



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio funcional de la autofagia por estrés específico
en el cloroplasto de la microalga modelo
*Chlamydomonas reinhardtii***

**Estudio funcional de la autofagia por estrés específico
en el cloroplasto de la microalga modelo
*Chlamydomonas reinhardtii***

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Biotecnología por el graduado

Luis Gonzaga Heredia Martínez

Sevilla, febrero de 2022

Directores:

Dr. José Luis Crespo González

Investigador Científico del Consejo
Superior de Investigaciones Científicas

Dra. María Esther Pérez Pérez

Científica Titular del Consejo
Superior de Investigaciones Científicas

Tutor:

Dr. Francisco Javier Florencio Bellido

Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular

Agradecimientos

El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido financiado principalmente con una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad. Los datos experimentales se han obtenido en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de Sevilla. Por tanto, me gustaría agradecer a estas instituciones, así como a todo su personal, por hacer posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, tengo que agradecer a mis directores de tesis, José Luis Crespo “Pepelu” y Esther Pérez, por formarme en mi carrera investigadora y sobre todo por haber confiado en mí. Gracias Pepelu por enseñarme tanto y por tener siempre tu puerta abierta para hablar de ciencia y responder todas mis dudas. Esas discusiones, a veces extensas porque te gusta enrollarte, hicieron que entienda la ciencia de otra manera. Gracias Esther por tu infinita paciencia, porque no es fácil discutir con un “melón” como yo. Gracias a ti he conseguido ordenar mis ideas cuando ni siquiera yo sabía organizarme. Gracias a mi tutor, Javier Florencio, por su experiencia y porque gracias a él empecé en la ciencia antes incluso de plantear el doctorado.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del L14 por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio. Gracias Águila y Manuel por todas las veces que me habéis ayudado y por motivarme para ser mejor investigador y persona. Gracias Emilio por tener siempre un rato para escucharme y animarme con la tesis. Gracias Inma por tu experiencia y tus consejos, es un privilegio poder aprender de personas como vosotros. Gracias a todos por esos descansos con el café para hablar de cotilleos científicos.

Me gustaría agradecer a todos mis compañeros doctorandos por habernos apoyado y animado entre nosotros. En especial agradecer a Diego por nuestras consultas de papeleo y administración siempre tan tediosas. Gracias Diego por tu ayuda. Gracias a todos los integrantes del L2/3 por hacerme sentir como en casa. Gracias a Maribel y a M^a José por todas las veces que me habéis aconsejado. Sandra, muchas gracias por todas las conversaciones que hemos tenido y por saber escucharme, aunque solo sea para hablar de pañales, gracias por todo tu apoyo. Gracias a todos los que han formado y forman parte del cicCartuja.

Quiero agradecer de manera especial a Luis, quien me enseñó con paciencia y dedicación cuando entré por primera vez en un laboratorio. Gracias por contagiarme de tu entusiasmo con la ciencia. Gracias por enseñarme que refrescar la colección un viernes por la tarde o revelar en el cuarto oscuro con un anticuerpo que ambos sabemos que no detecta nada no está reñido con pasar un buen rato con un amigo. Agradecer también de manera muy especial a Migue, por ayudarme en todo lo posible y hacer que el laboratorio fuera además de un trabajo una diversión. Por sus infinitos

consejos o sus conversaciones sobre el Betis. Porque entré en el laboratorio conociendo a una persona maravillosa y salí descubriendo a un amigo.

A mis amigos Josan, Dani, Alejandro y José. Por todos los momentos en la carrera en los que nos apoyamos mutuamente, por todos los momentos y desahogos a lo largo de los años y porque siga así muchos años más. Gracias a mis amigos Carlos, Curro, José y Rafa que siempre me han acompañado desde mi niñez. A mis amigos José Antonio, Cristina, Patricia, Sandra y Pablo por ser ejemplos de buenas personas. A mis amigos Vane, Bruno, Helena y Juan que siempre han intentado entender lo que hago. Simplemente gracias.

A mi familia. Gracias a mis padres y mis hermanos por todo su apoyo. Gracias a ellos he tenido la oportunidad de formarme académica y personalmente. Gracias a Andrés y a M^a José por acogerme siempre. Gracias a mi madre, porque has sido mi referente para estudiar biología y empezar una carrera científica.

Por último, el mayor de los agradecimientos es para la persona que ha estado cada día apoyándome, aguantándome y entendiéndome de manera incondicional y con una paciencia infinita, muchas gracias Silva. Aunque no sabías las dificultades de empezar una carrera científica, siempre me has apoyado en todo. Te doy las gracias porque junto a Manuel, sois el motor de mi vida.

ÍNDICE

Índice

Índice	1
Índice de figuras	8
Índice de tablas	11
Abreviaturas	12
1. Introducción	15
1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
1.1.1. Clasificación y distribución	16
1.1.2. Morfología	17
1.1.3. Ciclo de vida	18
1.1.4. <i>Chlamydomonas</i> como organismo modelo	20
1.1.4.1. Estudio de la fotosíntesis	20
1.1.4.2. Secuenciación del genoma de <i>Chlamydomonas</i>	21
1.1.4.3. Manipulación genética	22
1.2. Autofagia	23
1.2.1. Marcadores de autofagia	25
1.2.1.1. Lipidación de la proteína ATG8	25
1.2.1.2. Flujo autofágico	28
1.2.1.3. Localización celular de la proteína ATG8	28
1.2.1.4. Activación transcripcional de los genes <i>ATG</i>	29
1.2.2. Autofagia en organismos fotosintéticos	29
1.2.3. Autofagia selectiva	30
1.2.4. Regulación de la autofagia	32
1.2.4.1. Ruta de señalización TOR	32
1.2.4.2. Estrés oxidativo	34
1.3. Cloroplasto	36
1.3.1. Estructura del cloroplasto	36
1.3.2. Función del cloroplasto	37

