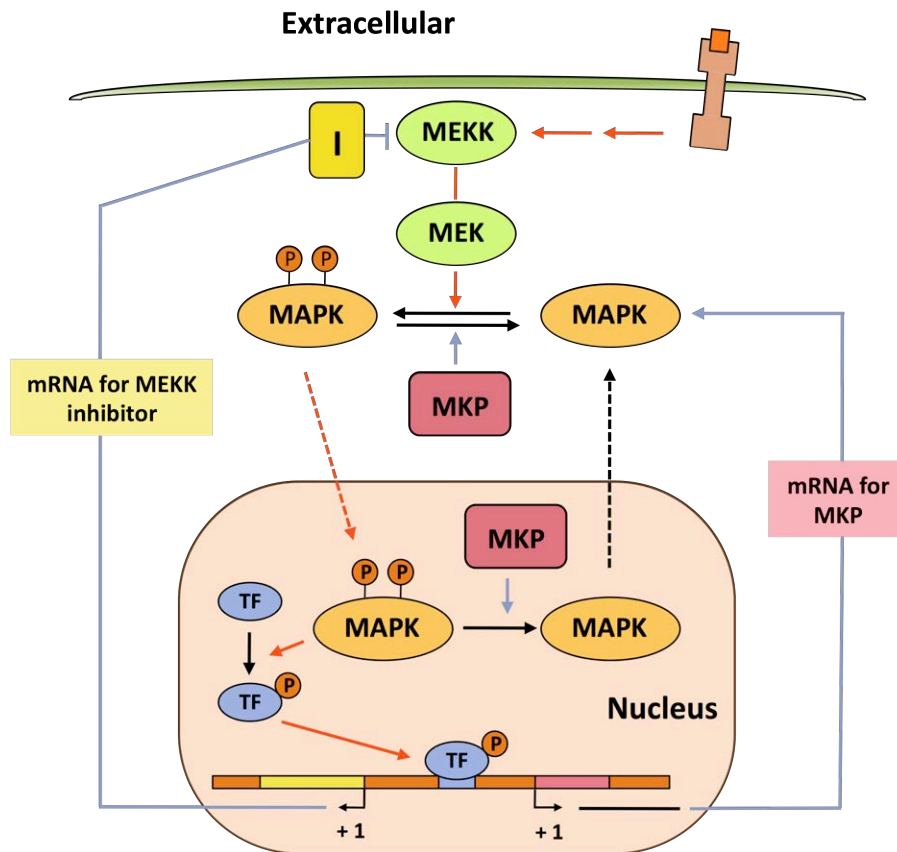


Figura 3. Regulación de la retroalimentación de la señalización MAPK mediante los inhibidores (I) y las fosfatasas de las MAPK (MKP). Se establece un bucle de realimentación negativa cuando el gen que codifica para la síntesis del péptido inhibidor o el gen que codifica para la síntesis de la MKP es activado a través de los factores de transcripción que son sustratos de MAPKs (TF: factor de transcripción) (Redibujado de Krauss 2008).

Figure 3. Feedback regulation of MAPK signalling by the inhibitors (I) and by the MAPK phosphatases (MKP), establishing a negative feedback loop where the gene coding for the peptide synthesis inhibitor or the gene coding for the synthesis of MKP is activated by transcription factors which are substrates of MAPKs (TF: transcription factor) (Redrawn from Krauss 2008).

De manera general podemos dividir las MAPKs en tres grandes grupos: las **ERKs**, las **SAPKs** o **JNKs** y las **p38**-quinasas. En la actualidad sabemos de cinco vías principales de las MAPK en mamíferos, que se nombran según la quinasas en el extremo inferior de la cascada; éstas son:

- ERK 1 y 2 (ERK 1/2)

- C-Jun N-terminal kinases (JNK, 1, 2 y 3)
- p38
- ERK3 y ERK4
- ERK5,

de las cuales sólo en tres de ellas (**ERK1/2**, **JNK** y **p38**) todos los componentes han sido completamente identificados (Figura 4). Por su parte, en levaduras se ha identificado únicamente una cascada (HOG-1) similar a la p38. Así, atendiendo a la clasificación inicial propuesta por Kültz (1998), la familia de las MAPKs al completo, incluyendo todas las secuencias procedentes de levaduras, plantas y animales se dividen en 3 subgrupos principales: las quinasas activadas por estrés (**SAPKs**), quinasas reguladas por señales extracelulares (**ERKs**) y el subgrupo de las **MAPK3** (o p38 quinasas).

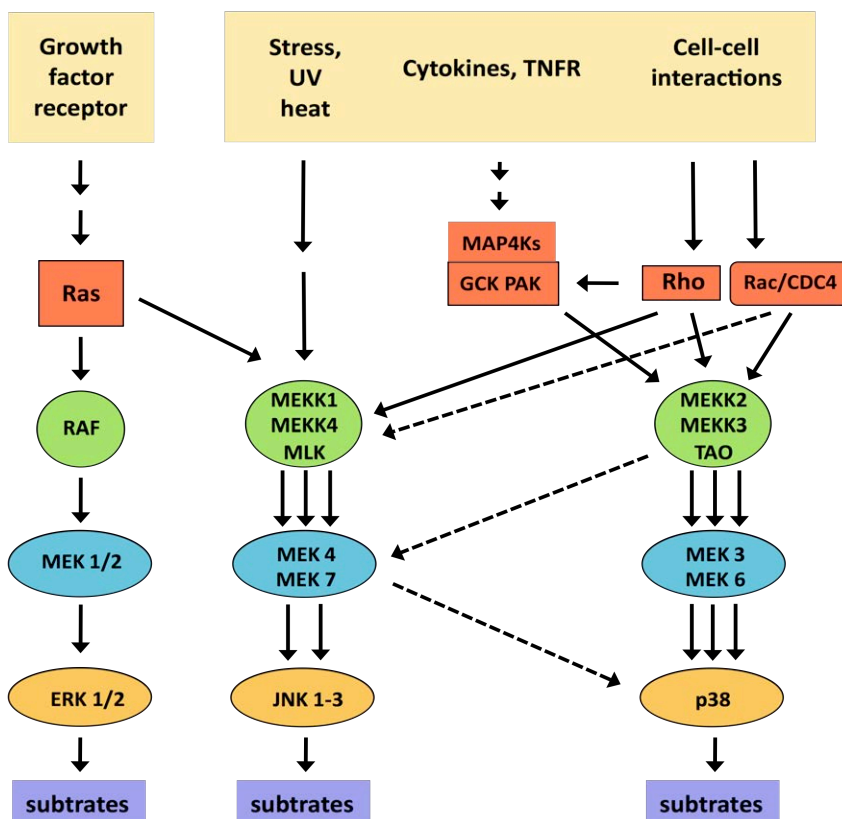


Figura 4. Resumen de las tres principales cascadas de las MAPK en mamíferos. Se muestran las señales de entrada y los componentes de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK, la vía de SAPK/JNK y la de la p38, y las interacciones entre sendas vías (Redibujado de Krauss 2008).

Figure 4. Summary of the three major MAPK cascades in mammals. It is shown the input signals and components of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, SAPK/JNK and p38, and the interactions between them (Redrawn from Krauss 2008).

Estructura tridimensional

Todas las MAPKs muestran una estructura tridimensional muy similar, presentando una estructura característica en dos lóbulos, y con el sitio activo en el dominio de contacto (Goldsmith & Cobb 1994). Los dominios N-terminales se componen principalmente de beta-filamentos, mientras que los dominios C-terminales son predominantemente α -hélices. Esta topología es, en general, similar a la de la quinasa de proteína dependiente de cAMP y de la CDK2 (Taylor & Radzio-Andzelm 1994).

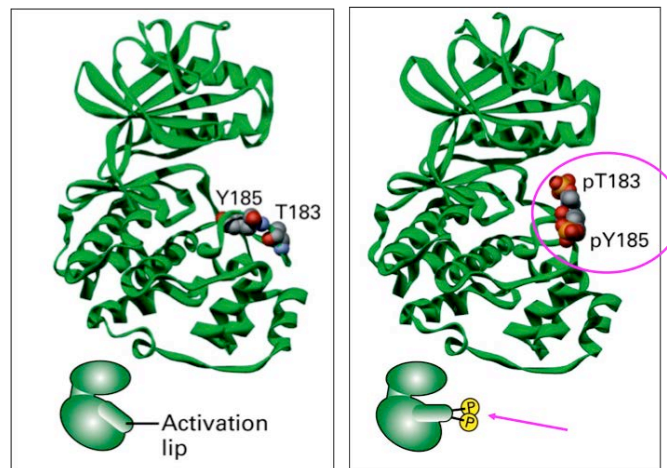


Figura 5. Imagen tridimensional que refleja el cambio conformacional que experimenta la JNK tras la doble fosforilación en su centro activo.

Figure 5. Three-dimensional image that reflects the conformational change of the JNK after the double phosphorylation in the active site.

Formando parte de la estructura secundaria de las MAPKs nos encontramos con el elemento más importante y menos estable, se trata del denominado “bucle de activación”, que forma el “labio” del sitio activo (Zhang et al. 1995) y que contiene el motivo de doble fosforilación altamente específico, **TXY** (treonina-X-tirosina) (Payne et al.

1991, Gartner et al. 1992). Esta elevada especificidad no sólo se debe al tipo de aminoácidos que conforman el motivo, sino a la posición que dichos residuos ocupan. De esta manera, en humanos la posición que ocupan los residuos de treonina-X-tirosina en el caso de la p38, JNK y ERK son respectivamente: Thr180-X-Tyr182, Thr183-X-Tyr185 y Thr202-X-Tyr204.

La doble fosforilación de los residuos de treonina y tirosina es condición indispensable para la activación completa de las MAPKs (Figura 5). La forma inactiva presenta los residuos catalíticos desalineados y el bolsillo de unión del sustrato bloqueado. Cuando se produce esa doble fosforilación en el centro activo, ambas características inhibitorias son corregidas mediante cambios conformacionales que posibilitan la activación de la MAPK. Además, la fosforilación induce un cambio conformacional que facilita la formación de homodímeros. En general, como se representa en la Figura 6, la presencia de los residuos fosfato crea una red de interacciones (interfaz) que orienta apropiadamente los residuos de la α -hélice y el centro catalítico, promoviendo de este modo el cierre del lóbulo. La fosforilación del bucle activo facilita la homodimerización de la quinasa, que se requiere para la translocación nuclear de la enzima.

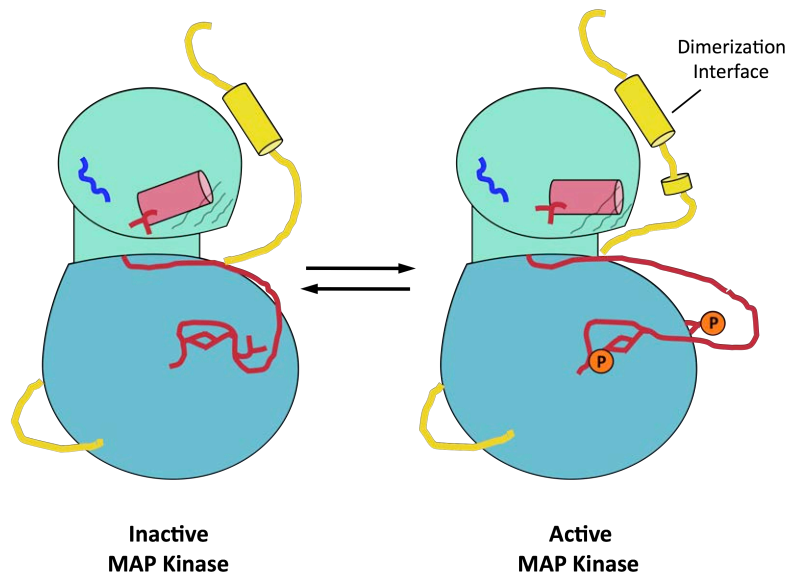


Figura 6. Activación de las MAPKs por fosforilación del bucle o lazo de activación. La fosforilación en un residuo de treonina (Thr 183) y un residuo de tirosina induce el movimiento del bucle de activación (rojo), lo que posibilita la correcta orientación de la α -hélice (azul) y promueve el cierre del lóbulo y la consiguiente activación de la quinasa. La p-Thr reorganiza la extensión C-terminal (amarillo) en una interfaz que permite la dimerización necesaria para la translocación nuclear de la enzima (Redibujado de Krauss 2008).

Figure 6. Activation of MAPKs by phosphorylation of the activation loop. Phosphorylation on a threonine residue (Thr 183) and a tyrosine residue induces the movement of the activation loop (red), enabling the correct orientation of the α -helix (blue), promoting the closure of the lobe and the resulting activation of the kinase. The p-Thr reorganizes the C-terminal extension (yellow) on an interface that allows the dimerization required for nuclear translocation of the enzyme (Redrawn from Krauss 2008).

La longitud del bucle de activación, así como las secuencias de residuos susceptibles de ser doblemente fosforilados, es específica en cada MAPK. Por ejemplo, **ERK**, **JNK** y **p38** presentan bucles de 25, 21 y 19 residuos, y unos motivos específicos de doble fosforilación de **TEY**, **TPY** y **TGY** respectivamente. Se han encontrado diferencias importantes en la secuencia de los aminoácidos que constituye el bucle de activación entre miembros de los subgrupos de la ERK y la SAPK. Un motivo característico en la activación del bucle está definido por el aminoácido situado entre la T (Treonina) y la Y (Tirosina) en los sitios de fosforilación de las MAPK, como se ha detallado más arriba. De este modo, y al igual que ocurre en mamíferos, la ERK2 tiene una E (Ácido glutámico) en esta posición (TEY), mientras que la p38 presenta una G (Glicina) en esa misma posición (TGY) y la JNK tiene una P (Prolina) también en esa misma posición (TPY). La función de la inserción en el bucle de activación y el motivo TEY frente TGY fue estudiada por mutagénesis dirigida (Jiang et al. 1997).

Las MAPKs se activan por la quinasa situada “corriente arriba” (upstream), y, como hemos dicho, la fosforilación de un residuo Tyr y un residuo Thr del motivo **Thr-X-Tyr** del bucle de activación de la MAPK desencadena la transducción de la señal “corriente abajo” (downstream) en la cascada, así como la traducción en diferentes respuestas celulares, por translocación al núcleo de la MAPK doblemente fosforilada. Allí fosforilan, y por lo tanto activan, diversos factores de transcripción. La MAPK fosforilada puede, igualmente,

permanecer en el citoplasma, donde podrá fosforilar proteínas asociadas al citoesqueleto, o a ciertas enzimas como quinasas, fosfatasas y fosfolipasas. Hemos de remarcar que, como ya se ha mencionado, la fosforilación de estos sustratos se produce sólo en residuos de serina o treonina que son inmediatamente seguidos por una prolina (González et al. 1991). Esta especificidad está regulada por el llamado bucle P+1, que se encuentra en el bolsillo de unión del sustrato de las MAPKs.

Las MEKs (MAPKKs)

Las MAPKs son fosforiladas por la proteína quinasa anterior en la cascada, la **MEK** o **MAPKK**. Las MEKs son quinasas doble-específicas, responsables de la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina del motivo TXY y por tanto, actúan a modo de “activadores” de las MAPKs. A su vez, las MEKs son fosforiladas y activadas por las MEK quinasas (MEKK o MAPKKKs). Estas proteínas fosforilan a las MEKs actuando sobre dos residuos de serina separados por tres aminoácidos. Todas las proteínas MEK conocidas tienen un sitio de fosforilación similar con la secuencia conservada LID/NSXANS/T (X: cualquier aminoácido) (Krauss 2008). Cada uno de los grupos de las MAPKs es activado por MEKs específicas. Normalmente las MEKs sólo actúan en 1 ó 2 cascadas diferentes y por tanto se consideran puntos de convergencia de las cascadas al ser las responsables de la integración de diferentes señales de entrada dentro de una vía determinada (Ligterink 2000).

La falta de intercomunicación entre diferentes cascadas a nivel de MEK puede sugerir que la activación de las MAPKs a través de las MEKs tenga, principalmente, un papel en la amplificación de la señal (Brown et al. 1997). Sin embargo, al encontrarse tanto las MEKs como las MAPKs en concentraciones más o menos similares (Ferrell 1996), esta hipótesis parece poco probable, y gana peso la idea de que las MEKs podrían actuar en la regulación de la cinética de otras enzimas (Huang & Ferrell 1996), y ya que las MEKs se encuentran presentes normalmente en exceso respecto a las MEKKs, la amplificación es más probable que ocurra en este paso de la cascada (Ferrell 1996).

Las MEKKs (MAPKKKs)

Las MEKKs son quinasas específicas con residuos de serina y treonina conservados, que constituyen el punto de entrada hacia la transducción de señales en un módulo de MAPK. El representante más caracterizado, la quinasa Raf-1, es activado por la proteína Ras. Otros representantes del grupo MEKK son Mos y las quinasas MEKK 1-3. Las proteínas de señalización que actúan sobre las MAPKKKs comprenden, en su mayoría, pequeñas GTPasas, como miembros de las familias Ras y Rho/Rac u otras quinasas de proteínas (Figura 4).

A diferencia de las MAPKs y las MEKs, la estructura de las MEKKs es más diversa, y presentan diferentes motivos reguladores. Pueden ser activadas por diferentes mecanismos, tales como la fosforilación de las quinasas a través de MEKKK y PKC (Protein Kinase C), por la interacción con las proteínas G de las familias Rho y Ras, o por la activación directa de los receptores (Whitmarsh & Davis 1996, Fanger et al. 1997, Würgler-Murphy & Saito 1997, Rommel & Hafen 1998). Esta heterogeneidad en la estructura y la diversidad de los dominios reguladores de las diferentes MEKKs confiere flexibilidad a las cascadas de las MAPKs para responder ante una amplia gama de estímulos. Por otra parte, a diferencia de la especificidad de sustrato comentada anteriormente de las MEKs, esto no ocurre en las MEKKs, ya que éstas pueden abastecer múltiples vías de las MAPKs (Fanger et al. 1997, Gustin et al. 1998).

En general, la activación de las MEKKs es un proceso complejo que requiere las etapas de translocación a través de la membrana, la fosforilación, la oligomerización de los péptidos y la unión a proteínas de andamiaje. Actualmente se desconoce en profundidad el mecanismo de activación de las MEKKs.

Las MAPKs en plantas. Papel de las cascadas en la transducción de las señales de estrés

Las denominadas “vías MAPKs” han sido ampliamente estudiadas en levaduras y células de mamíferos, pero es en los últimos años cuando el estudio de estas vías en plantas ha ido en aumento. Investigaciones sobre las funciones de estos componentes en organismos vegetales han revelado que las MAPKs desempeñan un papel crucial en la respuesta ante gran variedad de estímulos estresantes, en la señalización de la mayoría de las hormonas vegetales, así como en diversos procesos de desarrollo. Estos estudios han sido extendidos a plantas vasculares de importancia para la agricultura como son el tomate y la avena, siendo descritos inicialmente (Jonak et al. 1999) unos 20 genes relacionados con las MAP quinasas. Estudios más recientes han demostrado la presencia de las cascadas de señalización de las MAPKs también en otras plantas vasculares como *Arabidopsis*, tabaco o arroz (Nakagami et al. 2005). Sin embargo, mientras que en las células animales están presentes las tres principales subfamilias de las MAPKs (ERK, JNK y p38; ver Figura 4), en plantas los genes codificantes de estas quinasas solo pertenecen a la subfamilia ERK (Zhang et al. 2006).

Al tratarse, en la mayoría de los casos, de organismos sésiles, la fluctuación de los factores ambientales a que las plantas están expuestas hace necesario, para su supervivencia, el desarrollo de una amplia gama de respuestas específicas y adecuadas. Como ya se ha mencionado, las plantas, en ocasiones, tienen que enfrentarse a cambios extremos en las condiciones abióticas medioambientales. Las plantas comparten con el resto de eucariotas, y con determinados procariontes, la capacidad para responder ante una situación estresante, poniendo en marcha vías de señalización celular como las vías de las MAPKs. Éstas, como ya se ha expuesto anteriormente, implican la activación/desactivación de grupos de genes específicos.

Se ha realizado un análisis de las secuencias completas de aminoácidos presentes en las MAPKs de plantas, observándose gran homología entre todas ellas. Las secuencias más conservadas y que muestran mayor similitud se corresponden con aquellas que

forman parte de los 11 dominios responsables de la función catalítica. Los residuos de serina y treonina, cuya fosforilación resulta necesaria para la activación de las MAPKs, se encuentran en todas las MAPKs de plantas entre los subdominios VII y VIII del centro catalítico (Jonak et al. 1999).

Se han obtenido más de 23 secuencias de cDNAs completos de MAPKs a partir de gran variedad de especies vegetales. Se han secuenciado 9 genes de *Arabidopsis*, 5 de tabaco, 4 de alfalfa y un único gen de guisante, perejil y petunia, además de dos representantes individuales de especies de monocotiledóneas como la avena y el trigo. El análisis bioinformático de las secuencias completas de aminoácidos de las MAPKs de estas plantas mostró una estructura conservada, con valores de similitud que oscilan entre el 50 y el 98 %. Una vez más, los 11 dominios responsables de la función catalítica fueron los que mostraron mayor grado de similitud.

Hasta la fecha, solo se han estudiado unos pocos componentes de las cascadas de las MAPKs en plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene aproximadamente 110 genes que codifican para posibles componentes de las rutas de las MAPKs: 20 MAPKs, 10 MAPKKs y más de 80 MAPKKKs. De ellos, sólo 8 de las 20 MAPKs han sido estudiadas en detalle (Nakagami et al. 2005). Las MAPKs de plantas mejor caracterizadas son la MPK3, MPK4 y MPK6, las cuales son activadas por diferentes estímulos, como factores abióticos estresantes y patógenos. La MPK4 regula negativamente la señalización por estrés biótico, mientras que la MPK3 y la MPK6 son reguladores positivos en respuestas de defensa. En la planta de tabaco se han detectado dos MAPKs, SIPK y Ntf4 (MAPK Group 2002). SIPK está implicada principalmente en la señalización de diferentes respuestas de defensa de la planta, desarrollando un papel específico en la regulación de la producción de etileno en plantas sometidas a estrés (Kim et al. 2003, Liu & Zhang 2004). Hasta la fecha, los diferentes genes identificados en plantas que codifican para las MAPKs (por ejemplo, alfalfa, *Arabidopsis*, perejil, guisante, petunia, y tabaco) son todos similares a la familia ERK, mostrándose que no existen en plantas vasculares representantes de las cascadas de la JNK y la p38. Las MAPKs de plantas tipo-ERK se han dividido en al menos



cuatro subgrupos diferentes (Machida et al. 1997, Ligterink 2000, Nakagami et al. 2005, Zhang et al. 2006). Los subgrupos I y II parecen estar involucrados en la respuesta ambiental y hormonal, mientras que al menos algunas de las MAPKs pertenecientes al grupo III están involucradas en la regulación del ciclo celular (Bögre et al. 1999, 2000).

Como ya se ha dicho, es importante remarcar que pueden encontrarse miembros de los tres subgrupos principales de MAPKs en células animales, sin embargo, la totalidad de los autores, según los análisis de filogenia y los análisis estructurales de las secuencias aminoacídicas realizados, consideran que todas las MAPKs conocidas en plantas son más similares a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) (Yu and Tang 2004, Pitzschke et al. 2009), denominándose por tanto, como quinasas de plantas reguladas por señales extracelulares (**PERK**). Basándose en este análisis filogenético se ha sugerido que el ancestro común de las MAPKs de plantas se separó antes de los linajes de la SAPK de animales, y que la MAPK3 (p38) evolucionó como subgrupo aparte.

En plantas vasculares, según el análisis de secuencias similares, como mínimo se pueden establecer **3 familias** diferentes dentro de las MAPKs (Grupo 1, 2 y 3), bien entendido que todas pertenecen al subgrupo de las ERKs. A su vez, éstas pueden subdividirse en al menos **5 subfamilias**, denominadas pERK1-5 (Figura 7). Únicamente, dos MAPKs presentes en monocotiledóneas (AsPK9 y WCK1) no se agrupan dentro de estas 5 subfamilias. Por lo tanto, podemos agrupar a las MAPKs de plantas en al menos cuatro familias distintas (las formadas por los grupos 1, 2 y 3 y las formadas por las representantes monocotiledóneas). A pesar de que la filogenia de las MAPKs de plantas es hasta la fecha incompleta, varios autores apoyan la hipótesis de que las MAPKs que se encuentran presentes en una misma familia o subfamilia, podrían cumplir las mismas funciones a pesar de estar presentes en especies vegetales muy diferentes.

De acuerdo con la información disponible, las familias de las MAPKs de los **Grupos 1 y 2** participan en su mayoría en procesos de señalización frente a patógenos y estrés abiótico, mientras que determinadas familias de las MAPKs del **Grupo 3** están implicadas



en la regulación del ciclo celular. Por lo tanto, las diferencias observadas en las secuencias probablemente reflejen diferentes funciones y especificidades de sustrato, como fue ya observado por Jonak et al. (1995) mediante diferentes análisis realizados con las MAPKs de la planta de la alfalfa.

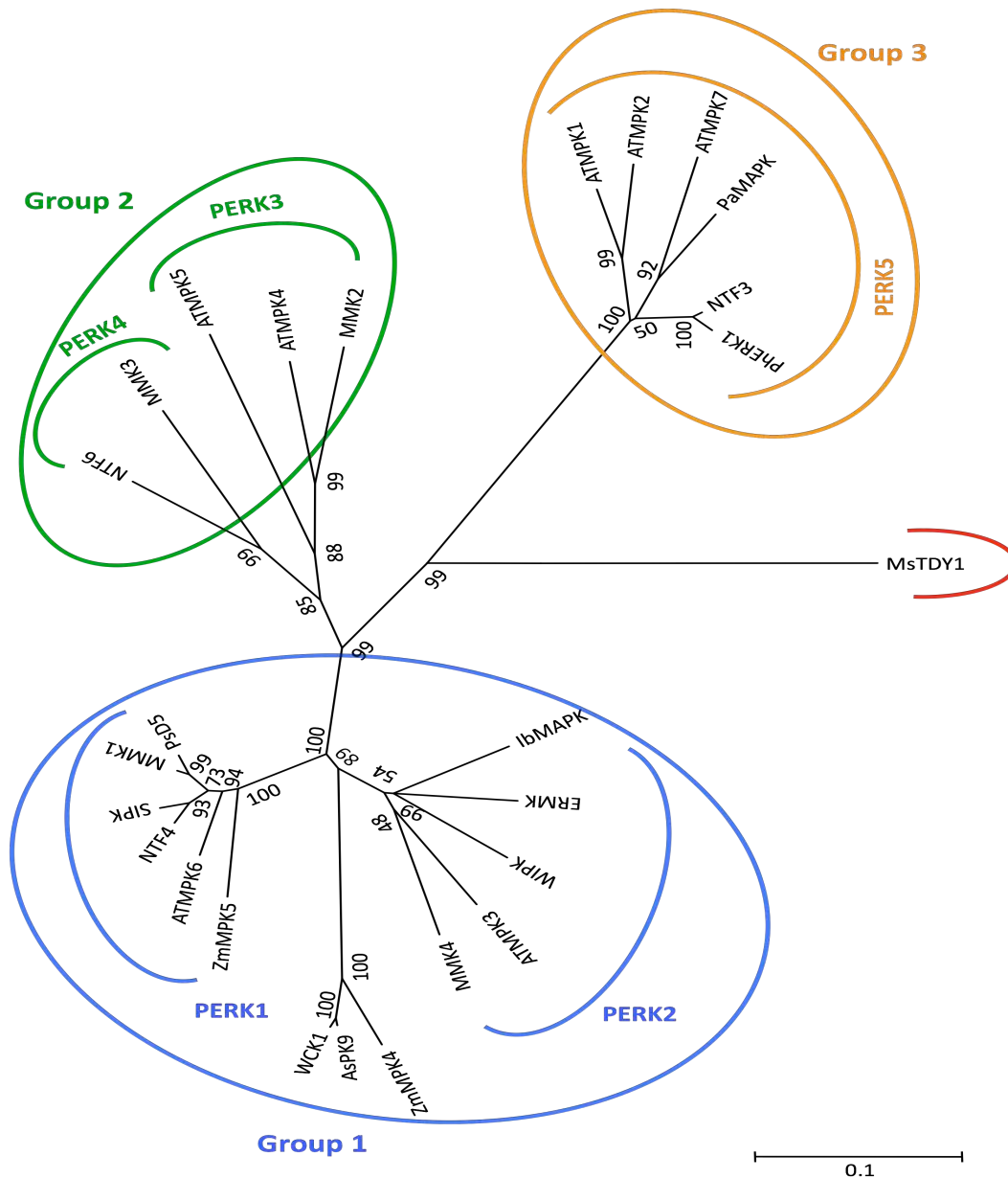


Figura 7. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de las MAPK de plantas. El árbol fue construido usando el programa MEGA 5.05 con el método neighbor-joining. Los valores de bootstrap (10000 repeticiones) se muestran en cada división de las ramas. Se han usado para este estudio filogenético las siguientes MAPKs de plantas, mostrando sus correspondientes acrónimos y números de acceso: *Arabidopsis thaliana* (ATMPK1: D14713, ATMPK2: D14714, ATMPK3: D21389, ATMPK4: D21840, ATMPK5: D21841, ATMPK6: D21842, ATMPK7: D21843), *Nicotiana tabacum*

(NTF3: X69971, NTF4: X83880, NTF6: X83879, SIPK: U94192, WIPK: D61377), *Medicago sativa* (MMK1: X66469, MMK2: X82268, MMK3: AJ224336, MMK4: X82270, MsTDY1: AF129087), *Avena sativa* (AsPK9: Q43379), *Ipomoea batatas* (IbMAPK: AF149424), *Petroselinum crispum* (ERMK: Y12785), *Petunia hybrida* (PhERK1: X83440), *Pisum sativum* (PsD5: X70703), *Prunus armeniaca* (PaMAPK: AF134730), *Triticum aestivum* (WCK1: AF079318) y *Zea mays* (ZmMPK4: AB016801, ZmMPK5: AB016802).

Figure 7. Phylogenetic tree based on the aminoacid sequences of plant MAPKs. The tree was constructed using the MEGA 5.5 program with the neighbor-joining method. Bootstrap values (10000 replicates) are shown in each division of the branches. The following plant MAPKs were used to build the phylogenetic study, showing their corresponding acronyms and accession numbers: *Arabidopsis thaliana* (AtMPK1: D14713, AtMPK2: D14714, ATMPK3: D21389, ATMPK4: D21840, ATMPK5: D21841, ATMPK6: D21842, ATMPK7 : D21843), *Nicotiana tabacum* (NTF3: X69971, NTF4: X83880, NTF6: X83879, SIPK: U94192, WIPK: D61377), *Medicago sativa* (MMK1: X66469, MMK2: X82268, MMK3: AJ224336, MMK4: X82270, MsTDY1: AF129087), *Avena sativa* (AsPK9: Q43379), *Ipomoea batatas* (IbMAPK: AF149424), *Petroselinum crispum* (ERMK: Y12785), *Petunia hybrida* (PhERK1: X83440), *Pisum sativum* (PsD5: X70703), *Prunus armeniaca* (PaMAPK: AF134730), *Triticum aestivum* (WCK1: AF079318) and *Zea mays* (ZmMPK4: AB016801, ZmMPK5: AB016802).

A priori, las cascadas de la p38 y la JNK parecerían estar ausentes en las plantas vasculares, no obstante, contamos al menos con un caso en el que la fosforilación de una proteína MAPK tipo-p38 ha sido detectada en plantas en respuesta al estrés; Komis et al. (2004) demostraron la participación de una MAPK tipo p38 en la reorganización del citoesqueleto de tubulina, así como en la regulación del volumen del protoplasto de células de raíz de trigo en condiciones de hiperosmoticidad.

Como ya sabemos, la disponibilidad de agua y las temperaturas extremas son factores limitantes para el desarrollo y el crecimiento de todas las plantas. Las estrategias de adaptación dependen principalmente de la expresión de conjuntos de genes específicos, que producen cambios en la composición de los componentes principales de las células. Ha sido demostrada la implicación de ciertas vías de las MAPKs en la señalización celular en procesos como la sequía y las bajas temperaturas (Jonak et al. 1996), entre otras, en plantas de alfalfa. El empleo de anticuerpos específicos frente a diferentes formas de las MAPKs demostró que sólo una MAPK específica resulta activada por frío y sequía siendo, además, el gen que codifica para esta MAPK el único que se induce transcripcionalmente. Aunque la inducción de la expresión génica de las MAPKs por un estímulo determinado demuestre la participación de estas cascadas en el

mecanismo de transducción de señales, es muy probable que esas vías de las MAPKs también desempeñen un papel en la respuesta frente a otros factores. En *Arabidopsis* se han encontrado cantidades mayores de transcritos específicos de MAPK y MAPKK (*AtMPK3* y *AtMEKK1*, respectivamente) en plantas expuestas a estrés hídrico, por frío, por contacto y por elevadas concentraciones salinas (Mizoguchi et al. 1996).

El estudio de la transducción de señales en algas es muy escaso y reciente. Yuasa & Muto (1996) observaron que la recuperación del volumen celular en la microalga *Dunaliella tertiolecta* tras un cambio de la osmolaridad del medio implicaba la actividad de quinasas denominadas LAP Kinase y HAP Kinase. Mediante el empleo del inhibidor específico K-252a se bloqueó la actividad de dichas quinasas, impidiendo la recuperación del volumen original, poniéndose de manifiesto la implicación de estas quinasas de proteínas en la mediación del proceso de tolerancia osmótica en *Dunaliella*. Más recientemente, determinados estudios llevados a cabo con microalgas (Jiménez et al. 2004, 2007, Gómez-García et al. 2012) han demostrado la presencia de quinasas tipo-p38, tipo-JNK y tipo-ERK en microalgas del género *Dunaliella*, analizando el papel que desempeñan en la aclimatación al estrés y en la división celular. Jiménez et al. (2007) llevaron a cabo la secuenciación parcial de la ERK1 y la ERK2 de la microalga *D. viridis*, demostrando una homología muy conservada con quinasas de proteínas tipo ERKs de otros organismos. Ha de subrayarse una relevante diferencia entre las algas y las plantas vasculares; se trata de la presencia de p38 y de JNK en las primeras, y, como ya se ha comentado, en las plantas vasculares no existen evidencias de la presencia de homólogos de ninguna de estas MAPKs, siendo la ERK la única representante. El hecho de que sí existan p38 y JNK en algas, pero no en plantas vasculares, podría poner de manifiesto que las tres cascadas de las MAPKs (p38, JNK y ERK) existieron en algas, pero que posteriormente desaparecieron a lo largo del proceso evolutivo.

La activación de las MAPKs no constituye una respuesta al estrés de carácter general. El calor, la salinidad, el frío, los patógenos, etc., son factores que activan estas vías de las MAPKs específicas. La mayoría de la bibliografía sobre la implicación y



participación de las cascadas de las MAPKs en la señalización de estrés se centra en plantas vasculares, muchas de ellas de gran interés agronómico, siendo la información de la que se dispone actualmente muy escasa para algas y plantas acuáticas.

3. El sistema Intermareal: características generales, estrés ambiental vs organismos intermareales. Sistema Intermareal de Punta Carnero (Algeciras): un sistema altamente fluctuante y sometido a condiciones estresantes.

Las mareas son el resultado de los efectos gravitacionales de la Luna y del Sol. En la práctica, es posible predecir estas oscilaciones de la superficie del mar mediante la interpolación y extrapolación de datos locales con componentes de fases y amplitudes características. Podemos encontrar muchos tipos de mareas, siendo el más general aquel que comprende dos ondas diarias de mareas: dos pleamares y dos bajamares, que avanzan unos 52 minutos cada día. La amplitud de oscilación de las mareas es muy variable; en “mares pequeños” como es el caso del mar Mediterráneo, la marea apenas alcanza 15 cm de altura y consta de una única onda diaria, en cambio, en océanos, como es el caso del océano Atlántico, podemos encontrarlas de hasta 15 metros de amplitud. Las oscilaciones regulares del nivel del mar en forma de ondas de mareas tienen una importancia fundamental en la vida de los organismos que viven en las costas (Margalef 2005). Las mareas, al cubrir y descubrir la zona litoral, obligan a los organismos que allí habitan a permanecer sumergidos o expuestos, condicionando de este modo su actividad vital.

Debido a las condiciones cambiantes, las costas rocosas presentan siempre una zonación característica de la biota. Aunque esta zonación difiere de un lugar a otro, como resultado de las variaciones locales en aspecto, sustrato, acción de las olas, intensidad luminosa, perfil costero, exposición o no a los vientos, diferencias climáticas y otras condiciones similares, siempre presentan las mismas características generales (Smith & Smith 2001). El hecho más patente en el sistema intermareal es el de la disposición en horizontes de las algas y animales bentónicos. Dicha disposición se debe, principalmente, al tiempo que las distintas especies son capaces de resistir la emersión (Niell 1977).

Numerosos estudios se han dedicado históricamente a la disposición de las algas en el sistema intermareal, existiendo dos criterios para adoptar una nomenclatura: uno basado en los organismos característicos de cada “zona”, y el otro en la definición de los límites de la manifestación de determinados factores físicos; según Seoane-Camba (1969) el sistema intermareal se divide en *zonas* que, a su vez, se dividen en *niveles*, viniendo caracterizados todos ellos por factores físicos.

Así, según este autor, la *zona supralitoral* se divide en dos niveles (superior e inferior) separados por el límite marcado por las salpicaduras del agua. La *zona litoral*, separada de la supralitoral por la línea superior de mareas vivas equinocciales, se divide en tres niveles (superior, medio e inferior) que vienen determinados por la línea de pleamares y bajamares muertas. La *zona infralitoral* se dispone inmediatamente por debajo del nivel del agua, y se divide en dos niveles, el nivel superior hasta los 10 m de profundidad y el nivel inferior, hasta el límite inferior de la vegetación algal. Y finalmente la *zona eulitoral* (también denominada *zona elitoral*) comprendida entre el límite inferior de la vegetación y el borde de la plataforma continental. El límite entre la *zona infralitoral* y la *zona eulitoral* lo determina la ausencia de luz (no de vegetación). En estas zonas la vegetación se dispone en *horizontes* tipificados por especies dominantes (Niell 1977).

De manera generalizada, y a fin de poder realizar una clasificación estandarizada que sirva de referencia, los estudios sobre la función de marea desarrollan otra clasificación que, si bien difiere de la propuesta por Seoane-Camba (1969) expuesta más arriba, también comparte tres de las cuatro zonas principales (Figura 8): la primera de ellas, **la zona supralitoral**, en la que los organismos permanecen más tiempo fuera que dentro del agua (algunas veces pasan días hasta que el agua los cubre después de la última inmersión). La segunda, **la zona litoral**, permanece descubierta cada día el mismo tiempo que queda cubierta, tratándose de la zona media del sistema intermareal, y en ella el ritmo de emersión-inmersión es semidiario. Finalmente, la tercera zona, **la zona infralitoral** o **sublitoral**, es la zona del fondo marino (bentos) que está más tiempo dentro

que fuera del agua.

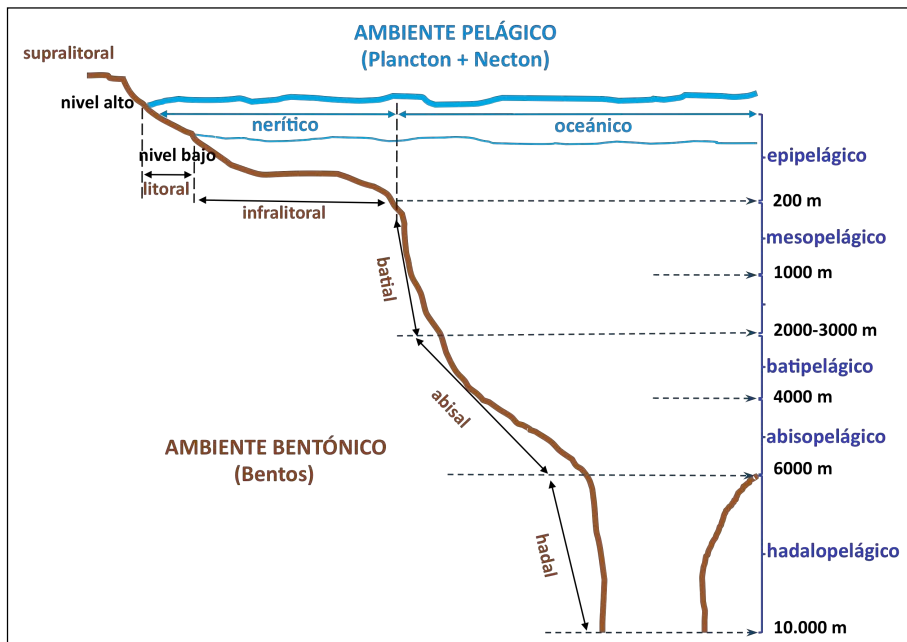


Figura 8. Clasificación de los ambientes marinos.

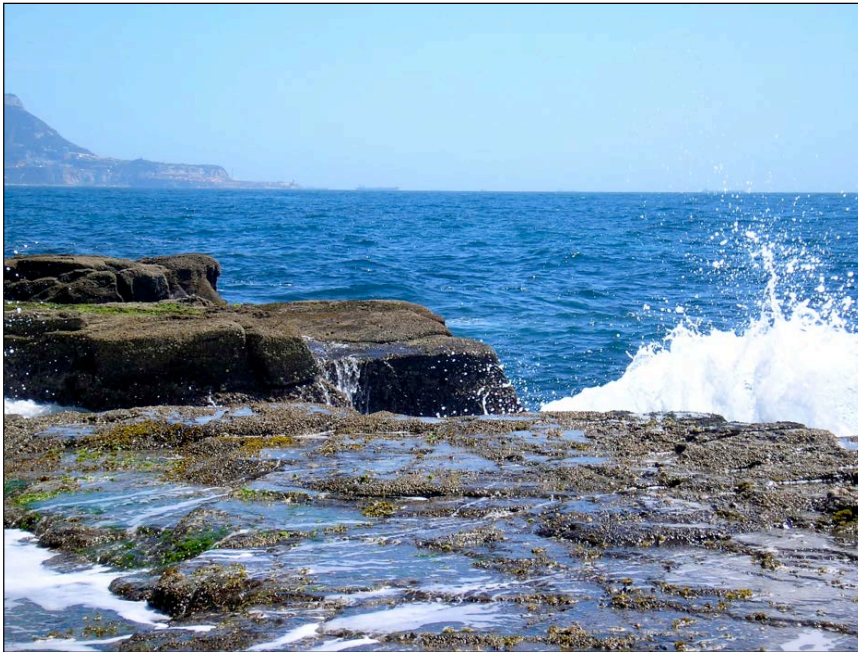
Figure 8. Classification of marine environments.

Estrés ambiental vs organismos intermareales

Las algas marinas se encuentran globalmente distribuidas, desde el Ecuador hasta las regiones polares y, principalmente, se asientan en la parte inferior del sustrato duro, como las costas rocosas. Aquí las comunidades de algas suelen mostrar diferentes patrones de zonación verticales que muestran una secuencia característica de especies al aumentar la profundidad (Stephenson & Stephenson 1972). Las especies que se establecen en la zona supralitoral (la franja por encima del nivel de la marea alta) se encuentran expuestas a la desecación, la alta radiación solar y los cambios atmosféricos de temperatura.

El sistema intermareal establece una frontera entre el mar y la tierra, que se sitúa entre los niveles extremos alcanzados por las mareas equinocciales. El extremo de la marea alta y el extremo de la marea baja delimitan, por tanto, lo que conocemos como

“orilla de la mar”. En situación de pleamar esta orilla constituye un “medio acuático”, en cambio, durante la bajamar nos encontramos con un “medio terrestre” y consecuentemente con sus subyacentes variaciones de temperatura, salinidad, humedad y radiación solar. A medida que el mar se retira durante la bajada de la marea comienza a emerger, capa a capa, la vida que quedaba oculta bajo el agua. Los estratos superiores de organismos quedan, durante un período considerable de tiempo, expuestos al aire, a la desecación, a la intensa radiación solar y a prolongadas fluctuaciones de temperatura. Por el contrario, los organismos de las capas inferiores de la zona intermareal sólo quedarán expuestos al aire de manera breve antes de que el flujo de marea los sumerja de nuevo.



Fotografía 3. Acción de las olas sobre las comunidades de macroalgas intermareales (Punta Carnero, Algeciras).

Picture 3. Wave action on intertidal macroalgal communities (Punta Carnero, Algeciras).

Además, el estrés mecánico debido a las corrientes de marea, y como queda reflejado en la Fotografía 3, la exposición al oleaje, constituye un importante factor de impacto sobre las comunidades intermareales. Ya en la zona sublitoral (también denominada zona infralitoral), que se extiende por debajo del nivel de la marea baja, las

algas suelen encontrarse en un hábitat mucho más estable, ya que la columna de agua amortigua los fuertes cambios en las variables abióticas. A pesar de ello, es difícil determinar cuáles son los factores físicos más determinantes en la distribución de las especies debido a que son varios de ellos los que varían desde la zona alta a la zona baja de la costa (Davison & Pearson 1996).

La sucesión (recolonización de las superficies desprovistas) está relacionada con el flujo de energía a través las comunidades intermareales (Niell 1979, Fernández & Niell 1981, Niell & Varela 1984). Las comunidades de animales y plantas que habitan en la zona intermareal de las costas rocosas están dominadas, con frecuencia, por poblaciones densas de macroalgas, como podemos observar en la Fotografía 4, que presentan distintos patrones de distribución vertical. Estos patrones han suscitado gran interés por parte de ecólogos y ficólogos durante más de un siglo (Baker 1909, 1910, Zaneveld 1969, Niell 1977, Chapman 1986, Norton 1986), pero el mecanismo subyacente, la distribución de las especies y las interacciones que se establecen, son aún objeto de investigación (Davison & Pearson 1996).



Fotografía 4. Comunidades naturales de macrófitos intermareales del nivel superior de la zona litoral de Punta Carnero (Algeciras).

Picture 4. Natural communities of intertidal macrophytes of the upper level of the coastal area of Punta Carnero (Algeciras).

Ejemplo de un sistema altamente fluctuante y sometido a condiciones estresantes: el sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras)

El sistema intermareal de Punta Carnero se sitúa en la confluencia del Atlántico y el Mediterráneo. Debido a la coincidencia de características atlánticas (como son la onda mareal y la masa de agua), con características mediterráneas (elevada temperatura e iluminación típicas de un clima subárido), hacen imposible la supervivencia de las especies de macrófitos típicas de ambos sistemas, siendo así las especies “acompañantes” de cada uno de ellos las que conforman los diferentes horizontes. En la zonación de Punta Carnero se encuentra una **Zona Supralitoral** compuesta por líquenes terrestres y marinos y por *Melaraphe neritoides*. Una **Zona Litoral** formada por los horizontes de *Lichina pigmea*, *Fucus spiralis*, *Chamalus stellatus*, *Gellidium pusillum*, una zona desocupada (debido a la falta de un sustrato adecuado o al tratarse de una zona crítica de emersión) y una zona de mayor amplitud ocupada por *Corallina elongata*, que finaliza en la **Zona Infralitoral**, ocupada por *Laminaria ochroleuca* y *Saccorhiza polyschides*, en su parte superior (Fernández 1982). Por lo general, las especies “dominantes” biológicamente controlan los cambios en la comunidad (Niell 1977), siendo *C. elongata* la especie dominante en el sur de España.

La presencia de macrófitos se reduce, por tanto, a los horizontes inferiores. El criterio para determinar las especies “importantes” condicionará el cálculo de un área mínima cualitativa (*específica*) o cuantitativa (*estructural*), la primera definida por Boudouresque en 1971, como “el área en la que casi la totalidad de las especies están representadas”, y tiene un valor para el horizonte de *Corallina elongata* de 16 cm². A partir de este valor las especies que aparecen al ir aumentando el área se consideran especies “raras” en la comunidad y poco importantes desde el punto de vista de la biomasa. La segunda, el área mínima cuantitativa, se define como “el área en la que se da la estabilización relativa del recubrimiento, de su frecuencia o de su variancia” (Boudouresque 1971) y en Punta Carnero esta área mínima estructural, calculada en función de la diversidad, alcanza un valor de 25 cm² (Fernández 1982). La distribución de

la vegetación en Punta Carnero es uniforme, encontrándose organismos con altos valores de índice foliar (Algarra & Niell 1987) y que no sobrepasan los 10 cm de altura.

El ecosistema intermareal es un medio extremadamente variable, en el que el significado de la periodicidad de las mareas es distinto para los organismos según el nivel en el que se encuentran. Se trata de un medio hostil, en el que los organismos que lo ocupan están estresados, aunque muy bien adaptados a esas condiciones. Asimismo, las especies intermareales poseen mecanismos bioquímicos que les permiten la supervivencia en esas condiciones altamente estresantes. La combinación de la severidad ambiental con la frecuencia de las fluctuaciones rige el comportamiento del sistema y selecciona las estrategias de supervivencia. Cuando las fluctuaciones son impredecibles la supervivencia se hace difícil y prácticamente no hay individuos capaces de soportar tales condiciones. En condiciones de severidad alta pero donde las fluctuaciones son predecibles, existen especies adaptadas que sobreviven; así ocurre en los niveles altos de éste y de otros sistemas intermareales. Como es natural, si las condiciones son adecuadas y las fluctuaciones presentan frecuencias bajas y no son muy acentuadas tenemos las comunidades que denominamos “normales”.

Niell et al. (1989) llevaron a cabo una transformación del valioso modelo propuesto por Grime (1974) a la hora de representar el comportamiento disipativo esperado en un sistema en relación con el estrés. Se trata de una expresión global de la severidad del medio ambiente, que estima los cambios en la frecuencia de la entrada de energía en el sistema y el grado de su predicción. Un sistema que no se encuentra sometido a ninguna perturbación ni estrés sigue un modelo estacional de alternancia de fases de una especie dominante-competitiva que afecta a todas las especies. Se produce una minimización del flujo de energía, volviéndose la comunidad cada vez más diversa. Cuando se producen perturbaciones que se suceden con elevada frecuencia se promueve el predominio de especies oportunistas, que siguen patrones de disipación irregulares y que no pueden definirse.

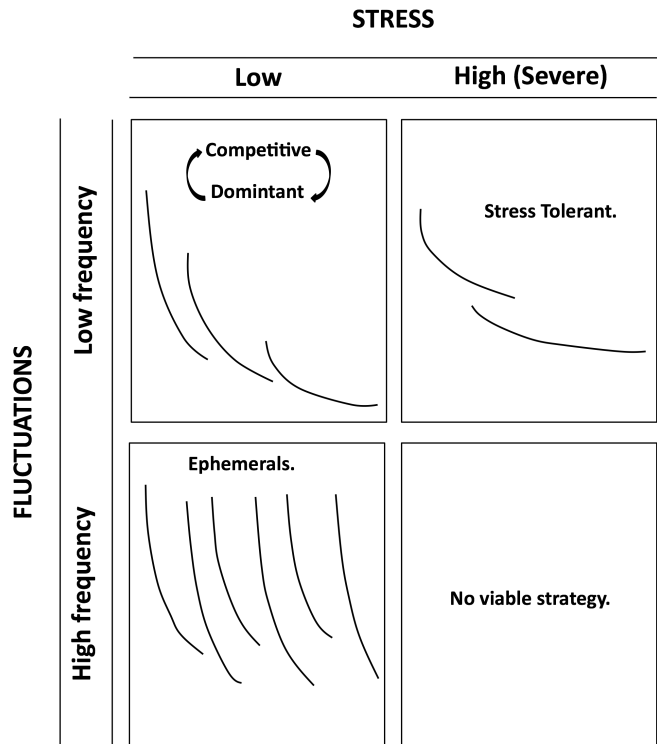


Figura 9. Modelo de Grime de estrategias relacionadas con el comportamiento disipativo, bajo diferentes combinaciones de estrés y perturbaciones (Redibujado de Niell et al. 1989).

Figure 9. Grime's model of strategies related to dissipative behaviour, under different combinations of stress and disturbances (Redrawn from Niell et al. 1989).

En cambio, cuando las perturbaciones se producen con baja frecuencia, en un sistema sometido a estrés severo, predomina la presencia de especies tolerantes al estrés, cuyas características aseguran la supervivencia en ambientes desfavorables.

Los cambios en las localidades altamente estresadas son impredecibles y drásticamente selectivos. Ante este panorama, resulta imposible encontrar una estrategia viable, en aquellos ambientes intermareales altamente estresados por la temperatura como los del sur de España.

4. El ecosistema costero ártico: características generales, factores ambientales estresantes y aproximación al cambio global.

Las especies de macrófitos objeto de estudio en esta memoria proceden del ecosistema costero ártico de Ny-Ålesund (Spitsbergen). El Kongsfjord es parte de la costa noroccidental del archipiélago Svalbard (78°55'N, 11°56'E). En él la amplitud de la marea es de aproximadamente 2 metros; el interior del fiordo se encuentra libre de hielo, por lo menos durante el verano, debido a la suavidad del clima influenciado por la corriente Westspitsbergen y la temperatura anual media del agua se encuentra ligeramente por encima de los 0° C (Ito & Kudoh 1997). Los valores de radiación máxima se alcanzan durante Junio y Julio, con un valor medio máximo diario de 170 W m⁻² de PAR, 16.8 W m⁻² de UV-A y de 0.27 W m⁻² sólo de radiación UV-B en el aire, lo que significa una cantidad máxima diaria de radiación UV-B de 23.3 kJ m⁻² (Hanelt et al. 2004).



Fotografía 5. Imagen del Kongsfjorden y del glaciar Konsvegen. Ny-Ålesund, Svalbard.

Picture 5. Image of the Kongsfjorden and the glacier Konsvegen. Ny-Alesund, Svalbard.

Estudios de zonación intermareal llevados a cabo por Wiencke et al. (2004), muestran cuatro zonas: la *zona litoral*, la *sublitoral superior* (3-5 m de profundidad), la *sublitoral media* (8-15 m) y la *sublitoral inferior* (aproximadamente 30 m).

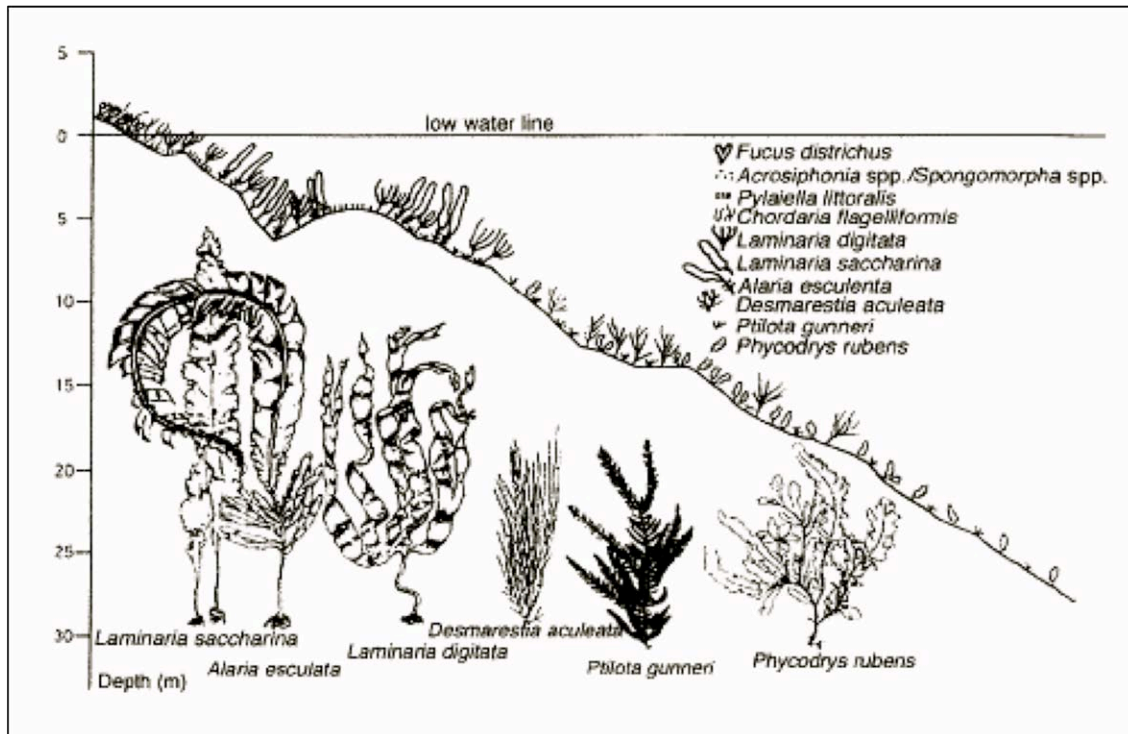


Figura 10. Zonación de las macroalgas dominantes en Hansneset (Blomstrand, Kongsfjorden) (Tomado de Wiencke et al. 2004)

Figure 10. Zonation of dominant macroalgae at Hansneset (Blomstrand, Kongsfjorden) (Taken from Wiencke et al. 2004).

La zona **sublitoral superior** se caracteriza por la presencia de las algas pardas: *Fucus distichus* junto con la epífita *Elachista fucicola*, *Pyloiella littoralis*, *Chordaria flagelliformis*, *Saccorhiza dermatodea*, las algas verdes *Urospora penicilliformis* y las especies similares morfológicamente a *Acrosiphonia* y a *Spongomorpha*. Y la representante de algas rojas más importante es la especie endémica del Ártico *Devaleraea ramentacea*.

En la zona **sublitoral media** nos encontramos con las especies clave de algas pardas *Alaria esculenta*, *Laminaria digitata* y *Laminaria saccharina*. El alga roja *Callophyllis*

cristata y las algas verdes *Desmarestia viridis*, *Sphacelaria plumosa* y *Desmarestia aculeata*, esta última a veces se puede encontrar formando por separado un cinturón entre el sublitoral medio y bajo.

La zona **sublitoral inferior** se caracteriza, además de por la presencia de algas incrustantes calcáreas, por las representantes de algas rojas *Phycodrys rubens* y *Ptilota gunneri*. Ambas rodófitas también crecen como “especies maleza” en el sublitoral medio.

El alga parda *Dictyosiphon foeniculaceus* y la especie endémica del Ártico *Laminaria solidungula*, el alga verde *Monostroma obscurum* así como la rodófitas *Palmaria palmata* son, independientemente de la zonación, todas ellas especies características de este sistema costero ártico. *Alaria esculenta*, *Laminaria digitata* y *Laminaria saccharina* son las especies que cuentan con mayor biomasa por m², seguidas de *Fucus distichus* y de especies de los géneros *Acrosiphonia* y *Spongomorpha*.

El patrón de zonación que se ha descrito anteriormente es comparable con el propuesto para Isfjorden (Svendsen 1959) y otros lugares del Ártico, como por ejemplo para la región de las Islas Nuvuk de la Bahía de Hudson al noreste (Keats et al. 1989) y para el Este de Groenlandia (Lund 1959a, b).

Factores ambientales estresantes y aproximación al cambio global

Se sabe que, en exceso, la radiación solar puede afectar negativamente a las comunidades de plantas (Hanelt 1998). En verano, en esta región ártica, con el aumento de la temperatura, y con la fusión de las capas de nieve y de hielo, así como con los aportes de los glaciares, se produce una gran descarga de agua dulce en el fiordo. Tras la entrada del agua producida por el deshielo, se forma una capa turbia de agua dulce por encima del agua de mar (más densa), produciéndose en la cuenca interior del Kongsfjord una disminución de la salinidad (Svendsen et al. 2002). Esto provoca una estratificación,

quedando los organismos de aguas más profundas completamente protegidos contra la radiación UV-B (Hanelt et al. 2001), a pesar de ello los organismos intermareales se encuentran expuestos a la radiación UV-B durante la marea baja.

La variación estacional en la descarga de agua dulce crea una estratificación estable en verano, la cual se desestabiliza en otoño por el enfriamiento y en invierno se puede producir una estratificación inversa, aumentándose este efecto por el calentamiento de la atmósfera durante el verano y por el frío en el invierno. La circulación de la capa superior en verano se limita a una capa superficial (Svendsen et al. 2002) con unos valores de salinidad inferiores a 30 ups (unidades prácticas de salinidad, ‰). De manera general, en primavera la masa de agua local presenta unos valores de salinidad de aproximadamente 34,5 ups, en verano, debido a los procesos de fusión la salinidad de las aguas superficiales cae por debajo de los 28 ups en la cuenca del interior, cerca de los glaciares y es de aproximadamente 30 ups en el interior del fiordo (Svendsen et al. 2002).

La distribución en profundidad de las especies se ve afectada por el régimen de radiación solar de dos maneras; en la zona sublitoral superior, los valores tanto de radiación UV como de radiación fotosintéticamente activa pueden resultar demasiado elevados para las especies sensibles, permitiendo solamente la presencia de especies más tolerantes (Hanelt et al. 1997, Aguilera et al. 1999, Wiencke et al. 2000, Karsten et al. 2001, Bischof et al. 2002, 2004). Por el contrario, la radiación fotosintéticamente activa es limitante en la zona sublitoral inferior y el límite de distribución en profundidad de cada especie viene determinado por el balance entre la fotosíntesis y la respiración, el denominado equilibrio metabólico del carbono (Gómez et al. 1997).

Es ampliamente aceptado que el Ártico es una de las regiones del mundo donde los cambios en el clima, la hidrografía y la ecología, relacionados con el calentamiento global, van a expresarse de manera más acusada. Podemos observar cómo el aumento de la temperatura y la descarga de los ríos, así como la reducción de la banquisa en el Ártico, junto con el aumento en los niveles de CO₂ atmosférico a escala global, están ocurriendo

a mayor velocidad de lo previsto (Stroeve et al. 2007). Si hay una característica importante del actual cambio global y de su actividad sobre el ecosistema ártico es la velocidad a la se está produciendo, de ahí que exista gran preocupación por cómo estos cambios van a afectar al medio acuático del Ártico. Conforme acontecen los cambios, las nuevas condiciones favorecerán a unos organismos más que a otros. De persistir estos cambios, es esperable la alteración en la composición de las especies que conforman las comunidades, y por tanto también en la red trófica, determinándose nuevos patrones estructurales de flujo de C en el ecosistema (Gordillo et al. 2006, Li et al. 2009). Además, la amplitud de estas fluctuaciones es muy superior a los cambios climáticos previstos para las próximas décadas (Thomsen & Melzner 2010).

De este modo, el sistema ártico contribuye en un 5-14 % al balance global de CO₂ y actúa como sumidero de C (Bates & Mathis 2009). Como consecuencia de la incorporación de CO₂ a las capas superficiales del océano, la concentración de carbono inorgánico disuelto (C_i) ha aumentado durante las últimas décadas y consecuentemente el pH ha disminuido (Takahashi et al. 2009). Este proceso, conocido como “acidificación oceánica”, tendrá unas dimensiones de 0.3 a 0.5 unidades de pH durante el presente siglo según el informe del IPCC de 2007. Esta disminución de pH tendrá enormes consecuencias para multitud de procesos biológicos. Además, el descenso en CO₃²⁻ resulta esencial para organismos con conchas y otras estructuras carbonatadas, tanto animales (Langdon et al. 2003) como vegetales (Riebesell et al. 2000). La acidificación oceánica implica un aumento en los niveles de CO₂ disuelto (de 19 a 55 μM para aguas polares en equilibrio con la atmósfera).

Los modelos de predicción de las consecuencias del cambio climático en el ciclo del C en el Ártico tienen que tener en cuenta las características físicas del océano Ártico y la actividad fitoplanctónica (Arrigo et al. 2008, Bates & Mathis 2009). Sin embargo, estos estudios no suelen incluir la contribución de las macroalgas. A pesar de que la presencia de las especies de macrófitos se limita a los primeros 40 m de la zona costera, su actividad



se desarrolla durante todo el año (a diferencia del fitoplancton que sólo aparece de manera significativa durante unas pocas semanas) y a escala regional tienen un papel dominante en los flujos de C.

Se sabe que las macroalgas dominan la producción primaria en las zonas costeras del Ártico, pero los mecanismos de adquisición y asimilación de C, así como su regulación están poco descritos. La gran mayoría de los estudios sobre incorporación de carbono se han desarrollado en microalgas (en cianobacterias principalmente, en clorófitas unicelulares y en diatomeas). Recientemente, los macrófitos sésiles (uno de los tipos de organismos acuáticos afectados), han captado la atención de varios grupos de investigación. Se han estudiado los patrones de zonación en profundidad, así como las características fotosintéticas básicas, nutricionales y el crecimiento a temperaturas cercanas al punto de congelación (Gómez et al. 2011). Además, se han descrito las estrategias estructurales y funcionales que permiten a las algas polares sobrevivir durante largos períodos de tiempo en oscuridad, y enfrentarse al exceso de luz y limitación de nutrientes en verano (Wiencke et al. 2011), así como algunos de los efectos de la UVR sobre estos organismos.

Por tanto, las regiones polares constituyen sistemas muy severos donde los organismos que las habitan han debido desarrollar estrategias únicas de adaptación y aclimatación, distintas a las ya descritas para algas procedentes de latitudes templadas.

Justificación del Trabajo. Hipótesis y Objetivos

Las algas, al igual que las plantas vasculares, están frecuentemente expuestas a condiciones ambientales cambiantes. Para sobrevivir en estas situaciones han desarrollado una compleja red de señales bioquímicas que les permite percibir los cambios ambientales y desarrollar una respuesta que las proteja frente a los mismos. Cuando las plantas han de responder a una situación de estrés se pone en marcha una compleja red de fosforilaciones y defosforilaciones de quinasas de proteínas específicas denominadas MAP quinasas (Mitogen Activated Protein Kinases-MAPK), lo que lleva a la activación/desactivación de grupos de genes específicos. Estas proteínas constituyen tres cascadas bien descritas en células de mamíferos, en plantas y de manera escasa en algas.

Los resultados que se mostrarán a lo largo de esta Memoria se han obtenido con especies de macrófitos procedentes de dos sistemas costeros muy diversos y que presentan peculiares características cada uno: el sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras) y el ecosistema costero Ártico de Ny Ålesund (Spitsbergen). La elección de estos ecosistemas no es banal, ya que se trata de medios extremadamente variables. Nuestra hipótesis de trabajo es que al tratarse de sistemas altamente fluctuantes y hostiles, los organismos que los ocupan están realmente estresados, aunque muy bien adaptados a esas condiciones, y sin duda, estos sistemas de control y respuesta han de estar bien desarrollados tanto en macrófitos intermareales como en macrófitos árticos.

Es en este marco donde nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Desarrollar y poner a punto un método de extracción de proteínas fosforiladas eficiente en macroalgas, en el que se mantenga intacto el estado de fosforilación.
2. Determinar la presencia de proteínas MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK en respuesta a factores ambientales tales como emersión y radiación en macrófitos intermareales en el Sur de España.

3. Detectar y analizar la actividad de proteínas MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK en respuesta al aumento de temperatura y radiación ultravioleta en dos especies de Laminariales árticas.

CAPÍTULO I

Un novedoso método de extracción de fosfoproteínas en macroalgas

Los resultados presentados en este capítulo han sido incluidos en la siguiente publicación:

Parages ML, Capasso JM, Meco V, Jiménez C (2012) A novel method for phosphoprotein extraction from macroalgae. *Bot Mar* 55: 261-267.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Abstract

Extraction of proteins from macroalgae has always been difficult, primarily because of their high internal levels of polysaccharides and polyphenols. Several methods for protein extraction have been developed recently that allow the production of high quality extracts for 1-D SDS gel electrophoresis or 2-D SDS polyacrylamide gel electrophoresis for proteomic analysis. However, none of the existing methods are applicable to the study of the phosphorylation state of kinases involved in stress responses of macroalgae, primarily because trichloroacetic acid and phenol are used for protein precipitation. In this chapter, we describe a novel method for protein extraction from macroalgae based on the counter intuitive use of commercial RNA purification kits; this method maintains the phosphorylation state of the kinases intact, as demonstrated by either polyclonal or monoclonal antibodies against the phosphorylated forms of mitogen activated protein kinases using Western blot methodology. This method may be appropriate for wider use in the analysis of phosphoproteomes.

Introducción

La extracción de proteínas de macroalgas ha sido siempre una tarea complicada, debido, principalmente, a la existencia de paredes celulares y a los elevados niveles de determinados componentes internos que presentan, tales como polisacáridos y polifenoles. Desde la descripción de los primeros métodos, la extracción de proteínas de macroalgas ha experimentado una gran evolución. Los primeros protocolos incluían pasos donde los talos (ya fuesen congelados o no) eran manualmente macerados en tampón fosfato en frío, 0.1 M pH 6.5, y posteriormente seguían uno o varios pasos de centrifugación a velocidad media ($19.000 \times g$) a 4°C y, finalmente, se llevaba a cabo la determinación de la concentración de proteínas existentes en el sobrenadante obtenido. Una vez preparados y cuantificados los extractos proteicos, se realizaba la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (Laemmli 1970) tras una desnaturalización con SDS y β -mercaptoetanol.

El éxito de estos métodos dependía, en gran medida, del grupo de algas concretas con las que se trabajaba. En muchos casos era necesario llevar a cabo la concentración del contenido proteico de los extractos antes de realizar la electroforesis debido a la baja eficiencia que presentaban los métodos de extracción. La concentración del contenido proteico de los extractos podía realizarse bien por precipitación mediante el empleo de acetona, metanol o ácido tricloroacético (TCA), o por liofilización.

El interés creciente en la actualidad por la genómica y la proteómica de macroalgas ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de extracción de proteínas para el análisis mediante electroforesis de geles de poliacrilamida en 2D (Contreras et al. 2008, Nagai et al. 2008).

Las proteínas incluidas en el grupo de las quinasas constituyen un grupo de enzimas reguladoras, cuya actividad resulta clave para el funcionamiento celular. Estas enzimas modifican la estructura química de otras proteínas mediante la adición de grupos fosfato. Como resultado de este proceso, denominado fosforilación, o debido a los cambios estructurales y funcionales que provocan sobre otras proteínas, su nivel de actividad, su localización subcelular, o ambos, se ven modificados para poder llevar a cabo otros procesos metabólicos. Se han descrito más de 500 quinasas de proteínas, y su actividad resulta particularmente importante en el proceso de transducción de señales desde los receptores celulares hasta la activación de genes específicos. En la mayoría de los casos, la fosforilación implica la transferencia del grupo γ -fosforilado, desde una molécula donante de ATP a cualquiera de los tres aminoácidos canónicos con radicales hidroxilo libre: treonina, serina y tirosina.

Las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) constituyen un tipo de quinasas específicas con residuos de serina y treonina altamente conservados, que han sido ampliamente estudiadas en organismos desde levaduras a seres humanos, por su papel como transductores de señales extracelulares. La activación de las quinasas tiene efectos cruciales en muchas de las rutas metabólicas de la célula. Por esta razón, poder ser capaces de detectar el estado de fosforilación de las quinasas es básico y fundamental para la comprensión de las respuestas celulares bajo condiciones de estrés. Para ello, es frecuente emplear la técnica de “Western blot”, mediante la cual las formas fosforiladas de las quinasas son detectadas empleando anticuerpos específicos contra ellas. Resulta totalmente necesario que los grupos fosfato permanezcan unidos a las proteínas durante todos los pasos del proceso: extracción, electroforesis, transferencia a la membrana y detección por anticuerpos. En cada paso, desde la extracción de proteínas hasta la inmunodetección, se puede producir la pérdida de los grupos fosfato, llevándonos a errores en la evaluación y el posterior análisis de los datos. Los anticuerpos empleados han sido diseñados para actuar y reconocer las formas fosforiladas de estas quinasas de proteínas. Esta unión proteína-anticuerpo primario es altamente específica, descartando cualquier reactividad cruzada con las formas no fosforiladas. Varios factores



fisicoquímicos pueden inducir la ruptura del enlace fosfato, por ejemplo, los tratamientos con ácidos fuertes (Brautigán et al. 1985).

La extracción de proteínas tipo MAPKs en algas fue desarrollada por primera vez por Jiménez et al. (2004, 2007). En estos trabajos se describió la presencia de componentes de las tres principales vías de las MAPKs de mamíferos, en la microalga unicelular *Dunaliella viridis* Teodoresco. Las cascadas de la p38 y de la JNK son cruciales para la adaptación y la supervivencia de este microalga bajo estrés hiperosmótico. Además, ha quedado demostrado que la actividad de la vía de señalización ERK controla la proliferación celular en *D. viridis*. Debido al hecho de que *Dunaliella* carece de una pared celular rígida, la extracción de proteínas se realizó según lo descrito por Capasso et al. (2001a) para cultivos de células de mamíferos. En el protocolo empleado se centrifugaron los cultivos de *Dunaliella*, siendo extraídas las proteínas directamente desde los pellets, utilizando un tampón de lisis específico para las MAPKs (Wojtaszek et al. 1998). Sin embargo, a diferencia de los exitosos resultados que este método permitió obtener en *Dunaliella*, su aplicación en el caso de las macroalgas resultó ser extremadamente ineficiente y, por tanto, este método fue descartado.

En este capítulo se describe un nuevo método que proporciona extractos proteicos de alta calidad y que permite la detección del estado de fosforilación real de las MAPKs en macroalgas. Este método se basa en la capacidad de algunos kits comerciales de enlazar y unir selectivamente el RNA, permitiendo la obtención de extractos proteicos mucho más purificados. Este método ha sido aplicado con éxito para la extracción de las formas fosforiladas de las MAPKs en macroalgas clorófitas, rodófitas y heterocontófitas.

Material y Métodos

Material y pretratamiento

Se recolectaron varias especies de macroalgas clorófitas (*Ulva rigida* C. Agardh y *Ulva compressa* Linnaeus), heterocontófitas (*Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss y *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux) y rodófitas (*Corallina elongata* Ellis et Sollander y *Jania rubens* (Linnaeus) J.V. Lamouroux) de diferentes sistemas intermareales del sur de España. La macroalga roja *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* Zhang et Xia fue cedida por la Profesora M. Pedersén de la Universidad de Uppsala (Suecia) y lleva cultivándose en nuestro laboratorio de la Universidad de Málaga durante los últimos 20 años. Como control del método de extracción de proteínas se emplearon cultivos de la clorófitica unicelular *Dunaliella viridis*, que fue cultivada según lo descrito previamente por Jiménez & Niell (1991).

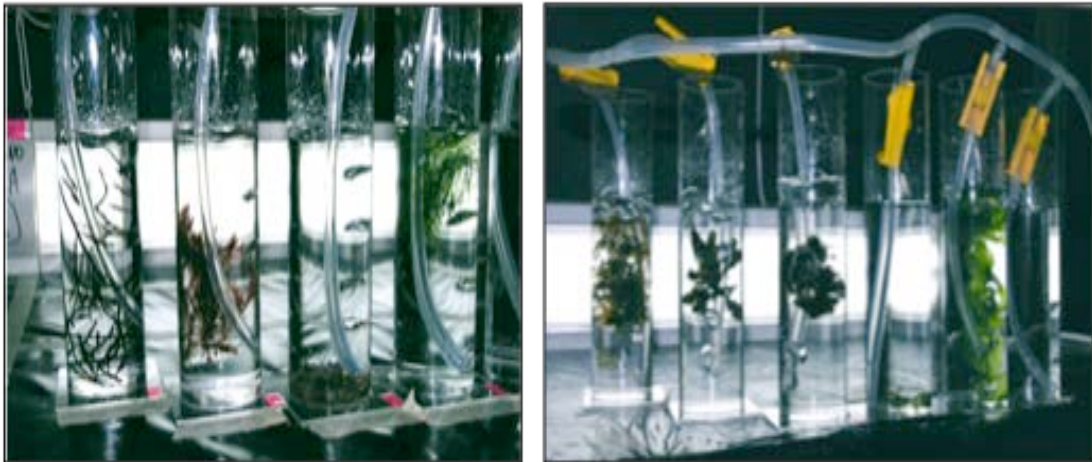
Las especies de macrófitos seleccionadas fueron transportadas cuidadosamente al laboratorio en cajas refrigeradas. Una vez en el laboratorio, se limpiaron y se les retiraron los organismos epífitos. Para cada muestra, aproximadamente 4-5 g de material fue colocado en cilindros de policarbonato transparente de 1 L de capacidad. Durante un período de tres días, los macrófitos fueron cultivados en agua de mar filtrada suplementada con medio Provasoli (1968) (Tabla I.1), con un aporte continuo de aireación bajo una irradiancia de $150 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suministrada de manera continua mediante el uso de lámparas fluorescentes de luz blanca (TL-D daylight 36W/54-765, Holland)(Fotografía I.1).

La temperatura de la cámara de crecimiento fue ajustada, proporcionando temperaturas con valores similares a los registrados en el agua de mar del lugar de muestreo en cada época de año. En estas condiciones, los talos fueron aclimatados durante un período de 3 días, añadiendo medio Provasoli a las 48 horas.

Tabla I.1. Composición del medio de cultivo Provasoli (1968).

Table I.1. Composition of Provasoli's medium (1968).

For 1000 ml of filtered sea water	
NaNO ₃	0.07 g
Na ₂ glycerophosphate	0.01 g
Fe (as EDTA)	0.5 mg
P II metals	
H ₃ BO ₃	0.028 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	1.22 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	4.1 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.55 mg
CoSO ₄ 7H ₂ O	0.12 mg
Na ₂ EDTA	25 mg
Vitamin B12	2 µg
Thiamine	0.1 µg
Biotine	1 µg
Tris buffer	100 mg
pH 7.8	



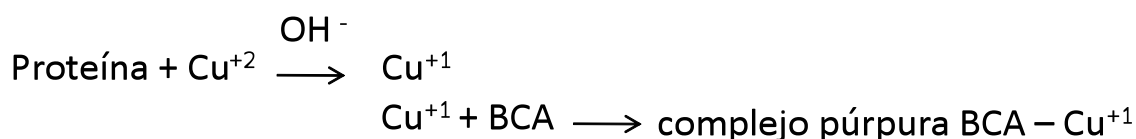
Fotografía I.1. Diferentes macrófitos durante el período de aclimatación (aireación continua y 150 µmoles de fotones m⁻²s⁻¹ de irradiancia).

Picture I.1. Different macrophytes during the acclimation period (continuous aeration and 150 µmols photons m⁻²s⁻¹ of irradiance).

Finalizado el período de aclimatación, los talos de cada especie fueron expuestos a alta radiación lumínica (500 μmoles de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR) durante 30 minutos. Posteriormente, estos talos se congelaron en N_2 líquido y fueron almacenados a -80°C hasta su análisis posterior. Alrededor de 1 g por réplica de esa biomasa congelada fue macerado a mano para la obtención de los extractos proteicos.

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas solubles totales de los extractos fue determinada mediante el método del ácido bicinconínico. El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas y el ión Cu^{2+} del reactivo en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que resultan susceptibles de interferir cuando se usan otros métodos. La recta patrón se elaboró a partir ampollas de albúmina sérica bovina (1 mg/ml) en un rango de 0-1 mg/ml de la proteína.



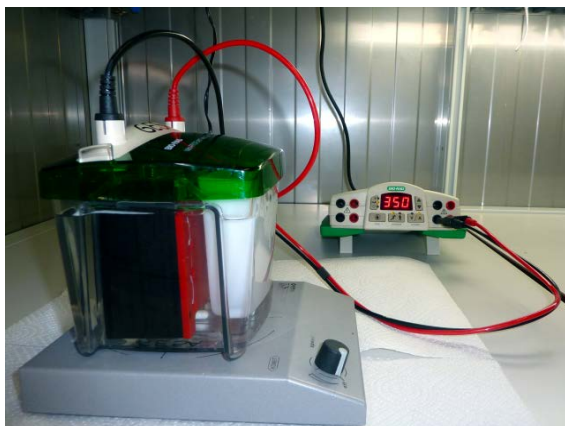
Análisis de proteínas mediante la técnica “Western blot”

La electroforesis, la transferencia a las membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) y la inmunodetección se llevaron a cabo según el método descrito por Capasso et al. (1992, 2001b) y Jiménez et al. (2004).

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) bajo condiciones reductoras (**SDS-PAGE**), es un método rápido, reproducible y de bajo coste, y que es ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Se trata de una técnica analítica semipreparativa en la que se separan las biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico (Laemmli 1970). El método permite separar proteínas haciéndolas pasar a través de una resina de Acrilamida-BisAcrilamida, que genera una matriz en la cual se quedarán retenidas las proteínas.

El empleo de compuestos como el SDS, que alteran las condiciones nativas de las proteínas, permite que éstas adquieran una relación carga/masa idéntica, y que sean desnaturalizadas por completo (rompiendo las uniones no covalentes que mantiene la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas). Los grupos sulfato se sitúan en la superficie de la cadena polipeptídica, generándose una carga neta negativa y obteniéndose de este modo siempre la misma carga por unidad de masa.

En nuestro caso, la electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a un voltaje constante de 100 V, empleando un único tampón para el gel (3.0 M Tris, pH 8.45 /0.3% SDS) y un tampón de corrida (0.025 M Tris/0.192M Glicina/0.1% SDS). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon-P de PVDF por el sistema de transferencia Mini-Protean (BioRad) durante 2 horas a un amperaje constante de 390 mA, empleando el siguiente tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% metanol (Fotografía I.2).



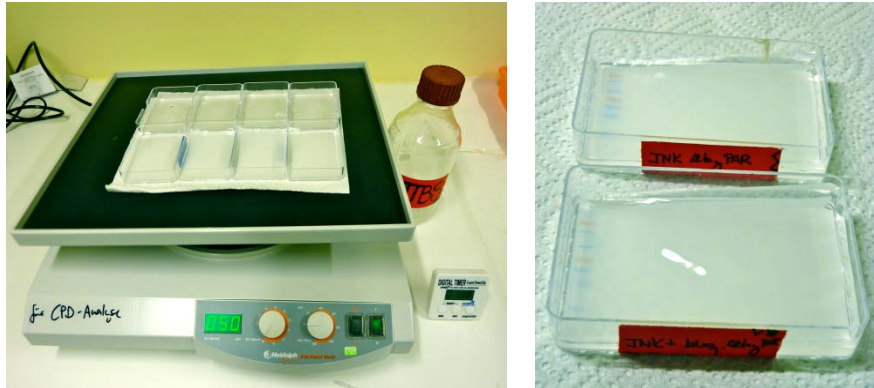
Fotografía I.2. Imagen tomada durante el paso de transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF en el interior de una cámara a una temperatura controlada de 4° C.

Picture I.2. Image taken during the step of transferring the proteins onto PVDF membranes inside a chamber at a controlled temperature of 4° C.

Finalizada la transferencia, se bloquearon las regiones de la membrana donde no había proteínas transferidas, impidiendo las uniones inespecíficas del anticuerpo, con una solución de bloqueo compuesta por BSA (albúmina sérica bovina) al 3% en TTBS (3 M NaCl, 0.5 M Tris, pH 7.5-7.8 y 0.1% Tween-20) durante 2 horas, a 4° C en agitación.

Para la inmunodetección, los anticuerpos empleados contra las formas fosforiladas de las MAPKs p38 y JNK fueron adquiridos en Cell Signaling Technology (Ph-p38 #9211, Ph-p38-Blocking Peptide #1170, Ph-JNK #9251, Ph-JNK-Blocking Peptide #1215, Anti-rabbit IgG, HRP-linked # 7074, Beverly, MA, USA). Se emplearon diluciones 1/1000 en el caso de los anticuerpos primarios y diluciones 1/2000 en el caso de los anticuerpos secundarios. Tras la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C en agitación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación, con solución TTBS (Fotografía I.3). A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-IgG (inmunoglobulinas G) de conejo, conjugado con HRP

(peroxidasa de rábano) durante 2.5 horas, tras las cuales se realizó otra serie de 3 lavados de 10 minutos en agitación con la misma solución TTBS. Finalmente, y tras otra serie de lavados, las membranas se revelaron con el kit comercial ECL (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System RNP2019, Amersham) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.



Fotografía I.3. Diferentes pasos de lavado de las membranas en TTBS previos al revelado con ECL.

Picture I.3. Different steps of washing the membranes in TTBS prior to development with ECL.

Resultados y Discusión

En este trabajo vamos a revisar varios métodos para la extracción de proteínas de macroalgas. Mostraremos las características que diferencian unos de otros y los discutiremos comparándolos con el nuevo método de extracción de proteínas fosforiladas presentado en esta memoria.

Método de extracción 1

El primer método de extracción de proteínas probado en este trabajo fue el propuesto por Hadlung et al. (1992) para la rodófito *Gracilaria tenuistipitata*. El tampón de extracción empleado en este primer caso contenía 50 mM Tris, 25 mM ácido ascórbico, 25 mM β -mercaptoetanol y 5 mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos contra las formas fosforiladas de la MAPK p38. En la Figura I.1, se muestran los resultados obtenidos usando este primer método de extracción.

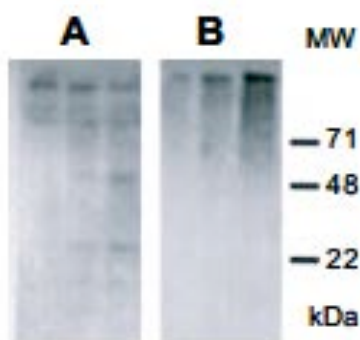


Figura I.1. Western blots de extractos proteicos de *Ulva rigida* (A) y *Corallina elongata* (B) tras la extracción con 50 mM Tris, 25 mM ácido ascórbico, 25 mM β -mercaptoetanol y 5 mM EDTA (Hadlung et al. 1992). En todas las calles aparecen los resultados obtenidos con los anticuerpos contra las formas fosforiladas de la p38, ensayados a diferentes concentraciones crecientes de proteínas (50, 100 y 200 μ g proteína/pocillo), de izquierda a derecha, primera, segunda y tercera calle respectivamente. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.1. Western blots of cell extracts from *Ulva rigida* (A) and *Corallina elongata* (B) after protein extraction with 50 mM Tris, 25 mM ascorbic acid, 25 mM β -mercaptoethanol and 5 mM EDTA (Hadlung et al. 1992). Membranes were incubated with antibodies raised against the phosphorylated form of the p38 MAPK. Lanes 1, 2 and 3 for each species indicate an increasing protein load: 50, 100 and 200 μ g per lane. MW: molecular weight marker.

El análisis por Western blot mostró unas bandas muy tenues en los geles de *Ulva rigida* cuando se usó el anticuerpo anti fosfo-p38, y en los geles de *Corallina elongata* no se observaron bandas, ni siquiera en las calles en la que se cargó una concentración de 200 µg de proteínas. Además, en ambos casos aunque de manera más patente en los geles de *Corallina*, apareció al inicio de cada calle una señal muy patente en los pocillos, sugiriendo que las proteínas podrían no haberse desnaturalizado completamente o podrían haber formado agregados con otras moléculas de alto peso molecular.

Existen posibles explicaciones para la ausencia de señales en el análisis por Western blot: 1) la ausencia de MAPK en la macroalgas (improbable), 2) la no reactividad cruzada con anticuerpos de mamíferos, 3) la baja calidad de la fracción de proteínas en los extractos, que no permitiría una buena separación durante la electroforesis (probable) y 4) la pérdida del grupo fosfato durante la extracción de las proteínas (probable). Los extractos de proteínas de macroalgas (especialmente las algas pardas) incluyen grandes cantidades de polifenoles (Ragan & Jensen 1977) y de polisacáridos ácidos. Los polifenoles son compuestos que pueden unirse fuertemente a las proteínas, y además la viscosidad que aportan los polisacáridos complica siempre el proceso de extracción.

Método de extracción 2

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta trabajos anteriores sobre MAPKs en algas (Jiménez et al. 2004, 2007) con *D. viridis*, nos centramos en macroalgas del mismo grupo, como *Ulva rigida* y *Ulva compressa*. El segundo método que se probó fue el descrito por Wojtaszek et al. (1998) y Capasso et al. (2001a) para células de mamíferos, utilizando como control positivo *D. viridis*. Grosso modo, en el método original las células eran separadas por centrifugación a baja velocidad (1500 × g) y resuspendidas directamente en 1 ml del tampón de lisis para MAPKs, en frío. La composición del tampón de lisis para MAPKs aparece especificada a continuación en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Composición del tampón de lisis usado para la extracción de las MAPKs en células de mamíferos (Wojtaszek et al. 1998, Capasso et al. 2001a) y en *Dunaliella viridis* (Jiménez et al. 2004, 2007).

Table I.2. Composition of the lysis buffer used for extraction of MAPKs in mammalian cells (Wojtaszek et al. 1998, Capasso et al. 2001a) and *Dunaliella viridis* (Jiménez et al. 2004, 2007).

β -glycerophosphate (pH 7.2)	50 mM
Triton X-100	0.5 %
Sodium vanadate	0.1 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	1 mM
Dithiothreitol	1 mM
Leupeptin	2 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Aprotinin	2 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Las muestras se incubaban durante 1 h a 4° C, y posteriormente se ultracentrifugaban a 100.000 \times g durante 45 minutos también a 4° C. Finalmente los sobrenadantes se guardaban a -80° C para posteriormente determinar el contenido proteico. En el caso de las macroalgas, este método ha sido modificado, agregando dos importantes pasos: en el primero, una cantidad aproximada de 1-2 g de los talos congelados fueron macerados en N₂ antes de añadir 1 ml del tampón de lisis para MAPKs en frío (Tabla I.2) y en el segundo, las muestras fueron sonicadas (3 pulsos de 1 min cada uno) y durante 1 h se mantuvieron en hielo, siendo mezcladas con la ayuda de un agitador de tubos (Vórtex) cada 15 minutos. Después se ultracentrifugaron a 100.000 \times g durante 45 minutos a 4° C. Para terminar, se recuperó el sobrenadante, se estimó la concentración de proteínas de las muestras que a continuación se analizarían por SDS-PAGE. En todas las calles de los geles de electroforesis se cargó la misma cantidad de proteínas (100 μg). Una vez finalizada la electroforesis los geles fueron teñidos con azul Coomassie para detectar los patrones de las proteínas (Figura I.2). Este segundo método presentaba, al igual que el anterior, una baja eficiencia en la extracción de proteínas.

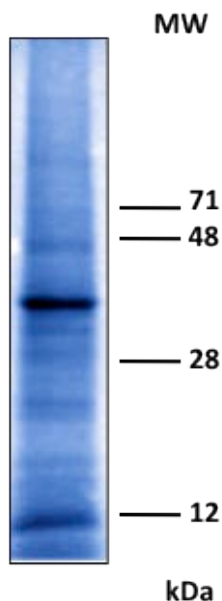


Figura I.2. Gel de *Ulva rigida* teñido con azul Coomassie. La extracción de las proteínas fue llevada a cabo según el método descrito por Wojtaszek et al. (1998) para células de mamíferos y Jiménez et al. (2004), en la microalga *Dunaliella viridis*. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.2. Coomassie blue staining of *Ulva rigida* protein extracts. Extraction of the proteins was performed following Wojtaszek et al. (1998) and applied by Jiménez et al. (2004) to the microalga *Dunaliella viridis*. MW: molecular weight marker.

Como se puede apreciar en la Figura I.2, la mayoría de las bandas que se obtuvieron fueron muy tenues, indicando que la extracción de proteínas resultó no ser todo lo eficiente que se esperaba, o que las proteínas no se habían separado correctamente durante la electroforesis, debido posiblemente a la interacción con otras macromoléculas.

De nuevo, ante los resultados obtenidos, nos centramos en averiguar si de alguna manera la separación de las proteínas o la extracción de las mismas se podía estar viendo entorpecida por algún artefacto o componente celular. Según Ragan & Jensen (1977) las macroalgas son ricas en polifenoles y en polisacáridos, por tanto, estos compuestos podrían estar interfiriendo a la hora de alcanzar nuestro objetivo de obtener unos extractos de proteínas fosforiladas de calidad.

Según los resultados obtenidos después de aplicar los dos métodos descritos anteriormente, y sabiendo que en la mayoría de los casos las proteínas pueden encontrarse unidas a polifenoles y a polisacáridos, o incluso al RNA, nuestro propósito fue intentar conseguir desligar a las proteínas de cualquier componente que pudiera

interferir en su separación electroforética y por supuesto, preservar su estado de fosforilación.