1.3.3. Estrés en el cloroplasto.....	40
2. Objetivos	43
3. Materiales y Métodos.....	45
3.1. Organismos y métodos de cultivo	46
3.1.1. <i>Chlamydomonas</i>	46
3.1.2. Medios y condiciones de cultivo.....	47
3.2. Biología molecular	47
3.2.1. Análisis de ADN.....	47
3.2.1.1. Aislamiento de ADN genómico de <i>Chlamydomonas</i>	47
3.2.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	48
3.2.1.3. Purificación de fragmentos de ADN.....	48
3.2.1.4. Manipulación enzimática del ADN	49
3.2.1.5. Ampliación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
3.2.1.6. Secuenciación del genoma nuclear.....	49
3.2.1.7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	50
3.2.2. Análisis de ARN.....	50
3.2.2.1. Tratamiento del material.....	50
3.2.2.2. Aislamiento de ARN total de <i>Chlamydomonas</i>	51
3.2.2.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	51
3.2.2.4. Retrotranscripción	52
3.2.2.5. Cuantificación de ADN complementario mediante PCR cuantitativa (qPCR)	52
3.2.2.6. Análisis transcriptómico.....	52
3.2.3. Manipulación genética en <i>Chlamydomonas</i>	53
3.2.3.1. Transformación de <i>Chlamydomonas</i>	53
3.2.3.2. Obtención de un mutante <i>atg8</i> en <i>Chlamydomonas</i> mediante <i>CRISPR/Cas9</i>	53

3.3. Métodos bioquímicos	55
3.3.1. Preparación de extractos celulares de <i>Chlamydomonas</i>	55
3.3.1.1. Extracción de fracciones solubles de proteínas	55
3.3.1.2. Extracción de fracciones totales de proteínas	55
3.3.2. Cuantificación de proteínas	56
3.3.2.1. Método de Bradford.....	56
3.3.2.2. Método de ácido bicinconínico (BCA).....	56
3.3.2.3. Análisis cuantitativo del proteoma	56
3.3.3. Electroforesis unidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida	59
3.3.4. Inmunodetección de proteínas mediante western blot.....	60
3.3.5. Preparación de células de <i>Chlamydomonas</i> para su análisis por microscopía.....	61
3.3.5.1. Microscopía óptica y confocal	61
3.3.5.2. Microscopía electrónica.....	62
3.4. Extracción y análisis de metabolitos	63
3.4.1. Análisis de lípidos y ácidos grasos	63
3.5. Ensayos celulares.....	64
3.5.1. Determinación del número de células en <i>Chlamydomonas</i> con la cámara de Neubauer.....	64
3.5.2. Citometría de flujo.....	64
3.5.3. Determinación de la viabilidad celular.....	64
3.5.4. Medidas de parámetros fotosintéticos	65
3.5.5. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	65
4. Resultados	67
4.1. Inhibición de la enzima ácido graso sintasa (FAS) en <i>Chlamydomonas</i>	68
4.1.1. La inhibición de la enzima FAS activa la autofagia.....	68
4.1.2. La inhibición de la enzima FAS disminuye los niveles del lípido de membrana monogalactosil diacilglicerol (MGDG)	70

4.1.3. El tratamiento con cerulenina produce un daño en el cloroplasto de células de <i>Chlamydomonas</i>	71
4.1.4. El tratamiento con cerulenina de células de <i>Chlamydomonas</i> causa el apilamiento de las membranas tilacoidales.....	73
4.1.5. Las células de <i>Chlamydomonas</i> tratadas con cerulenina presentan una activación de la respuesta a estrés del cloroplasto y una disminución en la eficiencia fotosintética	75
4.1.6. La inhibición de la enzima FAS provoca un aumento en los niveles de ROS en células de <i>Chlamydomonas</i>	78
4.1.7. Análisis transcriptómico de células de <i>Chlamydomonas</i> tratadas con cerulenina.....	79
4.2. Efecto de la cerulenina en células de <i>Chlamydomonas</i> creciendo en oscuridad.....	84
4.2.1. Efecto de la inhibición en la enzima FAS sobre el flujo autofágico en células de <i>Chlamydomonas</i> creciendo en oscuridad.....	84
4.2.2. Las células de <i>Chlamydomonas</i> tratadas con cerulenina y creciendo en condiciones de oscuridad presentan un daño en el cloroplasto.....	85
4.2.3. Las células de <i>Chlamydomonas</i> tratadas con cerulenina y creciendo en oscuridad conservan la respuesta a estrés en el cloroplasto.....	87
4.2.4. La inhibición de la enzima FAS en células de <i>Chlamydomonas</i> creciendo en oscuridad provoca un efecto en la estructura del cloroplasto	88
4.3. Generación y caracterización de un mutante deficiente en autofagia.....	90
4.3.1. Generación de un mutante <i>atg8</i> de <i>Chlamydomonas</i> mediante el método <i>CRISPR/Cas9</i>	90
4.3.2. El mutante <i>atg8</i> presenta niveles alterados de proteínas ribosomales.....	92