Método de extracción 3

Sobre el último método de extracción descrito, introdujimos ciertas variaciones que afectaban principalmente al procedimiento de trituración y homogenización de las muestras. De este modo, probamos el tercer método en el que, después de macerar la biomasa congelada en N₂ líquido a mano, el polvo obtenido fue mezclado con la misma cantidad de tierra de diatomeas y se le añadió 1 ml de TRIzol® (Invitrogen) como disolvente de extracción. Posteriormente, las muestras se sometieron a 3 pulsos de 1 min cada uno de Ultra-Turrax® (IKA, T10, Wilmington, NC, Estados Unidos) manteniendo siempre las muestras refrigeradas en hielo entre cada uno de los pulsos. El TRIzol es un conocido reactivo para la obtención de RNA intacto y de alta calidad, y que está compuesto principalmente de fenol y de isotiocianato de guanidina. El uso del fenol, con o sin la adición del isotiocianato de guanidina, promueve la precipitación de las proteínas. Recientemente, el fenol ha sido propuesto por diversos autores para la extracción de proteínas de macroalgas para estudios de proteómica (Wong et al. 2006, Contreras et al. 2008, Nagai et al. 2008). El TRIzol es capaz de alterar la estructura espacial de las proteínas, liberándolas de los ácidos nucleicos y de cualquier otro sustrato al que puedan estar unidas. Además, inhibe cualquier actividad enzimática. El uso de TRIzol exige la separación de fases, que se realiza por adición de cloroformo y la precipitación de las proteínas en la fase acuosa con isopropanol.

Después de los diferentes pasos con TRIzol, las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en tampón de lisis para MAPKs (Tabla I.2). Finalmente las muestras se prepararon y se cargaron en los geles de manera idéntica al método anterior.

Tal y como se muestra en la Figura I.3, los geles teñidos con azul Coomassie pusieron de manifiesto, un vez más, que tampoco con el empleo del TRIzol se conseguían resultados satisfactorios. En este caso, en los geles se apreciaban claramente las muestras de *Dunaliella* (control) en comparación con el resto de macroalgas ensayadas.

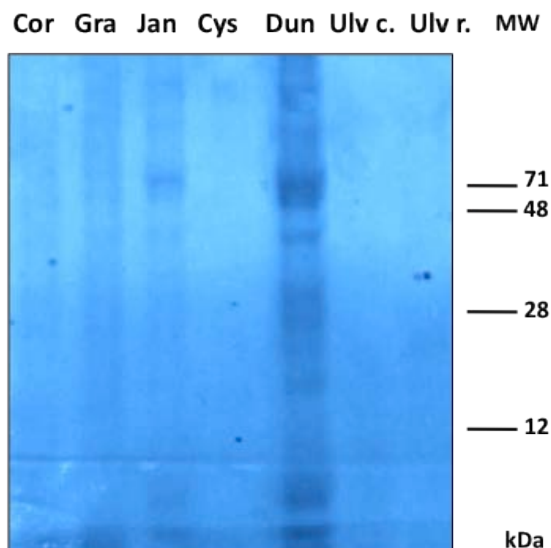


Figura I.3. Gel teñido con azul Coomassie de diferentes extractos de proteínas obtenidos macerando los talos empleando Ultra-Turrax en presencia de tierra de diatomeas y TRIzol. Cor: *Corallina*, Gra: *Gracilaria*, Jan: *Jania*, Cys: *Cystoseira*, Dun: *Dunaliella*, Ulv c: *Ulva compressa*, Ulv r: *Ulva rigida*. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.3. Coomassie blue staining of several protein extracts performed by grinding the thalli using an Ultra-Turrax disperser in the presence of diatomaceous earth and TRIzol. Cor, *Corallina* Gra, *Gracilaria*; Jan, *Jania*; Cys, *Cystoseira*; Dun, *Dunaliella*; Ulv c, *Ulva compressa*; Ulv r, *Ulva rigida*; MW: molecular weight marker.

Método de extracción 4

Se desarrolló un cuarto método de extracción utilizando de nuevo el TRIzol y añadiendo otro paso de precipitación, con acetona o metanol, después de la extracción de las proteínas con TRIzol. Además, en este método la glicina fue reemplazada por tricina en la composición del tampón para el gel de electroforesis. Con este método se consiguió por primera vez obtener bandas de proteínas mucho más nítidas y definidas.

Como se muestra en la Figura I.4, el paso de precipitación con acetona no mejoró el patrón de proteínas en *U. rigida* (Figura I.4A). En cambio, la precipitación con metanol incrementó notablemente el número de bandas detectadas de esta especie. Sin embargo, los resultados con este método aplicado a otros taxones no fueron satisfactorios, especialmente para las heterocontófitas (Figura I.4B). Además, la inmunodetección

realizada utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de la p-38 y de la JNK era todavía muy pobre (Figura I.4C).

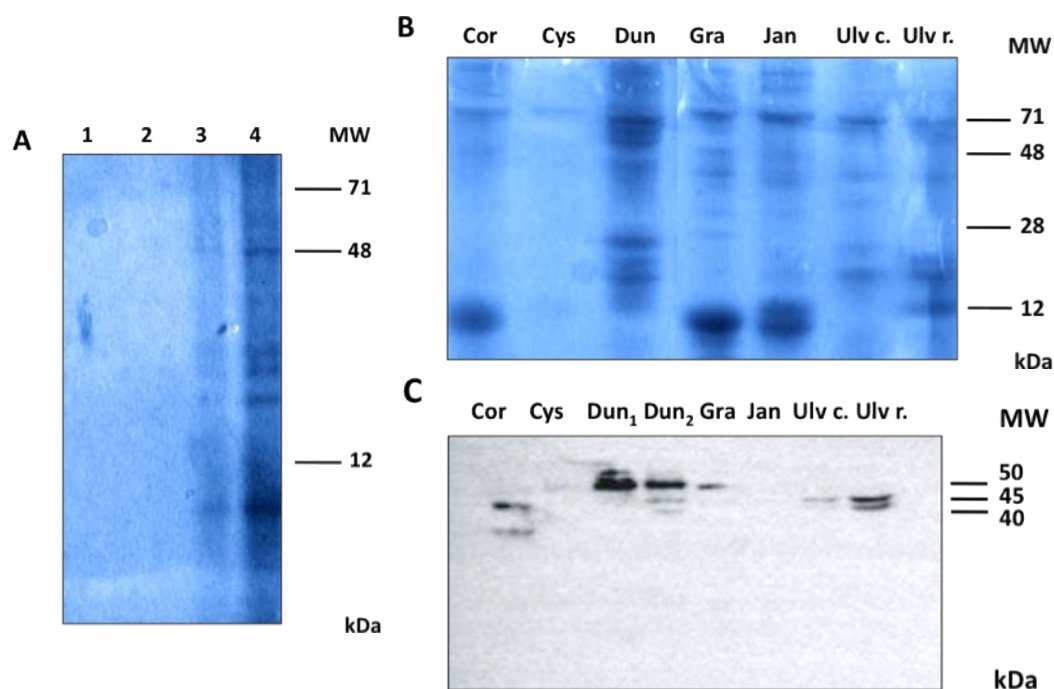


Figura I.4. (A). Gel teñido con azul Coomassie de extractos de *Ulva rigida* realizados con TRIzol (como en la Figura I.3), seguido de la precipitación de proteínas con acetona (calles 1 y 2; 50 y 100 µg de proteínas, respectivamente) o con metanol (calle 3 y 4; 50 y 100 µg de proteínas, respectivamente) y donde la Glicina fue reemplazada por Tricina en el tampón de elaboración del gel. MW: Marcador de peso molecular. (B). Gel teñido con azul Coomassie de extractos de varias macroalgas seguido de la precipitación con metanol. Se cargaron 50 µg de proteínas en todas las calles y se reemplazó la Glicina por Tricina en la composición del tampón de elaboración del gel. Cor: *Corallina*, Cys: *Cystoseira*, Dun: *Dunaliella*, Gra: *Gracilaria*, Jan: *Jania*, Ulv c: *Ulva compressa*, Ulv r: *Ulva rigida*. *Dunaliella* fue usada como control. MW: Marcador de peso molecular. (C). Western blots de extractos de proteínas de macroalgas llevados a cabo con TRIzol, seguidos de la precipitación de proteínas con metanol, se cargaron 50 µg de proteínas en todas las calles y se reemplazó la Glicina por Tricina en el tampón de elaboración del gel. Cor: *Corallina*, Cys: *Cystoseira*, Dun: *Dunaliella*, Gra: *Gracilaria*, Jan: *Jania*, Ulv c: *Ulva compressa*, Ulv r: *Ulva rigida*. *Dunaliella* fue usada como control. Las muestras fueron ensayados con anticuerpos contra las formas fosforiladas de la JNK de mamíferos. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.4. (A). Coomassie blue staining of *Ulva rigida* extracts carried out with TRIzol (as in Figure I.3), followed by protein precipitation using either acetone (lanes 1 and 2; 50 and 100 µg protein, respectively) or methanol (lanes 3 and 4; 50 and 100 µg protein, respectively). Glycine was replaced by tricine in the gel buffers. MW, molecular weight markers. (B) Coomassie blue staining of macroalgal extracts, as described in Figure I.4A, followed by protein precipitation with methanol. Fifty micrograms of protein was loaded in all

lanes. Glycine was replaced by tricine in the gel buffers. Cor, *Corallina*; Cys, *Cystoseira*; Dun, *Dunaliella*; Gra, *Gracilaria*; Jan, *Jania*; Ulv c, *Ulva compressa*; Ulv r, *Ulva rigida*. *Dunaliella* was used as control. MW, molecular weight markers. (C) Western blot of macroalgal extracts with TRIzol, followed by protein precipitation with methanol. Fifty micrograms of protein was loaded in all lanes. Glycine was replaced by tricine in the gel buffers. Cor, *Corallina*; Cys, *Cystoseira*; Dun, *Dunaliella*; Gra, *Gracilaria*; Jan, *Jania*; Ulv c, *Ulva compressa*; Ulv r, *Ulva rigida*. *Dunaliella* was used as control. Samples were tested against mammalian phospho-JNK antibodies. MW: molecular weight marker.

Método de extracción 5

Después de la mejora significativa obtenida con el método anterior, se introdujo el uso de un molino criogénico (FreezerMill 6870, SPEX CertiPrep Inc., NJ, USA) a la hora de macerar los talos, consiguiendo así aumentar el rendimiento de la extracción. El TRIzol fue descartado y se incluyó una novedosa variación, el uso de kits comerciales diseñados para la purificación de RNA como el Qiagen® RNeasy Mini Kit® y el Qiagen® RNeasy plant Mini Kit®. Estos kits están diseñados para retener selectivamente el RNA en una membrana de sílice, y contienen buffers en cuya composición interviene la guanidina (al igual que el TRIzol). Para separar de manera efectiva las proteínas del resto de los compuestos solubles en el extracto, nos basamos en la capacidad para separar las proteínas del ARN que presentaban estos kits comerciales. El uso del kit de Mini RNeasy® fue descartado, ya que no proporcionó extractos de proteínas de buena calidad. Sin embargo, el kit Qiagen® RNeasy plant Mini Kit®, quizá por ser de uso específico en plantas, dio mucho mejores resultados que el resto de métodos probados o desarrollados anteriormente. Este kit específico para plantas incluye dos columnas selectivas diferentes, una columna “QIAshredder” a través de la cual se filtra todo el contenido viscoso procedente de la maceración, consiguiendo homogeneizar la muestra, y la columna “RNeasy spin” capaz de purificar hasta 100 µg de RNA debido a que contiene membranas de sílice. Por lo tanto, la combinación de ambas columnas y sus correspondientes tampones, permitió disminuir la viscosidad de los extractos. Aunque no se hicieron valoraciones específicas, estimamos que con el uso de estas columnas se consiguió, por primera vez de manera exitosa, descartar el contenido de polisacáridos, polifenoles y RNA de las muestras.

Finalmente, se realizó la puesta a punto del método de extracción contemplando los siguientes pasos:

- 1) Una cantidad de 1-2 g de los talos congelados fueron macerados mediante el uso del molino criogénico.
- 2) Se añadieron 20 μl g^{-1} de β -mercaptoetanol y de 2 ml g^{-1} del tampón Qiagen (incluido en el kit).
- 3) Después de mezclar con ayuda del Vórtex[®], las muestras fueron homogeneizadas con Ultra-Turrax[®] (IKA, T10) realizando 3 pulsos de 1 min cada uno siempre manteniendo las muestras refrigeradas en hielo.
- 4) Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 15.000 \times g.
- 5) Se pasaron dos veces los sobrenadantes a través de la columna QIAshredder, que una vez usadas fueron descartadas.
- 6) Se añadió al eluyente obtenido etanol absoluto hasta alcanzar el 33%.
- 7) Tras mezclar con la ayuda del Vórtex[®], la solución obtenida fue cargada en la columna RNeasy spin.
- 8) La solución que pasaba por la columna fue recogida y se le añadió SDS en una concentración final del 2% y, después de mezclar de nuevo con el Vórtex[®], se agregaron 5 volúmenes de metanol para la precipitación de proteínas.
- 9) La solución se conservó durante toda la noche a -20° C.
- 10) Tras este período, las muestras se centrifugaron a 4° C durante 30 minutos a 15.000 \times g.
- 11) Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 200 μl de SDS al 10%.
- 12) Se agregaron 800 μl de tampón de lisis para MAPKs (Tabla I.1), del cual había sido eliminado el Tritón X-100.
- 13) Finalmente se centrifugaron las muestras a 4° C durante 30 minutos a 15.000 \times g. El sobrenadante en este último paso de centrifugación constituía nuestros extractos proteicos. Se determinó el contenido proteico total mediante el método del BCA y se realizó el análisis por Western blot.

Como se muestra en la Figura I.5A, se obtuvieron patrones de proteínas de gran calidad después de teñir los geles con azul Coomassie. Además, se encontraron dos bandas muy intensas en el intervalo de peso molecular de 43–45 KDa, detectadas por los anticuerpos específicos anti-fosfo-JNK (Figura I.5B) en *Cystoseira*, *Ulva rigida* y *Ulva compressa*, y una única banda fue detectada en *Corallina elongata*. Este resultado indicó que se había conseguido preservar intacto el estado de fosforilación en las muestras. En la Figura I.6 se muestra, de manera detallada, todos los pasos del protocolo.

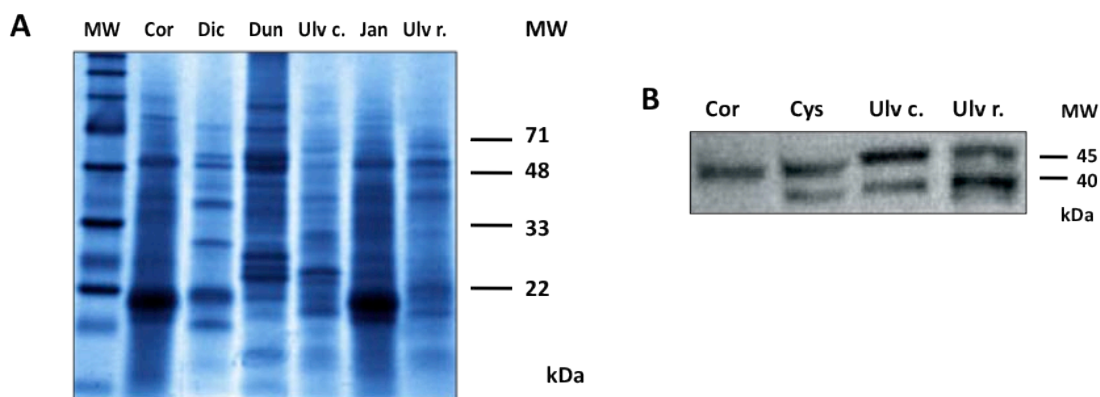


Figura I.5. (A). Gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie de extractos de proteínas de diferentes especies de macroalgas, usando como control extractos de proteínas de *Dunaliella*. Cor: *Corallina*, Dic: *Dictyota*, Dun: *Dunaliella*, Ulv c: *Ulva compressa*, Jan: *Jania*, Ulv r: *Ulva rigida*. MW: Marcadores de peso molecular. (B). Western blot de extractos de proteínas seleccionados. Las muestras fueron enfrentadas contra anticuerpos de mamíferos anti-fosfo-JNK. Cor: *Corallina*, Cys: *Cystoseira*, Ulv c: *Ulva compressa*, Ulv r: *Ulva rigida*. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.5. (A) Coomassie blue staining of poly-acrylamide gels of protein extracts from several macroalgal species. *Dunaliella* extract was used as control. Cor, *Corallina*; Dic, *Dictyota*; Dun, *Dunaliella*; Ulv c, *Ulva compressa*; Jan, *Jania*; Ulv r, *Ulva rigida*. MW, molecular weight markers. (B) Western blot of selected protein extracts performed as in Figure I.5A. Samples were challenged against mammalian Ph-JNK antibodies. Cor, *Corallina*; Cys, *Cystoseira*; Ulv c, *Ulva compressa*; Ulv r, *Ulva rigida*. MW: molecular weight marker.

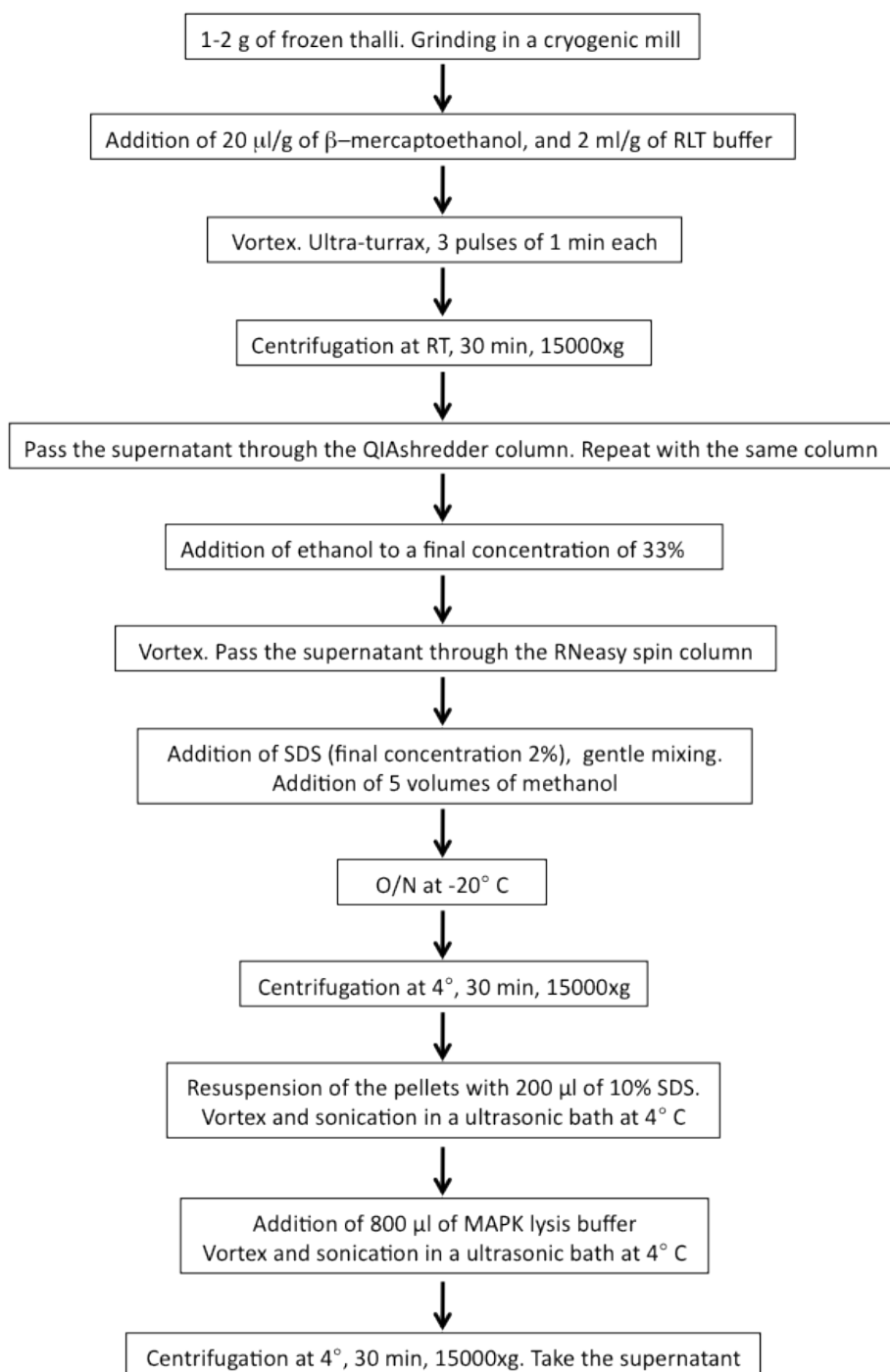


Figura I.6. Representación esquemática del método desarrollado para la extracción de proteínas fosforiladas de macroalgas. O/N: overnight.

Figure I.6. Schematic representation of the method developed for the extraction of phosphorylated proteins from macroalgae. O/N: overnight.

Una vez confirmada la presencia de proteínas fosforiladas tipo MAPKs en las muestras de macroalgas, se comprobó la efectividad en la extracción de los dos tampones diferentes incluidos en el kit comercial Qiagen, el tampón RLT y el tampón RLC. La principal diferencia entre ambos tampones reside en el tipo de sal de guanidina, mientras que el tampón RLC contiene clorhidrato de guanidina, el tampón RLT contiene tiocianato de guanidina. Como se muestra en la Figura I.7, el tampón RLT mostró un mayor rendimiento que el tampón RLC, de esta manera, el RLT fue seleccionado para las extracciones.

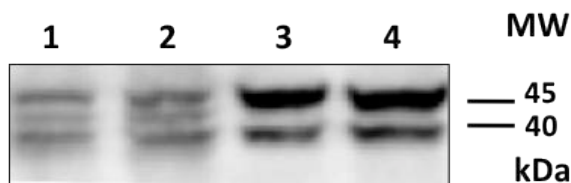


Figura I.7. Western blot de extractos de *Ulva rigida* llevados a cabo con el Qiagen RNeasy Plant Mini Kit, utilizando el tampón RLC (calles 1 y 2; 50 y 100 µg de proteínas, respectivamente) o el tampón RLT (calles 3 y 4; 50 y 100 µg de proteínas, respectivamente) Las muestras se enfrentaron contra anticuerpos fosfo JNK de mamíferos. MW: marcador de peso molecular.

Figure I.7. Western blot of *Ulva rigida* extracts performed with the Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (see Figure I.5 for details) using either the RLC (lanes 1 and 2; 50 and 100 µg protein, respectively) or the RLT (lanes 3 and 4; 50 and 100 µg protein, respectively) extraction buffers. Samples were challenged against mammalian Ph-JNK antibodies. MW: molecular weight marker.

Para intentar obtener una mayor concentración de proteínas y una mayor estabilidad de las muestras, se incluyó un paso de liofilización, que se emplea de manera generalizada en la extracción de proteínas de otras algas. Sin embargo, como se muestra en la Figura I.8, la liofilización no debe emplearse para la detección de proteínas fosforiladas tipo MAPKs. Tanto en *Ulva rigida*, como en *Corallina elongata* el uso del anticuerpo anti-fosfo-p38 generó una señal fuerte antes de la liofilización, desapareciendo ésta casi por completo tras la misma.

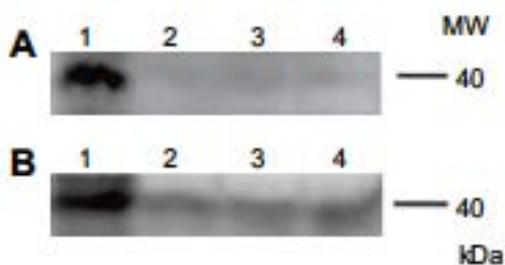


Figura I.8. Western blot de extractos de proteínas de *Ulva rigida* (A) y *Corallina elongata* (B). enfrentados contra anticuerpos de mamíferos fosfo p38. Calle 1: extractos de proteínas no liofilizadas de ambas especies. Las calles 2, 3 y 4: extractos de proteínas liofilizadas (100, 200 y 300 µg de proteínas por calle, respectivamente). MW: marcador de peso molecular.

Figure I.8. Western blot of *Ulva rigida* (A) and *Corallina elongata* (B) protein extracts challenged against mammalian Ph-p38 antibody. Lane 1 indicates non-lyophilized extracts in both species. Extracts were performed as detailed in Figure I.5. Lanes 2, 3 and 4 were loaded with lyophilized protein extracts (100, 200 and 300 µg per lane, respectively). MW: molecular weight marker.

En conclusión, mediante la utilización de este nuevo método de extracción de proteínas (incluyendo las proteínas fosforiladas) en macroalgas, se obtuvieron extractos de proteínas de alta calidad en todos los grupos de macroalgas. Como los polisacáridos y los polifenoles de las algas presentan densidades y propiedades de enlace iónico similares que el RNA (Su & Gibor 1988), se propone la utilización del kit comercial Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit para descartar componentes celulares como RNA, polisacáridos y polifenoles, que quedan retenidos en las columnas, y que interfieren durante la obtención de buenos extractos de proteínas. Además, otra mejora aportada con este nuevo método consiste en modificar la composición del tampón de lisis empleado para las células de mamíferos y para las clorofitas unicelulares como *Dunaliella viridis*, sustituyendo el Tritón X-100 por el SDS al 10%.

Sin duda, este método constituye una herramienta útil en el estudio de la Ecología molecular y la Proteómica de macroalgas. El desarrollo de este método ha sido crucial para el desarrollo de los restantes capítulos de la presente memoria.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CAPÍTULO II

Fosforilación de proteínas tipo-MAPKs en macrófitos intermareales en respuesta a estrés ambiental

Los resultados presentados en este capítulo están en fase de preparación para su publicación.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Abstract

In this chapter we describe the presence and activation of MAPK-like proteins in intertidal macroalgae. Two MAPK-like proteins of 40 and 42 KDa similar to p38 and JNK respectively, of mammalian cells, have been detected in six representative species of intertidal macrophytes of the Strait of Gibraltar (Southern Spain), namely *Ulva rigida* and *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta), *Corallina elongata* and *Jania rubens* (Rhodophyta), and *Dictyota dichotoma* and *Dilophus spiralis* (Heterokontophyta). Phosphorylation of these MAPKs was studied during semitidal cycles on site. For this, MAPKs were extracted following a newly developed methodology that helps to keep intact the phosphorylated state of the kinases, with further detection by Western blot (see Chapter I). Analysis of p38 and JNK was carried out by using specific antibodies against the phosphorylated forms of both MAPKs, as well as their specific blocking peptides. Analysis by Western blot of samples collected through the years 2008 to 2011 from the natural growing site, both in days when low tides occurred at midday and when maximal irradiance coincided with high tides, indicated that in all species phosphorylation of these kinases was highly stimulated in response to either desiccation imposed by low tide, or by high irradiance at midday. Concomitantly, p38 phosphorylation always preceded that of JNK. Results are discussed on the basis of stress signal transduction network, on the different structural and metabolic adaptations of the different species, and on the ecological implications for intertidal macrophytes.

Introducción

Las algas, al igual que las plantas vasculares, se ven a menudo expuestas a diferentes tipos de estrés debido a las variaciones de las condiciones ambientales. Los cambios de temperatura, salinidad, irradiancia (visible y ultravioleta) y la disponibilidad de nutrientes afectan a su crecimiento, desarrollo y producción. Las plantas en general y las algas en particular sobreviven gracias a una compleja red metabólica mediante la que perciben las señales de estrés y elaboran una respuesta apropiada que permite su adaptación a un ambiente cambiante. Entre las comunidades algales sometidas a ambientes altamente fluctuantes y estresantes están aquellas de los sistemas intermareales. El sistema intermareal situado entre los niveles extremos alcanzados por las mareas equinocciales constituye una frontera entre el mar y la tierra. Durante la bajamar los organismos que viven en el sistema intermareal quedan expuestos al aire y sufren diferentes tipos de estrés como son el estrés hídrico, térmico, lumínico, nutricional y osmótico.

El ecosistema intermareal es un medio extremadamente variable, en el que el significado de la periodicidad de las mareas es distinto para los organismos según el nivel en el que se encuentren. Es, pues, un medio hostil, en el que los organismos que lo ocupan están realmente estresados, aunque muy bien adaptados a esas condiciones. La combinación de severidad ambiental con la frecuencia de las fluctuaciones rige el comportamiento del sistema y selecciona las estrategias de supervivencia.

Actualmente se sabe que cuando un cambio ambiental estimula a las células de las plantas se pone en marcha una respuesta que permite la supervivencia en el nuevo ambiente. En general la información externa es transmitida hasta el núcleo celular a través de una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones de determinadas quinasas de proteínas, que llevan a la activación o desactivación de grupos de genes específicos (Kyriakis & Avruch 2001). Este proceso lleva a dos posibilidades excluyentes: o bien son

capaces de adaptarse a las nuevas condiciones, o bien entran en un proceso que conduce hacia la muerte celular. Estos mecanismos de respuesta deben ser rápidos, y deben estar perfectamente regulados para poder captar los cambios ambientales y por lo tanto sobrevivir; si no, los organismos morirán durante los períodos de marea baja.

La transmisión de la señal en eucariotas desde el ambiente externo al núcleo celular es controlada por los procesos de fosforilación de las denominadas MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases-MAPKs, Quinasas de proteínas activadas por mitógenos). Estas quinasas participan en la respuesta celular, activándose ante un amplio espectro de estímulos extracelulares, tales como factores de crecimiento, desecación, radiación UV, cambios osmóticos, variaciones de temperatura, señales de diferenciación, etc. La función que desempeñan las MAPKs resulta esencial para la viabilidad de las células, debido entre otras razones a que se encuentran involucradas en muchos programas celulares, tales como la proliferación y la diferenciación celular, el movimiento y la muerte celular.

Como ya se ha mencionado, existen trabajos pioneros (Jiménez et al. 2004, 2007) en los que se ha detectado la fosforilación de varias quinasas en la microalga *Dunaliella viridis* en respuesta a distintos tipos de estrés ambiental, usando anticuerpos específicos de mamíferos contra las formas fosforiladas de las MAPKs. Después de someter a estas microalgas a un choque osmótico, lumínico o térmico, se induce la fosforilación de distintos polipéptidos reconocidos por anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las tres cascadas principales de las MAPKs descritas en las células de mamíferos (p38, JNK, ERK). Hasta el momento estos resultados, junto con los de García-Gómez et al. 2012, constituyen la única identificación de homólogos de las MAPK en algas, y se trata de la primera información que se tiene sobre su actividad y función fisiológica.

Tomando como base los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo con microalgas, en este capítulo nos planteamos la hipótesis de que los macrófitos



intermareales podrían cíclicamente fosforilar y desfosforilar proteínas MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK en respuesta al movimiento de las mareas y a los cambios de irradiancia asociados. A lo largo del capítulo se demuestra la presencia de homólogos de las cascadas de la p38 y de la JNK en macrófitos intermareales como: *Ulva rigida*, *Chaetomorpha aerea*, *Dictyota dichotoma*, *Dilophus spiralis*, *Jania rubens* y *Corallina elongata*, y se muestra la fosforilación y desfosforilación de determinadas MAPKs reconocidas por anticuerpos muy específicos contra las formas fosforiladas de las MAPKs, en respuesta al estrés ambiental que imponen la marea baja y la alta irradiancia. En todos los casos, después de la emersión, se detecta una fosforilación transitoria de varios polipéptidos tipo MAPK.

Material y Métodos

Lugar de muestreo y toma de muestras

Se tomaron muestras de las siguientes especies de macrofitos: *Ulva rigida* C. Agardh, *Chaetomorpha aerea* (Dillwyn) Kützinger, *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Dilophus spiralis* (Montagne) G. Hamel, *Jania rubens* (Linnaeus) J.V. Lamouroux y *Corallina elongata* Ellis et Sollander del sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras, Estrecho de Gibraltar, Sur de España). A lo largo de la costa que bordea el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico se suceden mareas semidiurnas, con semiperiodos de mareas de entre 6 y 7 horas de duración. En el Estrecho de Gibraltar, como ya sabemos, la marea tiene una amplitud de aproximadamente 1 m, esto nos da una idea de los largos períodos de emersión a los que se encuentran sometidos los macrófitos intermareales de esta zona costera, sujetos sin duda a duras condiciones ambientales, pero que a pesar de todo toleran perfectamente. La estructura del sistema intermareal de Punta Carnero constituye una región de tránsito entre el Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo y comprende diferentes niveles y zonas bien diferenciados, desde la zona supralitoral a la zona infralitoral (Fernández 1982, Niell et al. 1989).

Hemos de aclarar que todas las especies de macrófitos empleadas en este trabajo se recogieron en el nivel medio e inferior de la zona litoral, ya que debido a las severas condiciones ambientales reinantes en los sistemas intermareales del sur de España, la presencia de macrófitos en el nivel superior de la zona litoral es casi inexistente, encontrándose sólo representada la especie *Fucus spiralis*. En el nivel medio de la zona litoral se encuentra un horizonte, entendiéndose como tal a “un tipo de vegetación dispuesta de una forma determinada en la Zona Litoral” (Niell 1977), entre los 0 y los 0.6 m sobre el nivel del mar, en el cual *Corallina elongata* constituye la especie más representativa. *U. rigida* se encontró dispuesta formando parches en la parte media-superior. Entre los 10 y 35 cm sobre el nivel de mar fue localizada *Chaetomorpha aerea* en pequeñas pozas formadas en marea baja (si bien quedaba también totalmente

expuesta al aire), mientras que *Jania rubens* aparecía un poco más arriba, entre los 15 y 45 cm sobre el nivel del mar. *Dictyota dichotoma* y *Dilophus spiralis* sólo se encontraron en una restringida banda a 50-55 cm de altura, aunque en ocasiones, también se han localizado alojadas en cubetas formadas en bajamar. *Corallina elongata* como se ha comentado más arriba, es la especie más representativa y se distribuye de manera homogénea a lo largo de todo este horizonte. Siempre, en todos los experimentos realizados, se ha empleado como control positivo la microalga unicelular *Dunaliella viridis* Teodoresco. La extracción de proteínas de todos los macrófitos intermareales seleccionados para este estudio se ha llevado a cabo según la metodología desarrollada en el Capítulo I de la presente memoria y la extracción de proteínas para el control positivo de *Dunaliella* se realizó según Jiménez et al. (2004).

Los talos completos de las especies de macrófitos seleccionadas se tomaron de sus respectivos lugares naturales de crecimiento cada hora durante marea alta y marea baja durante las horas de luz, tal y como queda reflejado el apartado de resultados de este capítulo. Directamente en la zona de muestreo, y durante el transcurso de los experimentos, las muestras de macrófitos fueron limpiadas, retirando de ellas las especies epífitas, e inmediatamente los talos fueron congelados en N₂. Una vez finalizados los experimentos, se transportaron en contenedores especiales para el transporte de N₂ en seco hasta el laboratorio, donde fueron reservados a -80° C hasta los análisis posteriores.

Extracción de proteínas, electroforesis e inmunodetección

Los talos congelados fueron macerados con el molino de bolas Retsch MM400 mixer mill (Retsch, Haan, Germany). Para ello, tanto las muestras como los contenedores y las bolas se depositaban en N₂ líquido previa a la trituración, para así asegurarnos de que los talos no se descongelaban. Las proteínas se extrajeron según el reciente método puesto a punto y desarrollado en el capítulo I, y la determinación del contenido proteico de los extractos se llevó a cabo mediante el método BCA (Ácido Bicinconínico).

Los análisis de “Dot blots” se realizaron empleando el equipo Schleider & Schnell Dot Blot (Bio-Rad Laboratories). Se trata del método más sencillo que existe actualmente para transferir proteínas a una membrana. En primer lugar, para activar y hacer hidrófilas las membranas de PVDF se pretrataron éstas con metanol 100% durante 15 s, y posteriormente se lavaron en agua bidestilada durante 5 min. Una vez activadas las membranas permanecieron en PBS (Phosphate Buffered Saline- 1x PBS: 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.4) durante 3-5 min. Se añadió, por igual, en cada pocillo, una cantidad de 200 µg de extracto de proteínas, ajustándose el volumen de todos ellos a 200 µl. La absorción de la gota provoca la adhesión de las proteínas a la membrana, quedando en forma de una mancha o *dot*. Para facilitar la adhesión de las proteínas sobre la membrana se aplicó una presión de vacío de 400 mbar; con esta succión se facilita la penetración de la solución proteica. Una vez las muestras se encontraban en la membrana, se bloquearon las regiones de la misma en las que no había proteínas transferidas, impidiendo posteriores uniones inespecíficas con los anticuerpos, y para ello se usó una solución de bloqueo compuesta por BSA (albúmina sérica bovina) al 3% en TTBS (3 M NaCl, 0.5 M Tris, pH 7.5-7.8 y 0,1% Tween-20) durante 1 hora, a 4° C en agitación. La inmunodetección y el revelado posterior se realizó según el capítulo I de la presente memoria.

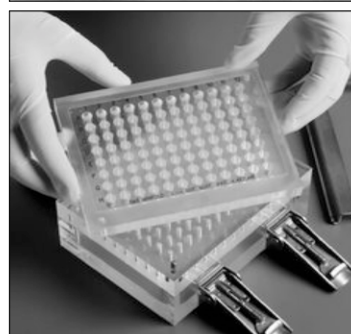
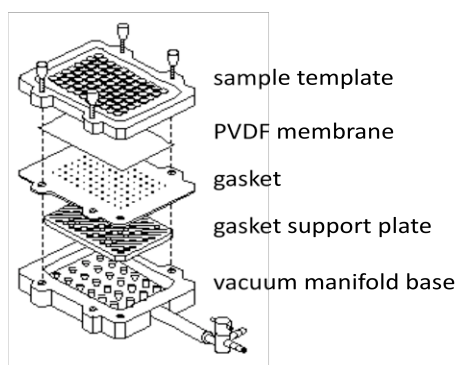


Figura II.1. Equipo de análisis de Dot blot Schleider & Schnell Dot Blot (Bio-Rad Laboratories).

Figure II.1. Dot blot analysis equipment Schleider & Schnell (Bio-Rad Laboratories).

La electroforesis e inmunodetección se realizaron igualmente según el capítulo I de esta memoria, y se emplearon anticuerpos contra las formas fosforiladas de las MAPKs p38 y JNK. En los análisis de Western blots las membranas se revelaron con el kit comercial ECL (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System RNP2019, Amersham) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante, y se analizaron con el sistema Kodak Gel Logic 1500 Image System. Todos los anticuerpos así como los péptidos de bloqueo empleados se adquirieron en Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Por último, la intensidad de las bandas obtenidas se analizaron mediante el software gratuito ImageJ 1.440 (National Institutes of Health, USA).

Los datos de radiación fueron registrados por el radiómetro multifiltro NILU UV-6 (NILU Products AS, Norway), y cedidos por el Prof. Dr. Félix López Figueroa y la Dra. Francisca de la Coba Luque, de la Unidad de Fotobiología de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

Resultados

Detección de proteínas tipo MAPKs en macrófitos intermareales

En primer lugar, en este estudio se determinó la presencia de las proteínas tipo MAPKs en las siguientes especies de macrófitos intermareales, *C. elongata*, *D. dichotoma*, *D. spiralis*, *U. compressa*, *J. rubens* y *U. rigida* mediante “dot blots” de los extractos proteicos. En la inmunodetección se emplearon anticuerpos de mamíferos específicos contra las formas fosforiladas de las MAPKs p38 y JNK, y se usó como control positivo extractos proteicos de la microalga unicelular *Dunaliella viridis*.

Como se puede observar en la Figura II.2, en todas las especies de macrófitos los anticuerpos específicos anti-fosfo-p38 y anti-fosfo-JNK reaccionaron de manera cruzada con una o más de una proteína de los extractos, mostrándose diferencias entre especies. La señal de mayor intensidad correspondía a *Ulva compressa* y la señal menos intensa se encontró en *Corallina elongata*.

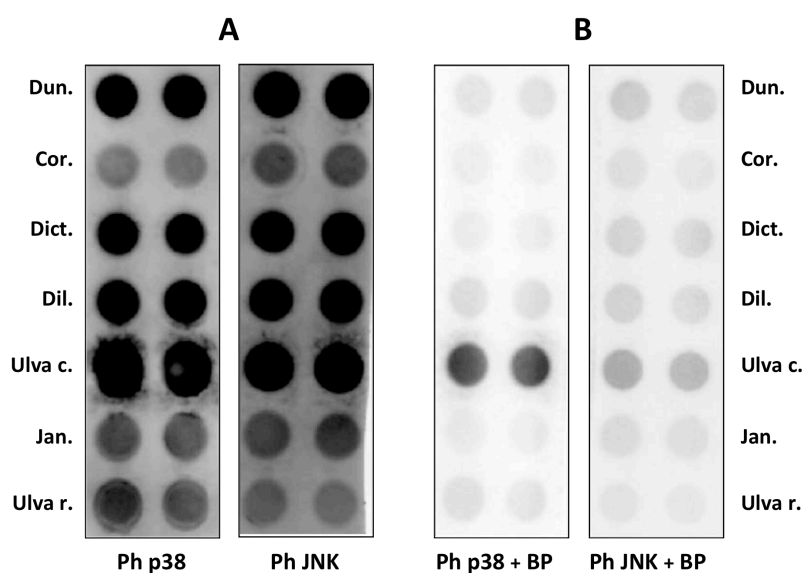


Figura II.2. Análisis de Dot blot de las formas fosforiladas de las proteínas tipo MAPKs detectadas por los anticuerpos específicos anti-fosfo-p38 y anti-fosfo-JNK. (A) en ausencia (-BP) y (B) en presencia (+BP) del péptido de bloqueo específico para cada anticuerpo. Dun:

Dunaliella, Cor: *Corallina*, Dict: *Dictyota*, Dil: *Dilophus*, Ulv c: *Ulva compressa*, Jan: *Jania*, Ulv r: *Ulva rigida*.

Figure II.2. Dot blot analysis of the phosphorylated forms of MAPK-like proteins detected by specific antibodies anti-phospho-p38 and anti-phospho-JNK. (A) in the absence (-BP) and (B) in the presence (+ BP) of the specific blocking peptides of the antibodies. Dun: *Dunaliella*, Cor: *Corallina*, Dict: *Dictyota*, Dil: *Dilophus*, Ulv c: *Ulva compressa*, Jan: *Jania*, Ulv r: *Ulva rigida*.

Para poder asegurar que las señales obtenidas no se debían a reactividad inespecífica, otras membranas se incubaron con los mismos anticuerpos (fosfo-p38 y fosfo-JNK) junto con sus péptidos de bloqueo específicos. Los péptidos de bloqueo (ver Figura II.3) son pequeñas moléculas que reaccionan específicamente con los anticuerpos primarios, ocupando el lugar de unión con las proteínas fosforiladas. De esta manera se bloquea la unión proteína-anticuerpo primario y consecuentemente al no poder unirse el anticuerpo secundario (que se encuentra marcado) con el anticuerpo primario, no se obtiene ninguna señal. En la Figura II.2B se observa una gran reducción en la intensidad de las señales cuando se emplearon los péptidos de bloqueo. Esta reducción en la intensidad de las señales se dio en todas las especies y con los dos tipos de anticuerpos empleados (fosfo-p38 y fosfo-JNK), siendo aproximadamente del 90%. Únicamente en el caso de *U. compressa* permaneció algo de señal, pero este hecho se debía a que la señal inicial que se encontró en esta especie fue extremadamente elevada, encontrándose sobresaturada.

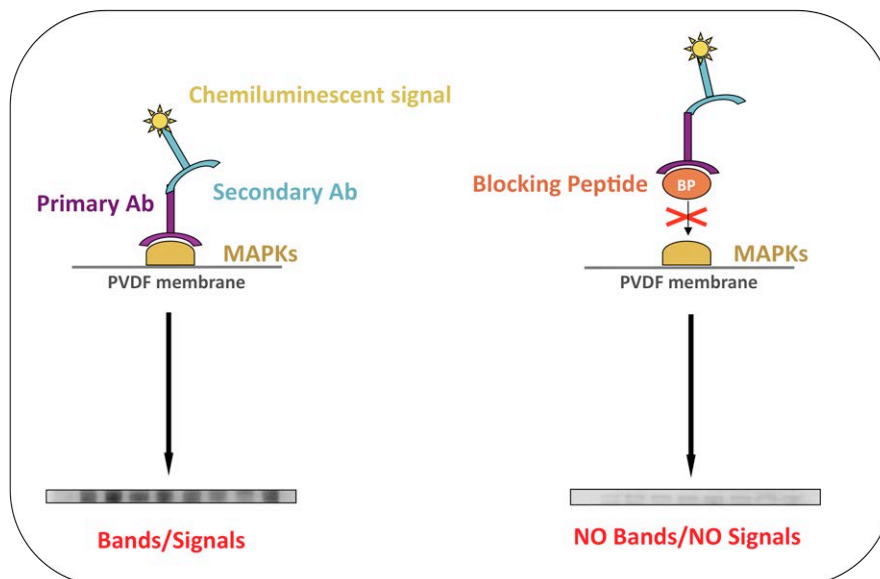


Figura II.3. Representación esquemática del mecanismo de acción del Péptido de Bloqueo (BP). Anticuerpo primario (Primary Ab), Anticuerpo secundario (Secondary Ab).

Figure II.3. Schematic representation of the mechanism of action of Blocking Peptide (BP). Primary Antibody (Primary Ab), Secondary Antibody (Secondary Ab).

Los resultados obtenidos en relación al comportamiento de la fosforilación de las proteínas tipo-p38 y tipo-JNK en las seis especies de macrófitos intermareales seleccionados se van a presentar a continuación en dos apartados diferenciados: 1) cuando la marea baja ocurre aproximadamente al medio día y 2) cuando el momento de marea alta coincide con el medio día.

1) Inducción de la fosforilación de proteínas tipo MAPK durante marea baja

Como queda reflejado en la Figura II.4, anticuerpos específicos de la p38 y de la JNK detectaron las formas fosforiladas de las proteínas tipo-p38 y tipo-JNK en la clorófito *C. aerea* durante un semi-ciclo mareal.

En cada panel se muestra la evolución de la fosforilación de la p38 (A) y de la JNK (B). En el panel superior se muestra la intensidad de las bandas de 40 y 42 kDa detectadas por los anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las respectivas MAPKs, además de las curvas de irradiación (PAR, UVA y UVB). En el centro del panel se muestran las bandas detectadas por inmunodetección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) del péptido de bloqueo específico para cada MAPK y en el panel inferior se observa una representación semicuantitativa del momento de máxima fosforilación frente a la altura de la marea.

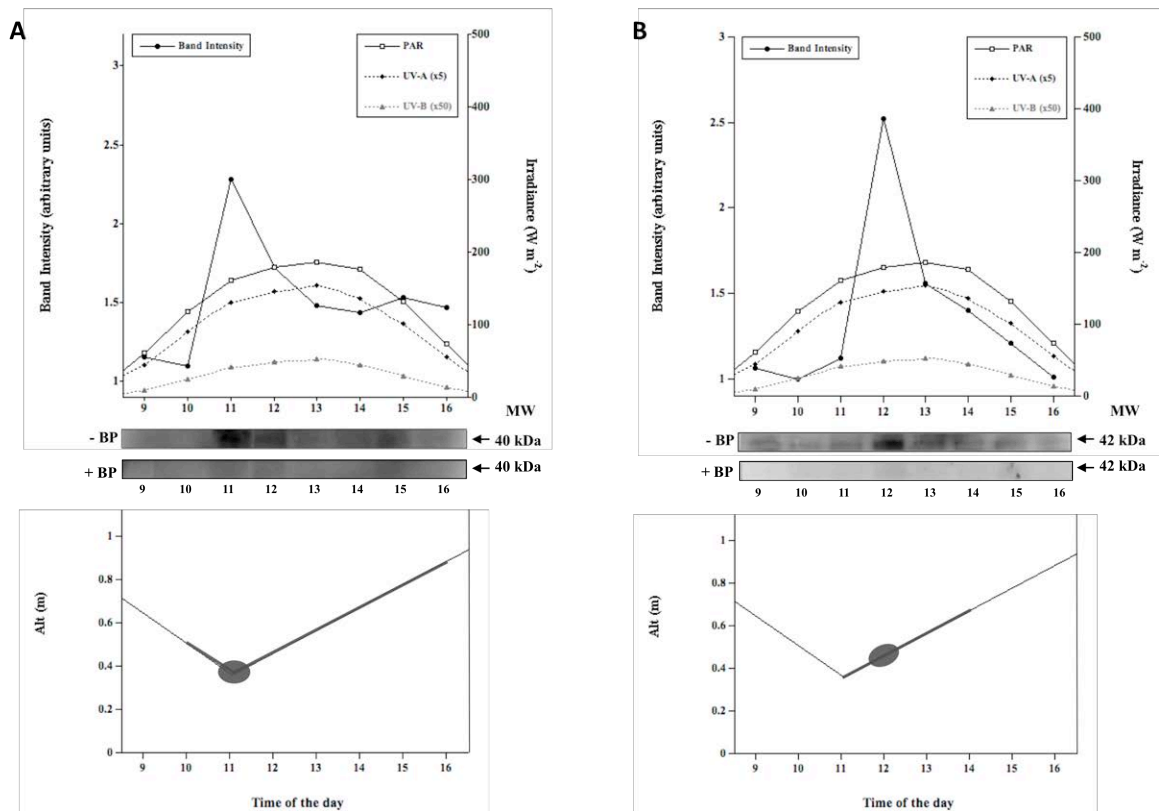


Figura II.4. Evolución de la fosforilación en *C.aerea* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos de dos proteínas de 40 kDa (A) y de 42 k Da (B) durante marea baja.

Figure II.4. Evolution in *C.aerea* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK like-protein and detection in the absence (-BP) and presence (+ BP) of the specific blocking peptides, of two proteins of 40 kDa (A) and 42 k Da (B) during low tide.

Como se puede ver en la Figura II.4, la marea baja fue sobre las 11:00 horas, alcanzándose la máxima radiación solar entre el medio día y las 14:00 horas. Durante las primeras horas del día se detectaron bandas de fosforilación muy tenues tanto de p38 (Figura II.4A) como de JNK (Figura II.4B). Sin embargo a medida que avanza el día y justo una hora o una hora y media después de que las algas queden expuestas al aire (la exposición comienza entre las 9:00-9.30 horas), un gran pico de fosforilación que corresponde a una sola banda de 40 kDa fue observado en el caso de la MAPK p38 (Figura II.4A). Tras este pico inicial y transitorio de fosforilación que coincide con la situación de marea baja, alguna señal de fosforilación permanece durante las siguientes horas, prolongándose incluso más tiempo que el propio período de emersión.

Los resultados obtenidos tras el uso de péptidos bloqueantes específicos de la fosfo-p38 indicaron que en efecto esa proteína detectada era similar a la fosfo-p38 de mamíferos. Además, en todos los casos se realizó lo que a lo largo de esta memoria se ha denominado “control de inespecíficos”, que como ya sabemos se emplea para descartar cualquier reactividad cruzada de carácter inespecífico y que consiste en incubar los blots directamente con los anticuerpos secundarios, obviando el paso de incubación con los anticuerpos primarios.

También se analizó la presencia de la MAPK tipo-JNK en los extractos proteicos de *Chaetomorpha aerea*. Como podemos observar en la Figura II.4B, durante el período de marea baja se detectó una patente banda de 42 kDa mediante el empleo de anticuerpos anti-fosfo-JNK, sin embargo la presencia de la forma fosforilada de la proteína fue muy tenue durante el período de marea alta, mostrándose altamente fosforilada desde el momento de máxima marea baja (aproximadamente a las 11:00 horas) hasta las 13:00 horas.

Sin embargo hemos de señalar que la fosforilación de esta MAPK tipo-JNK no coincide con el pico de fosforilación de la MAPK tipo-p38; en todos los casos la fosforilación de esta última (la MAPK tipo-38) precede en el tiempo a la fosforilación de la MAPK tipo-JNK. Cuando *C. aerea* sea nuevamente cubierta por el agua del mar, la fosforilación de esta proteína tipo-JNK disminuirá hasta niveles similares a los encontrados durante las primeras horas del día.

De la misma manera que en el caso de la p38, el uso de péptidos bloqueantes específicos de la JNK disminuyó notablemente la intensidad de la señal, y en este caso se consiguen niveles de señal casi indetectables. De esta modo, se corrobora la naturaleza de esta proteína fosforilada. Además, podemos observar cómo la fosforilación de la MAPK tipo-JNK fue también transitoria, alcanzando su pico máximo a las 12:00 horas, justo una hora después del momento de máxima marea baja. Sin embargo, la MAPK tipo-p38 mostró su máximo valor de fosforilación a las 11:00 horas, coincidiendo con el

momento justo de máxima marea baja; además la fosforilación en este caso se prolongó en el tiempo durante las horas de máxima irradiancia.

En el caso del alga parda *Dilophus spiralis* (Figura II.5) y del alga roja *Jania rubens* (Figura II.6) se obtuvieron resultados similares., aunque los picos de máxima fosforilación no coinciden en todas las especies.

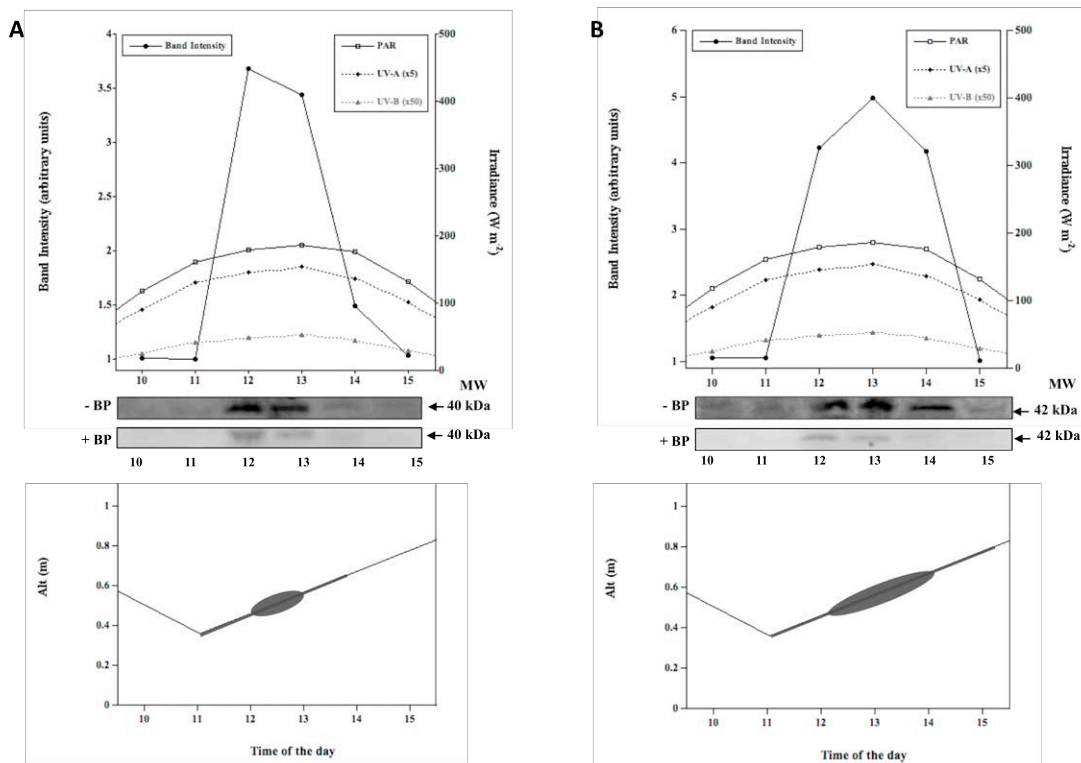


Figura II.5. Evolución de la fosforilación en *D. spiralis* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos, de dos proteínas de 40 kDa (A) y de 42 k Da (B) durante marea baja.

Figure II.5. Evolution in *D. spiralis* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK-like proteins and detection in the absence (-BP) and presence (+BP) of the specific blocking peptides, of two proteins of 40 kDa (A) and 42 k Da (B) during low tide.

En el caso concreto de *D. spiralis*, durante las primeras horas de la mañana se encontraron niveles de fosforilación prácticamente indetectables, y sólo se detectó una intensa banda de 40 kDa que corresponde a la MAPK tipo-p38 (Figura II.5A) entre las

12:00 y las 13:00 horas. Durante el resto de la tarde la intensidad de fosforilación de las bandas detectadas vuelve a valores iniciales. En el caso de la inmunodetección llevada a cabo con las formas fosfo-JNK (Figura II.5B), también se detectó una única banda, en este caso con un peso molecular de 42 kDa, que aparecía desde las 12.00 hasta las 14:00 horas.

En el caso de *Chaetomorpha* la máxima intensidad de banda y por tanto el máximo grado de fosforilación en el caso de la fosfo-JNK ocurrió una hora después que en el caso de la fosfo-p38. El período de emersión de las especies analizadas, y como es el caso de *Chaetomorpha*, se produjo desde las 9:00-9:30 horas hasta las 13:00 horas aproximadamente. Por lo tanto existe una clara diferencia entre ambas especies (*Dilophus* y *Chaetomorpha*), los máximos niveles de fosforilación en *Dilophus* ocurren más tarde que en *Chaetomorpha*. Finalmente, la intensidad de ambas bandas (40 y 42 kDa) resultó insignificante en presencia de los péptidos de bloqueo específicos para cada MAPK. Este resultado indicaba de nuevo similitud entre las proteínas tipo MAPKs detectadas en *Dilophus*, y las MAPKs de células de mamíferos.

La rodófito *Jania rubens* (Figura II.6) mostró un comportamiento más parecido a *Chaetomorpha* que a *Dilophus*. La proteína tipo fosfo-p38 mostró un destacadísimo incremento en la señal de fosforilación antes del momento de máxima marea baja, que se correspondía con un pico a las 10:00 horas (Figura II.6A). El nivel de fosforilación de esta proteína tipo p38 de 40 kDa, después de un pico muy agudo de fosforilación, disminuye progresivamente hasta alcanzar niveles iniciales.

Durante las horas centrales del día, justo cuando se alcanzan los mayores valores de irradiancia, se aprecian niveles “basales” de fosforilación. En esta especie la emersión se extendió durante seis horas, desde las 8:00 a las 14 ó 14:30 horas. Respecto a la fosfo-JNK (Figura II.6B), *Jania* presentó un pico de fosforilación entre las 11:00 y 12:00 horas, (que se produce de 1 a 2 horas más tarde que en la fosfo-p38) correspondiendo con el



momento de mínima altura de la marea, independientemente del régimen de luz que existiera.

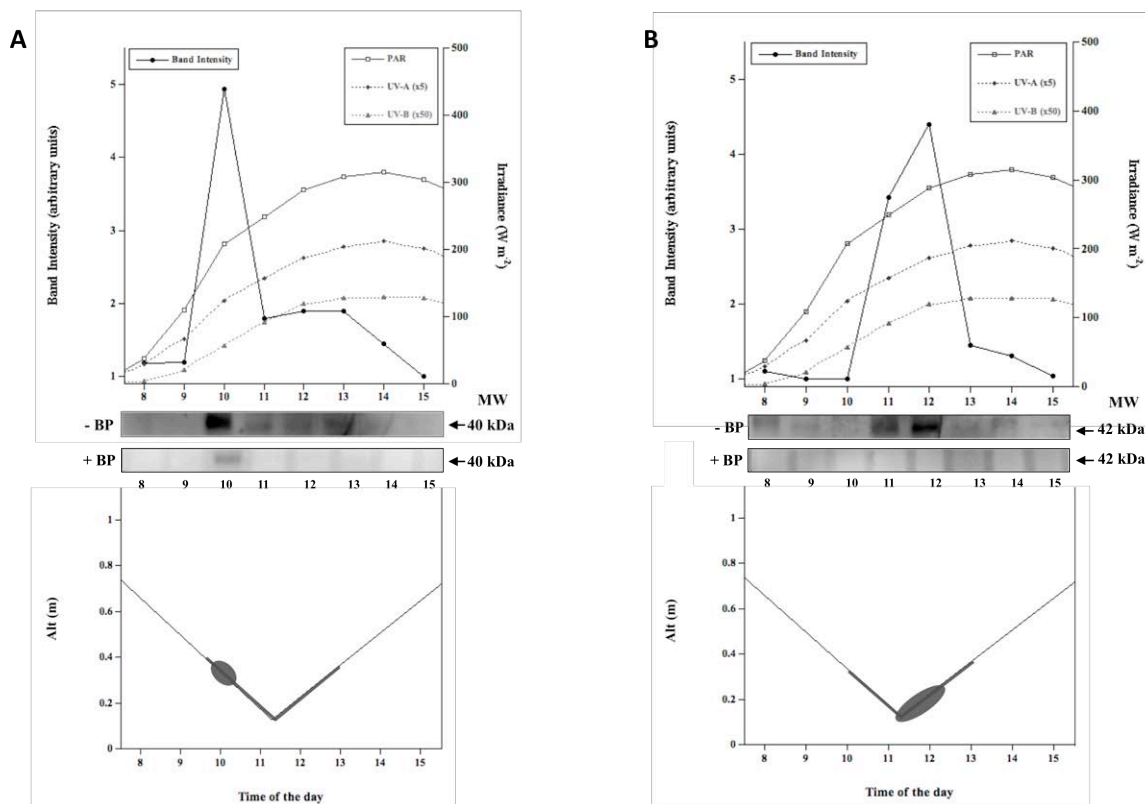


Figura II.6. Evolución de la fosforilación en *J.rubens* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos de una banda de 40 kDa (A) y de 42 k Da (B) durante marea baja.

Figure II.6. Evolution in *J.rubens* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK like-proteins and detection in the absence (-BP) and presence (+ BP) of the specific blocking peptides of a band of 40 kDa (A) and 42 k Da (B) during low tide

Chaetomorpha y *Dliophus*, debido a su disposición en la zona litoral más baja permanecen expuestas al aire durante apenas cuatro horas, por el contrario, *Jania* permanece expuesta aproximadamente seis horas. De nuevo, en este caso, el uso de los péptidos de bloqueo específicos para ambas MAPKs (p38 y JNK), aportaron en *Jania* resultados similares a los ya obtenidos en *Dilophus* y *Chaetomorpha*.



2) Inducción de la fosforilación de proteínas tipo MAPK en marea alta

Los resultados obtenidos cuando la bajamar se produjo aproximadamente al mediodía (Figuras. II.4, II.5, II.6) se completan con los resultados obtenidos cuando el comportamiento de la marea fue el inverso, es decir, cuando la marea alta coincidió con las horas del mediodía. Debido a la dinámica poblacional en el sistema intermareal durante todo el año, en este apartado las especies con las que se trabajó fueron otras, si bien muy próximas filogenéticamente a las anteriores. En el caso de las clorofitas se seleccionó *U. rigida*. En la Figura II.7 se representa la evolución de la fosforilación tanto de p38 como de JNK a lo largo de un semiciclo mareal.

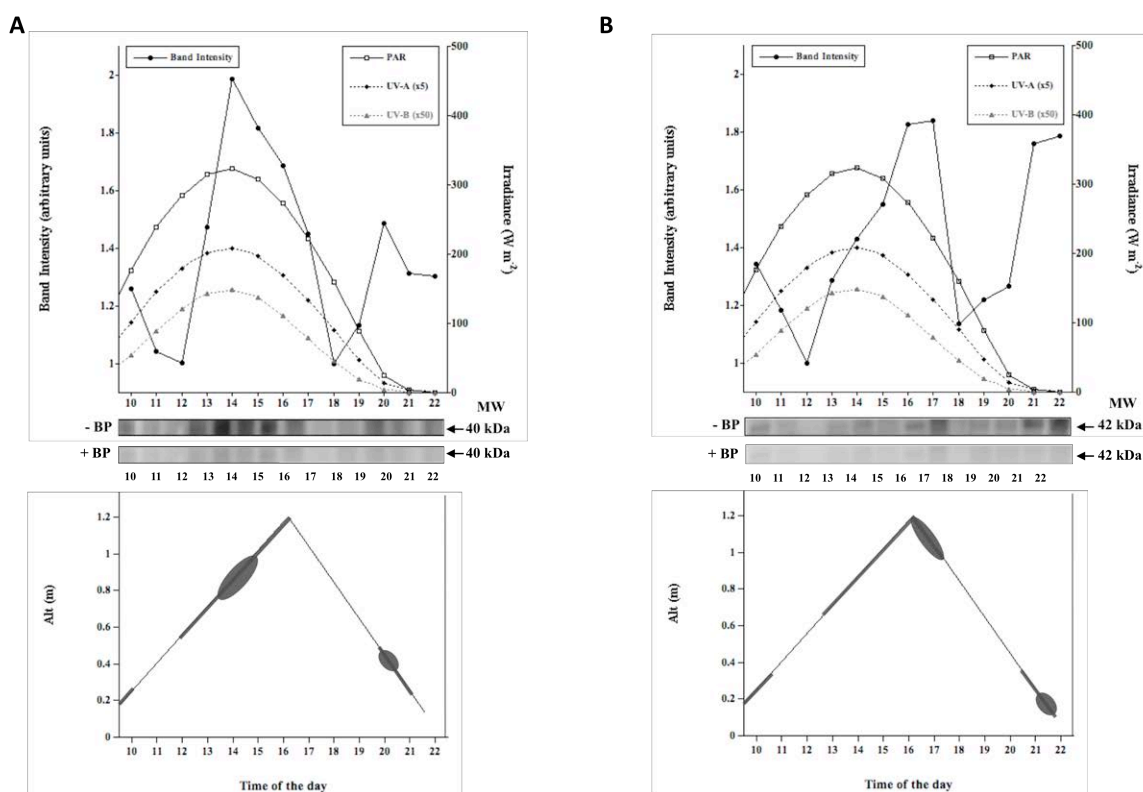


Figura II.7. Evolución de la fosforilación en *U. rigida* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos de una banda de 40 kDa (A) y de 42 kDa (B) durante marea alta.

Figure II.7. Evolution in *U. rigida* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK-like proteins and detection in the absence (-BP) and presence (+BP) of the specific blocking peptides, of a band of 40 kDa (A) and 42 kDa (B) during high tide

En el caso de la p38 (Figura. II.7A), se detectaron tres períodos transitorios de fosforilación. El primero de ellos se dio a las 10:00 horas, coincidiendo con las últimas horas de la emersión del talo, el segundo pico se produjo entre las 13:00-17:00 horas, (presentando su valor máximo a las 14:00 horas) horas del día que corresponden con la máxima irradiancia, mientras que el último período de fosforilación coincide con el segundo período de emersión del talo y alcanza su valor máximo de fosforilación a las 20:00 horas.

Un comportamiento similar se encontró en la fosforilación de la JNK (Figura II.7B). Sin embargo, y al igual que ocurriera en las especies analizadas en el apartado 1) en situación de marea baja al mediodía, la fosforilación de la p38 precede siempre a la fosforilación de la JNK. En todos los casos, se detectaron bandas muy débiles cuando se utilizaron los péptidos bloqueantes específicos.

La segunda especie seleccionada para los experimentos de “marea alta al mediodía” fue la heterocontofita *Dictyota dichotoma*. En este caso se observó, mediante el uso del anticuerpo anti-fosfo-p38, un claro pico de fosforilación correspondiente a una banda de 40 kDa, detectado al comienzo del período de emersión del talo (Figura II.8A). Esta fosforilación se vio reforzada por la alta irradiancia impuesta por el momento del día en el que se producía. Durante el resto del día se detectaron valores de fosforilación muy débiles, hasta que, coincidiendo con el segundo período de emersión del talo, y aproximadamente cuando comenzaba a anochecer, apareció un segundo pico de fosforilación sobre las 21:00 horas. Esta respuesta cíclica fue más patente cuando se usó el anticuerpo anti-fosfo-JNK (Figura II.8B). En este caso, se observó un patente pico de fosforilación correspondiente a una banda de 42 kDa detectada al comienzo del período de emersión matinal, un segundo pico intenso de fosforilación fue observado justo dos horas más tarde de que se alcanzará el máximo valor de irradiancia en el día. Finalmente, al atardecer y coincidiendo con el segundo período de emersión diario, se observó de nuevo la fosforilación de la proteína. En todos los casos, con el uso de los péptidos de

bloqueo específicos para cada anticuerpo, de nuevo encontraron bandas de fosforilación muy tenues, casi indetectables.

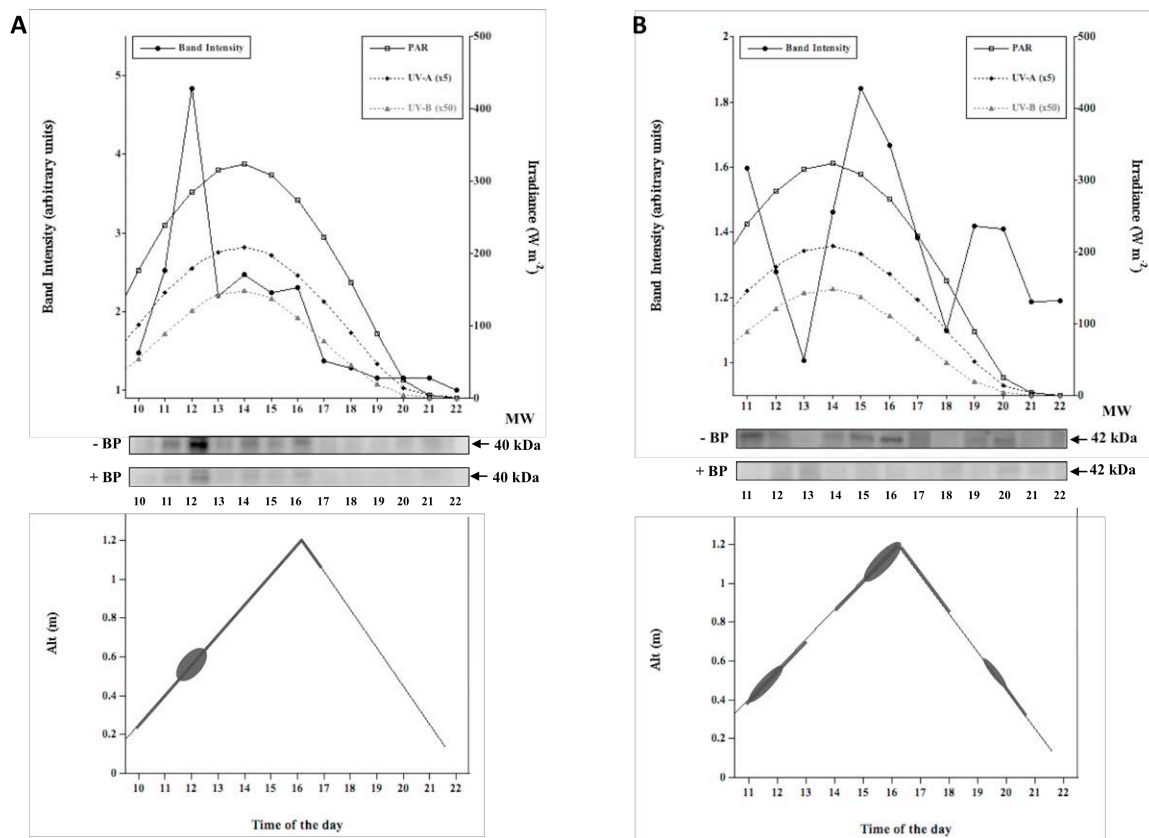


Figura II.8. Evolución de la fosforilación en *D.dichotoma* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos de una banda de 40 kDa (A) y de 42 k Da (B) durante marea alta.

Figure II.8. Evolution in *D.dichotoma* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK like-proteins and detection in the absence (-BP) and presence (+ BP) of the specific blocking peptides of a band of 40 kDa (A) and 42 k Da (B) during high tide

Para completar el estudio de la inducción de la fosforilación de proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK en situación de marea alta al mediodía, se analizó la evolución de la fosforilación de la especie rodófito *Corallina elongata*. No se observó ninguna fosforilación con el uso del anticuerpo anti-fosfo-p38 durante las primeras horas del día, sin embargo más adelante se encontraron dos patentes picos de fosforilación, correspondientes a la fosforilación de una proteína de 40 kDa. El primero de ellos fue

menos intenso y coincidió con el momento de máxima irradiancia, durante el período de pleamar (Figura II.9A) de los talos y el segundo se produjo durante el período de emersión por la tarde.

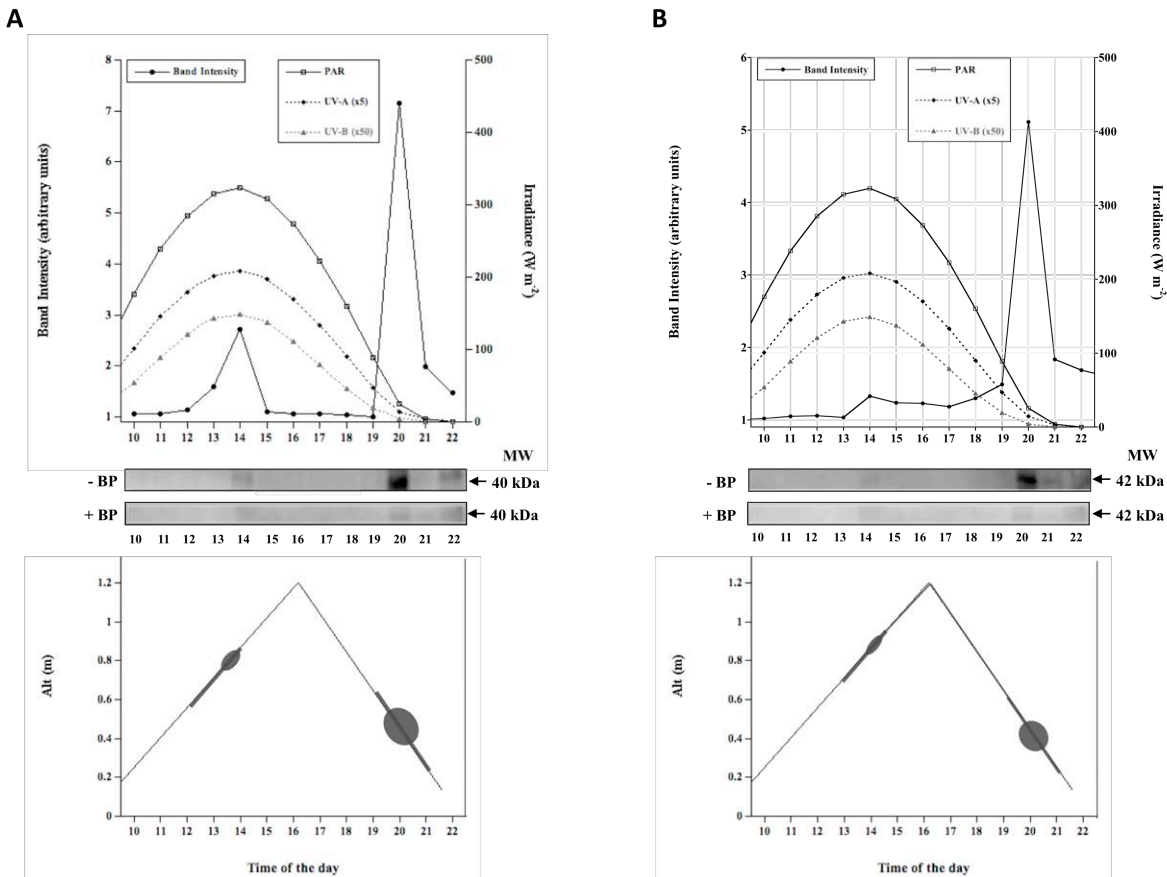


Figura II.9. Evolución de la fosforilación en *C. elongata* de la proteína MAPK tipo-p38 (A) y tipo-JNK (B) y detección en ausencia (-BP) y en presencia (+BP) de péptidos de bloqueo específicos de una banda de 40 kDa (A) y de 42 kDa (B) durante marea alta.

Figure II.9. Evolution in *C. elongata* of phosphorylation of the p38 (A) and JNK (B) MAPK like-protein and detection in the absence (-BP) and presence (+BP) of the specific blocking peptides of a band of 40 kDa (A) and 42 kDa (B) during high tide.

En el caso de la JNK (Figura II.9B) se encontró un comportamiento similar, no se produjo señal de fosforilación durante la mañana y sólo apareció un pequeño aumento en los valores de fosforilación durante las horas del día de máxima irradiancia. A pesar de ello, y tal y como ocurriese en el caso de la fosfo-p38, una acusada y transitoria fosforilación correspondiente a una banda de 42 kDa detectada con el uso del anticuerpo

primario anti-fosfo-p38, apareció al atardecer, durante el segundo período de emersión y cuando ya la irradiancia era de apenas 20 W m^{-2} .

Según los resultados obtenidos en todos los casos, se observó fosforilación transitoria de una banda de 40 kDa correspondiente a la MAPK tipo-p38, resultado del aumento de la radiación solar o de la exposición al aire de los talos durante los períodos de marea baja; además en esas mismas condiciones también se observó una fosforilación transitoria de una banda de 42 kDa correspondiente a la MAPK tipo-JNK. Sin embargo, se mostraron claras diferencias en todos los grupos de macrófitos intermareales seleccionados, entre la situación de marea alta y de marea baja. Como regla general, la fosforilación de la p38 precede siempre en el tiempo a la fosforilación de la JNK, la cual se produjo entre una y dos horas después del pico de fosforilación de la p38.

Discusión

En este capítulo se ha demostrado que las proteínas tipo MAPK se encuentran involucradas en la respuesta al estrés ambiental en macrófitos intermareales de las costas del Sur de España. Los resultados obtenidos en el medio natural han puesto de manifiesto la existencia de un ciclo de fosforilación/desfosforilación de las proteínas MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK, en respuesta a dos factores ambientales: la emersión y la radiación.

La respuesta obtenida es diferente para cada MAPK, y varía entre unos grupos de algas y otros. Las rodofíceas (*J.rubens* y *C.elongata*) son las que presentan una respuesta más rápida, seguidas de las clorofíceas (*C.area* y *U.rigida*) y por último de las heterocontófitas (*D.spiralis* y *D.dichotoma*), desde el inicio de la emersión. Cuando se representa la respuesta de la fosforilación detectada para la p38 (Figura II.10), se observa cómo apenas 30-60 minutos desde el inicio del período de emersión ya se detecta una respuesta de fosforilación en las rodofíceas, en cambio en las heterocontofíceas, que muestran la respuesta más tardía, ésta no se inicia hasta pasadas más de 3 horas desde que quedan expuestas durante la emersión. Respecto a la fosforilación detectada para la JNK frente al inicio del período de emersión (Figura II.11), se observa cómo la respuesta en las primeras (rodofíceas) se inicia apenas 60 minutos tras quedar en emersión, mientras que, en las heterocontofíceas (las últimas en responder), ésta no se inicia hasta pasadas más de 3 horas.

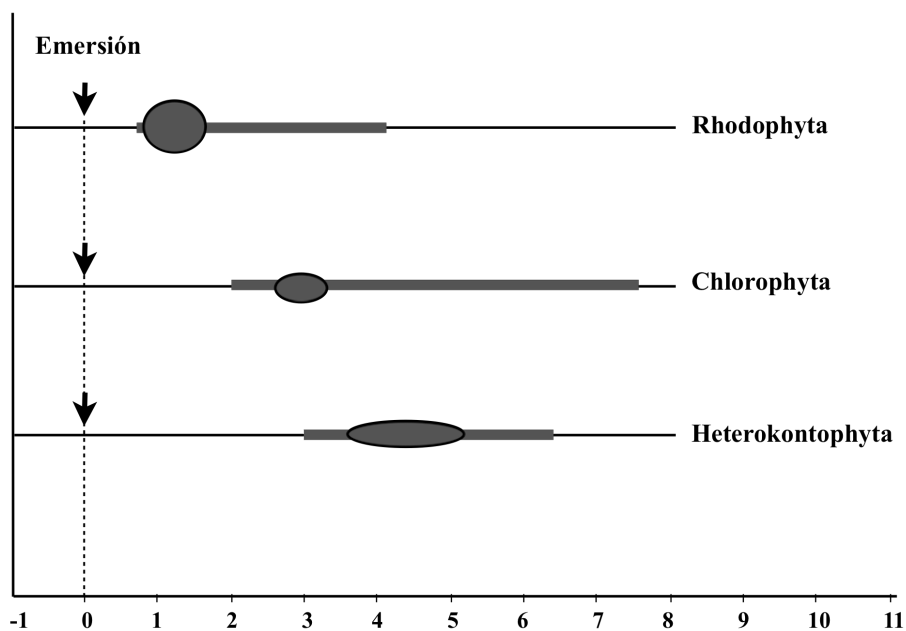


Figura II.10. Representación de la respuesta de la p38 en rodofíceas, clorofíceas y heterocontofíceas frente al inicio del período de emersión. El radio, en la escala vertical, del óvalo es una estimación semicuantitativa de la fosforilación detectada.

Figure II.10. Representation of the p38 response in rhodophyceae, chlorophyceae and heterokontophyceae against the beginning of the period of emersion. The radius, on the vertical scale, of the oval is a semiquantitative estimation of the phosphorylation detected.

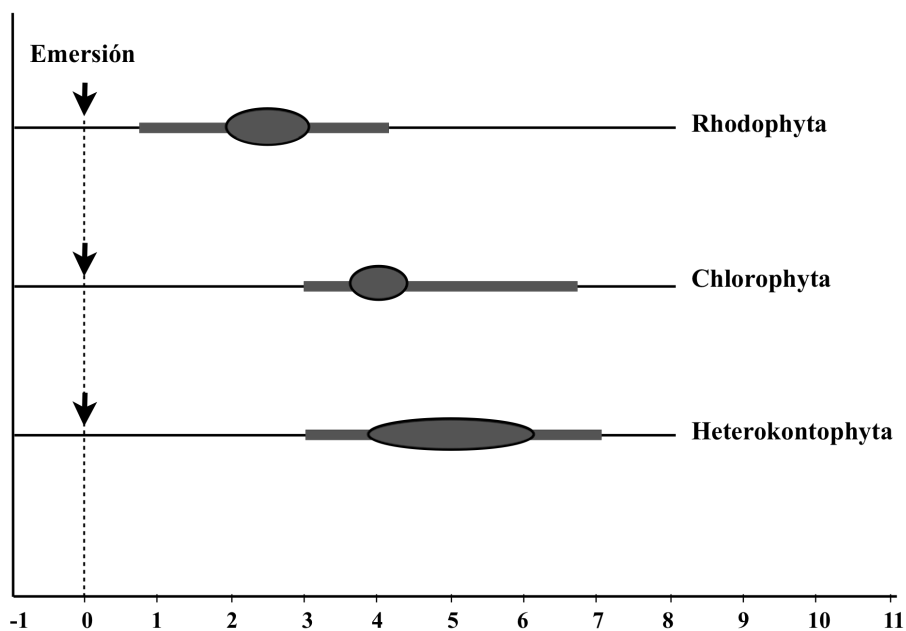


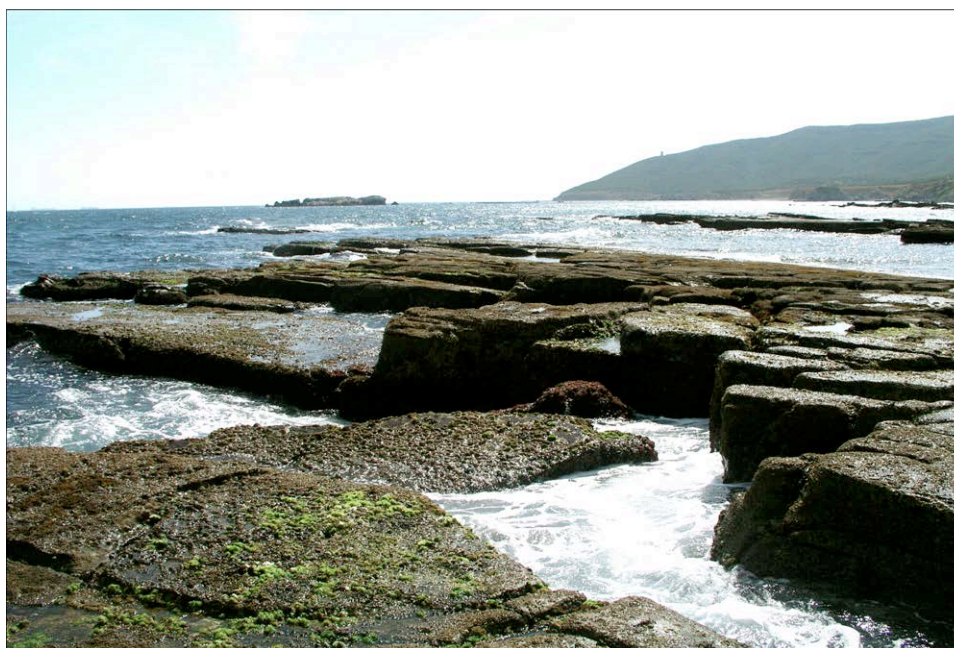
Figura II.11. Representación de la respuesta de la JNK en rodófitas, clorófitas y heterocontófitas frente al inicio del período de emersión. El radio, en la escala vertical, del óvalo es una estimación semicuantitativa de la fosforilación detectada.

Figure II.11. Representation of the JNK response in rhodophyceae, chlorophyceae and heterokontofyceae against the beginning of the period of emersion. The radius, on the vertical scale, of the oval is a semiquantitative estimation of the phosphorylation detected.

Sabemos que la familia de las MAPKs ha sido profusamente estudiada en células de mamíferos, y que estas quinasas de proteínas son consideradas como “actores principales” que desempeñan un papel crucial en el proceso de transducción de señales de estrés en células animales. Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, de las tres cascadas principales y completamente descritas en células animales (p38, JNK y ERK), prácticamente todas las MAPKs en plantas vasculares son similares a las familias ERK1/2. Sin embargo, Komis et al. (2004) analizaron la participación que sobre la regulación del volumen protoplasmático de células plasmolizadas de raíz de trigo en condiciones hiperosmóticas tenía una proteína de 46 kDa tipo p38. Hasta la fecha, los resultados presentados en esta memoria, constituyen la primera evidencia de presencia y actividad de proteínas tipo MAPK en macroalgas. En trabajos previos de nuestro grupo se ha demostrado la presencia, actividad y papel de proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK (Jiménez et al. 2004, García-Gómez et al. 2012) y tipo-ERK (Jiménez et al. 2007, García-Gómez et al. 2012) en las microalgas unicelulares *Dunaliella viridis* y *Dunaliella tertiolecta*.

A partir de los resultados obtenidos en estas microalgas (y habiendo demostrado la presencia de las tres cascadas principales en *D.viridis* y, su operatividad en el control de la supervivencia y división celular en *D.tertiolecta*) y considerando que las MAPKs son ubicuas, se seleccionaron como material biológico diferentes especies de macrófitos intermareales del sistema intermareal de Punta Carnero, sometidas a constantes fluctuaciones ambientales, para demostrar la presencia y actividad de proteínas tipo MAPK.

Todas las especies de macrófitos empleadas en este trabajo proceden del sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras) que, situado en el Estrecho de Gibraltar, y como ya se ha comentado anteriormente a lo largo de esta memoria, constituye una zona de tránsito entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo. Tanto el océano Atlántico como el mar Mediterráneo presentan un clima y un régimen de marea muy diferente, así como son también muy diferentes los efectos que acontecen sobre las especies que permanecen expuestas durante los períodos de emersión (Niell et al. 1989); es este tiempo el que condicionará la disposición que ocuparán los macrófitos dentro del sistema intermareal y, esta exposición aérea a la que quedan sometidos los macrófitos intermareales durante la emersión se traduce en un cambio inmediato en el suministro de carbono inorgánico fotosintético (Mercado & Niell 2000, Zou & Gao 2002a, 2004).



Fotografía II.1. Sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras).

Picture II.1. Intertidal system of Punta Carnero (Algeciras).

El comportamiento fisiológico de los macrófitos intermareales está sujeto, entre otros, a los daños causados por la radiación solar ultravioleta (UVR, 280-400 nm), ésta afecta al crecimiento (Henry & Van Alstyne 2004), fotosíntesis (Aguilera et al. 1999, Davison et al. 2007), germinación de esporas (Roleda et al. 2006) y al desarrollo temprano (Jiang et al. 2007) de especies individuales, así como a la estructura de las comunidades (Makarov 1999, Bischof et al. 2006); además, a nivel celular y molecular la radiación UV actúa directamente sobre el DNA, provocando diferentes daños y modificaciones (Atienzar et al. 2000, Pakker et al. 2000). En la mayoría de los casos, en el medio natural estos efectos adversos de la radiación UV-B sobre diferentes procesos se han observado sólo en combinación con altos niveles de PAR, lo que indica los efectos sinérgicos de las dos gamas de longitud de onda (Bischof et al. 2002).

En macroalgas los efectos nocivos provocados por la radiación UV son a menudo contrarrestados por determinadas estrategias de protección, tales como la acumulación de compuestos que actúan a modo de filtros (Karsten & Wiencke 1999, Oren & Gunde-Cimerman 2007) y los mecanismos de fotorreparación (Neale 2000, Häder et al. 2002). Los aminoácidos tipo micosporinas (MAAS) son compuestos responsables de la absorción de la radiación UV, y su acumulación reduce en micro y macroalgas la inhibición causada por la radiación UV (Oren & Gunde-Cimerman 2007, Figueroa et al. 2008, De la Coba et al. 2009). En cambio, los mecanismos de fotorreparación implican la resíntesis de las proteínas dañadas (Vicente & Neale 2000, Häder et al. 2002) y la fotorreparación del DNA (Pakker et al. 2000, Segovia & Berges 2005, 2009), resultando ambos mecanismos muy caros energéticamente (Raven & Beardall 1981).

A nivel celular, además de los ya mencionados efectos nocivos provocados por la radiación UV, cuando la exposición al aire es prolongada se acentúa la intensidad del proceso de desecación, y las membranas celulares y las proteínas se vuelven más vulnerables a la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan peroxidación y desesterificación de los lípidos de membrana, haciéndolos más fluidos y

permeables (Senaratna et al. 1987, Crowe et al. 1989). Además las ROS actúan sobre las proteínas oxidando grupos funcionales de determinados aminoácidos, haciéndolos susceptibles a proteólisis y reduciendo o inactivando la rehidratación (Rossib et al. 2003, França et al. 2007).

En este estudio se ha observado un comportamiento diferencial según el tipo de macrófito del que se tratara, de este modo, las especies rodófitas seleccionadas, *Corallina* y *Jania*, son ejemplos de macrófitos calcificados; esta capa de carbonato cálcico actúa a modo de escudo y les permite presentar valores muy bajos de transmitancia de radiación solar y elevados niveles de reflexión PAR y UVR (Beach et al. 2006). Además, es sabido que los aminoácidos tipo micosporinas (MAAS) en algas rojas presentan un espectro de absorción entre 310 y 360 nm, y juegan un importante papel protector frente a la radiación UV (Oren & Gunde-Cimerman 2007). Ambas especies de rodófitas respondieron de modo similar, tanto en situación de marea baja a mediodía (*Jania*) como en situación de marea alta en esa parte del día (*Corallina*). Los picos de fosforilación más intensos que se detectaron correspondían a la situación de emersión, y, por el contrario en situación de alta irradiancia, la fosforilación detectada era prácticamente basal. Sin duda, estas algas presentan ventajosas estrategias que les permiten tolerar perfectamente los elevados valores de irradiancia (PAR y UV), sin embargo son muy susceptibles a la pérdida de agua a la que se encuentran sometidas durante los períodos de emersión.

Según los resultados obtenidos las representantes de algas verdes *Chaetomorpha* y *Ulva* son las especies que parecen estar menos protegidas y ser más vulnerables a la desecación y a la alta irradiancia, sin embargo han mostrado una gran capacidad de recuperación frente a la radiación PAR y UV y a la desecación. En todos los casos, la fosforilación detectada fue mayor cuando coincidían la situación de emersión con los momentos del día de mayor radiación solar. Se sabe que, debido a la morfología que presenta el fino talo en forma de lámina, *Ulva lactuca* es altamente susceptible a la desecación durante el período de emersión (Zou et al. 2007). La desecación puede afectar

a determinadas reacciones catalizadas por enzimas localizadas en la interfase agua-membrana como la ATPasa (Kaiser 1987) y la pérdida de agua en exceso puede llevar a un mayor pH superficial, y a la reducción o cese de la fotosíntesis (Bidwell & McLachlan 1985). Las algas que presentan un “talo plano” como sería el caso de *Ulva* y *Enteromorpha* sufren una fotoinhibición más acusada, pero sin embargo, se recuperan antes que aquellas algas de “talo macizo”. Según Häder et al. (1999), las algas con talos planos sufren una fotoinhibición más pronunciada que las algas con talos macizos, incluso si las primeras son plantas adaptadas al sol, sin embargo, son capaces de iniciar la recuperación tan pronto como la fuente de tensión es suprimida, mientras que las algas con talos macizos no se recuperan completamente de tales efectos, incluso después de largos períodos.