4.3.3. Caracterización del mutante <i>atg8</i> en distintas condiciones de estrés y limitación de nutrientes	93
4.3.4. El mutante <i>atg8</i> en fase estacionaria tardía presenta un defecto en el crecimiento	95
4.3.5. El mutante <i>atg8</i> es hipersensible al tratamiento con la droga cerulenina	96
4.3.5.1. El mutante <i>atg8</i> en condiciones de inhibición de la enzima FAS presenta un retraso en su crecimiento	96
4.3.5.2. El mutante <i>atg8</i> tratado con cerulenina presenta una disminución en la eficiencia fotosintética	98
4.3.5.3. El tratamiento con la droga cerulenina en el mutante <i>atg8</i> aumenta los niveles de ROS	99
4.3.5.4. La inhibición de la enzima FAS en el mutante <i>atg8</i> presenta un efecto en la estructura del cloroplasto.....	100
4.3.5.5. Análisis transcriptómico del mutante <i>atg8</i> tratado con cerulenina	103
4.3.5.6. Análisis proteómico del mutante <i>atg8</i> tratado con cerulenina	105
5. Discusión.....	116
5.1. La inhibición de la enzima FAS activa la autofagia	117
5.2. La inhibición de la enzima FAS genera estrés oxidativo	117
5.3. La inhibición de la enzima FAS genera daño específico en el cloroplasto.....	118
5.4. El tratamiento con la droga cerulenina produce daños en el cloroplasto y en la estructura celular	119
5.5. Estudio transcriptómico del efecto de la inhibición de la enzima FAS en células de <i>Chlamydomonas</i>	120
5.5.1. Efecto global del tratamiento con cerulenina en las chaperonas y proteínas de respuestas a estrés en el cloroplasto de células de <i>Chlamydomonas</i>	120
5.5.2. El tratamiento con cerulenina activa la autofagia	

en células de <i>Chlamydomonas</i>	122
5.6. Plasticidad metabólica de <i>Chlamydomonas</i> creciendo en oscuridad	123
5.7. El tratamiento con cerulenina de células de <i>Chlamydomonas</i> creciendo en oscuridad provoca estrés oxidativo y la reorganización de las membranas del cloroplasto	124
5.8. Caracterización de la estirpe mutante <i>atg8</i> de <i>Chlamydomonas</i>	126
5.8.1. Retraso en el crecimiento del mutante <i>atg8</i> en fase estacionaria	126
5.8.2. Inhibición de la enzima FAS en el mutante <i>atg8</i> de <i>Chlamydomonas</i>	127
5.8.2.1. Efecto del tratamiento con cerulenina en el cloroplasto de células del mutante <i>atg8</i>	127
5.8.2.2. La inhibición de la enzima FAS en el mutante <i>atg8</i> genera estrés oxidativo	129
5.8.2.3. Estudio transcriptómico del mutante <i>atg8</i> tratado con cerulenina	129
5.8.2.4. Estudio proteómico del mutante <i>atg8</i> tratado con cerulenina	130
6. Conclusiones	133
7. Bibliografía	135
Anexos	

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de una célula vegetativa de *Chlamydomonas*

Figura 2. Ciclo de vida de *Chlamydomonas*

Figura 3. Proceso de autofagia, localización y funciones de las proteínas ATG

Figura 4. Sistema de lipidación de la proteína ATG8

Figure 5. Conservación de residuos de aminoácidos que son esenciales para la función de la proteína ATG8

Figura 6: Modelo del proceso de autofagia selectiva

Figura 7: Modelo de la señalización de la ruta TOR en *Chlamydomonas*

Figura 8: Modelo de la regulación por ROS de la autofagia en plantas y algas

Figura 9: Representación esquemática del proceso de fotosíntesis en cloroplastos de *Chlamydomonas*

Figura 10: Esquema del sistema de degradación del proteasoma

Figura 11. Esquema del sistema de edición génica *CRISPR/Cas9*

Figura 12. Análisis proteómico cuantitativo de células WT y *atg8* tratadas con cerulenina

Figura 13. Efecto de la inhibición de la enzima FAS en el crecimiento celular de *Chlamydomonas*

Figura 14. Activación de la autofagia en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 15. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre el contenido en lípidos polares y ácidos grasos en *Chlamydomonas*

Figura 16. Efecto de la cerulenina sobre la morfología celular de *Chlamydomonas*

Figura 17. Análisis estructural de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 18. Apilamientos de membranas tilacoidales en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 19. Efecto de la inhibición de la enzima FAS en las propiedades fotosintéticas de *Chlamydomonas*

Figura 20. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre proteínas marcadoras de la respuesta a estrés en el cloroplasto

Figura 21. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Figura 22. Distribución de los datos del estudio de la expresión génica de cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 23. Estudio funcional de los transcritos relacionados con la respuesta a estrés celular de cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 24. Clasificación de los transcritos relacionados con la respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 25. Abundancia relativa del ARNm en distintos grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 26. Abundancia relativa del ARNm relacionado con procesos degradativos en respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina

Figura 27. Efecto de la cerulenina sobre el crecimiento celular en cultivos de *Chlamydomonas* creciendo en luz u oscuridad

Figura 28. Activación de la autofagia en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina en oscuridad

Figura 29. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre la expresión de genes de respuesta a estrés celular en *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

Figura 30. La respuesta a estrés en el cloroplasto está conservada en *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

Figura 31. Análisis estructural de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina en oscuridad

Figura 32. Obtención del mutante *atg8* mediante *CRISPR/Cas9*

Figura 33. El mutante *atg8* presenta niveles inapreciables de ATG8

Figura 34. El mutante *atg8* presenta niveles alterados de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37

Figura 35. Ensayos de sensibilidad en el crecimiento de las estirpes WT y *atg8* en condiciones limitantes o de estrés

Figura 36. Análisis inmunológico de ATG8 en las estirpes WT y *atg8* en condiciones de estrés y deficiencia de nutrientes

Figura 37. Defecto en el crecimiento de la estirpe *atg8* en fase estacionaria

Figura 38. El mutante *atg8* es hipersensible a la inhibición de la enzima FAS por el tratamiento con cerulenina

Figura 39. Efecto de la inhibición de FAS sobre los niveles de ATG8 en las estirpes WT y *atg8*

Figura 40. Efecto del tratamiento con concentraciones sub-letales de cerulenina en las propiedades fotosintéticas de las estirpes WT y mutante *atg8*