La respuesta de las representantes seleccionadas de algas pardas *Dilophus* y *Dictyota* ha sido más similar a la encontrada en algas verdes que en rojas, según su morfología, al tratarse también de algas de talo plano, siendo muy susceptibles tanto a la radiación UV como a la radiación fotosintéticamente activa (PAR). Sin embargo, la señal de fosforilación detectada ha sido más lenta y prolongada en el tiempo que en las clorofíceas.

Con excepción de las algas “carnosas” (*sacked*) (como por ejemplo *Colpomenia* y *Halosaccion*) las macroalgas, aparentemente, no poseen características anatómicas ventajosas como pueden ser la de poseer cutículas resistentes e impermeables, o presentar estomas, que las protejan contra la pérdida de agua (Oates 1985, 1986), y por lo tanto no pueden evitar la desecación impuesta durante la emersión. Sin embargo, las algas pardas presentan unas vacuolas celulares denominadas fisoides, que entre otros componentes contienen polifenoles (Baardseth 1958). Los polifenoles de algas pardas se producen como una sola clase estructural, la florotaninos, que se forman por la polimerización del floroglucinol.

Además, los fisoides pueden contener polisacáridos como es el caso del fucoidán; se trata de un polisacárido sulfatado soluble en agua, que forma parte de la pared celular de las heterocontófitas. Numerosas aportaciones desde comienzos del siglo XX muestran variaciones diurnas en cuanto al número de fisoides y en cuanto al contenido en fucoidán presente en los mismos (por ejemplo, Pontillon 1926). En estos estudios se observó como en situación de marea baja, y encontrándose expuesta al aire, *Fucus serratus* presentaba una gran cantidad de fucoidán, principalmente en el interior de los fisoides, en cambio, en situación de marea alta se encontró más cantidad de fucoidán soluble y relativamente poco en el interior de los fisoides. Se sugirió que estas variaciones se debían principalmente a la desecación producida durante la emersión, y no a los cambios en la intensidad de la luz incidente. Variaciones estacionales en el número de fisoides también han sido observadas por Huger (1902) y por Evans & Holligan (1972 a,b).

El gran contenido en polifenoles y polisacáridos que presentan las algas pardas favorece la formación de capas mucilaginosas con gran capacidad de hidratación y de retención hídrica. De este modo el ambiente presenta una mayor humedad y la pérdida de agua durante el proceso de desecación se produce de manera más gradual y paulatina. Además, ante la pérdida de agua a consecuencia de la desecación o de alguna otra forma de estrés hídrico, y para retardar el proceso de pérdida de agua en el interior de la célula se produce una concentración de osmolitos intracelulares. Aunque algunas contribuciones a la presión osmótica intracelular de células provienen de iones, una fracción importante de estos solutos osmóticamente activos corresponde a osmolitos orgánicos. El término "solutos compatibles" fue acuñado en 1972 por Brown et al. y se aplica a pequeños carbohidratos (polioles) y su acumulación, incluso en altas concentraciones, no sólo no perturban la función y estructura macromolecular, sino que proporcionan equilibrio osmótico con el ambiente externo. En estudios de estrés osmóticos realizados sobre la línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney), se demostró como la inhibición de la p38 con el inhibidor específico SB203580 provocó la pérdida de inducción de aldosa reductasa, una enzima que genera sorbitol, un conocido

osmolito compatible de adaptación hipertónica. Otro ejemplo de osmolito compatible sería el D-manitol; se sabe que este alcohol de azúcar, presente en diversas Dictyotales, Laminariales y Fucales, ayuda a retardar la pérdida de agua desde la célula. Estos pequeños componentes orgánicos se encuentran en diferentes grupos de organismos que habitan la zona intermareal (Hand & Menze 2007).

En este capítulo, diferentes especies de macrófitos han sido seleccionadas procedentes de un peculiar sistema intermareal. Los resultados obtenidos muestran una clara reactividad cruzada con anticuerpos muy específicos contra los dos MAPKs principales de las células animales (p38 y JNK), y, lo más importante, los péptidos de bloqueo específicos empleados impidieron, en todos los casos, la unión entre los anticuerpos primarios y las MAPKs. Según el fabricante, la especificidad de los anticuerpos empleados en todos los casos es tan elevada que el anticuerpo fosfo-p38 solo y únicamente detecta la forma doble fosforilada, y es incapaz de reaccionar con cualquier forma fosforilada sólo una vez en esta quinasa, además como ya sabemos, el anticuerpo reconoce de manera altamente específica exclusivamente la secuencia del antígeno TGY, no pudiendo producirse una reacción cruzada con secuencias similares, como TPY de (JNK) o TEY (ERK). Los anticuerpos fosfo-JNK son específicos y reconocen únicamente la secuencia TPY, y sólo cuando existe una doble fosforilación. De igual modo, no reaccionan de forma cruzada con ninguna de las otras MAPKs (la p38 o la ERK). Además, este anticuerpo reconoce todas las isoformas de la proteína JNK. Por lo tanto, los resultados presentados en este capítulo confirman que al menos en estos macrófitos intermareales las secuencias TGY y TYP, específicas del núcleo central de la p38 y JNK, respectivamente, están presentes y se encuentran doblemente fosforiladas en condiciones de estrés ambiental.

CAPÍTULO III

Fosforilación de proteínas tipo-MAPKs en respuesta a aumento de temperatura y radiación UV en dos especies de Laminariales árticas

Los resultados presentados en este capítulo se encuentran en fase de revisión para su publicación y parte de ellos han sido presentados en una comunicación oral titulada "*Phosphorylation of Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) mediates the response of arctic macroalgae to increased temperature and UV-radiation* ", incluido en el libro de abstracts del V European Phycological Congress. 04-09 Septiembre de 2011. Rodas (Grecia).

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Abstract

Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) are a group of cytoplasmic phosphoproteins that constitute the central core of the signaling network to respond to stress in most organisms. Their role in stress acclimation has been extensively studied in organisms from yeast to humans, and recently their presence is also described in higher plants as well as in micro- and macroalgae. Organisms respond to stress by activation or de-activation of specific groups of genes following the phosphorylation/de-phosphorylation cycle of the MAPKs. In this chapter it is demonstrated the activation of two MAPKs, similar to p38 and JNK of mammalian cells, in two Arctic kelps, *Laminaria solidungula* and *Saccharina latissima* exposed to temperature and UV stress. The p38 has a molecular mass of 40 KDa in *L. solidungula* and of 42 KDa in *S. latissima*, while two JNK were detected in both species, showing 42 and 36 KDa in *L. solidungula*, and 40 and 36 KDa in *S. latissima*. These MAPKs are highly phosphorylated in response to temperature change and in presence of UV. In *S. latissima* both the p38 and the JNK showed higher phosphorylation at 2 than at 7° C, while the reverse occurred in *L. solidungula*. In addition, a significant increase in phosphorylation of both kinases was found after exposure to UVR. Exposure to PAR+UVA+UVB induced higher phosphorylation than PAR+UVA in *L. solidungula*, especially at 7° C. In *S. latissima* this response occurred only with the JNK, while no differences appeared in p38 phosphorylation between PAR+UVA and PAR+UVA+UVB at any temperature.

Introducción

Las regiones polares constituyen las áreas más remotas del planeta. El Polo Norte magnético fue alcanzado por primera vez en 1926 por el explorador noruego Roald Amundsen. Se trata de una región de gran valor ecológico, que es clave en la circulación atmosférica y oceánica del planeta, y que participa en la regulación del clima. A pesar de desempeñar un papel tan relevante, actualmente se encuentra entre las zonas más amenazadas por la actividad humana y se prevé que en ella los cambios en el clima, la hidrografía y la ecología, relacionados con el calentamiento global, van a ser muy significativos (Zacher et al. 2011). Si hay una característica destacable del actual cambio global en el Ártico es la velocidad a la que está sucediendo, y existe gran interés en conocer cómo estos cambios van a afectar al medio acuático del Ártico.

Entre los organismos acuáticos afectados, los macrófitos sésiles han captado la atención de varios grupos de trabajo. La investigación sobre la ecofisiología de macroalgas polares tiene como principales objetivos el estudio de los patrones de zonación en profundidad, así como de la capacidad fotosintética básica, la capacidad nutricional y las características de crecimiento a temperaturas cercanas a la congelación (Gómez et al. 2011). Numerosas investigaciones se han centrado en el estudio de determinadas estrategias funcionales y estructurales que permiten a los macrófitos polares hacer frente a los largos períodos de oscuridad durante el invierno y a la excesiva irradiación y a la limitación de nutrientes durante el verano (Wiencke et al. 2011). Una de las principales preocupaciones en estos estudios radica en conocer los efectos del exceso de radiación ultravioleta causado por la reducción del ozono estratosférico.

Concretamente, ha sido descrito que elevados niveles de radiación UV-B causan graves alteraciones de la fisiología y la productividad de macroalgas del Ártico, provocando procesos de fotoinhibición y fotodaño eventual del aparato fotosintético (Hanelt et al. 1997). La exposición a radiación UV-B causa daños en el DNA de las esporas

de las algas (Wiencke et al. 2000, Roleda et al. 2004, 2005a) y produce alteraciones en la germinación (Wiencke et al. 2004, 2006, Steinhoff et al. 2011). En la mayoría de los casos esta radiación UV-B induce lesiones relacionadas con la dimerización de las bases pirimidínicas adyacentes que resultan del proceso de formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs), interrumpiéndose el metabolismo y la división celular (van de Poll et al. 2001). Además, han sido descritas alteraciones de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables, entre otros, del daño oxidativo de los componentes celulares (Aguilera et al. 2002).

El objetivo principal que se plantea en este capítulo es determinar la presencia de los componentes tipo MAPKs en macrófitos polares árticos, así como el análisis de su comportamiento en respuesta al estrés ambiental causado por el aumento de la temperatura y la radiación ultravioleta. La elección de macroalgas árticas como modelo experimental no es banal, debido a que las regiones polares son sistemas muy severos y, por tanto, los organismos que viven en estas regiones deben haber desarrollado estrategias únicas de adaptación y aclimatación, distintas a las ya descritas para algas de latitudes templadas. Los sistemas celulares encargados del control de la respuesta al estrés ambiental deben haberse desarrollado exitosamente en estos macrófitos, permitiéndoles adaptarse a las muy distintas condiciones ambientales reinantes en las diferentes épocas del año, para de este modo hacer frente a las variaciones de temperatura o de radiación UV que tienen lugar en su entorno natural.

Material y Métodos

Esta investigación se integró dentro de un proyecto más amplio del Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI) de Alemania llamado: “Biology of Arctic Benthic Algae (KOL 06)” y formó parte de la expedición de Mayo-Junio de 2010 centrada en el estudio de la expresión génica de dos especies de Laminariales árticas, en la estación científica Koldewey, Ny-Ålesund, Archipiélago de Svalbard, Noruega.

Material, localización y pretratamiento

Se recolectaron esporofitos jóvenes de aproximadamente 10-15 cm de longitud de las especies *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl G.W.Saunders y *Laminaria solidungula* J. Agardh (Figura III.1), en el Kongsfjorden en las proximidades de Ny-Ålesund (78°39'N, 11°57'E). Los talos seleccionados fueron transportados al laboratorio en contenedores fríos de plástico negro. Después de limpiar y retirar los epífitos, los talos completos se mantuvieron en contenedores de 100 litros de capacidad, bajo aireación permanente y con circulación continua de agua de mar filtrada, a una temperatura de entre 3 y 4° C bajo condiciones de baja irradiancia ($10 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los talos fueron preincubados y aclimatados en estas condiciones durante 3 días antes de iniciar los experimentos.

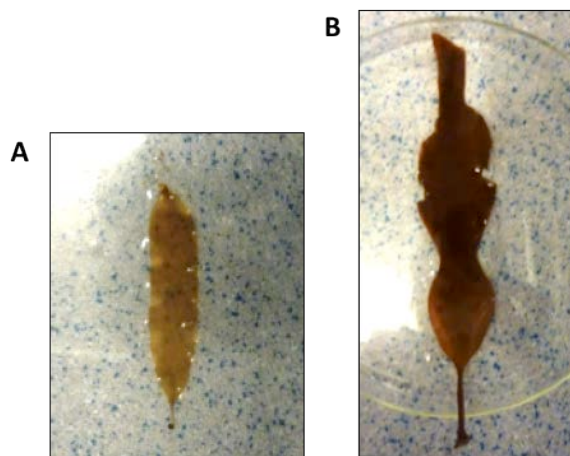


Figura III.1. Talos juveniles de *Saccharina latissima* (A) y *Laminaria solidungula* (B).

Figure III.1. Young thalli of *Saccharina latissima* (A) y *Laminaria solidungula* (B).

Diseño experimental

Después del periodo de aclimatación, los talos se colocaron en contenedores rectangulares de poca profundidad (13 cm) de 50 cm de largo por 15 cm de ancho, con aireación continua, y fueron irradiados combinando lámparas tipo TL-D daylight 36W/54-765 (Philips, Holland) y Q-Panel UVA-340 (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, USA) (Figura III.2) a las dosis que se detallan en la Tabla III.1. Los contenedores fueron cubiertos con diferentes filtros (Schott-WG 280, Schott, Germany; Ultraphan 295, DigeFra GmbH, Germany; Schott-GG 400) para obtener los tres tratamientos de radiación deseados: radiación fotosintéticamente activa (PAR), PAR+UVA y PAR+UVA+UVB (Figura III.3A). Haremos referencia a estos tratamientos como P, PA y PAB, respectivamente. Denominaremos C al tratamiento control (PAR a t=0). Se ensayaron dos temperaturas diferentes, 2° C y 7° C, para analizar el posible efecto que el aumento de la temperatura podría tener en la activación de las MAPKs de estos macrófitos. El tiempo de exposición bajo las diferentes condiciones de temperatura y UVR fue en todos los casos de 1 hora.

Tabla III.1. Valores de irradiancia utilizados durante los experimentos en los diferentes tratamientos de luz (P, PA y PAB) a 2 C y 7°C.

Table III.1. Experimental irradiance values during the light treatments (P, PA, PAB) at 2 and 7° C.

Temperature (°C)	PAR (400-700 nm) $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	UV-A (320-400 nm) W m^{-2}	UV-B (280-320 nm) W m^{-2}
2	22.38 (± 2.93)	9.68 (± 1.07)	0.47 (± 0.03)
7	21.71 (± 2.68)	10.60 (± 1.18)	0.47 (± 0.03)

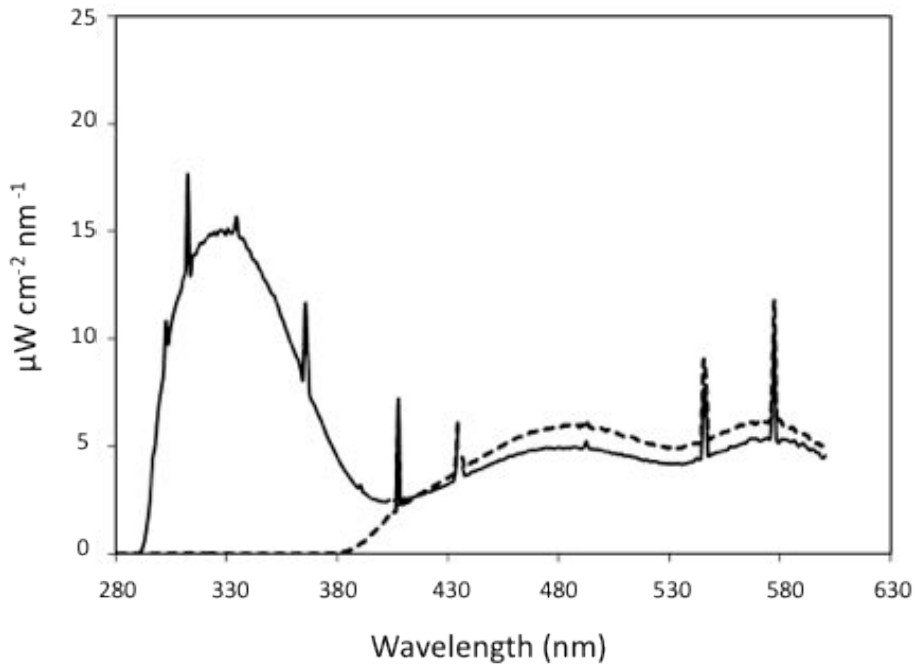


Figura III.2. Espectros de irradiancia de las lámparas UV (Q-Panel, línea continua) y PAR (Philips, línea discontinua).

Figure III.2. Spectral irradiance of the UV (Q-Panel, continuous line) and PAR (Philips, discontinuous line) lamps.

Fluorimetría PAM

Se analizó el comportamiento fisiológico de cinco réplicas independientes de ambas especies mediante mediciones de la eficiencia fotosintética a través de fluorimetría PAM (Figura III.3B). Se midió el Rendimiento Cuántico Óptimo (F_v/F_m) inicial y final en cada tratamiento con ayuda del equipo Imaging PAM M-series versión MAXI (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemania).

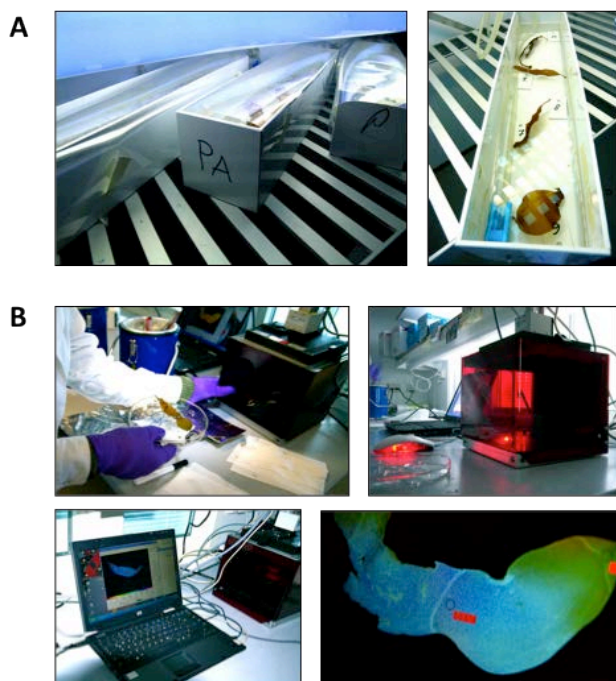


Figura III.3. Sistemas de cultivo para la exposición de los talos de *S. latissima* y *L. solidungula* a distintas combinaciones de PAR+UVR y temperatura (A). Medición del rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) mediante el uso del Imaging PAM (B).

Figure III.3 Culture systems for exposure of the thalli of *S. latissima* and *L. solidungula* to different combinations of temperature and PAR+UVR (A). Optimal quantum yield measurements (F_v/F_m) by using ImagingPAM (B).

Procesado de las muestras

Una vez realizados los experimentos, los talos completos de ambas especies de macrófitos fueron congelados en nitrógeno líquido, macerados a mano y almacenados a -80°C hasta su procesamiento posterior en el centro Alfred Wegener Institute for Polar and Marine research (AWI), Bremerhaven. La extracción de proteínas, la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y la inmunodetección de proteínas fosforiladas tipo MAPKs se llevó a cabo en la Universidad de Málaga según el método descrito en el capítulo I de esta memoria. Los diferentes anticuerpos utilizados así como los péptidos bloqueantes específicos fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) y utilizados según se muestra en el Capítulo I de esta memoria, junto con las recomendaciones del fabricante.

Los resultados obtenidos de los Western blots fueron analizados mediante el equipo de análisis de imagen Kodak Gel Logic 1500, utilizando como agente quimioluminiscente el Amersham ECL Advance (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino

Unido). Finalmente, para el análisis de la intensidad de las bandas se empleó el software gratuito ImageJ 1.440 (National Institutes of Health, EEUU).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de las medidas fotosintéticas se realizó por medio del Análisis de la Variancia con mediciones repetidas ($p < 0.05$). Las diferencias significativas así como la interacción de las medias fueron comparadas utilizando el test de Tukey (HSD, $p < 0.05$). La intensidad de las bandas obtenidas en los blots fueron comparadas mediante el test de la t-Student y mediante un ANOVA de dos vías, con 3 ó 5 réplicas independientes para cada dato ($p < 0.05$).

Resultados

Fluorimetría PAM

En la Figura III.4 se muestra un resumen de los resultados del rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) de *S. latissima* y *L. solidungula* después de 1 hora de exposición bajo P, PA y PAB, ensayando ambas especies a 2° y a 7° C. Los valores iniciales de F_v/F_m fueron ligeramente, pero significativamente, mayores ($p < 0.05$) en *L. solidungula* (0.68) que en *S. latissima* (0.56). El aumento de la temperatura bajo P después de 1 hora de exposición no indujo diferencias significativas entre 2° C y 7° C en ninguna de las especies, sin embargo, la exposición a la radiación UV indujo una disminución clara y significativa de la eficiencia de los centros de reacción del Fotosistema II (PSII). La bajada de F_v/F_m fue más patente a 2° C que a 7° C en ambas especies, entre un 25-30 % a 2° C, pero sólo entre un 15-20 % a 7° C, sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos PA y PAB en ninguna de las especies.

Detección de las proteínas MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK en *Laminaria solidungula* y *Saccharina latissima*

Los Western blots de los extractos de proteínas seleccionadas de ambas especies revelaron la presencia de proteínas fosforiladas tipo MAPKs, detectadas mediante los anticuerpos específicos anti fosfo-p38 y anti fosfo-JNK (Figura III.5). En el caso del anticuerpo anti-fosfo-p38, se detectó una banda de 42 KDa en *S. latissima*, mientras que una banda de 40 KDa fue encontrada en *L. solidungula*, bajo estrés por radiación UV (Figura III.5A). El anticuerpo anti-fosfo-JNK reaccionó de manera cruzada con dos proteínas principales de 40 y 36 KDa en *S. latissima* y de 42 y 36 KDa en *L. solidungula*, ambas especies expuestas a radiación UV (Figura III.5B).

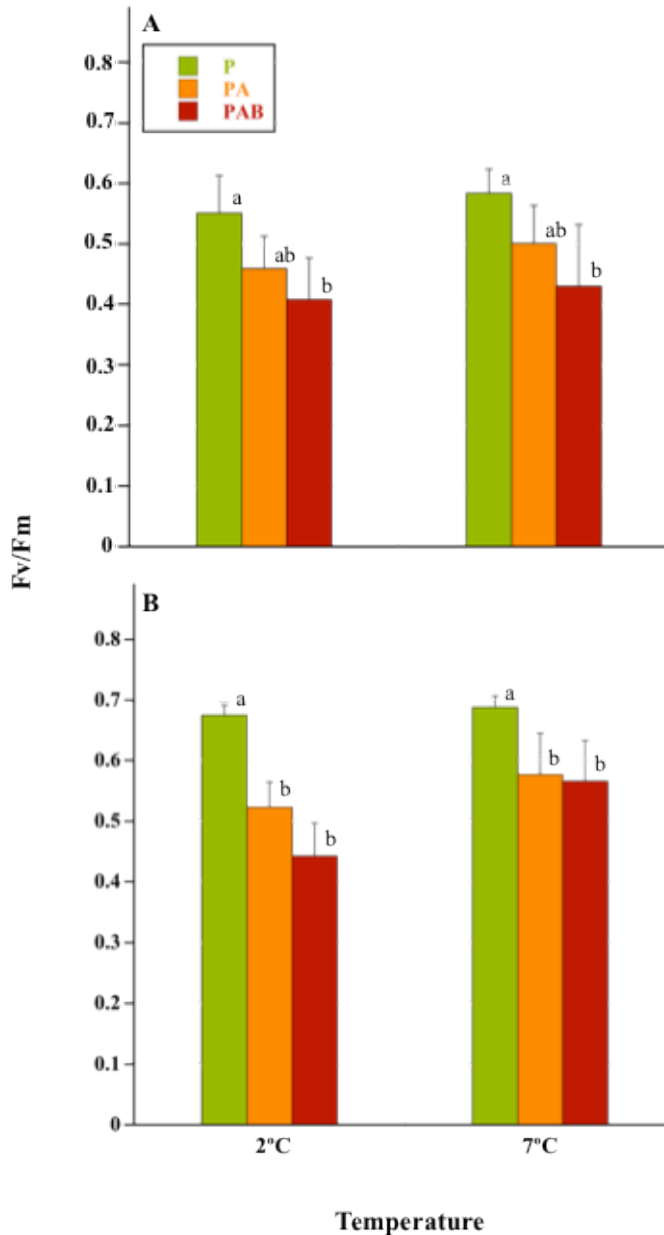


Figura III.4. Rendimiento fotosintético óptimo (F_v/F_m) de esporofitos jóvenes de *Saccharina latissima* (A) y *Laminaria solidungula* (B) medido a través de Imaging PAM después de 1 h de exposición en PAR (P, columnas verdes), PAR+UV-A (PA, columnas naranjas) y PAR+UV-A+UV-B (PAB, columnas rojas) bajo dos temperaturas diferentes (2 y 7° C). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos se indican mediante diferentes letras.

Figure III.4. Optimal quantum yield (F_v/F_m) of young sporophytes of *Saccharina latissima* (A) and *Laminaria solidungula* (B) measured through Imaging PAM after 1 hour of exposure to PAR (P, green columns), PAR+UV-A (PA, orange columns) and PAR+UV-A+UV-B (PAB, red columns) under two different temperatures (2 and 7° C). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by different letters.

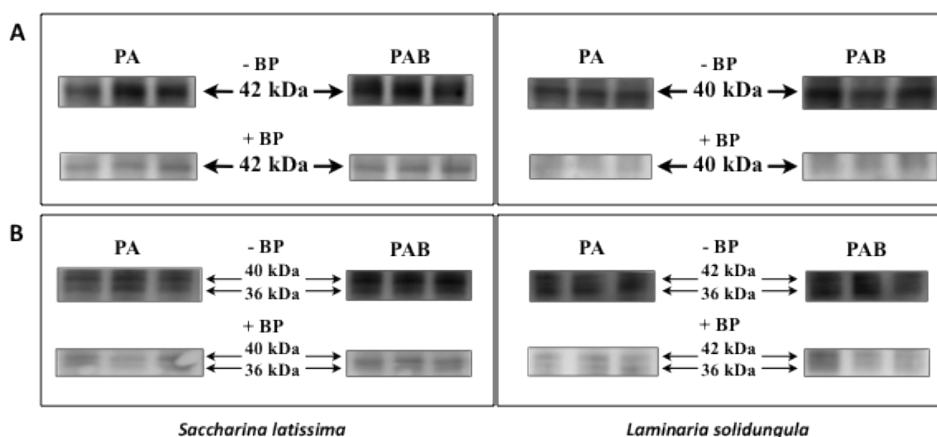


Figura III. 5. Análisis por Western blot de las formas fosforiladas de las proteínas tipo MAPK detectadas por los anticuerpos específicos anti-fosfo-p38 (A) y anti-fosfo-JNK (B) en *Saccharina latissima* y *Laminaria solidungula* bajo estrés UV (PA y PAB), ambos en presencia (+BP) y ausencia (-BP) del péptido de bloqueo específico para cada anticuerpo.

Figure III. 5. Analysis by Western blot of phosphorylated forms of the MAPK-like proteins as detected by specific anti-phospho-p38 (A) and anti-phospho-JNK antibodies (B) in *Saccharina latissima* and *Laminaria solidungula* under UV stress (PA and PAB), both in the presence (+BP) and absence (-BP) of the specific blocking peptides of each antibody.

Debido al empleo de anticuerpos policlonales enfrentados contra las formas fosforiladas tanto de p38 como de JNK de células de mamíferos, se consideró la posibilidad de que estos resultados se trataran simplemente de un artefacto y que las bandas reveladas se debieran a una reactividad cruzada inespecífica. Por lo tanto, para confirmar que estas bandas realmente correspondían a proteínas tipo MAPK, se llevaron a cabo dos análisis paralelos. En el primero, en lo que denominamos “análisis de inespecíficos”, se estudió la posibilidad de reactividad cruzada inespecífica con los anticuerpos comerciales contra las formas fosforiladas de las MAPKs de células de mamíferos, mediante la incubación de al menos una de las calles de cada tratamiento con el anticuerpo secundario, impidiendo el contacto con los anticuerpos primarios. Según los resultados obtenidos, las bandas inespecíficas serían descartadas. En el segundo, el “análisis con Péptido de Bloqueo (BP)”, se bloqueó de manera específica el sitio de unión

del anticuerpo primario usando péptidos bloqueantes específicos comerciales (Cell Signaling Technology), impidiendo de esta manera la unión con las proteínas fosforiladas.

Los péptidos de bloqueo son pequeñas moléculas que a modo de epítopos se unen específicamente al anticuerpo, impiden que la proteína tipo MAPK ocupe el sitio de unión específico del anticuerpo primario, inhibiendo la reacción proteína-anticuerpo primario y anticuerpo primario-anticuerpo secundario, no detectando las señales de las formas fosforiladas de las proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK. De este modo se puede evaluar la especificidad de la reactividad del anticuerpo. El uso de los péptidos de bloqueo (Figura III.5A, III.5B) redujo claramente la intensidad de las bandas detectadas por ambos anticuerpos. Cuando se añadieron los péptidos de bloqueo específicos, la intensidad de las bandas disminuyó entre un 60 y un 98%, confirmando la presencia de las proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK.

Fosforilación de las proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK en respuesta al estrés por aumento de temperatura y radiación UV

Una vez confirmada la presencia de las proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK en estas dos especies de macrófitos árticos, se analizó el efecto de factores estresantes como el aumento de la temperatura y la radiación UV. En la Figura III.6 se presentan los resultados del efecto de la radiación UV y del aumento de la temperatura sobre la proteína MAPK tipo-JNK en *L. solidungula*. Se detectaron dos bandas de fosforilación de baja intensidad de 36 y 42 KDa bajo PAR, a 2° C y 7° C (Figura III.6A, III.6B), lo que indica que la cascada de la JNK se activaba en todos los casos. No se observó aumento en la fosforilación de ninguna de las bandas inducido por el aumento de temperatura en PAR. Por el contrario, la intensidad de la fosforilación detectada fue menor a 7° C que a 2° C.

La intensidad de las bandas detectadas en el tratamiento de exposición a radiación UV aumentó de manera considerable el grado de fosforilación. En todos los casos, la intensidad de las bandas fue mayor bajo PA que bajo P, así como bajo PAB que bajo PA. Además, siempre se detectó un mayor grado de fosforilación a 7° C en PA y PAB tanto

para la banda de 36 KDa (Figura III.6A) como para la banda de 42 KDa (Figura III.6B). Sin embargo, las diferencias entre PA y PAB fueron mayores a 7° C que a 2° C.

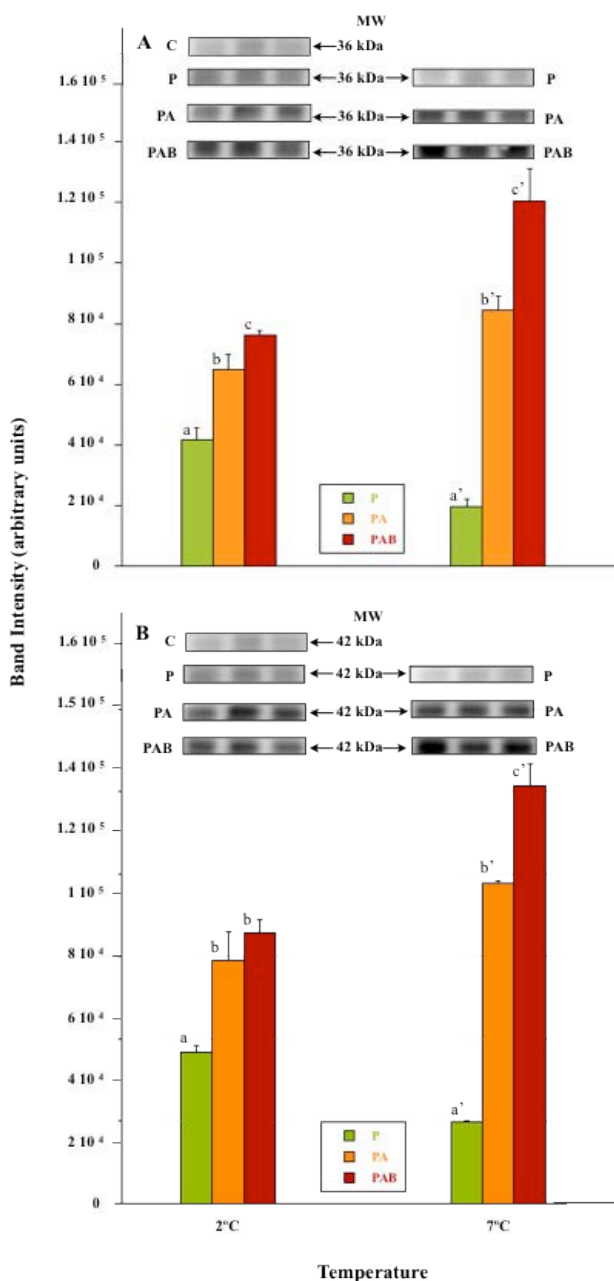


Figura III.6. Western blots de extractos de *Laminaria solidungula* para la detección de las formas fosforiladas de la MAPK tipo-JNK bajo P (columnas verdes), PA (columnas naranjas) y PAB (rojas negras), que revelan la presencia e inducción de dos proteínas diferentes de 36 KDa (A) y 42 KDa (B). C = Control a tiempo 0. MW: Marcador de peso molecular. La gráfica muestra la media ± desviación estándar (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos se indican mediante diferentes letras.

Figure III.6. Western blots of *Laminaria solidungula* extracts for the detection of the phosphorylated forms of the MAPK-like JNK under P (green columns), PA (orange columns) and PAB (red columns), revealing the presence and induction of two different proteins of 36 KDa (A) and 42 KDa (B). C = Control at time 0. MW: Molecular weight markers. The graph depicts the Mean \pm S.D. (n=3). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by different letters.

En cuanto a los resultados obtenidos en el caso de la MAPK tipo-p38 (Figura III.7), se detectó una señal leve de fosforilación de una proteína de 40 KDa en *L. solidungula* en P, a 2° C y 7° C. Una vez más, como en el caso de la MAPK tipo-JNK, la exposición a radiación UV indujo una activación de la MAPK tipo-p38. Esta fosforilación fue mucho más pronunciada a 7° C que a 2° C tanto en PA como en PAB. Estos resultados indican que bajo P *L. solidungula* es capaz de responder al aumento de temperatura de 2° C a 7° C con los niveles basales de fosforilación de las MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK. Sin embargo, una activación mayor de ambas rutas sería necesaria para afrontar un aumento de radiación UV, y esta activación sería mayor cuando de manera conjunta aconteciera una situación de alta temperatura y radiación UV.

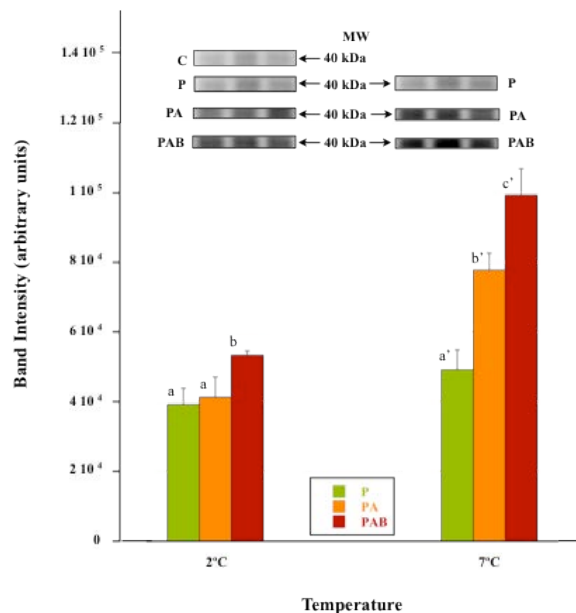


Figura III.7. Western blots para la detección de las formas fosforiladas de la proteína MAPK tipo-p38 de *Laminaria solidungula* bajo P (columnas verdes), PA (columnas naranjas) y PAB (columnas rojas). Anticuerpos policlonales específicos contra las formas fosforiladas de la p38 de células de mamíferos reaccionaron de manera cruzada con una proteína de 40 KDa. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos se indican mediante diferentes letras.

Figure III.7. Western blots for the detection of the phosphorylated forms of the p38 MAPK-like proteins of *Laminaria solidungula* under P (green columns), PA (orange columns) and PAB (red columns). The specific polyclonal antibodies rose against the phospho-p38 of mammalian cells cross-reacted with a 40 KDa protein. The graph depicts the Mean \pm S.D. (n=3). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by different letters

En el caso de *S. latissima* se encontró, en algunos aspectos, un comportamiento diferente. Se observó también una señal de fosforilación basal para las MAPKs tipo-JNK y tipo-p38 (Figuras III.8 y III.9) y como en el caso anterior no se observó una inducción posterior de ninguna de ellas a 7° C bajo PAR, indicando que el estado de fosforilación basal podría ser suficiente para señalar y montar la respuesta adecuada frente a la nueva temperatura. De igual manera que ocurriese en el caso de *L. solidungula*, se observó un claro aumento de la fosforilación de la proteína tipo-JNK bajo la radiación UV, sin embargo, fue más patente en *S. latissima* a 2° C que a 7° C (Figura III.8A, III.8B), mientras que lo contrario se observó en la especie anterior (Figura III.6). En todos los casos, la radiación UV-B indujo una mayor fosforilación que la radiación UV-A, tanto para la proteína de 36 KDa (Figura III.8A) y la proteína de 40 KDa (Figura III.8B).

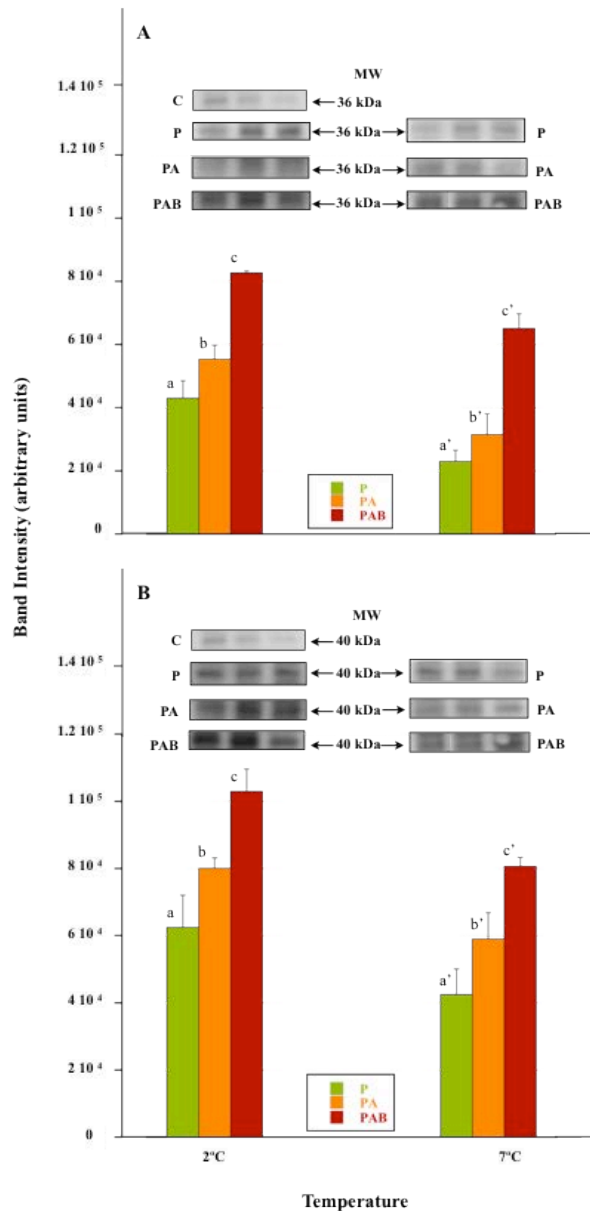


Figura III.8. Western blots de extractos de *Saccharina latissima* para la detección de las formas fosforiladas de la MAPK tipo-JNK bajo P (columnas verdes), PA (columnas naranjas) y PAB (columnas rojas), que revelan la presencia e inducción de dos proteínas diferentes de 36 KDa (A) y 40 KDa (B). C = Control a tiempo 0. MW: Marcador de peso molecular. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos se indican mediante diferentes letras.

Figure III.8. Western blots of *Saccharina latissima* extracts for the detection of the phosphorylated forms of the MAPK-like JNK under P (green columns), PA (oranges columns) and PAB (red columns), revealing the presence and induction of two different proteins of 36 KDa (A) and 40 KDa (B). C = Control at time 0. MW: Molecular weight markers. The graph depicts the Mean \pm S.E. (n=3). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by different letters.

La fosforilación de la proteína MAPK tipo-p38 (Figura III.9) fue también altamente inducida por la radiación UV en *S. latissima* y, una vez más, la activación fue superior a 2° C que a 7° C. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos PA y PAB a ninguna de las temperaturas ensayadas.

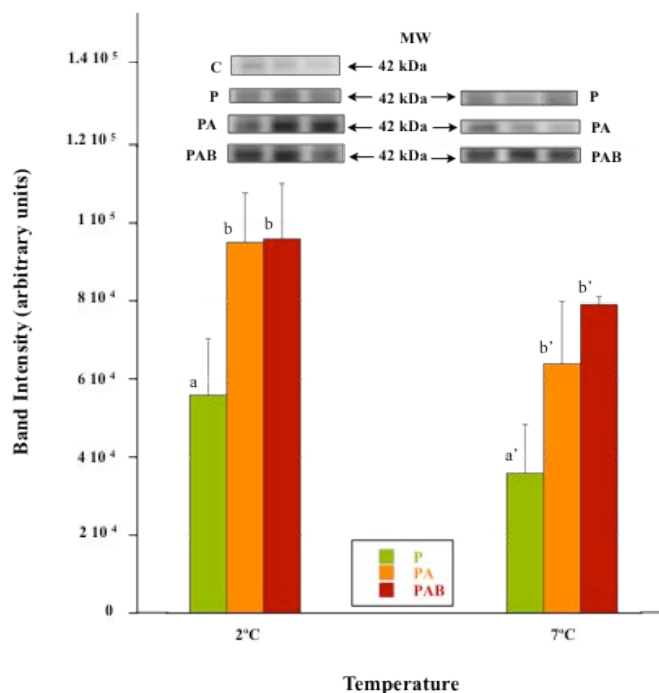


Figura III.9. Western blots para la detección de las formas fosforiladas de la proteína MAPK tipo-p38 de *Saccharina latissima* bajo P (columnas verdes), PA (columnas naranjas) y PAB (columnas rojas). Anticuerpos policlonales específicos contra las formas fosforiladas de la p38 de células de mamíferos reaccionaron de manera cruzada con una proteína de 42 KDa. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos se indican mediante diferentes letras.

Figure III.9. Western blots for the detection of the phosphorylated forms of the p38 MAPK-like proteins of *Saccharina latissima* under P (green columns), PA (orange columns) and PAB (red columns). The specific polyclonal antibodies rose against the phospho-p38 of mammalian cells cross-reacted with a 42 KDa protein. The graph depicts the Mean \pm S.E. (n=3). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by different letters.

Según los resultados obtenidos, la respuesta al estrés fue diferente en ambas especies. En *S. latissima* las MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK mostraron una mayor señal de fosforilación a 2° C que a 7° C, mientras que lo contrario ocurrió en *L. solidungula*, donde la fosforilación fue mayor a 7° C que a 2° C. No se detectó inducción de la fosforilación de ninguna de estas MAPKs tras el aumento de la temperatura de 2° C a 7° C bajo P. Asimismo, el estado basal de fosforilación pareció ser suficiente para activar la respuesta y hacer frente el estrés provocado por el aumento de la temperatura. En cuanto al efecto de la radiación UV, se detectó siempre un aumento significativo en la fosforilación de ambas quinasas después de la exposición a radiación UV. El tratamiento PAR+UVA+UVB indujo una mayor fosforilación que PAR+UVA en *L. solidungula*, especialmente a 7° C. En *S. latissima* esta respuesta se produjo sólo en el caso de la MAPK tipo-JNK, a 2° C y 7° C, mientras que no se observaron diferencias en el estado de fosforilación de la MAPK tipo-p38 entre PA y PAB a ninguna de las temperaturas ensayadas.

Discusión

La radiación UV representa una fuente de estrés potencial para la mayoría de los organismos en los ambientes naturales (Bischof et al. 2006). La tendencia actual de reducción del ozono estratosférico sobre la Antártida aumenta la radiación UV en la superficie terrestre de muchas zonas del hemisferio sur, representando una amenaza para muchos organismos sésiles (Solomon et al. 2007). No obstante, existen evidencias de que en los últimos años también se ha desarrollado un “agujero” en la capa de ozono estratosférico en el Ártico (Manney et al. 2011). Por lo tanto, la radiación solar UV podría afectar a los organismos marinos del Ártico, abarcando una amplia gama de efectos nocivos, que van desde la reducción de la productividad, hasta cambios en la estructura de las comunidades. Además, el Ártico es la región del mundo donde se espera el mayor aumento de temperatura (Zacher et al. 2011).

En este capítulo se presenta cómo, por primera vez, se ha detectado en macrófitos de la región ártica la presencia de dos proteínas tipo-MAPKs, similares a la p38 y JNK de células de mamíferos, cuya fosforilación en *S. latissima* y *L. solidungula* aumenta en respuesta al estrés ambiental, en concreto al aumento de la temperatura y a la exposición a la radiación ultravioleta. En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo (y como ya se ha presentado anteriormente en esta memoria) sabemos que las proteínas MAPKs están presentes en macrófitos de latitudes templadas. El objetivo de este capítulo era hacer extensivo este conocimiento a una área tan sensible como es el Ártico. El estudio de la activación de las MAPKs después de un cambio en las condiciones ambientales y la aclimatación concomitante al estrés, nos daría, sin duda, información sobre los cambios esperados en las comunidades de macrófitos en el escenario del cambio global. La presencia de estas quinasas de proteínas desempeñaría un papel similar en las macroalgas del Ártico al de en macrófitos intermareales, donde las condiciones ambientales reinantes son altamente impredecibles.

Está ampliamente aceptado que las MAPKs constituyen el núcleo central de la red de señalización de estrés de las células animales, y más recientemente su estudio está siendo extendido a las plantas vasculares. Sin embargo, los resultados previos de nuestro grupo han demostrado la presencia y la activación de las cascadas tipo-p38 y tipo-JNK también en microalgas (por ejemplo, *Dunaliella*, Jiménez et al. 2004, Gómez-García et al. 2012) y macroalgas (*Ulva*, *Corallina*, *Dictyota*, entre otras; Capítulo II de esta memoria) en respuesta al estrés. No cabe duda de que estas quinasas desempeñan un papel crucial en la respuesta temprana y aclimatación de las algas en entornos severos y hostiles, tales como los sistemas intermareales y los ambientes hipersalinos. Se ha demostrado previamente que tras un choque hiperosmótico, térmico o de radiación UV, se produce una fosforilación transitoria de varios polipéptidos reconocidos por anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las MAPKs (p38, JNK), y que cuando la fosforilación no tiene lugar, la supervivencia de las algas está comprometida. Los resultados de este capítulo ponen de manifiesto una respuesta diferencial entre las especies Laminariales árticas *L. solidungula* y *S. latissima*, indicando que al menos existen dos comportamientos diferentes. *S. latissima* es un alga que se encuentra ampliamente distribuida en el Ártico y en las regiones frías del hemisferio norte, pudiéndose encontrar desde las costas del norte de España y Portugal a las costas del círculo polar Ártico. En el Kongsfjorden, *S. latissima* crece en la zona media sublitoral. Por el contrario, *L. solidungula* es una especie endémica del Ártico que crece en la zona sublitoral inferior (Hop et al. 2012), y que está aclimatada a crecer en un entorno menos fluctuante que *S. latissima*, en aguas más profundas y a más baja temperatura y radiación UV.

Según los resultados obtenidos, ambos tipos de macrófitos son capaces de responder rápidamente a las nuevas condiciones, en algunos casos sin una nueva activación del mecanismo de respuesta al estrés mediado por las MAPKs. Se ha demostrado que el nivel de fosforilación de las MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK en ambas especies es suficiente para responder ante los cambios de temperatura, en ausencia de radiación UV, ensayados. Sin embargo, el umbral para la respuesta inmediata al estrés es superado cuando la radiación UV es aplicada, siendo entonces necesaria la activación de

rutas específicas, a través de la fosforilación de las MAPKs y probablemente de la síntesis "de novo", como ocurre en *D. viridis* (Jiménez et al. 2004). Los resultados muestran que en *L. solidungula* el efecto de UVA+UVB sobre la fosforilación de las MAPKs es más pronunciado que en UVA, y que este efecto se ve reforzado a 7° C. Por lo tanto, podemos asumir que a 7° C existe un efecto sinérgico (o al menos acumulativo) de ambos factores estresantes, especialmente de la radiación UV-B, obteniendo el mayor grado de fosforilación detectado en esta especie. Parece que *L. solidungula* es capaz de hacer frente a una situación estresante de incremento de temperatura (en el rango utilizado en estos ensayos) sin la activación posterior de las cascadas tipo-MAPKs, cuando no se produce una acumulación de efectos estresantes.

S. latissima también respondió, además, al aumento de la temperatura y a la radiación UV a través de la fosforilación de ambas quinasas tipo MAPK. Como se ha mostrado previamente, no era necesaria la activación de las cascadas cuando la temperatura varió de 2 a 7° C en ausencia de radiación UV. A pesar de ello, la radiación UV indujo la nueva fosforilación de las MAPKs tipo-p38 y tipo-JNK. Por el contrario, en el caso de *L. solidungula*, se detectó una mayor intensidad en las bandas detectadas a 2° C que a 7° C cuando se aplicaba radiación UV, apareciendo diferencias entre los tratamientos PA y PAB sólo en el caso de la fosforilación de la proteína tipo-JNK. Para este comportamiento diferencial podemos proponer dos posibles explicaciones: 1) la temperatura típica de verano en las aguas superficiales en el Kongsfjorden es de alrededor de 6° C (Hanelt et al. 2001), mientras que a 10-15 m de profundidad en una columna de agua estratificada, la temperatura puede ser tan baja como de 2° C. Por lo tanto, la respuesta diferencial de *L. solidungula* y *S. latissima* podría ser el resultado de las diferencias de temperatura que se producen en sus lugares de crecimiento, que de hecho en el caso de *L. solidungula* es varios grados inferior. Así, la temperatura seleccionada de 7° C representa aproximadamente un aumento de 4-5° C para esta especie, mientras que para *S. latissima* la temperatura experimental ensayada de 2° C representa una disminución también aproximada de 4-5° C.

Otra posible explicación para esta respuesta diferencial podría deberse al hecho de que *S. latissima* no es una especie endémica del Ártico y, por lo tanto, no se encuentra tan adaptada a las bajas temperaturas como *L. solidungula*. Según Wiencke et al. (1994), *S. latissima* es una "especie fría-templada del Ártico", mientras que *L. solidungula* es una "especie endémica del Ártico". Trabajos anteriores han demostrado que el rango óptimo de crecimiento de *S. latissima* oscila entre los 10° C y los 15° C (Fortes & Lüning 1980, Bolton & Lüning 1982, Lüning 1984), mientras que este rango cae hasta los 5-10° C en el caso de *L. solidungula* (Wiencke et al. 1994). Además, la temperatura mínima de supervivencia para los microtalos de ambas especies es de -1.5° C (Wiencke et al. 1994).

Como puede observarse en las Figuras III.4-7, la activación de las quinasas tipo MAPK en respuesta al estrés fue más pronunciada en el caso de *L. solidungula* que en el de *S. latissima*, como se muestra en el análisis de los diagramas de intensidad de las bandas detectadas (muestras de ambas especies fueron analizadas en paralelo en los mismos geles, y siempre la misma concentración de proteína fue cargada en cada calle). Esto podría indicar que las condiciones experimentales fueron más estresantes para *L. solidungula* que para *S. latissima*. Estos resultados son apoyados por otros trabajos previos, en los que se describe la capacidad de *S. latissima* para hacer frente a la radiación UV. Clayton & Wiencke (2004) demostraron que el efecto de la radiación UV en la germinación de las zoosporas de *S. latissima* es casi insignificante; Aguilera et al. (2004a) demostraron que el crecimiento de esta especie apenas se vio afectado por la radiación UV (no existían diferencias entre los tratamientos PA y PAB). De igual manera, Bischof & Hanelt (2004) concluyeron que *S. latissima* podría presentar una capacidad genética para hacer frente a la radiación UV, y que un individuo de esta especie de áreas más superficiales no sufría los efectos negativos de la exposición breve a radiación UV como les ocurría a especies de las zonas más profundas. Además, Aguilera et al. (2004b) demostraron que *S. latissima* presenta una mayor actividad superóxido dismutasa, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa y catalasa que *L. solidungula*. Por otro lado, Michler et al. (2002) y Aguilera et al. (2004a) han demostrado que *L. solidungula* es más

sensible a la radiación UV que otras Laminariales de la parte superior y media de zonas sublitorales, y que su tasa de crecimiento se encontraba más afectada en PAB que en PA.

Las especies de *Laminaria* y *Saccharina* han sido clasificadas como "plantas de sombra" (Lüning 1979). Sin embargo, como se ha demostrado en este capítulo, ambas especies son tolerantes al incremento de radiación UV, y además, ambas muestran una alta tolerancia a la temperatura. Si los umbrales de respuesta constitutiva son superados, un aumento de la actividad de las cascadas tipo-MAPK es necesario para la aclimatación y para evitar efectos deletéreos. Estos experimentos a corto plazo demuestran que ambas especies son capaces de responder rápidamente a las nuevas condiciones de radiación UV y de temperatura, experimentando sólo una pequeña caída en cuanto a su eficiencia cuántica fotosintética. Un trabajo previo de nuestro grupo de varios días de duración con macrófitos intermareales del estrecho de Gibraltar (véase el capítulo II de esta memoria) nos ha ayudado a concluir que la participación de estas quinasas de proteínas MAPK tipo-p38 y tipo-JNK en *L. solidungula* y *S. latissima* resulta crucial para la supervivencia, y que ambas Laminariales del Ártico muestran un alto grado de resiliencia, al igual que ocurre en los macrófitos intermareales.

Consideramos que la vida en un entorno tan selectivo como es el Ártico ha obligado a las especies de Laminariales a ser especies muy resistentes y a poseer mecanismos de respuesta muy eficaces contra el estrés. Este hecho ha sido confirmado para *S. latissima* por varios autores. En condiciones de baja irradiancia, este tipo de macrófitos no experimenta ningún tipo de estrés (Bartsch et al. 2008), contando con una alta concentración de pigmentos y mostrando adaptaciones fotosintéticas y morfológicas (Borum et al. 2002, Bartsch et al. 2008). Karsten (2007) demostró que *S. latissima* presenta un amplio rango de tolerancia a la salinidad, mostrando un valor del rendimiento cuántico efectivo máximo por encima del 60% después de 5 días sometida a una salinidad tan baja como 10 psu y un valor del 80% cuando la salinidad se incrementó a 60 psu; por el contrario, *L. solidungula* mostró una tolerancia a la salinidad mucho más restringida. En este sentido, Spurkland & Iken (2011a) demostraron que *S. latissima*



presenta alta tolerancia frente a baja salinidad e irradiancia reducida, concluyendo que podría tratarse en el futuro de la especie dominante en las regiones frías de alta variabilidad ambiental (Spurkland & Iken 2011b).

En conclusión la activación de las quinasas tipo MAPK en las Laminariales del Ártico *S. latissima* y *L. solidungula* refleja una rápida aclimatación a los cambios en las condiciones ambientales que pueden reproducir los cambios climáticos esperables en la zona. Ambas especies han mostrado actividades MAPK tipo-JNK y tipo-p38. La fosforilación de estas proteínas tipo MAPK se produce bajo un estrés ambiental impuesto por el aumento de la temperatura y por la radiación ultravioleta. En general, la radiación UV-B fue la responsable de la mayor inducción de estas quinasas, mientras que el efecto de la temperatura sólo se mostró de manera patente en los tratamientos de luz diferentes de PAR. Ambos macrófitos parecen ser capaces de afrontar el cambio de temperatura ensayado en este capítulo, sin mostrar una activación mayor de las vías MAPK, una vez eliminada la radiación UV.

Estimamos que estos resultados contribuyen a la mejor comprensión de las reacciones metabólicas implicadas en la respuesta al estrés en estos organismos polares. Nuevos experimentos ayudarán a aclarar la relación causa-efecto entre fosforilación de las quinasas de proteínas tipo MAPK en estas macroalgas y su aclimatación al estrés (como ya se ha demostrado en otras micro y macroalgas), así como para determinar su rango de tolerancia a los cambios ambientales, a fin de reunir información sobre los posibles cambios en la estructura de las comunidades de Laminariales dominadas por estas especies en un escenario futuro de incremento de temperatura y de radiación UV.

DISCUSIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Es muy poco lo que actualmente se conoce sobre la transducción de señales de estrés ambiental en algas así como sobre la implicación y la participación de las cascadas y vías de señalización celular tipo MAPK en estos organismos. A lo largo de esta discusión general abordaremos este fascinante tema desde tres puntos de vista dentro una misma línea temporal. El que constituye el **pasado**, las primeras aproximaciones y resultados que posibilitan y determinan el **presente**, confirmaciones de hipótesis, planteamiento de nuevas alternativas, nuevos resultados y una ingente cantidad de ideas que proyectan hacia un **futuro** prometedor, bien fundamentado metodológicamente y ávido de respuestas y nuevos interrogantes.

Como se ha puesto de manifiesto en esta Memoria, la superfamilia de las MAPKs consta principalmente de tres familias de quinasas: la familia ERK, la JNK y la p38, y está demostrado que cada una de ellas desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo intracelular y la expresión génica, en acciones integradas en diversas áreas, incluyendo el crecimiento y desarrollo, enfermedades, apoptosis y demás respuestas celulares.

Hace menos de 15 años que se describieron, por primera vez, proteínas quinasas en levaduras que participaban en el proceso de apareamiento inducido por feromonas y en el proceso de fusión celular inducida (Courchesne et al. 1989, Elion et al. 1990). Desde estos comienzos, el número de estudios sobre las MAPKs ha experimentado un crecimiento explosivo y ha posibilitado importantes avances que aumentan la comprensión sobre la regulación del crecimiento y desarrollo, así como de los mecanismos por los cuales las células responden a factores estresantes externos. Los mecanismos de transducción de señal vía MAPKs han demostrado ser omnipresentes en todos los eucariotas y, hasta la fecha, numerosas publicaciones han documentado su papel, necesario y fundamental, en multitud de funciones celulares.

Hasta la fecha, gran parte de la investigación sobre las MAPKs se ha centrado en **mamíferos**, donde en experimentos *in vitro* se exponían cultivos celulares aislados directamente a determinados factores estresantes. Gracias a estos estudios iniciales se han identificado respuestas específicas de estrés, órgano-específicas y tiempo-dependientes de la activación de una, dos o tres vías de las MAPKs, demostrándose claramente que las cascadas de transducción de señal tipo MAPKs desempeñan un papel crucial en la adaptación metabólica.

Un ejemplo de respuesta órgano-específica de estrés es el que se produce en el riñón de mamíferos. En este órgano se inducen procesos de isquemia por la activación de la JNK y p38 y por la fosforilación de MKK7, MKK4 y MKK 3/6, poniéndose de manifiesto que el pre-acondicionamiento atenúa estas respuestas, correlacionándose con la mejoría en la supervivencia (Park et al. 2001). En células renales de mamíferos mediante la técnica de detección de cDNA array, Nahm et al. (2002) demostraron la participación de las MAPKs en la inducción de genes sensibles a hipertonicidad. Este estudio enfatiza no sólo el papel clave de las MAPKs mediando las respuestas ante estrés osmótico en las células, sino también el enorme potencial de proyección del cDNA array para obtener una visión “global” de respuestas celulares al estrés. Una vez identificados los genes sensibles a la regulación de las MAPKs, estudios futuros podrían continuar a nivel de la cascada al completo, atendiendo a los mecanismos de regulación involucrados y llevando a cabo la caracterización de la función adaptativa de los productos proteicos de estos genes estimulados “*corriente arriba*”.

Además de en mamíferos, existen estudios en anfibios donde determinadas vías tipo MAPK también responden ante situación de anoxia, estrés hiperosmótico y estrés térmico, así como a sobrecarga mecánica, como por ejemplo los trabajos pioneros en corazón perfundido en la rana *Rana ridibunda* (Aggeli et al. 2001a, b, 2002). En estos estudios son destacables los datos obtenidos en los shocks hiperosmóticos (mediante perfusión con alto sorbitol, NaCl o KCl) donde se ha observado una rápida fosforilación de

p38, fácilmente reversible, mientras que en situación de hipotonicidad no se alteró la actividad de esta quinasa; las altas y bajas temperaturas también aumentaron el contenido de fosfo-p38 (Aggeli et al. 2002).

En la actualidad, la toxicidad por metales pesados constituye un grave problema de salud debido a la bioacumulación, potencialmente peligrosa, alcanzándose en los tejidos niveles tóxicos de estos metales. De este modo, diversos trabajos se han centrado en el estudio de la toxicidad por metales pesados, y han revelado como As^{3+} , V^{4+} , Cr^{3+} , Cu^{6+} y Zn^{2+} son responsables de la activación de MAPKs en mamíferos (Samet et al. 1998, Tessier & Pascal 2006).

En general, en el campo de la bioquímica animal comparada, a excepción de algunos estudios en embriología y desarrollo (por ejemplo, Pozios et al. 2001, Lisovsky et al. 2002, Moreno et al. 2002) se ha explorado relativamente poco sobre las MAPKs y sus funciones. Y esto a pesar de la obvia importancia potencial de estas quinasas en la mediación de las respuestas a múltiples factores ambientales estresantes. Los diversos estudios mencionados anteriormente indican claramente que las MAPKs desempeñan un papel clave en animales en las respuestas ante una amplia variedad de factores ambientales. “*Corriente abajo*”, las MAPKs desempeñan un papel crucial como reguladoras de la expresión génica inducida por estrés, constituyendo un importante foco de estudio en diversos organismos.

En hongos y animales existe una buena comprensión de cómo diferentes tipos de MAPKs participan en rutas de señalización celular donde cada vía se encarga de la transducción de diversas señales procedentes del medio ambiente extracelular. Como se ha demostrado, las MAPKs “convencionales” (ERK1/ERK2, p38, JNK y ERK5) que se conocen en animales son activadas “*corriente arriba*” por las “MKKs”, en cambio existe un grupo de MAPKs “atípicas”, muy similar a las MAPKs “convencionales”, que se desconoce que requieran ser fosforiladas vía MKKs (Dóczi et al. 2012). En humanos, éstas son las ERK3/ERK4 y ERK8 (Li et al. 2011). Además, existe una clase de proteínas quinasas

denominadas Mak-quinasas homólogas (MHKs), relacionadas con las MAPKs y con las quinasas dependientes de ciclina, y que en células humanas se denominan quinasas asociadas a células germinales macho (MAKs) (MAP Kinase Group 2002).

Respuestas específicas de estrés en **levaduras** se pueden encontrar en diferentes estudios. Ante condiciones de alto estrés osmótico la regulación se produce través del mecanismo HOG, donde las levaduras responden a través de la activación de esta cascada MAPK específica (*HOG: High Osmolarity Glycerol*) (Kaur & Gupta 2005). Además, mediante análisis de complementación y análisis de dos híbridos, se ha confirmado la presencia de un módulo MAPK constituido por MAPKKK1-MAPKK1/MAPKK2-MAPK4/MAPK6 que responde a estrés por frío y salinidad. Sin embargo, por el momento no se tiene constancia de la existencia de homólogos de las vías de la JNK y la ERK en levaduras.

A diferencia de la regulación tipo HOG de levaduras, en **plantas**, ante situaciones de estrés, se ha demostrado la participación de MAPKs como la SIMKK-SIMK en alfalfa y la NtMEK2 (MAP2K)-SIPKWIPK (MAPK inducida por estrés en plantas-MAPK inducida por heridas en plantas) en tabaco (Kiegerl et al. 2000, Yang et al. 2001). En *Arabidopsis*, mediante la activación de determinados componentes MAPKs y expresión génica inducida por alta salinidad u otro tipo de estrés, se ha demostrado una relación entre estrés osmótico y estrés oxidativo (Meskiene et al. 2000), y mediante la exitosa técnica de análisis de dos híbridos de levaduras se han detectado posibles interacciones proteína-proteína entre todas las MAPKs de *Arabidopsis*, posibilitando la obtención de un amplio patrón de interacciones (Lee et al. 2008).

En esta Memoria se ha puesto de manifiesto que a pesar de que las MAPKs en plantas, al igual que en animales, constituyen una gran familia (se puede recordar por ejemplo las aproximadamente 24 MAPKs detectadas en el genoma de *Arabidopsis*, donde 12 de las cuales son de tipo-ERK y donde las otras 12 son específicas de plantas), resulta relevante el hecho de que hasta la fecha no se han identificado ningún homólogo de las

MAPKs tipo-JNK y tipo-p38. En los últimos años ha tenido lugar un gran avance en los estudios sobre MAPKs y su regulación en las respuestas de estrés ambiental en plantas, en comparación con las respuestas de estrés similares evaluadas en modelos animales (vertebrados e invertebrados). Wrzaczek & Hirt en 2001 no sólo afirman la existencia de al menos 24 vías MAPK en *Arabidopsis thaliana*, con papeles conocidos en señalización de múltiples factores de estrés bióticos y abióticos tales como: heridas, infección por patógenos, estrés de temperatura o sequía, sino que ponen de manifiesto el papel como mediadoras que desempeñan las MAPKs en el ciclo celular y en determinados procesos de desarrollo así como los efectos de algunas hormonas vegetales (por ejemplo, etileno y auxina).

En plantas, en el interior de las células, la señalización mediante las MAPKs parece implicar la intercomunicación de variedad de respuestas de estrés y el desarrollo de procesos de formación de complejas redes interconectadas (Pedley & Martin 2005). Métodos genéticos y bioquímicos tradicionales han identificado los módulos de señalización celular completos (MAPKKK/MAPKK/MAPK) con funciones superpuestas en el control de diversas funciones celulares como: división celular, desarrollo, fitohormonas de señalización ABA (ácido abscísico), auxinas, etileno y la respuesta a estrés abiótico: heridas, alta y baja temperatura, alta salinidad, radiación UV, ozono, ROS, sequía y alta y baja osmolaridad, metales pesados, así como patógenos (Hirt 2000, Jonak et al. 2002, 2004, Yeh et al. 2004, Lin et al. 2005, Liu et al. 2010).

Las vías MAPK son particularmente importantes en la mediación de la respuesta de la planta al agua y su relación con el estrés (sequía, salinidad) (Munnik & Meijer 2001). El estrés por frío, sequía y salinidad estimula la acumulación de osmolitos compatibles y de antioxidantes (Hasegawa et al. 2000), así como la activación de MAPK4 y MAPK6, la inducción transcripcional de MAPKK1, y la activación de MAPKK4 y MAPKK5 que participan en la vía de señalización de la flagelina. Además, se ha demostrado que la MAPKK1 puede activarse por estrés provocado por heridas (Teige et al. 2004) y la MAPK4



puede fosforilarse en respuesta a sequía en *Arabidopsis* (Matsuoka et al. 2002).

Se ha identificado y ha sido alterada la expresión de muchos genes sensibles a estrés y responsables de la resistencia a la sequía en plantas (Zhu 2002, Li et al. 2008, Lee et al. 2009); recientemente una novedosa proteína quinasa nuclear y su mutante, la DSM1 (mutante de la proteína quinasa nuclear sensible a sequía), también han sido identificados, presentando similitud con la secuencia de MAPKKKs tipo-Raf (responsables de la resistencia a sequía y de la resistencia al estrés oxidativo en arroz, ya sea mediante regulación directa o indirecta) (Ning et al. 2010).

La señalización celular mediante fitohormonas (ácido abscísico, etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico y auxina), así como las vías de señalización de ROS, desempeñan un papel clave en la intercomunicación entre la señalización de estrés biótico y abiótico (Fujita et al. 2006). Estas hormonas pueden interactuar entre sí en la regulación de la señalización y tolerancia al estrés de la planta. Asimismo, se ha demostrado cómo las MAPKs son activadas ante baja concentración de ABA sobre la aleurona de protoplastos de cebada (Heimovaara-Dijkstra et al. 2000); además junto con la señalización de ABA, las MAPKs pueden mediar respuestas de estrés ambiental, principalmente hídrico. MAPK9 y MAPK12, que preferentemente se activan en las células oclusivas de los estomas (guard cells), pueden compartir redundancia funcional actuando como reguladores positivos “*corriente abajo*” de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de señales de calcio, pero también actuar “*corriente arriba*” sobre canales aniónicos en células oclusivas en la señalización por ABA (Jammes et al. 2009).

Numerosos estudios han documentado la implicación de las cascadas de señalización tipo MAPK y la fosforilación de proteínas en la señalización vía auxina. Por ejemplo, Mockaitis & Howell, en el año 2000, demostraron la activación por parte de auxina de una MAPK desconocida en raíces de plántulas de *Arabidopsis* y, recientemente, se ha demostrado cómo la MAPKK7 controla el transporte polar auxínico (Dai et al. 2006).

Además de las fitohormonas, otras moléculas de señalización celular como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producido por diversos estímulos ambientales, pueden actuar en diferentes procesos tales como la regulación a la tolerancia al estrés, el desarrollo de la planta y el proceso de muerte celular programada (PCD), la muerte de células de la aleurona, la respuesta hipersensible a patógenos y las interacciones alelopáticas planta-planta (Apel & Hirt 2004). La PCD inducida por H_2O_2 resulta esencial para numerosos procesos de desarrollo y respuestas ambientales (Taj et al. 2012). Asimismo, el H_2O_2 provoca la activación de dos MAPKs en plantas de *Arabidopsis*, una de las cuales también se activa de manera independiente a través de la vía de señalización de fitohormonas como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y etileno (Grant et al. 2000) o directamente a través de la MAPKKK ANP1, la AtMPK6 y la AtMPK3 (Desikan et al. 2001, Neill et al. 2001, Palavan-Unsal & Arisan 2009).

En tratamientos combinados con ozono, el H_2O_2 induce la activación de la MAPK ortóloga de la AtMPK en tabaco, la SIPK1 (salicylic acid-induced protein kinase 1) (Samuel et al. 2000). Un ejemplo de respuesta específica, rápida y muy compleja, es la inducida por el óxido nítrico (NO) y el H_2O_2 en el proceso de muerte celular hipersensible (De Gara et al. 2003). Además, el NO participa en la señalización de estrés de tipo biótico, ya que se encuentra involucrado en la activación de la actividad MAPK durante las respuestas de defensa de la planta contra las infecciones de patógenos en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Clark et al. 2000, Kumar et al. 2000), en *Arabidopsis thaliana* y en la formación de raíces adventicias inducidas por el ácido indol acético en pepino (*Cucumis sativus*) (Pagnussat et al. 2004).

De igual manera que ocurriese en el caso comentado con anterioridad en esta discusión en mamíferos, actualmente la bioacumulación de metales pesados constituye un grave problema que también afecta a las plantas. Recientemente también se ha demostrado la activación de MAPKs por metales pesados en plantas vasculares (Jonak 2002, Yeh et al. 2007), concretamente la activación transcripcional de MAPKKs en

Arabidopsis por CdCl₂ (Suzuki et al. 2001, Yeh et al. 2007). Asimismo, la exposición de plántulas de *Medicago* a iones de cobre y cadmio en exceso ha evidenciado la activación de cuatro MAPKs diferentes: SIMK (MAPK inducida por estrés), MMK2 (MAPK2), MMK3 (MAPK3) y SAMK (MAPK activada por estrés) (Cardinale et al. 2000, Jonak 2002) y en *Arabidopsis* la activación de MAPK3 y de MAPK6 por acumulación del nivel de ROS producido por estrés oxidativo en respuesta a cadmio (Liu et al. 2010). Una vez activadas las MAPKs las plantas responden, se adaptan y sobreviven, aunque en la mayoría de los estudios realizados no se va más allá en la relación causa-efecto.

La filogenia de las MAPKs, desde sus inicios, ha generado controversia y suscitado constantes interrogantes. Recientemente, análisis filogenéticos basados en similitud de secuencias, agrupan a las MKK y a las MAPKs en cuatro grupos filogenéticos designados con las letras A, B, C y D (Tabla 1). Estos análisis destinados al estudio evolutivo de las vías de señalización tipo MAPKs en plantas, demuestran la existencia de múltiples genes de MAPKs en los genomas de algunas algas estudiadas: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox*, *Micromonas spp.*, *Ostreococcus tauri* y *Ostreococcus lucimarinus*, pertenecientes a grupos MAPKs con bucles de activación tipo TEY-(grupos A, B y C) y tipo TDY-(Grupo D), que indica que la divergencia entre el motivo TxY característico de las MAPKs tuvo que constituir un evento temprano en la evolución de la planta (Dóczi et al. 2012).

Tabla 1. Secuencias ortólogas de *Arabidopsis* de MAPKs y MKKs identificadas en otras plantas y determinadas por el programa identificador de ortólogos InParanoid. MAPKs y MKKs se clasificaron en cuatro grupo (A, B, C y D) más el grupo de MKKs (Tomado de Dóczi et al. 2012).

Table 1. Ortholog sequences of *Arabidopsis* of MAPKs and MKKs identified in other plants and determined by the InParanoid ortholog identifier program. MAPKs and MKKs were classified into four group (A, B, C, and D) plus the MKKs group (Taken from Dóczi et al. 2012).



MAPK	Arabidopsis thaliana	Selaginella moellendorffii	Physcomitrella patens	Chlamydomonas reinhardtii	Volvox carteri	Ostreococcus lucimarinus	Ostreococcus tauri	Micromonas sp. RCC299	Naegleria gruberi
TDY									
Group D	MPK8 AT1G18150			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	
	MPK9 AT3G18040			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	XP_002672114_nag
	MPK15 AT1G73670			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	
	MPK16 AT5G19010	XP_002961155_sel		XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	XP_002672114_nag
		XP_002966854_sel							
	MPK17 AT2G01450			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	
	MPK18 AT1G53510			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	
	MPK19 AT3G14720			XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	XP_002672114_nag
	MPK20 AT2G42880	XP_001765894_phy		XP_001694300_chl	XP_002954367_vol	XP_001419059_olu	XP_003080614_ota	XP_002503335_mic	XP_002672114_nag
		XP_001766825_phy							
TEY									
Group C	MPK1 AT1G10210	XP_002967096_sel	XP_001776547_phy						XP_002672114_nag
		XP_002960915_sel	XP_001771474_phy						
		XP_002976409_sel							
	MPK2 AT1G59580	XP_002967096_sel	XP_001776547_phy						XP_002672114_nag
		XP_002960915_sel	XP_001771474_phy						
		XP_002976409_sel							
	MPK7 AT2G18170	XP_002967096_sel	XP_001776547_phy						XP_002672114_nag
		XP_002960915_sel	XP_001771474_phy						
		XP_002976409_sel							
	MPK14 AT4G36450	XP_002967096_sel	XP_001776547_phy						XP_002672114_nag
		XP_002960915_sel	XP_001771474_phy						
		XP_002976409_sel							
Group B	MPK5 AT4G11330								XP_002672114_nag
	MPK11 AT1G01560								
	MPK13 AT1G07880			XP_001700291_chl	XP_002955338_vol	XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002503699_mic	
	MPK12 AT2G46070	XP_002976336_sel		XP_001700291_chl	XP_002955338_vol	XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002501054_mic	
	MPK4 AT4G01370	XP_002976336_sel	XP_001763232_phy	XP_001700291_chl	XP_002955338_vol	XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002501054_mic	XP_002672114_nag
Group A	MPK6 AT2G43790			XP_001700291_chl	XP_002955338_vol	XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002503699_mic	XP_002672114_nag
	MPK3 AT3G45640			XP_001700291_chl	XP_002955338_vol	XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002501054_mic	XP_002672114_nag
	MPK10 AT3G59790			XP_001700291_chl		XP_001419851_olu	XP_003081390_ota	XP_002503699_mic	XP_002672114_nag
MHK	MPK21AT4G13020								
	MPK22 AT4G19110	XP_002987235_sel	XP_001757612_phy	XP_001697865_chl	XP_002949787_vol			XP_002505908_mic	XP_002675576_nag
			XP_001785524_phy						
			XP_001774238_phy						
	MPK23 AT5G45430	XP_002987235_sel	XP_001757612_phy	XP_001697865_chl	XP_002949787_vol			XP_002505908_mic	XP_002675576_nag
			XP_001785524_phy						
			XP_001774238_phy						



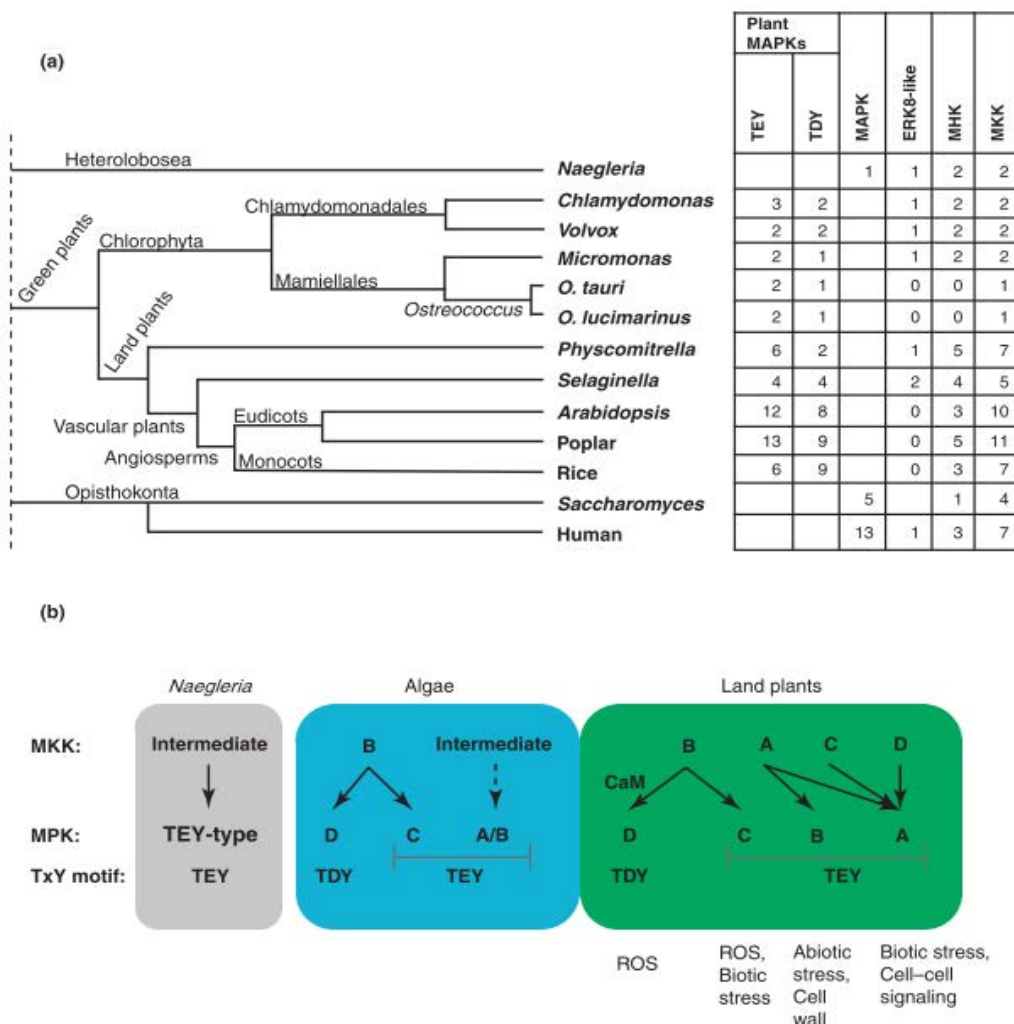


Figura 1. Expansión de vías MAPKs. (a) número de “MAPK convencionales” y de “MAPK atípicas” y de genes MAPK quinasa (MKK) en genomas del linaje de plantas verdes (*Viridiplantae*) así como en *Saccharomyces cerevisiae*, seres humanos y *Naegleria*, que representan otros dos clados principales en eucariotas. Se indican las relaciones filogenéticas entre las especies. Las longitudes de rama son arbitrarias. (b) aparición de los grupos filogenéticos de MKK y MAPK en plantas con flores y de las conexiones vía típica entre grupos (flechas). La vía MAPK ancestral presumiblemente compuesta por un MKK “corriente arriba” y MAPKs tipo TEY. Un aumento en la complejidad se ve en las algas, donde aparecen MAPKs tipo TDY y dos tipos de MKK. En las plantas terrestres, MAPKs TEY y los MKKs de tipo intermedio divergieron más. La flecha rota indica una hipotética vía en algas. CaM indica la participación de Ca₂-calmodulina en la activación de MAPK (Tomado de Dóczy et al.2012).

Figure 1. Expansion of MAPKs pathways. (a) number of “conventional MAPK” and “atypical MAPK” and MAPK Kinase (MKK) genes in genomes of the green plant lineage (*Viridiplantae*) as well as in *Saccharomyces cerevisiae*, humans and *Naegleria*, which represent two other major eukaryotic clades. Phylogenetic relationships between species are shown. Branch lengths are arbitrary. (b) emergence of the phylogenetic MKK and MAPK groups in flowering plants and of typical pathway connections between groups (arrows). The ancestral MAPK pathway presumably comprised a MKK upstream of a TEY-type MAPK. An increase in complexity is seen in algae, where TDY-type MAPKs and two types of MKK appear. In land plants, TEY MAPKs and the intermediate-type MKKs divergir further. The broken arrow indicates a hypothetical pathway in algae. CaM indicates the involvement of Ca₂-calmodulin in MAPK activation. (Taken from Dóczy et al.2012).

Inicialmente, estudios realizados en algas demostraron la existencia de un solo gen de MKK en el genoma de *Chlamydomonas* (Hamel et al. 2006). Posteriormente, fueron secuenciados los genomas de otras algas (Figura 1) como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox*, *Micromonas spp.*, *Ostreococcus tauri* y *Ostreococcus lucimarinus*. Curiosamente, en *Micromonas* hay dos tipos distintos de genes MKK: uno pertenece al grupo B y el otro no puede agruparse en ninguno de los grupos establecidos previamente en plantas con flores, agrupándose de manera independiente en un “clado intermedio”. Existen dos MKKs diferentes en *Volvox* y *Chlamydomonas*, pertenecientes a los dos clados distintos de MKK. En cada especie de *Ostreococcus* solo se encuentra un gen MKK y ambos pertenecen al “clado intermedio”.

Existen dos clados bien separados dentro del tipo TEY de MAPKs en algas, en las primeras plantas terrestres y en plantas con flores, sugiriendo que la diversificación de estos clados hubo de ser un acontecimiento muy antiguo en el linaje de la planta. En *Arabidopsis* la MKK3 (Grupo B) se encuentra “corriente arriba” de la MPK7 (proteína mitógeno quinasa 7) y de otra MAPK (grupo C) (Dóczy et al. 2007), así como de la MPK8, un miembro del grupo D (Takahashi et al. 2011). Como el grupo B, los grupos C y D de las MAPKs se encuentran en la mayoría de las algas secuenciadas (excepto en el genoma “mínimo” de *Ostreococcus*), y es probable que la organización de esta vía constituya un patrimonio común del linaje de la planta. Por el contrario, en ambas especies de *Ostreococcus* (*Ostreococcus tauri* y *Ostreococcus lucimarinus*) sólo hay un único MKK y dos distintas MAPKs con bucles de activación tipo TDY y tipo TEY. Se desconoce si las MKKs tipo B se han perdido en las especies de *Ostreococcus*, pero la capacidad de que una sola MKK regule dos tipos distintos de MAPKs aparecería de manera temprana durante la evolución de la planta. Este fenómeno podría sugerir la aparición de mecanismos regulatorios destinados a asegurar la especificidad de la señal y que proporcionan una base para la formación de redes de señalización más complejas (Dóczy et al. 2012). A pesar de que en la actualidad *Dunaliella viridis* no se encuentra completamente secuenciada, más adelante en esta Memoria se analizará la secuencia

TDY de la ERK clonada parcialmente por Jiménez et al. (2007).

Sin duda son muchos los antecedentes y los estudios realizados sobre estrés y sobre las diferentes respuestas mediadas por las MAPKs en células de mamíferos, plantas, levaduras, etc. que ponen de manifiesto la ubicuidad de estos mecanismos en diversos organismos. De todos ellos, las algas filogenéticamente son los más antiguas y sin embargo es muy poco lo que actualmente se conoce sobre la transducción de señales de estrés ambiental en algas así como sobre la implicación y la participación de las cascadas y vías de señalización celular tipo MAPKs.

Jiménez et al. en 2004, trabajando con la microalga *Dunaliella viridis* demostraron, por primera vez, la presencia y fosforilación de proteínas tipo MAPKs (p38 y JNK) en algas en respuesta al incremento de salinidad, radiación UV o temperatura. Las microalgas del género *Dunaliella* se encuentran entre los organismos eucariotas más ubicuos, siendo reconocida su extraordinaria alta tolerancia a la salinidad, la temperatura, la limitación de nutrientes y la irradiancia (Ben-Amotz et al. 2009). Se sabe que la microalga *D. viridis* presenta la capacidad de adaptarse ante la variación de una amplia gama de factores ambientales, incluyendo choques térmicos, osmóticos y lumínicos; además, al carecer de pared celular rígida, constituye un excelente candidato y un modelo “relativamente fácil” de estudio en la señalización celular de señales de estrés ambiental en organismos unicelulares eucariotas.

A pesar de tratarse de datos ya publicados, considero de interés hacer aquí una exposición detallada de estos trabajos pioneros con MAPKs en algas. En este estudio, cultivos de *D. viridis* en su fase exponencial de crecimiento cultivados en 2 M de NaCl y 5 mM NaNO₃, en agitación y bajo iluminación continua (150 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a una temperatura de 25 °C se sometieron a: estrés osmótico, consistente en el aumento (4 M NaCl o 5.04 M glicerol) o disminución (1 M NaCl o 1.57 M glicerol) de la presión osmótica del medio, estrés lumínico por radiación UV: exposición de los cultivos bajo 70 mJ cm^{-2} , o

estrés térmico en el que los cultivos pasaron de estar a 25° C a someterse a una temperatura de 36° C.

En todos los casos se obtuvo (por reactividad cruzada con anticuerpos específicos de mamíferos fosfo-p38 y de manera más acusada también con los anticuerpos específicos de homólogos de levaduras, HOG-1) una única banda correspondiente a una proteína de 57-kDa de peso molecular, cuya fosforilación se inducía rápidamente tras el shock (Figura 2). Además, con el empleo de anticuerpos altamente específicos contra las formas fosforiladas de la JNK se detectaron tres bandas que equivalen a las tres isoformas de la JNK correspondientes a tres proteínas de 50, 45 y 43 kDa de peso molecular.

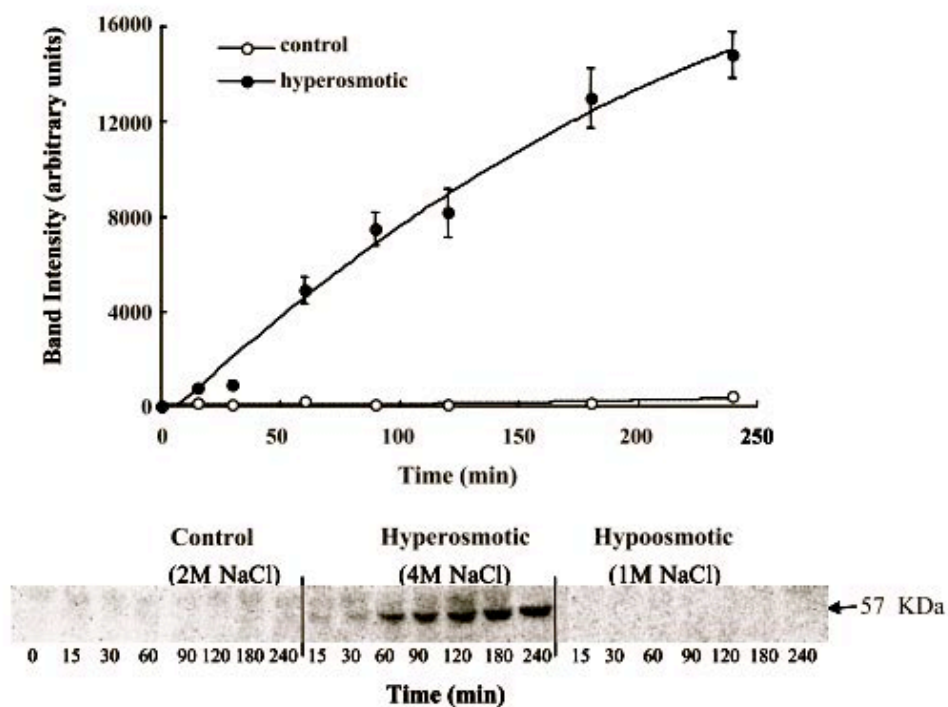


Figura 2. Cultivos de *D. viridis* a mitad de la fase logarítmica de crecimiento sometidos a tres tratamientos de NaCl diferentes (condiciones de control, hiperosmóticos e hipoosmóticos). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot usando anticuerpos específicos de mamíferos contra la forma fosforilada de la p38. La gráfica muestra la media \pm S.E. de la intensidad de una banda de 57 kDa de peso molecular (Tomado de Jiménez et al. 2004).

Figure 2. *D. viridis* cultures in mid-log phase of growth subjected to three different NaCl treatments (Control, hyperosmotic and hypoosmotic). Protein extracts were analyzed by Western blot using

antibodies against mammalian phosphorylated form of the p38. The graph depicts the mean \pm S.E. of a 57 kDa band (Taken from Jiménez et al. 2004).

Igualmente, se puso de manifiesto la relación causa-efecto entre fosforilación de las MAPKs mencionadas en situación de estrés (no letal) y la supervivencia celular. El empleo de inhibidores específicos de la p38 (SB203580) y de la JNK (SP600125) condujo, irremediablemente, a una incapacidad de respuesta al estrés e incluso a la muerte celular (Figura 3A).

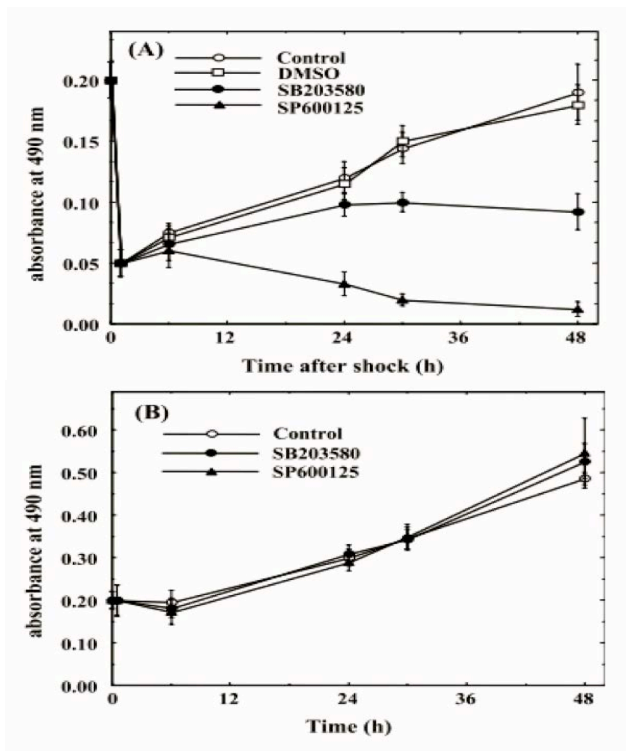


Figura 3. Cultivos de *D. viridis* incubados durante 2 h en presencia de los inhibidores específicos antes de someterse al estrés. (A) Efecto del inhibidor de la de la p38 (SB203580) y de la JNK (SP600125) sobre la viabilidad celular tras el choque osmótico. (B) Efecto de los inhibidores específicos de las MAPKs (p38 y JNK) en células no estresadas (Tomado de Jiménez et al. 2004).