Figura 41. Efecto de la droga cerulenina sobre la producción en los niveles de ROS y la viabilidad celular en las estirpes WT y *atg8*

Figura 42. Efecto de la cerulenina sobre la estructura celular de las estirpes WT y *atg8*

Figura 43. Cuantificación de la superficie del cloroplasto en las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina

Figura 44. Análisis transcriptómico de las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina

Figura 45. Análisis estadístico del proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 46. Análisis proteómico de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 47. Análisis de las proteínas que presentan un cambio significativo en su abundancia en las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 48. Análisis por categorías funcionales del proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Figura 49. Efecto en el proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* por el tratamiento con cerulenina

Figura 50. Modelo hipotético del efecto de la cerulenina sobre las células de *Chlamydomonas*

Figura 51. Metabolismo de células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

Figura 52. Flujo del transporte electrónico durante el metabolismo en *Chlamydomonas* creciendo en luz

Índice de tablas

Tabla1: Estirpes de *Chlamydomonas* utilizadas en esta tesis

Tabla2: Oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Tabla3: Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNmi	micro ácido ribonucleico
ARNt	ácido ribonucleico transferente
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ARNsg	ácido ribonucleico guía de cadena simple
ATP	trifosfato de adenosina
BCA	ácido bicinconínico
BSA	seroalbúmina de bovino
cél	célula
cer	cerulenina
ConcA	concanamicina A
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	trifosfato de desoxicitosina
dGTP	trifosfato de desoxiguanosina
DEPC	dietilpirocarbonato
dTTP	trifosfato de desoxitimidina
dNTP	trifosfato de nucleótido
E	einstein (energía por mol de fotones)
EDTA	etilendiaminotetraacetato de sodio
ETR	ratio de transferencia de electrones
FD	factor de dilución
F_v/F_m	máxima capacidad fotosintética del PSII
h	hora
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HSM	medio de cultivo hipersalino
kb	mil pares de bases
kDa	Kilodaltons
min	minuto
mQ	agua ultra pura

m/z	masa/carga
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	nanómetro
qPCR	PCR cuantitativa
p/v	relación peso/volumen
PAR	radiación fotosintéticamente activa
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
s	segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
TAP	medio de cultivo Tris Base-Acetato-Fosfato
TAG	triacil glicerol
Tris	tris-(hidroximetil)amincetano
v/v	relación volumen/volumen
WT	estirpe silvestre

Bases Nitrogenadas:

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Aminoácidos:

A	Ala	alanina
R	Arg	arginina
N	Asn	asparagina
D	Asp	aspartato
C	Cys	cisteína
E	Glu	glutamato
Q	Gln	glutamina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
K	Lys	lisina
M	Met	metionina
F	Phe	fenilalanina
P	Pro	prolina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
W	Trp	triptófano
Y	Tyr	tirosina
V	Val	valina

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii (*Chlamydomonas*) es el organismo empleado en esta tesis. Esta alga verde unicelular se ha utilizado ampliamente como organismo eucariota fotosintético modelo. Las estirpes de *Chlamydomonas* que se emplean actualmente en el laboratorio se han obtenido a partir de un único cigoto aislado en un campo de patatas de Massachusetts por G. M. Smith en 1945 (Harris, 2001; Pröschold et al., 2005).

1.1.1. Clasificación y distribución

Según la clasificación taxonómica de los protistas, el género *Chlamydomonas* se encuentra dentro del grupo de los *Archaeplastida*, los cuales poseen un cloroplasto que procede de la endosimbiosis de una cianobacteria. Dentro de este grupo, *Chlamydomonas* se sitúa en la división *Chlorophyta*, concretamente en la clase *Chlorophyceae*, junto con otros organismos modelo como *Volvox carterii* (Adl et al., 2005).

Las especies del género *Chlamydomonas* se caracterizan por la presencia de pared celular, un par de cilios apicales y un cloroplasto que rodea uno o más pirenoides (Harris, 2001).

Así, el género *Chlamydomonas* se encuentra ampliamente distribuido por todo el planeta y las distintas especies ocupan nichos ecológicos muy diferentes, que van desde el suelo (de donde procede la cepa de laboratorio *Chlamydomonas reinhardtii*) a los glaciares (*Chlamydomonas nivalis*), las minas ácidas (*Chlamydomonas acidophila*) o incluso aguas residuales (*Chlamydomonas polypyrenoideum*) (Kothari et al., 2013; Díaz et al., 2020; Zheng et al., 2020). Tradicionalmente, dentro del género las distintas especies se han identificado en función de sus características morfológicas, como el tamaño y la forma celular, la longitud de los cilios, la forma y posición del cloroplasto y los pirenoides, así como en la información presente en genes marcadores filogenéticos (Fabry et al., 1999; Buchheim et al., 2011).

Entre las distintas especies del género *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas reinhardtii* es la especie predominante en los laboratorios y algunas de sus características, como su facilidad de cultivo en condiciones controladas de laboratorio, la capacidad de crecer con acetato como única fuente de carbono sin necesidad de realizar fotosíntesis y un ciclo de vida simple y bien definido, la han convertido en un organismo modelo ampliamente utilizado en campos como el estudio de la fotosíntesis (Rochaix, 2011a), la biogénesis de los cilios (Pazour and Witman, 2009) o el metabolismo ácidos grasos y aminoácidos (Li-Beisson et al., 2019).

1.1.2. Morfología

La microalga *Chlamydomonas* presenta una forma ovalada, de unas 10 μm de longitud y 5 μm de anchura aproximadamente con dos cilios en su extremo anterior. Las células están rodeadas por una pared celular compuesta por glicoproteínas y carbohidratos organizados en siete capas (Goodenough and Heuser, 1985) (Figura 1).

Estas células se caracterizan por tener un par de cilios situados en el polo opuesto al cloroplasto y de la misma longitud que la célula: 10 ó 12 μm aproximadamente. Los cilios en esta microalga son prototipos de los cilios animales ya que muestran su misma simetría; sus axonemas son de nueve parejas de microtúbulos rodeando a una pareja central (Pazour and Witman, 2009). En este mismo extremo, la célula presenta las denominadas vacuolas contráctiles cuya finalidad es la regulación osmótica del citoplasma celular (Luykx et al., 1997) (Figura 1).

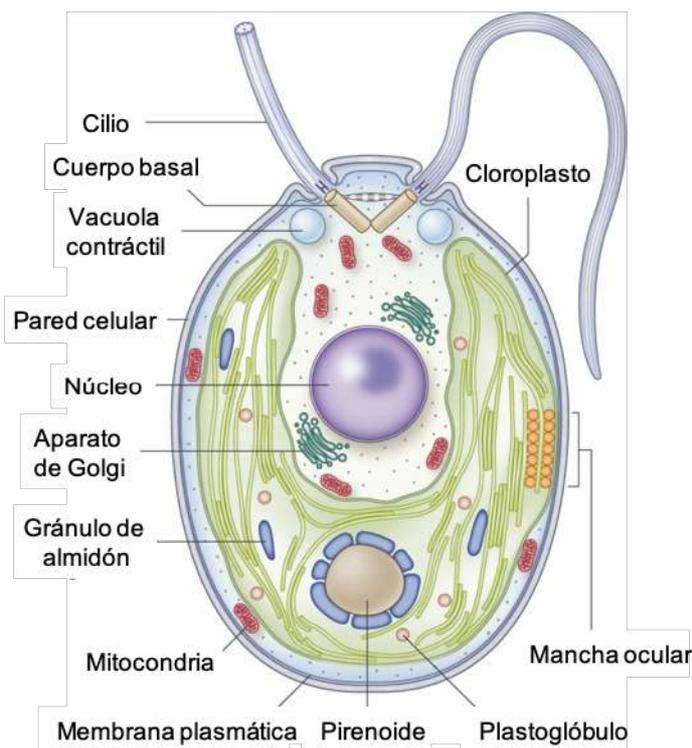


Figura 1. Estructura de una célula vegetativa de *Chlamydomonas*. Célula con 5-10 μm de diámetro. Dos cilios anteriores necesarios para la movilidad y el proceso de emparejamiento durante el ciclo sexual. Un único cloroplasto en forma de copa ocupando gran parte del volumen celular. Dentro de este orgánulo se encuentra el pirenoide, que contiene la enzima Rubisco y donde se concentra el CO_2 para facilitar su fijación. En el lateral del cloroplasto se encuentra la mancha ocular, necesaria para la orientación y la detección de fuentes lumínicas (fototaxis). En la zona anterior de la célula se encuentran las vacuolas contráctiles, necesarias para la regulación osmótica del citoplasma celular. Otras estructuras presentes en la célula señaladas en la figura son el núcleo, los cuerpos basales, la pared celular, el aparato de Golgi y la mitocondria. Figura adaptada de (Sasso et al., 2018).

Las células contienen un único cloroplasto con forma de copa que ocupa cerca del 40% del volumen total. Dentro de este orgánulo se encuentran las membranas tilacoidales que pueden agruparse en paquetes formando granas. Embebidas en estas membranas se encuentran las proteínas encargadas de la cadena de transporte electrónico necesaria para la fotosíntesis (Sager and Palade, 1957; Engel et al., 2015). Por otra parte, existen gránulos de almidón distribuidos entre

las membranas tilacoidales y rodeando una estructura más o menos esférica llamada pirenoide. Esta estructura contiene las enzimas Rubisco y anhidrasa carbónica, cuya finalidad es aumentar la concentración de CO₂ y facilitar la fijación de este compuesto (Mackinder et al., 2016; Mitchell et al., 2017). La mancha ocular o *eyespot*, es un dominio especializado en la membrana del cloroplasto que contiene una concentración de gránulos de carotenoides. El *eyespot* se asocia a la fotorrecepción y la movilidad celular (Eitzinger et al., 2015). En la parte central de la célula se encuentra el núcleo a cuya membrana está asociado el retículo endoplasmático. En el citoplasma también se encuentran los cuerpos de Golgi, las mitocondrias tubulares y las vacuolas líticas. Estas vacuolas equivalentes a los lisosomas animales, se encargan de degradar material celular y reciclarlo en *Chlamydomonas* además de mantener el pH en la célula (Ehara et al., 1995; Rochaix, 1995; Harris, 2001; Harris et al., 2008) (Figura 1).

1.1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Chlamydomonas* ha sido muy estudiado y resulta de gran interés ya que presenta tanto una reproducción asexual o fase vegetativa, como una reproducción sexual. Esta característica en su reproducción refleja una ventaja útil en el laboratorio ya que facilita el crecimiento y manipulación de este microorganismo, así como la facilidad para sincronizar sus cultivos o separar las distintas fases de su división celular (Lin and Goodenough, 2007) (Figura 2).

Cuando la fuente de energía no es limitante, la etapa asexual es predominante. Las células vegetativas tienen una carga cromosómica haploide y su división celular se lleva a cabo mediante mitosis generando nuevas células vegetativas idénticas (Lin and Goodenough, 2007). Si las condiciones de luz y nutrientes son óptimas, esta división se realizará aproximadamente cada 8 ó 10 horas, pero el ciclo celular completo puede alargarse hasta 24 horas por imposición diaria de períodos de luz y oscuridad. Las células permanecen en G1 durante el período de luz y se dividen de forma sincronizada durante el período de oscuridad, generalmente en dos divisiones mitóticas sucesivas, quedando las cuatro células hijas dentro de una pared celular común de la que se liberarán simultáneamente (Umen and Goodenough, 2001). En este período, las células vegetativas se diferencian en dos tipos de gametos o *mating types*: mt+ y mt-.