Figure 3. *D. viridis* cultures incubated for 2 h in the presence of specific inhibitors before undergoing the stress. (A) Effect of the inhibitor of the p38 (SB203580) and JNK (SP600125) on cell viability after the osmotic shock. (B) Effect of specific inhibitors of MAPKs (p38 and JNK) in non-stressed cells (Taken from Jiménez et al. 2004).

No se dispone de información anterior a esta investigación donde se describa la presencia de vías tipo MAPK en plantas acuáticas como las algas verdes (a partir de las cuales las plantas superiores evolucionaron en la transición a la vida terrestre). Mediante el uso de inhibidores altamente específicos de las MAPKs (p38 y JNK) en este estudio se confirma la presencia y el papel fisiológico de las vías tipo p38 y JNK en *D. viridis* y su implicación en mecanismos de señalización celular.

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta Memoria, se ha demostrado la participación de las MAPKs a través de la ruta de la ERK en procesos de proliferación y diferenciación en células de mamíferos. En plantas, diversos trabajos han relacionado el aumento en la expresión de proteínas tipo ERK con procesos de proliferación y diferenciación celular. Esta vía de señalización celular ERK es estructuralmente similar, pero funcionalmente diferente a las otras dos cascadas de las MAPKs (p38 y JNK). En 2007 Jiménez et al. ponen de manifiesto la relación que existe entre el mecanismo de división celular y la fosforilación de quinasas tipo ERK en organismos unicelulares fotosintéticos.

El crecimiento de los cultivos de *D. viridis* se inhibió casi completamente en presencia de 20 μ M del inhibidor específico de la ERK PD98059 (Figura 4). El inhibidor actúa sobre la quinasa MKK1/2 situada “corriente arriba”, evitando de este modo la fosforilación de ERK1/2. Tras la adición del inhibidor, las células sólo experimentaron un ciclo de división celular, y la presencia del inhibidor no afectó a la viabilidad celular, a la motilidad celular, ni a la capacidad de generar poder reductor (en forma de NADH y NADPH).

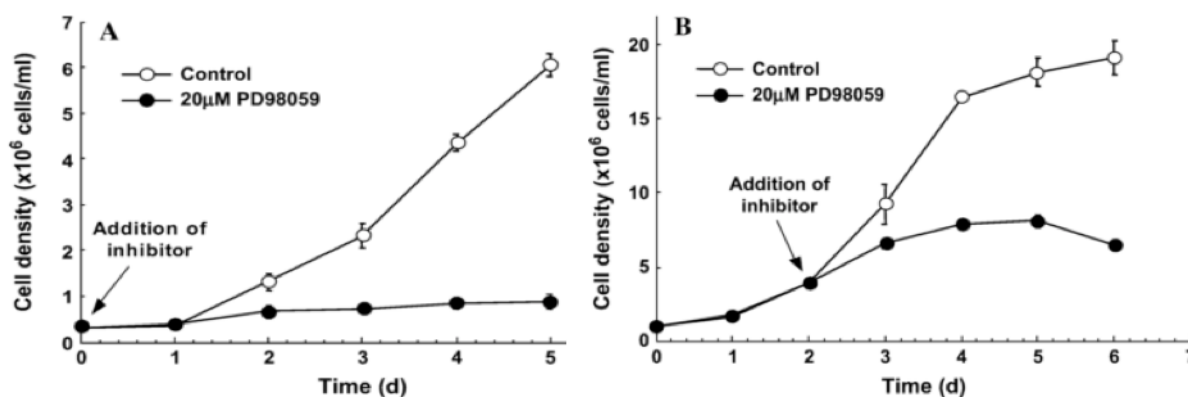


Figura 4. Efecto del inhibidor de la ERK PD98059 (20 μ M) sobre el crecimiento de *D. viridis*. El inhibidor se añadió en el momento de la inoculación del medio fresco (A) o al inicio de la fase exponencial de crecimiento (B) (Tomado de Jiménez et al. 2007).

Figure 4. Effect of the ERK inhibitor PD98059 (20 μ M) on growth of *D. viridis*. The inhibitor was added either at the time of inoculation of fresh medium (A) or at the onset of the exponential growth phase (B) (Taken from Jiménez et al. 2007)



Mediante citometría de flujo y fluorescencia con tinción de yoduro de propidio, se observó cómo las células incubadas en presencia de PD98059 desarrollaron dos veces la cantidad de DNA en comparación con las células control. La mayoría de las células control contienen una única copia de DNA, y en ellas la fase G1 es la más larga en duración dentro el ciclo celular, por el contrario las células de *D. viridis* en presencia del inhibidor duplican su contenido de DNA durante la fase S, y el ciclo celular se detiene en fase G2 no progresando hacia la fase M de mitosis. Mediante el empleo de anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de la ERK de mamíferos, se observó la presencia de bandas de pesos moleculares similares (42 y 44 kDa) a los de la ERK 1/2 de mamíferos, cuya fosforilación fue máxima durante la fase exponencial de crecimiento y muy reducida en la fase estacionaria cuando las células entraron en un claro declive incluyendo la muerte celular.

La clonación parcial de las ERKs de *D. viridis* llevada a cabo en dicho estudio mostró un alto grado de identidad con las de gran variedad de organismos que van desde los protozoos a los humanos. Cabe destacar que el característico motivo TEY no es universal (Dóczy et al. 2007, Takahashi et al. 2011, Dóczy et al. 2012), si bien es cierto que se encuentra en todos los animales, protozoos, hongos y en la mayoría de las plantas en las que se ha clonado y secuenciado esta MAPK. Existe un grupo de plantas que muestran un motivo diferente: el motivo TDY (Figura 5). Entre ellas se encuentran *Dunaliella viridis*, *Zea mays*, *Selaginella*, *Arabidopsis*, *Triticum* y *Oryza*. Resulta sorprendente la aparente divergencia evolutiva entre las dos algas verdes estrechamente relacionadas, *Chlamydomonas* y *Dunaliella*. Sin embargo, dado que esta comparación se basa sólo en un tercio de la secuencia codificante de la ERK1 y ERK2 (incluso considerándose la parte más conservada de los mRNAs), es probable que la secuencia completa de los mRNAs correspondientes generaran otro cladograma. Además, el cambio de TEY a TDY implica únicamente la sustitución de un solo nucleótido en la tercera posición del codón, esa mutación conduce a un cambio en los aminoácidos conservados, y es posible que la sustitución de ese simple nucleótido pudiese haber ocurrido durante el proceso evolutivo

de la planta. Además, recientes análisis filogenéticos mencionados anteriormente (Dóczy et al. 2012) basados en similitud de secuencias que agrupan a las MKK y a las MAPKs en cuatro grupos filogenéticos (A, B, C y D), demuestran la existencia de múltiples genes de MAPKs en los genomas de algas pertenecientes a grupos MAPKs con bucles de activación tipo TEY-(grupos A, B y C) y tipo TDY-(Grupo D), apoyando la idea de que este cambio o sustitución nucleotídica constituyese un fenómeno temprano dentro del proceso evolutivo de la planta.

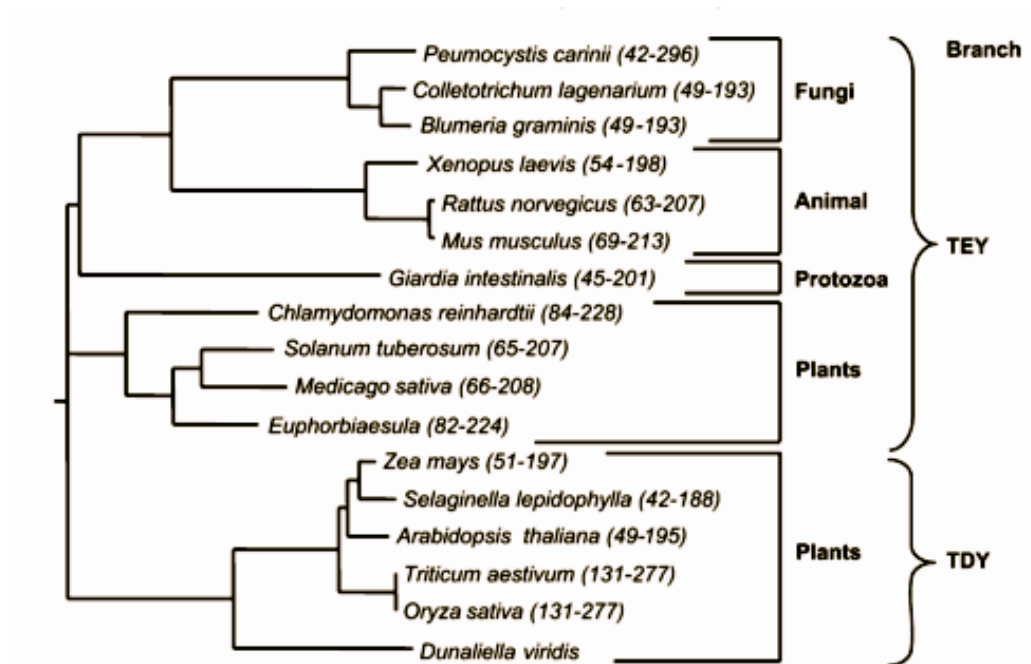


Figura 5. Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de la proteína ERK1 de diferentes organismos. Esta comparación se realizó utilizando el software MacVector (versión 6.5, Oxford Molecular Ltd, Madison, WI, USA) empleando sólo las secuencias parciales según se indica entre paréntesis (Tomado de Jiménez et al. 2007).

Figure 5. Phylogenetic analysis of the aminoacid sequences of the ERK1 protein from different organisms. This comparison was performed using MacVector software (version 6.5, Oxford Molecular Ltd, Madison, WI, USA) employing only the partial sequences as is indicating between the parentheses (Taken from Jiménez et al. 2007).

De acuerdo a todos estos datos, se puede asegurar que en este estudio se demostró de manera pionera cómo la fosforilación de la ERK desempeña un papel crucial y fundamental en la adaptación y la supervivencia de *Dunaliella* bajo condiciones ambientales estresantes como el shock hiperosmótico, actuando sobre la división celular. Se observó, asimismo, una correlación directa entre la inhibición de la división celular y el nivel de fosforilación de las quinasas de proteínas tipo ERK. Dicho control de la división celular parece seguir patrones similares de transducción de señal en los organismos unicelulares y multicelulares. Análisis genéticos realizados indican secuencias ERK fuertemente conservadas desde microalgas unicelulares a mamíferos, lo que sugeriría que el origen de la vía ERK es anterior a la divergencia de la planta y a los linajes hongo, animal y plantas superiores.

Es el presente año 2012, y entrando en lo que constituye el “presente” de esta discusión general, cuando García-Gómez et al. (2012) revelan la participación de las MAPKs en procesos de supervivencia celular de organismos unicelulares como la clorófito *Dunaliella tertiolecta* sometidos a estrés ambiental. La radiación ultravioleta induce daños en gran variedad de organismos; las células, para adaptarse, pueden desarrollar mecanismos de reparación o mecanismos de tolerancia para contrarrestar tales daños y evitar así la muerte celular. En este reciente estudio, cultivos de *Dunaliella tertiolecta* sometidos a exposición crónica de UVR, no mueren, y son capaces de resistir. A la hora de analizar dicha resistencia se estudió la dinámica de varios procesos relacionados con el daño y la reparación del DNA, observando que ante una exposición crónica de UVR la células sobreviven gracias a la participación y la activación de mecanismos de reparación del DNA mediante acumulación de proteínas PCNA (cell proliferation nuclear antigen) y ROS1 (repressor of transcriptional gene silencing). Asimismo, se demostró la activación de las MAPKs que actúan como mediadoras, y la directa participación de proteasas tipo caspasas (CL, caspase-like).

De nuevo para estudiar la actividad de las quinasas de proteínas tipo MAPKs en este estudio, se emplearon anticuerpos específicos y péptidos de bloqueo específicos contra las formas fosforiladas de JNK, p38 y ERK de mamíferos (Figura 6).

La fosforilación de la quinasa tipo-JNK (Figura 6A) en P y PAB se demostró mediante la detección de una patente señal, obteniéndose además una señal de fosforilación basal a $t=0$ indicativa de una fosforilación constitutiva. Coincidiendo con el momento en el que los cultivos alcanzan su capacidad de carga se detectó un aumento significativo en la fosforilación en P, y posteriormente, durante la fase estacionaria de crecimiento, el grado de fosforilación que se obtuvo descendió hasta valores iniciales. Observándose, en todos los casos, que el grado de fosforilación fue mayor bajo PAB que bajo P. La fosforilación de la quinasa tipo-p38 (Figura 6B) mostró un patrón similar; en presencia de UVR y transcurridas 24 h se obtuvo una señal significativa reduciéndose ésta a niveles iniciales en las siguientes 48 h. De igual manera, se detectó una notoria señal de fosforilación de la quinasa tipo-ERK (Figura 6C) transcurridas 24 h mucho más patente en P que en PAB, reduciéndose ésta a niveles casi iniciales tras las 144 h.

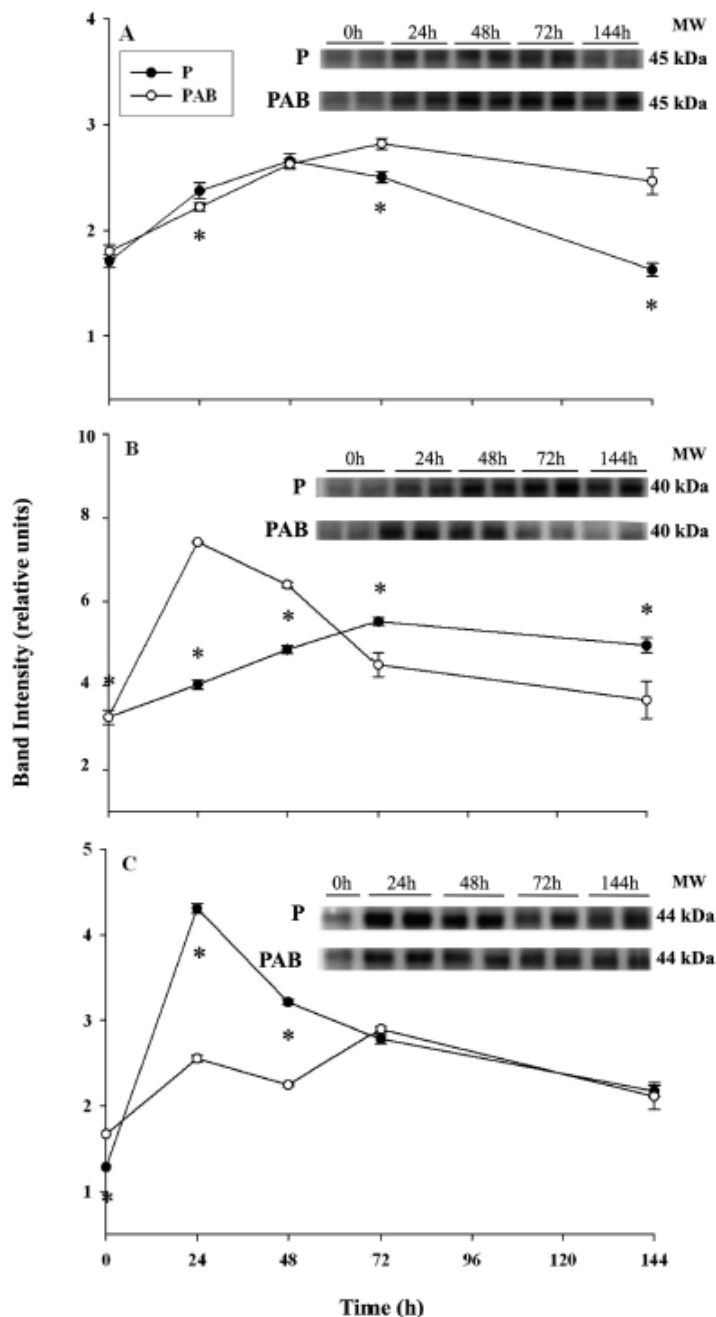


Figura 6. Western blots que muestran las formas fosforiladas de proteínas tipo MAPK en *D. tertiolecta* bajo P (símbolos cerrados) o PAB (símbolos abiertos) utilizando anticuerpos policlonales contra la forma fosforilada JNK (A), que reveló la presencia de una única banda de 45 kDa, la forma fosforilada p38 (B), que reaccionó de manera cruzada con una proteína específica de 40 kDa y contra la forma fosforilada ERK (C), que mostró una banda clara de 44 kDa. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos y bandas obtenidas por análisis de imagen se indican mediante asteriscos. (Tomado de García-Gómez et al. 2012).



Figure 6. Western blots showing the phosphorylated forms of MAPK-like proteins in *D. tertiolecta* under P (closed symbols) or PAB (open symbols) using polyclonal antibodies raised against phosphorylated form of JNK (A), which revealed the presence of a single band of 45 kDa, phosphorylated form of p38 (B), which cross-reacted with a specific 40 kDa protein, and phosphorylated form of ERK (C), which showed a clear 44 kDa band. Statistically significant differences ($P < 0.05$) between treatments and bands obtained by image analyses are indicated by asterisks. (Taken from García-Gómez et al. 2012).

En todos los casos, (JNK, p38 y ERK) con el uso de los péptidos de bloqueo específicos, se obtuvo una reducción y desaparición prácticamente total de la señal, indicando el alto grado de similitud entre las proteínas quinasas tipo MAPKs detectadas en *D. tertiolecta* y las MAPKs de mamíferos.

Estos resultados ponen de manifiesto una clara relación entre el estrés por radiación UV y la fosforilación de JNK y p38 y, como era de esperar, una disminución en la fosforilación de ERK en las células estresadas. A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, la microalga *D. tertiolecta* sobrevive bajo estas condiciones de estrés mediante la activación de varios programas celulares, en los que participan MAPKs como p38 y JNK, mecanismos de acumulación de proteínas como PCNA y ROS1, y actividades de reparación llevadas a cabo por proteínas tipo caspasas (CL).

El grueso del “presente” de esta discusión general lo constituye, sin lugar a dudas, esta Memoria de Tesis Doctoral. Sus tres capítulos principales conforman el “hoy” en cuanto al papel que desarrollan las quinasas tipo MAPKs en la transducción de señales de estrés ambiental en macrófitos. En este trabajo se ha desarrollado un nuevo procedimiento para detectar la presencia de homólogos de MAPKs en varias especies de macrófitos (Capítulo I); se ha planteado la hipótesis que defiende la fosforilación y desfosforilación cíclica de quinasas de proteínas como p38 y JNK en macrófitos intermareales del sur de España, en respuesta al estrés ambiental impuesto en situación de marea baja y alta irradiancia (Capítulo II), y se ha demostrado la activación de dos proteínas tipo MAPKs similares a p38 y JNK de mamíferos en dos especies de Laminariales árticas, en respuesta a factores ambientales estresantes como son el aumento de temperatura y de radiación UV (Capítulo III). Además, en esta Memoria se ha conseguido

demostrar (a diferencia de plantas vasculares en las que solo existen evidencias de la presencia de ERK) la presencia de MAPKs JNK y p38 homólogas de mamíferos, validando los resultados obtenidos en clorófitas por Jiménez et al, 2004, 2007 y García-Gómez et al. 2012.

Quizá sea pretencioso hablar de “futuro” y honestamente dadas las circunstancias por las que atraviesa la investigación en las universidades, debido entre otras, a la situación político-económica actual, más que pretencioso resultaría idealista hablar acerca de un “futuro” en ciencia, pero sí que podemos hablar de proyectos de futuro, iniciativas y de nuevas aproximaciones. De esta manera y sin perder el hilo de la cuestión que nos ocupa en esta discusión, ¿de qué iniciativas, nuevas aproximaciones o proyectos de futuro hablamos en relación al papel que desempeñan las MAPKs en la transducción de señales de estrés ambiental en macrófitos?

Hasta este momento ha quedado demostrada la presencia de quinasas de proteínas tipo MAPKs y su fosforilación en situaciones de estrés ambiental, pero ¿son éstas suficientes pruebas para concluir la relación causa-efecto entre activación y supervivencia?. Por ello, a partir de ahora nuestro “proyecto futuro” consistirá en confirmar si el bloqueo de las cascadas de las MAPKs dirige irremediamente a la muerte de las algas, y en determinar el papel fisiológico de las cascadas de las MAPKs en la supervivencia de las macroalgas intermareales en respuesta al estrés ambiental.

Los resultados publicados con *Dunaliella viridis* (Jiménez et al. 2004, 2007) y datos propios indicativos, aún en fase de ampliación y confirmación, en los que es inestimable la participación de la licenciada María Teresa Camarena, con las macroalgas *Ulva rigida* y *Corallina elongata* parecen indicar que el bloqueo de la cascada de la JNK en condiciones de estrés (alta irradiancia o UVR) en estas especies de macrófitos intermareales conduce a la muerte de las algas. A pesar de que estos novedosos resultados podrían incluirse según los criterios generales dentro de un capítulo de resultados, se han incluido dentro

de esta discusión general por dos razones: la primera es que no resultaría moral incluir como resultados propios aquellos obtenidos en colaboración con otra investigadora de nuestro grupo, y la segunda se basa en el hecho de que, aún sabiendo que se trata de resultados en fase de confirmación y ampliación a otras especies, cascadas y tratamientos estresantes, sin duda constituyen una valiosa base para discutir el papel de las MAPKs en macrófitos y la relación causa-efecto en la respuesta y supervivencia celular ante situaciones de estrés.

Este recientísimo y aún en desarrollo trabajo pretende demostrar que el bloqueo de las cascadas de señalización de las MAPKs conlleva al “empeoramiento” del estado fisiológico de los macrófitos, tras la aplicación de un estrés de carácter disruptivo. Para demostrarlo se ha recurrido al uso de un inhibidor altamente específico de la ruta de señalización de la JNK, el SP600125.

El inhibidor de la JNK (SP600125) actúa como un inhibidor competitivo del ATP de forma reversible en la producción de los genes JNK1, JNK2, JNK3 (Bennett et al. 2001). Se trata de un potente inhibidor, fotosensible, permeable a las células, selectivo y reversible; su *concentración inhibitoria media máxima* (IC_{50}) es de 40 nM para JNK-1 y JKN-2 y de 90 nM para JNK-3 y su lugar de actuación es citoplasmático a nivel de JNK 1/2/3 (Ennis et al. 2005), que actúa sobre la vía JNK a nivel citoplasmático (Figura 7).

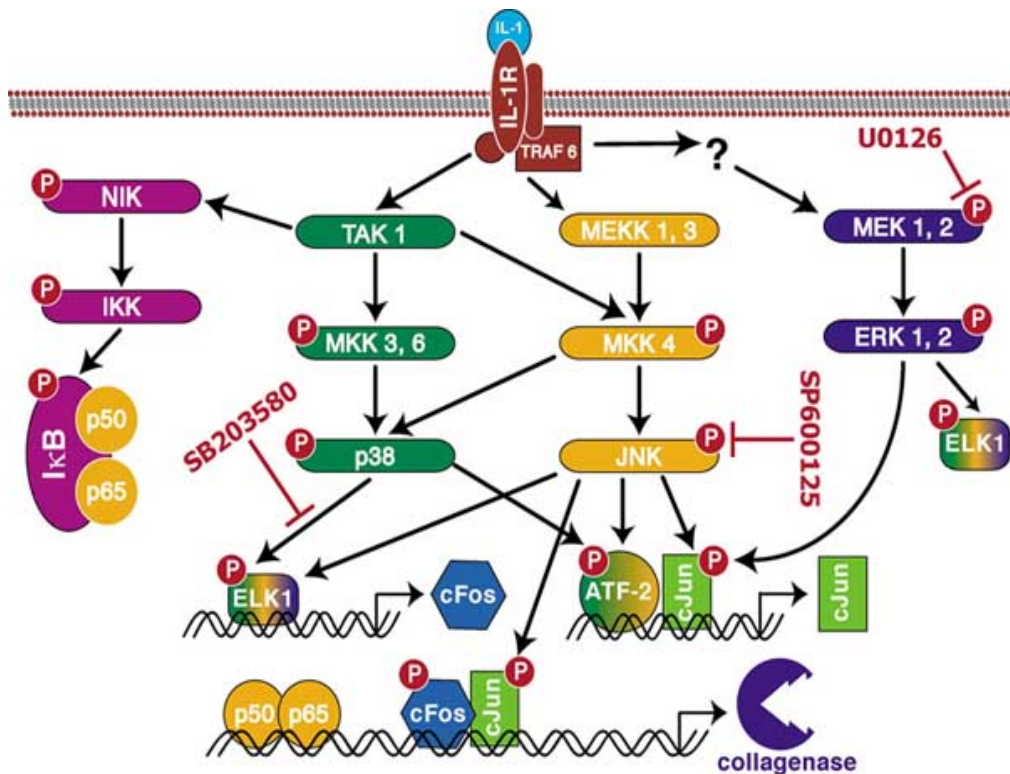


Figura 7. Principales vías de señalización para IL-1 beta en condrocitos y células sinoviales. U0126 y SP600125 son inhibidores químicos que impiden la fosforilación de MEK1/2 y JNK, respectivamente. SB203580 es un inhibidor químico conocido para bloquear la actividad de la quinasa de p38 (Tomado de Burrage et al.2006)

Figure 7. Major signaling pathways for IL-1 beta in chondrocytes and synovial cells. U0126 and SP600125 are chemical inhibitors that prevent the phosphorylation of MEK1/2 and JNK, respectively. SB203580 is a chemical inhibitor known to block the kinase activity of p38 (Taken from Burrage et al. 2006).

Esta es la primera vez en la que los inhibidores de las rutas de señalización de las MAPKs se emplean en macroalgas, ya que hasta la fecha su uso sólo se había destinado al esclarecimiento de las rutas de las MAPKs en células de mamíferos (Saporito et al. 2000, Bozyczko-Coyne et al. 2001, Issbrücker et al. 2003, Saklatvala 2004, Bain et al. 2007, Muniyappa & Das 2008, Neuder et al 2009, Scott et al. 2011, Issbru et al. 2012, Sun et al. 2012) plantas vasculares (Ding et al. 2009, Chen et al. 2012, Furukawa et al. 2012, Kimura et al. 2012, Schmidt et al. 2012) y microalgas (Jiménez et al. 2004, 2007). Se sabe que en el caso de células animales la ruta de señalización de la JNK y la ruta de la p38 participan en la respuesta al estrés físico como shock osmótico, calor, luz ultravioleta y respuesta a citoquinas como TNF- α , IL-1 o factores de crecimiento (Turjaski et al. 2007, Bagley et al. 2010) y la ruta ERK es activada por factores de crecimiento y mitógenos que desempeñan un papel fundamental en procesos de proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Turjaski et al. 2007).

En este trabajo, talos de *Ulva rigida* y *Corallina elongata* recogidos de la zona intermareal de Punta Carnero (Algeciras) se aclimataron en cámaras de cultivo a una temperatura controlada de 15° C, aproximadamente bajo 120 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con aireación continua y en agua de mar filtrada y suplementada con medio Provasoli (1968) durante 3-4 días antes de realizar los experimentos

Los tratamientos que se llevaron a cabo en este estudio fueron:

- Tratamiento 1: *Control* (sin shock de luz PAR o UVR y sin inhibidor).
- Tratamiento 2: *Control + Luz* (con shock de luz PAR o UVR y sin inhibidor).
- Tratamiento 3: *Control + Inhibidor* (sin shock de luz PAR o UVR y con inhibidor).
- Tratamiento 4: *Inhibidor* (con shock de luz PAR o UVR, y con inhibidor).

Previo a los experimentos se comprobó el posible efecto que tendría el DMSO (ya que el inhibidor SP600125 ha de reconstituirse en DMSO; dimetilsulfóxido, CH_3SOCH_3) y

se calculó la concentración óptima del inhibidor. Se emplearon tres réplicas por cada tratamiento, cada réplica formada por talos de 1 g de peso fresco, los cuales se pesaron (retirando previamente el exceso de agua) y se colocaron en matraces de 500 ml de capacidad que contenían 50 ml de agua de mar filtrada y a los que se les añadió (o no, según el tratamiento deseado) 5 μl de inhibidor SP600125.

La incubación en presencia del inhibidor se realizó durante 2 h, en oscuridad y con agitación constante de 90 rpm. El tratamiento 1 permaneció en la cámara de cultivo bajo las condiciones control (15 °C y 120 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$); el tratamiento 2 también se incubó durante 2 h en oscuridad y con agitación constante, pero en ausencia de inhibidor; los tratamientos 3 y 4, se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente pero se les añadió 5 μl de inhibidor procedente de una disolución concentrada de 100 μM en el caso de *Ulva* y de 150 μM en el caso de *Corallina*. Transcurrido el tiempo de incubación con el inhibidor en oscuridad, las muestras correspondientes a los tratamientos 1 y 3 se mantuvieron en la cámara de cultivo y, a las muestras de los tratamientos 2 y 4 se les aplicaron los shocks lumínicos consistentes en: shock de luz blanca en *Ulva* y *Corallina* (1600-1700 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), shock de UVR en *Ulva* (21.3 Wm^{-2} de UV-A y 1.56 Wm^{-2} de UV-B), y shock de UVR en *Corallina* (25.06 Wm^{-2} de UV-A y 2.28 Wm^{-2} de UV-B), asegurándonos, en todos los casos, de que la temperatura se mantenía constante. La duración de las exposiciones se detalla más abajo, ya que variaba según el tratamiento y la especie en cuestión.

En todos los casos, al inicio de los experimentos se midió el rendimiento fotosintético óptimo (F_v/F_m) de los talos. Para ello se usó un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (Mini-PAM, Waltz, Germany) según Schreiber et al. 1994. Con este fluorómetro es posible medir el estado fisiológico del alga *in vivo* y, al tratarse de un método no intrusivo, permite recuperar las muestras intactas una vez finalizada la medición del rendimiento cuántico. La técnica se basa en medir la fluorescencia que se emite en el PSII y evaluar, no sólo el rendimiento cuántico y la capacidad fotosintética,

sino también permite estimar cuánta energía se transfiere a la cadena de transporte electrónica fotosintética y cuánta es disipada en forma de calor (Schreiber et al. 1986). El rendimiento cuántico óptimo del PSII se mide a través de la razón fluorescencia variable–fluorescencia máxima (F_v/F_m), que indica la eficiencia en los procesos de conversión de energía fotoquímica de una planta adaptada a oscuridad.

Para realizar la medida inicial, los talos deben preincubarse durante al menos 5 minutos en oscuridad, para establecer un estado estacionario reproducible en el que se asume que todos los centros de reacción se encuentran oxidados o “abiertos”, y en esta situación el “pool” de plastoquinonas está oxidado y las ATPasas y las enzimas del ciclo de Calvin inactivas (Seaton & Walker 1990). Posteriormente se da un pulso de luz saturante para reducir por completo la quinona A (Q_A), alcanzándose el nivel máximo de fluorescencia, F_m . El equipo nos proporciona un valor de F_v/F_m mediante el que se puede estimar el estado fisiológico que presenta el alga. Así, en la bibliografía se encuentran valores estándares de F_v/F_m iniciales del orden de: 0.8-0.7 en Clorofíceas, 0.65-0.6 en Rodofíceas y de 0.75-0.6 en Heterocontofíceas.

Tras medir el F_v/F_m inicial, los talos se incubaron durante 2 h según los tratamientos determinados (en oscuridad y en presencia o ausencia del inhibidor) e inmediatamente transcurrido ese tiempo de incubación se repitió la medida. Después (y dependiendo del tratamiento) se llevaron a cabo los diferentes shocks (luz blanca o de UVR) y, de nuevo se midió el valor de F_v/F_m una vez finalizados los shocks, tras los cuales las muestras se disponían en las condiciones iniciales de iluminación PAR previas a los shocks. A partir de ese momento se realizaron una serie de medidas a diferentes intervalos de tiempo (cada 60-90 min), con una medida final a las 24 h tras el shock, según el tratamiento.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

A) Shock de Luz Blanca en *Ulva rigida*

En este experimento se utilizaron lámparas tipo “leds”, suministrando a los talos aproximadamente 1600-1700 $\mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 30 minutos. El choque lumínico induce una caída transitoria del rendimiento fotosintético (tratamiento 2, *Control + Luz*). Sin embargo, al aplicar el choque de luz blanca en talos preincubados con el inhibidor, se observó una bajada muy significativa del rendimiento fotosintético con respecto al resto de tratamientos, alcanzándose valores de F_v/F_m cercanos a 0 (Figura 8). El tratamiento 3 (*Control + Inhibidor*) presentó un descenso de F_v/F_m desde valores iniciales de 0.75 hasta valores finales en torno a 0.5 a las 24 h; esto puede ser debido a la necesidad de la existencia de cierto nivel de fosforilación basal de la JNK para el normal funcionamiento metabólico de las algas (como ya demostraron Jiménez et al. 2004 en *D. viridis*, y se ha puesto de manifiesto en capítulos precedentes en esta Memoria).

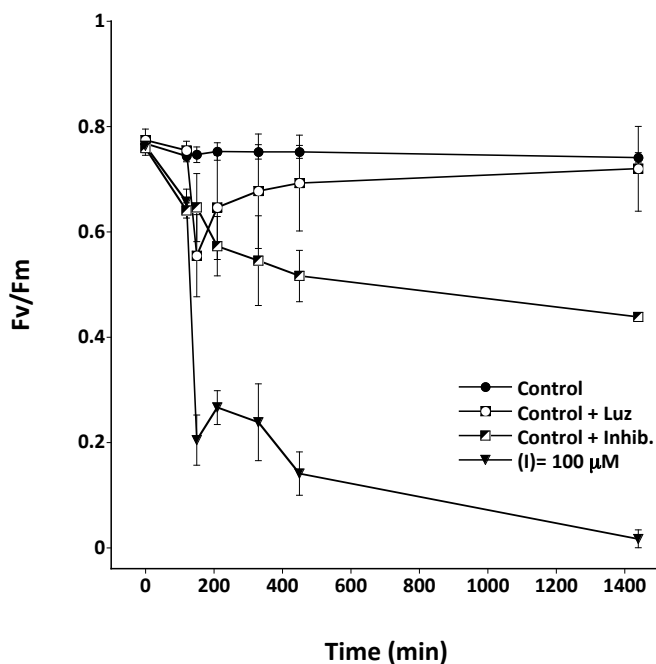


Figura 8. Respuesta del rendimiento cuántico de *Ulva* tras la exposición a luz blanca de alta irradiancia. La presencia del inhibidor específico de la cascada de la JNK lleva a un acusado descenso del valor de F_v/F_m en los talos pocas horas después de la exposición al shock.

Figure 8. Response of the quantum yield of *Ulva* after exposure to white light of high irradiance. The presence of the specific inhibitor of the cascade of the JNK leads to a sharp drop in the value of F_v/F_m in the thalli a few hours after exposure to the shock.

B) Shock de UVR en *Ulva rigida*

En este caso se utilizó un radiómetro de luz ultravioleta (PMA 2100, Solar Light Co.,Inc., US) para medir la UVR y se aplicó 21.30 Wm^{-2} de UV-A y 1.56 Wm^{-2} de UVB. Como se observa en la Figura 9, el efecto de la radiación UV combinado con la presencia del inhibidor mostró un resultado muy evidente, ya que el F_v/F_m cayó a valores prácticamente de 0. A pesar de que *Ulva* se ve afectada por la UVR (Tratamiento 2, *Control + UV*), es capaz de recuperarse en menos de 5 horas, alcanzando valores de F_v/F_m cercanos a 0.6. El efecto del shock en presencia del inhibidor indica que el bloqueo de la señal de estrés por inhibición de la fosforilación de la JNK lleva a la muerte de los talos tras el shock con radiación UV (“[I]= 100 μM ”).

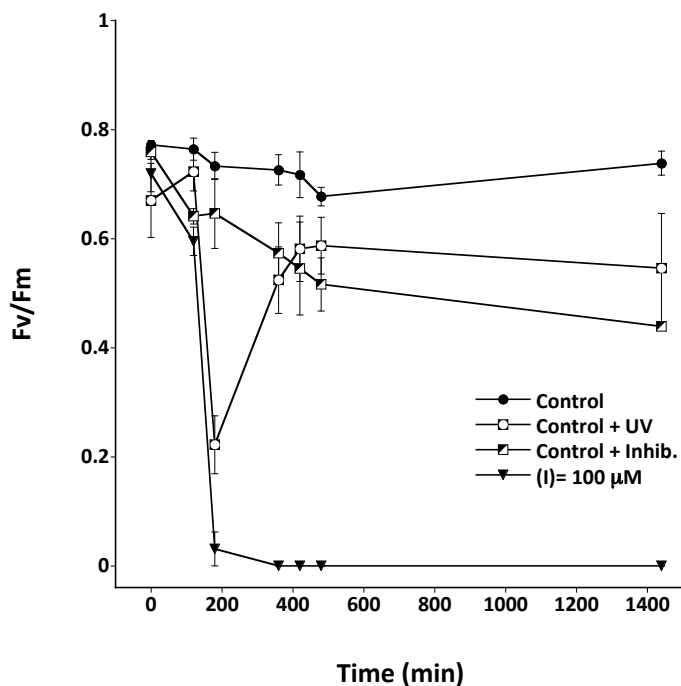


Figura 9. Respuesta del rendimiento cuántico de *Ulva* tras la exposición a UVR. La presencia del inhibidor específico de la cascada de la JNK lleva a la muerte de los talos pocas horas después de la

exposición a una dosis de UVR no letal en condiciones normales de funcionamiento de la cascada de transmisión de señales.

Figure 9. Response of the quantum yield of *Ulva* after exposure to UVR. The presence of the specific inhibitor of the cascade of the JNK leads to death of the thalli a few hours after exposure to a non-lethal dose of UVR in normal conditions of operation of the cascade of signal transduction.

En esta situación y con ese acusado descenso del valor de F_v/F_m *Ulva* presenta un deteriorado estado fisiológico, así como alterada la cascada responsable de la transmisión de señales. Este proceso de fotoinhibición puede considerarse como un proceso fisiológico regulatorio en el que, ante una radiación excesiva, el transporte de electrones se reduce con el fin de proteger el aparato fotosintético (Häder et al 1999). Ante una situación de alta irradiancia se reduce la actividad fotosintética de las algas que experimentan una disminución del rendimiento cuántico efectivo y de la producción fotosintética de O_2 (Figuroa et al. 1997). Cuando los organismos acuáticos se encuentran sometidos a radiación estresante, la señal más concluyente de fotoinhibición y de pérdida de capacidad fotosintética viene determinada por la disminución del rendimiento cuántico óptimo (García-Gómez et al. 2012). Por lo tanto, resulta normal que tras un choque de alta irradiancia (ya sea PAR o UVR), el valor de F_v/F_m experimente una caída. Las algas, transcurridas pocas horas desde el choque lumínico, experimentan una recuperación, cuyo tiempo dependerá de la especie y de la exposición natural a la radiación solar que presenten en sus hábitats naturales.

C) Shock de Luz Blanca en *Corallina elongata*

Al tratarse *Corallina elongata* de un alga roja calcárea y debido a la presencia de una cubierta externa calcárea que limita y dificulta la penetración del inhibidor así como la penetración de la radiación de cualquier tipo, para estos experimentos se aumentó tanto la concentración de inhibidor como la dosis de radiación. Se aplicó 1600-1700 $\mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 90 minutos y en los tratamientos 3 y 4 la concentración de inhibidor utilizada fue de 150 μM .

Tras aplicar el shock de luz blanca, y como muestra la Figura 10, se observó un descenso de los valores del F_v/F_m , hasta valores próximos a 0.25, tanto en el tratamiento 2 (*Control + Luz*), como en el tratamiento 4 (*Inhibidor*). Sin embargo, el tratamiento 4, al estar preincubado 2 horas con el inhibidor, presenta una mínima recuperación respecto al tratamiento 2, manteniéndose el valor de F_v/F_m por debajo de 0.4, mientras que en ausencia de inhibidor F_v/F_m llega a valores por encima de 0.55 (Figura 9).

Los problemas de penetración del inhibidor encontrados en las células de *Corallina* parecen confirmarse debido al menor efecto que presenta el inhibidor *per se*, en ausencia de shock lumínico, como se observa en la Figura 10; este efecto del inhibidor en ausencia de choque lumínico no es tan significativo como en el caso de *Ulva*, lo que nos induce a pensar en una limitada penetración del mismo debido a la presencia de la envuelta calcárea en *Corallina*. Sin embargo, los resultados son lo suficientemente claros como para poder determinar el papel crucial de la cascada de la JNK en la supervivencia de *Corallina* en esta situación concreta de estrés ambiental.

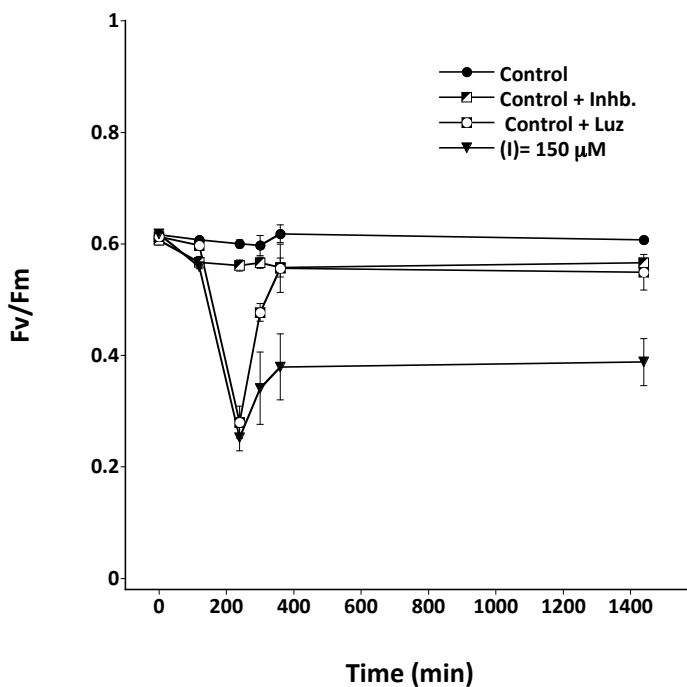


Figura 10. Respuesta del rendimiento cuántico de *Corallina* tras la exposición a alta irradiancia de luz blanca. La presencia del inhibidor específico de la cascada de la JNK lleva a un descenso del valor de F_v/F_m en los talos pocas horas después de la exposición al shock.

Figure 10. Response of the quantum yield of *Corallina* after exposure to white Light of high irradiance. The presence of the specific inhibitor of the cascade of the JNK leads to a sharp drop in the value of F_v/F_m in the thalli few hours after exposure to the shock.

D) Shock de UVR en *Corallina elongata*

En este caso, se aumentó la intensidad de UVR (25.06 Wm^{-2} de UVA y 2.28 Wm^{-2} de UVB), también durante 90 minutos. La concentración de inhibidor empleada fue de $150 \mu\text{M}$. En *C. elongata* (Figura 11) el inhibidor de la fosforilación de la JNK reduce la viabilidad de los talos tras un shock no letal. En el tratamiento "Control" el rendimiento fotosintético de los talos no sufre ningún efecto. En "Control + Inhib" el inhibidor, en ausencia de shock ambiental, induce una débil y transitoria caída del rendimiento cuántico óptimo. En ausencia del inhibidor el valor de F_v/F_m en talos expuestos a UVR ("Control + UVR") fue de alrededor de 0.5 a las 24 h, por tanto la radiación UV induce también una caída transitoria de la fotosíntesis. Sin embargo, tras la exposición a UVR en presencia del inhibidor de la JNK (" $[I] = 150 \mu\text{M}$ "), no hay apenas fluorescencia, siendo el valor de F_v/F_m a las 24 h tan solo de 0.2, indicando la escasa capacidad de las algas para sobrevivir frente a un shock que en ausencia del inhibidor no era letal.

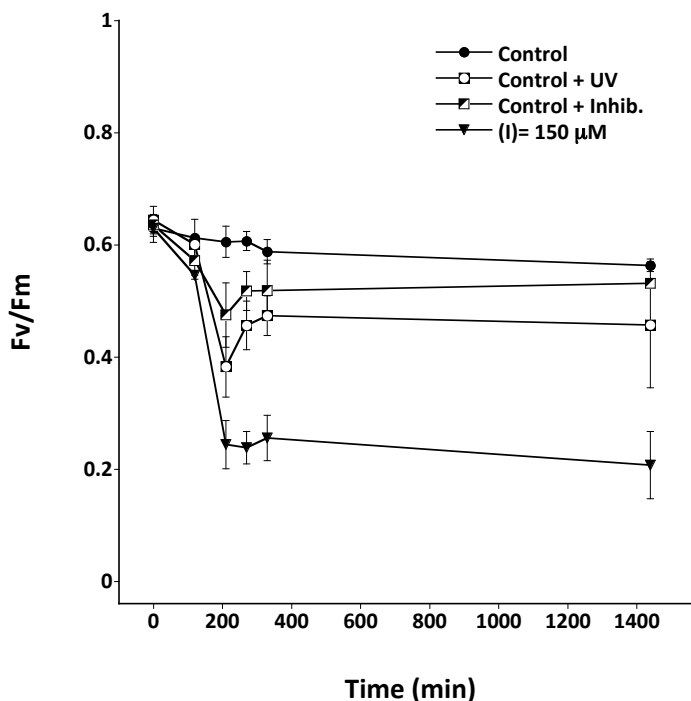


Figura 11.- Evolución del rendimiento cuántico de *Corallina* tras exposición a niveles no letales de radiación UV, estando la cascada de señales de la JNK activa (Control + UV) o inhibida ([I]= 150 μM). Como se observa, el bloqueo específico de la fosforilación de la JNK lleva a una drástica disminución del rendimiento fotosintético de los talos pocas horas después de la exposición a UVR.

Figure 11.-Evolution of the quantum yield of *Corallina* after exposure to non-lethal levels of UV radiation, while the cascade of signals of JNK was either active (UV Control) or inhibited ([I]= 150μM). As shown, the specific blockade of the JNK phosphorylation leads to a drastic decrease in the photosynthetic yield of the thalli few hours after the exposure to UVR.

Como se puede observar, según los resultados obtenidos, en el caso de *Corallina* no se apreciaron cambios tan drásticos como en el caso de *Ulva* debido, entre otras, a las diferencias estructurales que existen entre ambos macrófitos, pero aun así, los resultados son muy significativos teniendo en cuenta las diferencias entre los distintos tratamientos dentro de un mismo experimento. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de

manifiesto la crucial participación de la cascada de señalización de la JNK en la adaptación al estrés lumínico en macroalgas.