La etapa de reproducción sexual, se inicia si las condiciones del medio son desfavorables. Durante este proceso se forma el cigoto, que permite a *Chlamydomonas* sobrevivir si las condiciones son adversas (Lin and Goodenough, 2007). Este proceso se conoce como gametogénesis y puede ser inducido en el laboratorio mediante la retirada de nitrógeno del medio junto a condiciones de luz específicas (Cross and Umen, 2015). Ambas señales informan a las células vegetativas del cambio a una reproducción sexual. Es entonces cuando una célula haploide

$mt+$ se une a otra $mt-$ por el contacto de sus cilios. Esta fusión de gametos haploides resulta en un cigoto diploide denominado zigospora que presenta una fuerte resistencia a distintas condiciones ambientales. Una vez se restablecen los nutrientes en el medio, el cigoto se divide en cuatro células haploides mediante meiosis que pueden ser liberadas y volver, si las condiciones del medio son adecuadas, a su ciclo de vida asexual o vegetativo (Figura 2).

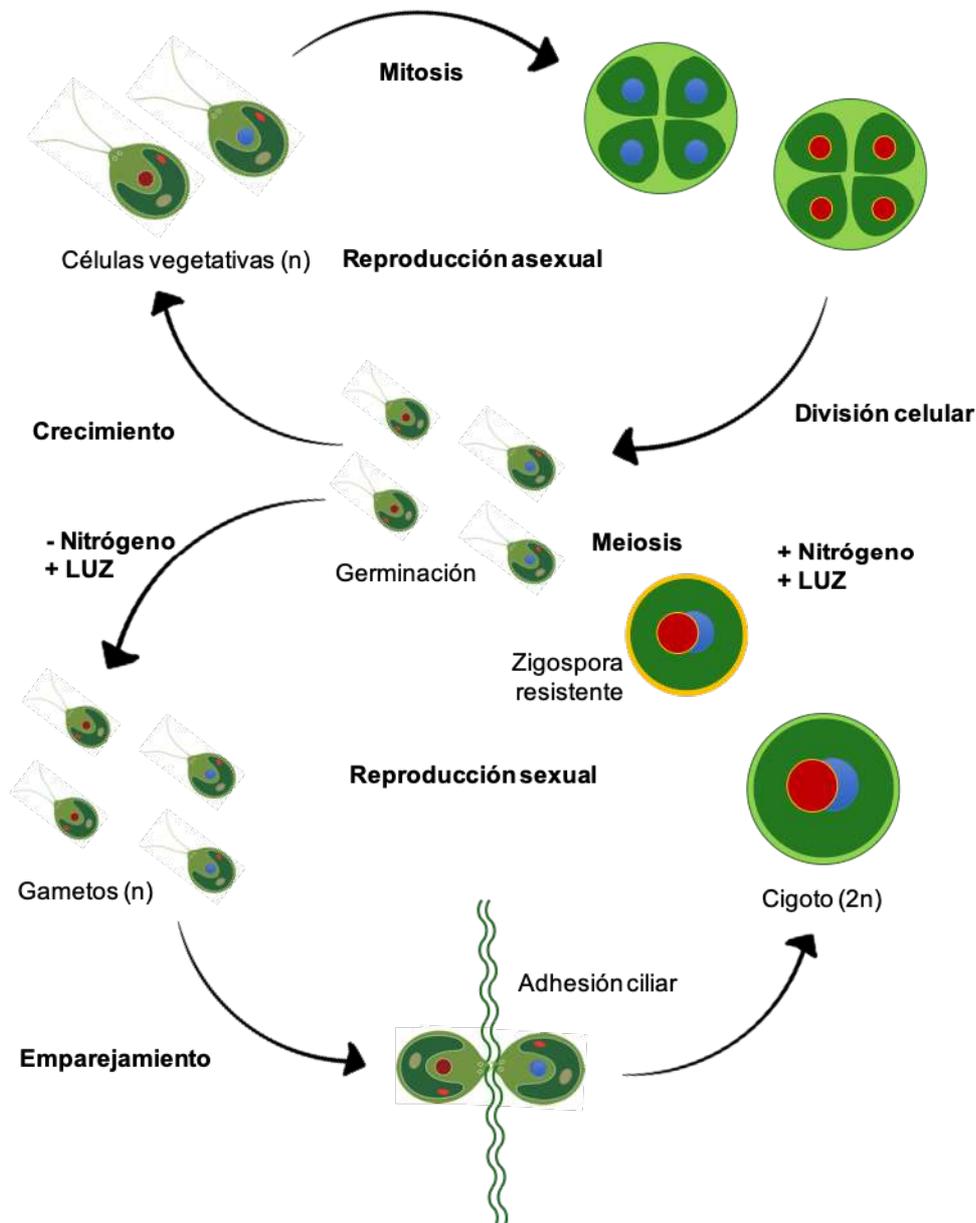


Figura 2. Ciclo de vida de *Chlamydomonas*. Células vegetativas de *Chlamydomonas* presentan dos variedades o *mating types*, $mt+$ y $mt-$. Estas células haploides (n) se dividen por mitosis durante su reproducción asexual. Se puede inducir la gametogénesis mediante condiciones limitantes de nitrógeno ($-N$) en presencia de luz ($+LUZ$), y los gametos de distintas tipologías se fusionan en un cigoto diploide ($2n$) durante la fase sexual de su reproducción. Este cigoto llega a convertirse en pocos días en una estructura multiresistente denominada zigospora. Una vez se restablecen las condiciones óptimas en el ambiente, esta estructura se divide por meiosis para liberar cuatro células haploides. Las células haploides resultantes crecen para volver al ciclo asexual o vegetativo (Harris, 2001; Lin and Goodenough, 2007).

1.1.4. *Chlamydomonas* como organismo modelo

Las algas representan un amplio y diverso grupo polifilético de eucariotas fotosintéticos que ocupan todos los nichos ecológicos posibles a lo largo del planeta (Blaby-Haas and Merchant, 2019). Estos organismos son productores primarios que contribuyen hasta en un 50% con el carbono mundial fijado (Field et al., 1998), lo que hace que su estudio sea fundamental para entender la fijación y el flujo del carbono a nivel global. Las algas también ofrecen una opción económica para la producción de compuestos de interés como el etanol, precursor del biodiesel, ya que se forman como parte de su metabolismo secundario únicamente a partir de agua, sales, aire y luz para su cultivo (Scranton et al., 2015).

En concreto, el alga unicelular *Chlamydomonas* presenta facilidades para su cultivo en el laboratorio debido a su ciclo de vida sencillo, su plasticidad metabólica y la rapidez en su crecimiento. Este organismo modelo puede ser cultivado con acetato como única fuente de carbono, haciendo dispensable las funciones del aparato fotosintético. Por tanto, esta microalga puede crecer de manera fotoautótrofa (luz y CO₂ como única fuente de carbono), mixótrofa (luz y CO₂ más acetato incluido en el medio) o heterótrofa (oscuridad con acetato presente en el medio) (Rochaix, 1995).

El genoma haploide de *Chlamydomonas* también facilita la manipulación genética de este organismo comparado con otros organismos diploides (Jinkerson and Jonikas, 2015). *Chlamydomonas* ha sido ampliamente utilizada en líneas de investigación tales como la fotosíntesis o la biogénesis de los cilios (Noordally and Millar, 2015). Además, existen nuevas ramas de investigación en las que se está utilizando este microorganismo modelo tales como la respuesta al estrés lumínico y la disipación de energía para prevenir daños celulares, el estudio de rutas metabólicas como la regulación de la autofagia en respuesta a estrés, el metabolismo de lípidos y el metabolismo de aminoácidos (Heredia-Martínez et al., 2018; Li-Beisson et al., 2019; Mallén-Ponce et al., 2022).

1.1.4.1. Estudio de la fotosíntesis

Chlamydomonas es un organismo autótrofo facultativo, es decir, puede prescindir del aparato fotosintético si existe acetato en el medio de cultivo como fuente de carbono, ofreciendo una gran ventaja para el estudio de la biogénesis y función del cloroplasto. Por ello, este microorganismo fue esencial en el estudio del aparato fotosintético gracias a los trabajos realizados a partir de estirpes deficientes en componentes de ambos fotosistemas y mediante compuestos que impedían el correcto transporte de electrones en el cloroplasto. Estas estirpes carentes de actividad fotosintética se cultivaron en medio con acetato como fuente de carbono para crecer y se seleccionaron gracias

al aumento en la fluorescencia de la clorofila como consecuencia de una cadena de transporte electrónico truncada (Rochaix, 2011a; Leister, 2019a). Estos mismos ensayos pueden utilizarse en plantas superiores, pero al contrario que en *Chlamydomonas*, estas mutaciones son letales en plantas una vez pasan su estado de plántula (Maiwald et al., 2003).

Las primeras evidencias de componentes del aparato fotosintético codificados desde el núcleo y desde el cloroplasto llegaron por el estudio de células de *Chlamydomonas* en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas específicos del citoplasma y el cloroplasto (Murchie and Niyogi, 2011). Además, el estudio genético de la fotosíntesis y la coordinación entre el núcleo y el cloroplasto para codificar subunidades del aparato fotosintético y enzimas críticas para el funcionamiento de este orgánulo se deben principalmente a la colección de mutantes de *Chlamydomonas* de los laboratorios de R. Levine, J. D. Rochaix y F. A. Wollman (Grossman et al., 2010).

1.1.4.2. Secuenciación del genoma de *Chlamydomonas*

Chlamydomonas es la primera microalga cuyo genoma completo ha sido secuenciado (Merchant et al., 2007). Desde su aislamiento original en 1945 por G. M. Smith, se han producido numerosos cruces e intercambios entre laboratorios. La comparación de estirpes entre distintos laboratorios resultó en sorprendentes diferencias genéticas entre ellas (Flowers et al., 2015; Gallaher et al., 2015). Por tanto, parece que las estirpes distribuidas originariamente por Smith no eran idénticas entre sí.

El genoma nuclear de *Chlamydomonas* ha sido secuenciado (Merchant et al., 2007) y su análisis indica que tiene un tamaño de aproximadamente 121 Mb y está organizado en 17 cromosomas con un total de 15.143 genes que codifican proteínas. Además, el genoma de *Chlamydomonas* contiene un alto contenido en guanina y citosina (64%). Estas características son comparables a otras algas como *V. carteri* (Prochnik et al., 2010) aunque su tamaño es mayor que el de otras algas verdes como *Chlorella spp* (Blaby-Haas and Merchant, 2019). El ensamble del genoma cubre alrededor del 99.5% aunque la comunidad científica sigue mejorando la calidad de la secuencia del genoma mediante su anotación y ensamblaje (Blaby et al., 2014).