Podemos afirmar que la combinación de cambios de temperatura, pH, UV y niveles de CO₂ produce efectos sinérgicos que, sin duda, generan estrés celular (Wiencke et al. 2000, Fredersdorf et al. 2009). Este estrés, que como se ha comentado con anterioridad a lo largo de esta Memoria se traduce en un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y que funciona como señal interna para la puesta en marcha de diferentes sistemas de aclimatación y respuesta (Jammes et al. 2009, Takahashi et al. 2011), puede ser determinante en la supervivencia y estructura de las comunidades. Pero, a pesar de estos esperanzadores resultados, son muchos aún los interrogantes que quedan a la espera de respuesta en esta temática, y a pesar de la cantidad de información obtenida en estos últimos años, siguen quedando pendiente diversas cuestiones.

Por ejemplo, en el Capítulo II de esta Memoria se ha demostrado cómo en situación de marea baja se activan las MAPKs, pero aún no se sabe qué variable (o conjunto de ellas) controla principalmente esta respuesta, se desconoce si es el aumento de PAR, de UVR, la desecación, la presión osmótica o la temperatura, o los efectos acumulados o sinérgicos de la combinación de dos o más de ellos. A pesar de que los resultados preliminares indiquen que el control lo ejerce principalmente la alta radiación PAR y UV, con una cierta influencia de la desecación, esto no se puede asegurar ya que no ha sido posible trabajar, por motivos de seguridad, en marea baja en oscuridad. Por ello son muchos los interrogantes que se suscitan, tales como: ¿Se activarán igual las MAPKs en marea baja *de noche*? Dado que la situación de estrés propuesta para la emersión propicia que los macrófitos queden expuestos y lleven a cabo la fotosíntesis en un medio más frío o más cálido (dependiendo de la época del año), con déficit de nutrientes y con mayor radiación fotosintéticamente activa y radiación UV, y a pesar de que los resultados previos así parecen indicarlo, ¿qué papel ejerce la desecación durante la emersión?, y

sobre todo, ¿cuántas macroalgas con mecanismos de transmisión de las señales de estrés que les permiten aclimatarse a las nuevas condiciones?.

Con todos estos antecedentes no resultaría descabellado plantear nuevos proyectos futuros de trabajo destinados a conseguir un nivel más amplio sobre el conocimiento de la presencia de las MAPKs en las especies de macroalgas más representativas del sistema intermareal del Sur de España en general, así como en especies de macrófitos procedentes de otras latitudes como las algas polares, y su participación en la respuesta al estrés, considerando el incremento de la concentración de CO₂, la acidificación oceánica, el incremento de temperatura y de la radiación como principales variables de estrés. Igualmente sería muy interesante elucidar en qué medida, la respuesta desarrollada depende de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que sabemos inducen la activación de las MAPKs.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CONCLUSIONS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



1. The development and set up of a novel and efficient method for protein extraction from macroalgae that keep intact the phosphorylation state of phosphoproteins MAPKs-like have been carried out. This method is a powerful tool in the Molecular Ecology and macroalgae Proteomic study.
2. The presence and the activation of MAPKs-like proteins such as p38 and JNK, have been detected for the first time in different types of macrophytes.
3. MAPKs-like proteins are involved in the environmental stress response in intertidal macrophytes of the coasts of Southern Spain. The presence of a phosphorylation/dephosphorylation cycle of these p38-like and JNK-like MAPKs of 40 and 42 KDa respectively, in response to two environmental factors, both the emersion and radiation (PAR and UV), has been shown.
4. The phosphorylation response obtained on the natural environment in both MAPKs (p38-like of 40 kDa and JNK-like of 42 kDa) is different and it varies according to the group of macrophytes. The rhodophytes (*Jania rubens* and *Corallina elongata*) showed the fastest response at the onset of the emersion, followed by the chlorophytes (*Chaetomorpha area* y *Ulva rigida*) and finally the heterokontophytes (*Dilophus spiralis* y *Dictyota dichotoma*). The phosphorylation of the p38-like MAPK precedes in time the phosphorylation of the MAPK JNK-like protein.
5. The presence and activation of two MAPK-like proteins (p38-like and JNK-like) in two species of Arctic kelps in response to environmental stress (increase of temperature and UV radiation) has been shown for the first time. The p38-like MAPK in *Laminaria solidungula* has a molecular mass of 40 KDa and of 42 KDa in *Saccharina latissima*, while two JNK-like MAPKs were detected in both species, showing 42 and 36 KDa of molecular mass in *Laminaria solidungula*, and 40 and 36 KDa in *Saccharina latissima*.

6. Phosphorylation of both MAPKs-like proteins (p38 and JNK) increases in response to environmental stress. There is a differential response between these Arctic kelp species. *S. latissima*, which grows in the middle sublittoral zone, shows higher phosphorylation at low temperature, where both MAPKs (p38-like and JNK-like) showed higher phosphorylation at low temperature, while *L. solidungula*, that inhabits the lower sublittoral zone, presents a higher phosphorylation at the highest temperature.

7. Exposure to PAR+UVA+UVB induced higher phosphorylation than PAR+UVA in *L. solidungula*, especially at 7° C. In *S. latissima* this response occurred only with the JNK, while no differences in phosphorylation appeared in the case of the p38-like MAPK between PAR+UVA and PAR+UVA+UVB at any temperature.

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



1. Se ha desarrollado y puesto a punto un método novedoso y eficiente para la extracción de fosfoproteínas de macroalgas que preserva intacto el estado de fosforilación de fosfoproteínas tipo MAPK. Este método constituye una valiosa herramienta en el estudio de la Ecología Molecular y la Proteómica de macroalgas.
2. Se ha detectado por primera vez la presencia y la activación de proteínas tipo MAPK tales como, p38 y JNK, en diferentes tipos de macrófitos.
3. Las proteínas tipo MAPK se encuentran involucradas en la respuesta al estrés ambiental en macrófitos intermareales de las costas del Sur de España. Se ha puesto de manifiesto la existencia de un ciclo de fosforilación/defosforilación de estas MAPKs tipo p38 y tipo JNK, de 40 y 42 kDa respectivamente, en respuesta a dos factores ambientales: la emersión y la radiación (PAR y UV).
4. La respuesta de fosforilación obtenida en el medio natural en ambas MAPKs (tipo p38 de 40 kDa y tipo JNK de 42 kDa) es diferente, y varía según el grupo de macrófitos. Las rodofíceas (*Jania rubens* y *Corallina elongata*) son las que presentan una respuesta más rápida, seguidas de las clorofíceas (*Chaetomorpha area* y *Ulva rigida*) y por último de las heterocontofíceas (*Dilophus spiralis* y *Dictyota dichotoma*), desde el inicio de la emersión. La fosforilación de la MAPK tipo p38 precede en el tiempo a la fosforilación de la MAPK tipo JNK.
5. Se ha demostrado por primera vez la presencia y la activación de dos MAPKs (tipo p38 y tipo JNK), en dos especies de Laminariales del Ártico en respuesta a estrés ambiental (aumento de la temperatura y radiación UV). La MAPK tipo p38 en *Laminaria solidungula* tiene un peso molecular de 40 KDa y de 42 KDa en *Saccharina latissima*, mientras que dos MAPKs tipo JNK se han detectado en ambas especies mostrando 42 y 36 KDa de peso molecular en *Laminaria solidungula*, y 40 y 36 KDa en *Saccharina latissima*.

6. La fosforilación de ambas MAPKs aumenta en respuesta al estrés ambiental. Existe una respuesta diferencial entre las especies de Laminariales árticas. *S. latissima*, que crece en la zona media sublitoral, muestra una mayor fosforilación a baja temperatura, mientras que en *L. Solidungula*, que crece a mayor profundidad, la fosforilación es mayor a la más alta de las temperaturas ensayadas.

7. La exposición bajo PAR+UVA+UVB induce una mayor fosforilación que bajo PAR+UVA en *L. solidungula*, especialmente a 7° C. En *S. latissima* esta respuesta ocurre únicamente en la MAPK tipo JNK, mientras que no se encuentran diferencias en el caso de la fosforilación de la MAPK tipo p38 entre PAR+UVA y PAR+UVA+UVB a ninguna temperatura.

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I (2001a) Stimulation of multiple MAPK pathways by mechanical overload in the perfused amphibian heart. *Am J Physiol* 281: 1689-1698

Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I (2001b) Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart. *Mol Cell Biochem* 221: 63-69

Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I (2002) Hyperosmotic and thermal stresses activate p38-MAPK in the perfused amphibian heart. *J Exp Biol* 205: 443-454

Aguilera J, Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (2002) Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord: II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Mar Biol* 140: 1087-1095

Aguilera J, Hanelt D, Wiencke C (2004) UV effects on growth of macroalgae from Kongsfjorden (Svalbard). *Ber Pol Meeres* 492: 209-214

Aguilera J, Wiencke C, Dummermuth AL (2004) Biochemical properties of antioxidative enzymes and the effect of radiation conditions in marine macroalgae from Kongsfjorden and other regions. *Ber Pol Meeres* 492: 195-208

Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266: 4220-4227

Ahn NG, Campbell JS, Seger R, Jensen AL, Graves LM, Krebs EG (1993) Metabolic labeling of mitogen-activated protein kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues. *Proc Nat Acad Sci USA*. 90: 5143-5147

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol* 55: 373-399

Arrigo KR, van Dijken GL, Pabi S (2008) The impact of a shrinking Arctic ice cover on marine primary production. *Geophys Res Lett* 35: L19603

Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH (2000) Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat Toxicol* 50: 1-12

Auerbach SI (1981) Ecosystem response to stress: a review of concepts and approaches. In: Barrett GW, Rosenberg R (eds), *Stress effects on natural ecosystems*. John Wiley and Sons Ltd, pp. 29-41

Baardseth E (1958) A method of estimating the physode content in brown algae. *Rep Norw Inst Seaweed Res* 20: 1-16

Bagley MC, Davis T, Rokicki MJ, Widdowson CS, Kipling D (2010) Synthesis of the highly selective p38 MAPK inhibitor UR-13756 for possible therapeutic use in Werner syndrome. *Future Med Chem* 2: 193-201

Bain J, Plater L, Elliott M, Shapiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408: 297-315

Barrett GW, Van Dyne GM, Odum EP (1976) Stress ecology. *BioScience* 26: 192-194

Bartsch I, Wiencke C, Bischof K, Buchholz CM, Buck BH, Eggert A, Feuerpfel P, Hanelt D, Jacobsen S, Karez R, Karsten U, Molis M, Roleda MY, Schubert H, Schumann R, Valentin K, Weinberger F, Wiese J (2008) The genus *Laminaria* sensu lato: recent insights and developments. *Eur J Phycol* 43: 1-86

Bates NR, Mathis JT (2009) The Arctic Ocean marine carbon cycle: Evaluation of air-sea carbon dioxide exchanges, ocean acidification impacts and potential feedbacks. *Biogeoscience* 6: 2433-2459

Beach KS, Borgeas HB, Smith CM (2006) Ecophysiological implications of the measurement of transmittance and reflectance of tropical macroalgae. *Phycologia* 45: 3450-3457

Ben-Amotz A (2009) Bioactive compounds: glycerol production, carotenoid production, fatty acids production. In: Ben-Amotz A, Polle JEW, Subba Rao DV (eds), *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, USA, pp. 189-208

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Signal Res Div* 98: 13681-13686

Bidwell RGS, McLachlan J, Lloyd NDH (1985) Tank cultivation of Irish moss *Chondrus crispus* Stackh. *Bot Mar* 28: 87-97

Bischof K, Janknegt PJ, Buma AGJ, Rijstenbil JW, Peralta G, Breeman AM (2002) Oxidative stress and enzymatic scavenging of superoxide radicals induced by solar UV-B radiation in *Ulva* canopies from southern Spain. *Sci Mar* 67: 353-359

Bischof K, Hanelt D (2004) Impacts of solar ultraviolet-B radiation on marine macroalgae from Kongsfjorden: Inhibition and acclimation of photosynthetic activity. *Ber Pol Meeres* 492: 156-166

Bischof K, Gómez I, Molis M, Hanelt D, Karsten U, Lüder U, Roleda MY, Zacher K, Wiencke C. (2006) Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev Environ Sci Biotech* 5: 141-166

Blum A (1996) Crop responses of drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulat* 20: 135-148

Bolton JJ, Lüning K (1982) Optimal growth and maximal survival temperatures of Atlantic *Laminaria* species (Phaeophyta) in culture. *Mar Biol* 66: 89-94

Boudouresque CF (1971) Méthodes d'étude qualitative du benthos (en particulier du phytobenthos). *Téthys* 3: 79-104

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249: 64-67

Borum J, Pedersén MF, Krause-Jensen DD, Christensen PB, Nielsen K (2002) Biomass, photosynthesis and growth of *Laminaria saccharina* in a high-arctic fjord, NE Greenland. *Mar Biol* 141: 11-19

Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with A β -induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem* 77: 849-863

Brautigam DL, Randazzo P, Shriner C, Fain JN (1985) Phosphorylation of chloroform soluble compounds in plasma membranes of human epidermoid carcinoma A431 cells. *Lipids* 20: 492-495

Brown AD, Simpson JR. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72: 589-591

Breitburg DL, Baxter JW, Hatfield C, Howarth RW, Jones CG, Lovett GM, Wigand C (1998) Understanding effects of multiple stressors: ideas and challenges. In: Pace M, Groffman P (eds), *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science*. Springer-Verlag, pp. 416-431

Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE (2006) Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 11: 529-543

Capasso JM, Hoving S, Tal DM, Goldshleger R, Karlsh SJD (1992) Extensive digestion of Na, K-ATPase by specific and non-specific proteases with preservation of cation occlusion sites. *J Biol Chem* 267: 1150-1158

Capasso JM, Rivard CJ, Berl T. (2001a) Long-term adaptation of renal cells to hypertonicity: the role of MAP Kinases and Na,K-ATPase. *Am J Physiol, Renal Physiol* 280: 768-776

Cardinale F, Jonak C, Ligtering W, Niehaus K, Boller T, Hirt H (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* 275: 36734-36740

Chen S, Gardner DG (2002) Osmoregulation of natriuretic peptide receptor signaling in inner medullary collecting duct. A requirement for p38 MAPK. *J Biol Chem* 277: 6037-6043

Chen W, Liu L, Luo Y, Odaka Y, Awate S, Zhou H, Shen T, Zheng S, Lu Y, Huang S (2012) Cryptotanshinone activates p38/JNK and inhibits Erk1/2 leading to caspase-independent cell death in tumor cells. *Cancer Prev Res* 5: 778-787

Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1380-1384

Clayton MN, Wiencke C (2004) UV effects on reproduction of brown algae from Kongsfjorden (Svalbard). *Ber Pol Meeres* 492: 215-221

Contreras L, Ritter A, Dennett G, Boehmwald F, Guitton N, Pineau C, Moenne A, Potin P, Correa JA (2008) Two dimensional gel electrophoresis analysis of brown algal protein extracts. *J Phycol* 44: 131-1321

Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31: 263-273

Cornic C, Massacci A (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. In: Baker NR (ed) *Photosynthesis and environment*. Kluwer Academic Publishers, pp. 347-366

Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J. (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cyclin in *S. cerevisiae*. *Cell* 58: 1107-1119

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1989) Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 520-523

Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, Mou Z, Li J (2006) Increased expression of MAP Kinase Kinase 7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 308-320

- Davis R J** (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252
- Davison IR**, Pearson GA (1996) Stress tolerance in Intertidal Seaweeds. *J Phycol* 32: 197-211
- Davison IR**, Dudgeon SR, Hang-Ming R (1989) Effect of freezing on seaweed photosynthesis. *Mar Ecol Prog Ser* 58: 123-131
- Davison IR** (2007) Adaptation of photosynthesis in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) to changes in growth temperature. *J Phycol* 23: 273-283
- De la Coba F**, Aguilera J, Figueroa FL, de Gálvez MV, Herrera E (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J Appl Phycol* 21: 161-169
- Denhardt DT** (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318: 729-747
- Desikan R**, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* 26: 1579-1587
- Ding H**, Tan M, Zhang C, Zhang Z, Zhang A, Kang Y (2009) Hexavalent chromium (VI) stress induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by distinct signal molecules in roots of *Zea mays* L. *Environ Exp Bot* 67: 328-334
- Dóczi R**, Brader G, Pettko-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H (2007) The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* 19: 3266–3279
- Dóczi R**, László Ö, Romero AE, Paccanaro A, Bögre L (2012) Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci* DOI: 10.1016/j.tplants.2012.05.009
- Dougherty CJ**, Kubasiak LA, Prentice H, Andreka P, Bishopric NH, Webster KA (2002) Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem J* 362: 561-571
- Dring MJ**, Brown FA (1982) Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation. *Mar Ecol Prog Ser* 8: 301-308

Dromgoule FI (1980) Desiccation resistance of intertidal and subtidal algae. *Bot Mar* 23: 149-159

Elion EA, Grisafi PL, Fink GR (1990) *FUS3* encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60: 649-664

Ennis BW, Fultz KE, Smith KA, Westwick JK, Zhu D, Boluro-Ajayi M, Bilter GK, Stein B (2005) Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and tumor cell proliferation by a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 325-332

Evans LV, Holligan MS (1972a) Correlated light and electron microscope studies on brown algae. I. Localization of alginic acid and sulphated polysaccharides in *Dictyota*. *New Phytol* 71: 1161-1172

Evans LV, Holligan MS (1972b) Correlated light and electron microscope studies on brown algae. II. Physode production in *Dictyota*. *New Phytol* 71: 1173-1180

Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* 7: 67-74

Ferrell JE (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci* 21: 460-466

Fernández C, Niell FX (1981) Distribución espacial del fitobentos en los horizontes inferiores del sistema intermareal rocoso de Cabo Peñas (Asturias). *Inv Pesq* 45: 309-326

Fernández C, Niell FX (1982) Zonación del fitobentos intermareal de Cabo Peñas (Asturias). *Inv Pesq* 46: 21-141

Fernández JA (1982) Estudios estructurales del sistema intermareal de Punta Carnero (Algeciras). Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga

Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Jiménez C, Mercado J, Viñegla B, Flores-Moya A, Altamirano M (1997) Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar Ecol Prog Ser* 151: 81-90

Figueroa FL, Bueno A, Korbee N, Santos R, Mata L, Schuenhoff A (2008) Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream *Asparus aurata*. *J World Aquacult Soc* 39: 692-699

Fortes MD, Luning K (1980) Growth rates of North Sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgoland Meeres* 34: 15-29

França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) Oxidative stress and its effects during

dehydration. *Comp Biochem Physiol Part A* 146: 621-631

Fredersdorf J, Müller R, Becker S, Wiencke C, Bischof K (2009) Interactive effects of radiation, temperature and salinity on different life history stages of the Arctic kelp *Alaria esculenta* (Phaeophyceae). *Oecologia* 160: 483-492

Frodin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151: 65-77

Frost TM, Montz PK, Kratz TK, Badillo T, Brezonik PL, Gonzalez MJ, Rada RG, Watras CJ, Webster KE, Wiener JG, Williamson CE, Morris DP (1999) Multiple stresses from a single agent: Diverse responses to the experimental acidification of Little Rock Lake, Wisconsin. *Limnol Oceanogr* 44: 784-794

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling net-works. *Curr Opin Plant Biol* 9: 436-442

Furukawa Y, Okuyama S, Amakura Y, Watanabe S, Fukata T, Nakajima M, Yoshimura M, Yoshida T (2012) Isolation and characterization of activators of ERK/MAPK from *Citrus* plants. *Int J Mol Sci* 13: 1832-1845

García-Gómez C, Parages ML, Jiménez C, Palma A, Mata MT, Segovia M (2012) Cell survival after UV stress in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* is mediated by DNA repair and MAPKs phosphorylation. *J Exp Bot* DOI 10.1093/jxb/ers185

Gartner A, Nasmyth K, Ammerer G (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev* 6: 1280-1292

Goldsmith EJ, Cobb MH (1994) Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* 4: 833-840

Gómez N, Cohen P (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 353: 170-173

Gómez I, Wulff A, Roleda MY, Huovinen P, Karsten U, Quartino ML, Dunton K, Wiencke C (2011) Light and temperature demands of marine benthic microalgae and seaweeds in polar regions. In: Wiencke C (ed) *Biology of polar benthic algae*. De Gruyter, pp. 195-220

Gordillo FJL, Aguilera J, Jiménez C (2006) The response of nutrient assimilation and biochemical composition of Arctic seaweeds to a nutrient input in summer. *J Exp Bot* 57: 2661-2671

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23: 441-450

Grime JP (1989) The stress debate-symptom of impending synthesis. *Biol J Linn Soc* 37: 3-17

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1264-1300

Häder DP, Lebert M, Jiménez C, Salles S, Aguilera J, Flores-Moya A, Mercado J, Viñegla B, Figueroa FL (1999) Pulse amplitude modulated fluorescence in the green macrophytes, *Codium adherens*, *Enteromorpha muscoides*, *Ulva gigantea* and *Ulva rigida*, from the Atlantic coast of Southern Spain. *Environ Exp Bot* 41: 247-255

Häder DP, Lebert M, Sinha RP, Barbieri ES, Helbling EW (2002) Role of protective and repair mechanisms in the inhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Photochem Photobiol Sci* 1: 809-814

Hadlung K, Björk M, Ramazanov Z, García-Reina G, Pedersén M (1992) Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 187: 275-281

Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehltng J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trend Plant Sci* 11: 192-198

Hamel LP, Benchabane M, Nicole MC, Major IT, Morency MJ, Pelletier G, Beaudoin N, Sheen J, Séguin A (2011) Stress-responsive mitogen-activated protein kinases interact with the EAR motif of a poplar zinc finger protein and mediate its degradation through the 26S proteasome. *Plant Physiol* 157: 1379-1393

Hand SC, Menze MA (2007) Desiccation stress. In: Denny MW, Gaines SD (ed), *Encyclopaedia of tide pools and rocky shores*. University of California Press, Berkeley, pp. 173-177

Hanelt D, Melchersmann B, Wiencke C, Nultsch W (1997) Effects of high light stress on photosynthesis of polar macroalgae in relation to depth distribution. *Mar Ecol Prog Ser* 149: 255-266

Hanelt D, Tüg GH, Bischof K, Groß C, Lippert H, Sawall T, Wiencke C (2001) Light regime in an Arctic fjord: a study related to stratospheric ozone depletion as a basis for determination of UV effects on algal growth. *Mar Biol* 138: 649-658

- Hanelt D**, Bischof K, Wiencke C (2004) The radiation, temperature and salinity regime in Kongsfjorden. *Ber Pol Meeres* 492: 14-25
- Hasegawa PM**, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Mol Plant Physiol* 51: 463-499
- Heimovaara-Dijkstra S**, Testerink C, Wang M (2000) Mitogen-activated protein kinase and abscisic acid signal transduction. *Result Probl Cell Differ* 27: 131-144
- Henry BE**, Van Alstyne KL (2004) Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J Phycol* 40: 527-533
- Hirt H** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 2: 11-15
- Hirt H** (2000) Connecting oxidative stress, auxin and cell cycle regulation through a plant MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2405-2407
- Hoeflich KP**, Woodgett JR (2001) Signal transduction and gene expression in the regulation of natural freezing survival. In Storey KB, Storey JM (ed.) *Cell and Molecular Responses to Stress*, Vol. 2. Elsevier Press, Amsterdam. pp. 175-193
- Hop H**, Wiencke C, Vögele B, Kovaltchouk NA (2012) Species composition, zonation and biomass of marine benthic macroalgae in Kongsfjorden, Svalbard. *Bot Mar* (in press)
- Huang CY**, Ferrell JE (1996) Dependence of Mos-induced Cdc2 activation on MAP kinase function in a cell-free system. *EMBO J* 15: 2169-73
- Hunger FWT** (1902) Über das Assimilationsproduct der Dictyotaceen. *Jahrb wiss Bot* 38: 138-139
- Irving EA**, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 631-647
- Issbrücker K**, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttorp N, Clauss M (2003) p38 MAP kinase-a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J* 17: 262-264
- Jammes F**, Song C, Shin D, Munemasa S, Takeda K, Gu D, Cho D, Lee S, Giordo R, Sritubtim S, Leonhardt N, Ellis BE, Murata Y, Kwak JM (2009) MAP kinases *MPK9* and *MPK12* are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20520-20525
- Jiang Y**, Li Z, Schwarz EM, Lin A, Guan K, Ulevitch RJ, Han J (1997) Structure- function

studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection. *J Biol Chem* 272: 11096-11102

Jiang H, Gao K, Helbling EW (2007) Effects of solar UV radiation on germination of conchospores and morphogenesis of sporelings in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). *Mar Biol* 151: 1751-1759

Jiménez C, Niell FX. (1991) Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: influence of salinity, temperature and nitrogen concentration. *J Appl Phycol* 3: 319-327

Jiménez C, Berl T, Rivard CJ, Edelstein CL, Capasso JM (2004) Phosphorylation of MAP kinase-like proteins mediate the response of the halotolerant alga *Dunaliella viridis* to hypertonic shock. *Bioch Biophys Acta* 1644: 61-69

Jiménez C, Cossío BR, Rivard CJ, Berl T, Edelstein CL, Capasso JM (2007) Cell division in the unicellular microalga *Dunaliella viridis* depends on phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs). *J Exp Bot* 58: 1001-1011

Jiménez C, Capasso JM, Edelstein CL, Rivard CJ, Lucia S, Breusegem S, Berl T, Segovia M (2009) Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase. *J Exp Bot* 60: 815-828

Jonak C, Kiegerl S, Lloyd C, Chan J, Hirt H (1995) MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol Gen Genet* 248: 686-694

Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker P J, Huskisson N S, Hirt H (1996) Stress signalling in plants: a MAP kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 11274-11279

Jonak C, Ligterink W, Hirt H (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55: 203-213

Jonak C, Okresz L, Bögre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 415-424

Jonak C, Nakahami H, Hirt H (2004) Heavy metal stress activation of distinct mitogen activated protein kinase pathway by copper and cadmium. *Plant Physiol* 136: 3276-3283

Kaiser CA, Preuss D, Grisafi P, Botstein D (1987) Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science* 235: 312-317

Karsten U, Wiencke C (1999) Factors controlling the formation of UV-absorbing

mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J Plant Physiol* 155: 407-415

Karsten U (2007) Salinity tolerance of Arctic kelps from Spitsbergen. *Phycol Res* 55: 257-262

Kaur N, Gupta AK (2005) Signal transduction pathways under abiotic stress in plants. *Curr Sci* 88: 1771-1780

Kiegerl S, Cardinale F, Siligan C, Gross A, Baudouin E, Liwosz A, Eklof S, Till S, Bogre L, Hirt H, Meskiene I (2000) SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* 12: 2247-2258

Kimura K, Sakamoto Y, Fujisawa N, Uesugi S, Aburai N, Kawada M, Ohba S, Yamori T, Tsuchiya E, Koshino H (2012) Cleavage mechanism and anti-tumor activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants. *Bioorg Med Chem* 20: 3887-3897

Komis G, Apostolakos P, Gaitannaki C, Galatis B (2004) Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Lett* 573: 168-174

Krauss G (2008) *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Wiley-Vch Verlag GMBH and Co. KGaA. Weinheim.

Kültz D (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46: 571-588.

Kültz D, Avila K (2001) Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp Biochem Physiol* 129: 821-829

Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-421

Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869

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

Langdon C, Broecker WS, Hammond DE, Glenn E, Fitzsimmons K, Nelson SG, Peng TH, Hajdas I, Bonani G (2003) Effect of elevated CO₂ on the community metabolism of an experimental coral reef. *Glob Biogeochem Cycl* 17: 1011-1024

Lange-Carter CA, Pleiman CJ, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260: 315-319

Lee HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I, Kim WT (2009) Drought stress-induced Rma 1H1, a RING membrane anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 21: 622-641

Lee JS, Huh KW, Bhargava A, Ellis BE (2008) Comprehensive analysis of protein-protein interactions between *Arabidopsis* MAPKs and MAP kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signal Behav* 3: 1037-1041

Li M, Liu J, Zhang C (2011) Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family. *PLoS ONE* 6: 26999

Li WKW, McLaughling FA, Lovejoy C, Carmack EC (2009) Smallest algae thrive as the Arctic ocean freshens. *Science* 326: 539

Ligterink W (2000) MAP kinases in plant signal transduction: how many, and what for?. *Res Prob Cell Diff* 27: 11-27

Lin CW, Chang HB, Huang HJ (2005) Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. *Plant Physiol Biochem* 43: 963-968

Lipkin Y, Beer S, Eshel A (1993) The ability of *Porphyra linearis* (Rhodophyta) to tolerate prolonged periods of desiccation. *Bot Mar* 36: 205-208

Lisovsky M, Itoh K, Sokol SY (2002) Frizzled receptors activate a novel JNK-dependent pathway that may lead to apoptosis. *Curr Biol* 12: 53-58

Liu XM, Kim KE, Kim KC, Nguyen XC, Han HJ, Jung MS, Kim HS, Park HC, Yun DJ, Chung W (2010) Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71: 614-618

Lüning K (1979) Growth strategies of three *Laminaria* species (Phaeophyceae) inhabiting different depth zones in the sublittoral region of Helgoland (North Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 1: 195-200

Lüning K (1984) Temperature tolerance and biogeography of seaweeds: The marine algal flora of Helgoland (North Sea) as an example. *Helgoland Meeres* 8: 305-317

Madsen TV, Maberly SC (1990) A comparison of air and water as environments for photosynthesis by the intertidal alga *Fucus spiralis* (Phaeophyta). *J Phycol* 26: 24-30

Manney GL, Santee ML, Rex M, Livesey NJ, Pitts MC, Veefkind P, Nash ER, Wohltmann I, Lehmann R, Froidevaux L, Poole LR, Schoeberl MR, Haffner DP, Davies J, Dorokhov V, Gernandt H, Johnson B, Kivi R, Kyrö E, Larsen N, Levelt PF, Makshtas A, McElroy CT, Nakajima H, Parrondo MC, Tarasick DW, von der Gathen P, Walker KA, Zinoviev NS (2011) Unprecedented Arctic ozone loss in 2011. *Nature* 478: 469-475

MAPK Group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308

Makarov M (1999) Influence of ultraviolet radiation on the growth of the dominant macroalgae of the Barents Sea. *Chemosph Glob Chang Sci* 1: 461-467

Margalef R (2005) *Ecología*. Ediciones Omega.

Matsuoka D, Nanmori T, Sato K, Fukami Y, Kikkawa U, Yasuda T (2002) Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J* 29: 637-647

Mercado JM, Niell FX (2000) Carbon dioxide uptake by *Bostrychia scorpioides* (Rhodophyceae) under emerged conditions. *Eur J Phycol* 35: 45-51

Meskiene I, Hirt H (2000) MAP kinase pathways: Molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol* 42: 791-806

Michler T, Aguilera J, Hanelt D, Bischof K, Wiencke C (2002) Long term effect of ultraviolet radiation on growth and photosynthetic performance of polar and cold-temperate macroalgae. *Mar Biol* 140: 1117-1127

Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archiv Biochem Biophys* 452: 55-68

Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 765-769

Mockaitis K, Howell SH (2000) Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 24:785-796

Moreno E, Basler K, Morata G (2002) Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416: 755-759

Muniyappa H, Das KC (2008) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 20: 675-683

Munnik T, Meijer HJ (2001) Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Lett* 498: 172-178

Mwanamwenge J, Loss SP, Siddique KHM, Cocks PS (1999) Effect of water stress during floral initiation, flowering and podding on the growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *Eur J Agro* 11: 1-11

Nadkarni V, Gabbay KH, Bohren KM, Sheikh-Hamad D (1999) Osmotic response element enhancer activity. Regulation through p38 kinase and mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase kinase. *J Biol Chem* 274: 20185-20190

Nagai K, Yotsukura N, Ikegami H, Kimura H, and Morimoto K (2008) Protein extraction for 2-DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (Laminariales): recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. *Electrophoresis* 29: 672-681

Nahm O, Woo SK, Handler JS, Kwon HM (2002) Involvement of multiple kinase pathways in stimulation of gene transcription by hypertonicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: 49-58

Neale PJ (2000) Spectral weighting functions for quantifying the effects of ultraviolet radiation in marine ecosystems. In: Effects of UV radiation on the marine environment, DeMora SJ, Vernet M (eds). Cambridge University Press, pp. 73-100

Neuder LE, Keener JM, Eckert RE, Trujillo JC, Jones SL (2009) Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 129: 192-199

New L, Han J (1998) The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trend Cardiovasc Med* 8: 220-229

Neill SJ, Radhika D, John TH, Kazuya I, Kazuo S (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* MAP Kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* 126: 1579-1587

Niell FX (1977) Distribución y zonación de las algas bentónicas en la facies rocosa del sistema intermareal de las Rías Bajas Gallegas. *Inv Pesq* 41: 219-223

Niell FX (1979) Structure and succession in rocky algal communities of a temperate intertidal system. *J exp mar Biol Ecol* 36: 185-200

Niell FX, Varela M (1984) Initial colonization stages on rocky coastal substrates. *Mar Ecol* 5: 45-56

- Niell FX**, Espejo M, Fernández JA, Algarra P (1989) Performances and use of energy in intertidal systems related to random disturbances and thermal stress. *Sci Mar* 53: 293-299
- Ning J**, Li X, Hicks LM, Xiong L (2010) A Raf-Like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 152: 876-890
- Nebreda AR**, Porras A (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25: 257-260
- Oates BR** (1985) Photosynthesis and amelioration of desiccation in the intertidal saccate alga *Colpomenia peregrina*. *Mar Biol* 89: 109-119
- Oates BR** (1986) Components of photosynthesis in the intertidal saccate alga *Halosaccion americanum* (Rhodophyta, Palmariales). *J Phycol* 22: 217-223
- Oates BR** (1988) Water relations of the intertidal saccate alga *Colpomenia peregrina* (Phaeophyta, Scytosiphonales). *Bot Mar* 31: 57-63
- Oren A**, Gunde-Cimerman N (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. *FEMS Microbiol Lett* 269: 1-10
- Pagnussat GC**, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279-286
- Pakker H**, Martins RST, Boelen P, Buma AGJ, Nikaido O, Breeman AM (2000) Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J Phycol* 36: 334-341
- Palavan-Unsal N**, Arisan D (2009) Nitric oxide signaling in plants. *Bot Rev* 75: 203-229
- Parages ML**, Capasso JM, Meco V, Jiménez C (2012) A novel method for phosphoprotein extraction from macroalgae. *Bot Mar* 55: 261-267
- Park KM**, Chen A, Bonventre JV (2001) Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38 and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 276: 11870-11876
- Payne DM**, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10: 885-892
- Pawson T**, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.

Science 278: 2075-2080

Pearson GA, Davison IR (1993) Freezing rate and duration determine the physiological response of intertidal fucooids to freezing. *Mar Biol* 115: 353-362

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183

Pedley KF, Martin GB (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 8: 541-547

Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signaling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 1-6

Pontillon C (1926) Sur les variations quantitatives du fucosane dans le *Fucus serratus* L. *C R Soc Biol* 95: 970-971

Posada J, Yew N, Ahn NG, Vande-Woude CF, Cooper JA (1993) Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* 13: 2546-2552

Pozios KC, Ding J, Degger B, Upton Z, Duan C (2001) IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3- kinase-signaling pathways. *Am J Physiol* 280: 1230-1239

Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A (eds) *Cultures and collections of algae. Proc US-Japan Conf, Hakone, Japan*, September 1966. *Jap Soc Plant Physiol, Kyoto*. pp. 63-75.

Ragan MA, Jensen A (1977) Quantitative studies on brown algal phenols. 1. Estimation of absolute polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L) *J Exp Mar Biol Ecol* 30: 209-221

Raven JA, Beardall J (1981) Respiration and photorespiration. *Can Bull Fish Aquat Sci* 210: 55-82

Ray LB, Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insuline of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylated microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 1502-1506

Riebesell U, Zondervan I, Rost B, Tortell PD, Zeebe RE, Morel FMM (2000) Reduced acidification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407: 364-367

Roleda MY, Wiencke C, Lüder UH (2006). Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage, and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*. *J Exp Bot* 57: 3847-3856

Rommel C, Hafen E (1998) Ras a versatile cellular switch. *Curr Biol* 8: 412-418

Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Columbo R, Dalle-Donnea I (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers or oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38

Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that p42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 6940-6943

Saklatvala J (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* 4: 372-377

Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA, Reed W (1998) Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 275: 551-558

Samuel MA, Miles GP, Ellis BE (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signaling in plants. *Plant J* 22: 367-376

Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000) MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigro-striatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75: 1200-1208

Schindler DW (2001) The cumulative effects of climate warming and other human stresses on Canadian freshwaters in the new millennium. *Can J Fish Aquat Sci* 58: 18-29

Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, Bittencourt CF, Zanetti GD, Heinzmann BM, Laufer S, Merfort I (2009) Biological studies on Brazilian plants used in wound ealing *J Ethnopharmacol* 122: 523-532

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photos Res* 10: 51-62

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM, (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, pp. 49-70

Scott AJ, O'Dea KP, O'Callaghan D, Williams L, Dokpesi JO, Tatton L, Handy JM, Hogg PJ, Takata M (2011) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase



mediate tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J Biol Chem* 286: 35466-35476

Seaton GGR, Walker DA (1990) Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation *Proc R Soc Lond B* 242: 29-35

Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9: 726-735

Segovia M, Berges JA (2005) Effect of inhibitors of protein synthesis and DNA replication on the induction of proteolytic activities, caspase-like activities and cell death in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. *Eur J Phycol* 40: 21-30

Segovia M, Berges JA (2009) Inhibition of caspase-like activities prevent the appearance of reactive oxygen species and dark-induced apoptosis in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. *J Phycol* 45: 1116-1126

Senaratna T, McKersie BD, Borochoy A (1987) Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. *J Exp Bot* 38: 2005-2014

Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: 131-136

Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang X, Andersson R (2006) Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 41: 472-480

Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B., Tuteja N (2011) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 6: 196-203

Smith RL, Smith TM (2001) *Ecología*. Pearson Educación. Madrid.

Solomon S, Portmann RW, Thompson DWJ (2007) Contrasts between Antarctic and Arctic ozone depletion. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 445-449

Spurkland T, Iken K (2011a) Salinity and irradiance effects on growth and maximum photosynthetic quantum yield in subarctic *Saccharina latissima* (Laminariales, Laminariaceae). *Bot Mar* 54: 355-365

Spurkland T, Iken K (2011b) Kelp bed dynamics in estuarine environments in subarctic. *J Coast Res* 27: 133-143

Steinhoff FS, Wiencke C, Wuttke S, Bischof K (2011) Effects of water temperature, UV radiation and low vs high PAR on phlorotannin content and germination in zoospores of *Saccorhiza dermatodea* (Tilopteridales, Phaeophyceae). *Phycologia* 50: 256-263

Stephenson TA, Stephenson A (1972) Life between tide-marks on rocky shores. Freeman WH (Eed). USA.

Stroeve J, Holland MM, Weier W, Scambos T, Serreze M (2007) Arctic sea ice decline: Faster than forecast. *Geophys Res Lett* 34: L09501

Sun C, Qi R, Wang L, Yan J, Wang Y (2012) p38 MAPK regulates calcium signal-mediated lipid accumulation through changing VDR expression in primary preadipocytes of mice. *Mol Biol Rep* 39: 3179-3184

Suzuki N, Koizumi N, Sano H (2001) Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* reveals protein denaturation and oxidative stress to be critical components of cadmium toxicity. *Plant Cell Environ* 24: 1177-1188

Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010) MAPK machinery in plants: Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav* 5: 1370-1378

Takahashi F, Mizoguchi T, Yoshida R, Ichimura K, Shinozaki K (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 41: 649-660

Takahashi T, Sutherland SC, Wanninkhof R, Sweeney C, Feely RA, Chipman DW, Hales B, Friederich G, Chavez F, Sabine C, Watson A, Bakker DCE, Schuster U, Metzl N, Yoshikawa-Inoue H, Ishii M, Midorikawa T, Nojiri Y, Körtzinger A, Steinhoff T, Hoppema M, Olafsson J, Arnarson TS, Tilbrook B, Johannessen T, Olsen A, Bellerby R, Wong CS, Delille B, Bates NR, Baar HJ (2009) Climatological mean and decadal change in surface ocean pCO₂, and net sea-air CO₂ flux over the global oceans. *Deep-Sea Res II* 56: 54-557

Taylor SS, Radzio-Andzelm E (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* 5: 345-355

Teige M, Scheik E, Eulgem T, Dóczy R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 15: 141-52

Tena G, Renaudin JP (1998) Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *Plant J* 16: 173-182

Tessier DM, Pascal LE (2006) Activation of MAPK by hexavalent chromium, manganese and nickel in human epithelial cell. *Toxicol Lett* 167: 114-121

Thomsen J, Melzner F (2010) Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 157: 2667-2676

Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240-3253

Van de Poll WH, Hanelt D, Hoyer K, Buma AGJ, Breeman AM (2002) Ultraviolet-B induced cyclobutane-pyrimidine dimer formation and repair in Arctic marine macrophytes. *Photochem Photobiol* 76: 493-501

Vincent WF, Neale PJ (2000) Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: de Mora ST, Demers S, Vernet M (ed) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, pp. 149-176

Vinebrooke RD, Cottingham KL, Norberg J, Scheffer M, Dodson SI, Maberly SC, Sommer U (2004) Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104: 451-457

Vom Dahl S, Schliess F, Graf D, Haussinger D (2001) Role of p38(MAPK) in cell volume regulation in perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem* 11: 285-294

Wahl M, Jormalainen V, Eriksson BK, Coyer JA, Molis M, Schubert H, Dethier M, Karez R, Kruse I, Lenz M, Pearson G; Rohde S, Wikström SA, Olsen JL (2011) Stress ecology in *Fucus*: abiotic, biotic and genetic interactions. *Adv Mar Biol* 59: 37-105

Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74: 589-607

Widegren U, Wretman C, Lionikas A, Hedin G, Henriksson J (2000) Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflugers Arch* 441: 317-322

Widmann CS, Gibson MB, Jarpe, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180

Wiencke C, Gómez I, Pakker H, Flores-Moya A, Altamirano M, Hanelt D, Bischof K, Figueroa FL (2000) Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar Ecol Prog Ser* 197: 217-229

Wiencke C, Clayton MN, Schoenwaelder M (2004) Sensitivity and acclimation to UV radiation of zoospores from five species of Laminariales from the Arctic. *Mar Biol* 145: 31-39

Wiencke C, Vögele B, Kovaltchouk NA, Hop H (2004) Species composition and zonation of marine benthic macroalgae at Hansneset in Kongsfjorden, Svalbard. *Ber Pol Meeres* 492: 55-62

- Wiencke C**, Roleda MY, Gruber A, Clayton MN, Bischof K (2006) Susceptibility of zoospores to UV radiation determines upper depth distribution limit of Arctic kelps: evidence through field experiments. *J Ecol* 94: 455-463
- Wiencke C**, Clayton MN, Gomez I, Iken K, Lüder UH, Amsler CD, Karsten U, Hanelt D, Bischof K, Dunton K (2007) Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. *Rev Environ Sci Biotech* 6: 95-126
- Wiencke C**, Gómez I, Dunton K (2011) Phenology and seasonal physiological performance of polar seaweeds. In: Wiencke C (ed) *Biology of polar benthic algae*. De Gruyter, pp. 181-194
- Wojtaszek PA**, Heasley LE, Siriwardana G, Berl T (1998) Dominant-negative c-Jun NH2-terminal kinase sensitizes renal inner medullary collecting duct cells to hypertonicity-induced lethality independent of organic osmolyte transport. *J Biol Chem* 273: 800-804
- Wong P-F**, Tan L-J, Nawi H, AbuBakar S (2006) Proteomics of the red alga, *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol* 42: 113-120
- Wrzaczek M**, Hirt H (2001) Plant MAP kinase pathways: how many and what for?. *Biol Cell* 93: 81-87
- Wurgler-Murphy SM**, Maeda T, Witten EA, Saito H (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* 17: 1289-1297
- Xu D**, Wang L, Olson JE, Lu L (2001) Asymmetrical response of p38 kinase activation to volume changes in primary rat astrocytes. *Exp Biol Med* 226: 927-933
- Yang KY**, Liu Y, Zhang S (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 741-746
- Yeh CM**, Hsiao LJ, Huang HJ (2004) Cadmium activates a mitogen activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant Cell Physiol* 45: 1306-3283
- Yeh CM**, Chien PS Huang HJ (2007) Distinct signaling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J Exp Bot* 58: 659-671
- Yordanov I**, Velikova V, Tsonev T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg J Plant Physiol, Special Issue* 187-206
- Yu S-W**, Tang K-X (2004) MAP Kinase cascades responding to environmental stress in plants. *Acta Bot Sin* 46: 127-136

Yuasa T, Muto S (1996) Activation of 40-kDa protein kinases in response to hypo- and hypertonic shock in the halotolerant green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Cell Physiol* 37: 35-42

Zacher K, Rautenberger R, Hanelt D, Wulff A, Wiencke C (2011) The abiotic environment of polar benthic algae. In Wiencke C (ed) *Biology of polar benthic algae*. De Gruyter, pp. 9-22

Zhang J, Zhang F, Ebert D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* 3: 299-307

Zhang Y, Lamm R, Pillonel C, Lam S, Xu JR (2002) Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol* 68: 532-538

Zhu T, Lobie PE (2000) Janus kinase 2-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 275: 2103-2114

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol* 53: 247-273

Zou DH, Gao KS (2002) Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emersed photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. *Eur J Phycol* 37: 587-592

Zou DH, Gao KS (2004) Exogenous carbon acquisition of photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) under emersed state. *Prog Nat Sci* 14: 34- 40

Zou DH, Gao K, Ruan Z (2007) Daily timing of emersion and elevated atmospheric CO₂ concentration affect photosynthetic performance of the intertidal macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in sunlight. *Bot Mar* 50: 275-279

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Es muy poco lo que actualmente se conoce sobre la transducción de señales de estrés ambiental en algas así como sobre la implicación y la participación de las cascadas y vías de señalización celular tipo MAPKs en estos organismos.

A lo largo de esta Memoria abordaremos este fascinante tema desde tres puntos de vista dentro una misma línea temporal. El que constituye el pasado, las primeras aproximaciones y resultados que posibilitan y determinan el presente, confirmaciones de hipótesis, planteamiento de nuevas alternativas, nuevos resultados y una ingente cantidad de ideas que proyectan hacia un futuro prometedor, bien fundamentado metodológicamente y ávido de respuestas y nuevos interrogantes.