Por otro lado, los genomas del cloroplasto y la mitocondria de *Chlamydomonas* también se han secuenciado (Vahrenholz et al., 1993; Maul et al., 2002; Gallaher et al., 2018). El genoma mitocondrial posee 15,8 kb y codifica 8 proteínas de las cuales 7 son subunidades de la cadena respiratoria o del complejo ATP sintasa, además de 3 ARNt y 15 ARNr (Boer et al., 1985). Este pequeño tamaño es sorprendente comparado con las plantas superiores que presentan un genoma mitocondrial mucho mayor de entre 300-600 kb que codifica alrededor de 60 proteínas. Este orgánulo

participa en la síntesis del ARNt del citosol y en su procesamiento alternativo, necesarios para una correcta traducción (Salinas et al., 2012).

El cloroplasto posee un genoma de 205 kb y su estructura es similar a otros genomas cloroplastídicos. Su singularidad se basa en un amplio número de repeticiones y su código está limitado por regiones intergénicas. Estudios de este genoma han demostrado la ausencia de edición de ARN en el transcriptoma del cloroplasto (Flowers et al., 2015; Gallaher et al., 2015).

1.1.4.3. Manipulación genética

Los métodos de transformación clásicos de ADN recombinante han sido validados en *Chlamydomonas*. Entre otros métodos, el ADN recombinante puede ser introducido en la célula mediante agitación en presencia de perlas de vidrio impregnadas de ADN, por electroporación o por bombardeo de partículas de oro recubiertas con ADN (Jinkerson and Jonikas, 2015). El método empleado con perlas de vidrio es más eficiente si se utilizan estirpes sin pared celular (Yamano et al., 2013). Por otro lado, la transformación por biobalística presenta una menor eficiencia, aunque es un sistema útil para la transformación del cloroplasto. De hecho, el primer genoma plastídico en ser manipulado se obtuvo a partir de células de *Chlamydomonas* (Shepherd et al., 1979; Boynton et al., 1988). También se ha demostrado que en *Chlamydomonas* se puede utilizar un gran número de marcadores de selección, como la resistencia a antibióticos o el crecimiento complementado con auxotrofías.

Recientemente se han descrito métodos más novedosos para la manipulación genética de este microorganismo. Entre otros procesos, *Chlamydomonas* posee la mayoría de proteínas necesarias para la biogénesis de pequeños ARN como ARN interferentes y ARNm, ARN monocatenario y de pequeña longitud con la capacidad de regular otros genes (Voshall et al., 2017; Yamasaki and Cerutti, 2017). La edición del genoma por medio de dedos de zinc (ZFN) (Sizova et al., 2013; Greiner et al., 2017) también se ha estudiado en *Chlamydomonas*, siendo los ZFN versiones modificadas de endonucleasas que pueden procesar dominios concretos de ADN (Reyon et al., 2011).

Actualmente, un nuevo sistema de edición del genoma, basado en repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR*) relacionadas con la proteína *Cas9*, está siendo muy empleado en muchos organismos debido a su simplicidad (Doudna and Charpentier, 2014). Este sistema de edición génica originalmente identificado en bacterias como sistema inmune adaptativo contra ADN vírico (Doudna and Charpentier, 2014; Mojica and Garrett, 2013), se basa en la capacidad de la endonucleasa *Cas9*

para cortar una cadena doble de ADN. Para ello, se requiere una molécula de ARN simple, denominado ARNsg. El ARNsg presenta una alta especificidad por su diana, una región concreta del genoma. Finalmente, Cas9 es dirigido por el ARNsg hacia su diana para cortar el genoma en una zona concreta (Shin et al., 2016). Este método ha sido adaptado rápidamente a muchos organismos (Baek et al., 2016; Greiner et al., 2017). Sin embargo, en algunos organismos como *Chlamydomonas*, el sistema *CRISPR/Cas9* presenta algunos inconvenientes como su baja eficiencia debido a la toxicidad generada por la expresión de la proteína Cas9. En *Chlamydomonas* se ha conseguido obtener mutantes mediante *CRISPR/Cas9* electroporando las células de este organismo con la proteína Cas9 recombinante y el ARNsg (Shin et al., 2016).

1.2. Autofagia

La macroautofagia (de ahora en adelante autofagia) es un proceso catabólico ampliamente conservado en eucariotas por el cual se degradan componentes celulares incluyendo proteínas, membranas, ribosomas u orgánulos completos, para mantener la homeostasis celular. Durante la autofagia, componentes citosólicos (denominados *cargo*) se engloban dentro de una vesícula de doble membrana en formación denominada fagóforo (Yang and Klionsky, 2010; Reggiori and Klionsky, 2013). Durante este proceso, el fagóforo se expande para generar el autofagosoma, el cual transporta el *cargo* hacia el orgánulo degradante, lisosoma en mamíferos o vacuola en levaduras, plantas y algas. Finalmente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la vacuola, liberando su contenido envuelto en la membrana interna (cuerpo autofágico) para su posterior degradación y reciclaje (Figura 3). Por ello, la autofagia juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la respuesta a estrés (He and Klionsky, 2009; Mizushima et al., 2011; Liu and Bassham, 2012; Pérez-Pérez et al., 2012a; Soto-Burgos et al., 2018).

La autofagia es un proceso altamente conservado en los organismos eucariotas. Este proceso está mediado por un grupo de proteínas denominadas ATG (*autophagy-related proteins*), que fueron originalmente identificadas en levaduras (Tsukada and Ohsumi, 1993a) y posteriormente en otros eucariotas como mamíferos, plantas y algas (Bassham et al., 2006; Díaz-Troya et al., 2008a; Nakatogawa et al., 2012). Entre estas proteínas ATG, se necesita un subgrupo de 18 proteínas para la formación del autofagosoma que constituyen el núcleo central de la maquinaria de la autofagia en la mayoría de eucariotas. Este núcleo central se compone de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina de las proteínas ATG8 y ATG12 que catalizan el enlace covalente entre la proteína ATG8 y el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE), un evento esencial en la formación del autofagosoma (Ichimura et al., 2000; Xie et al., 2008).

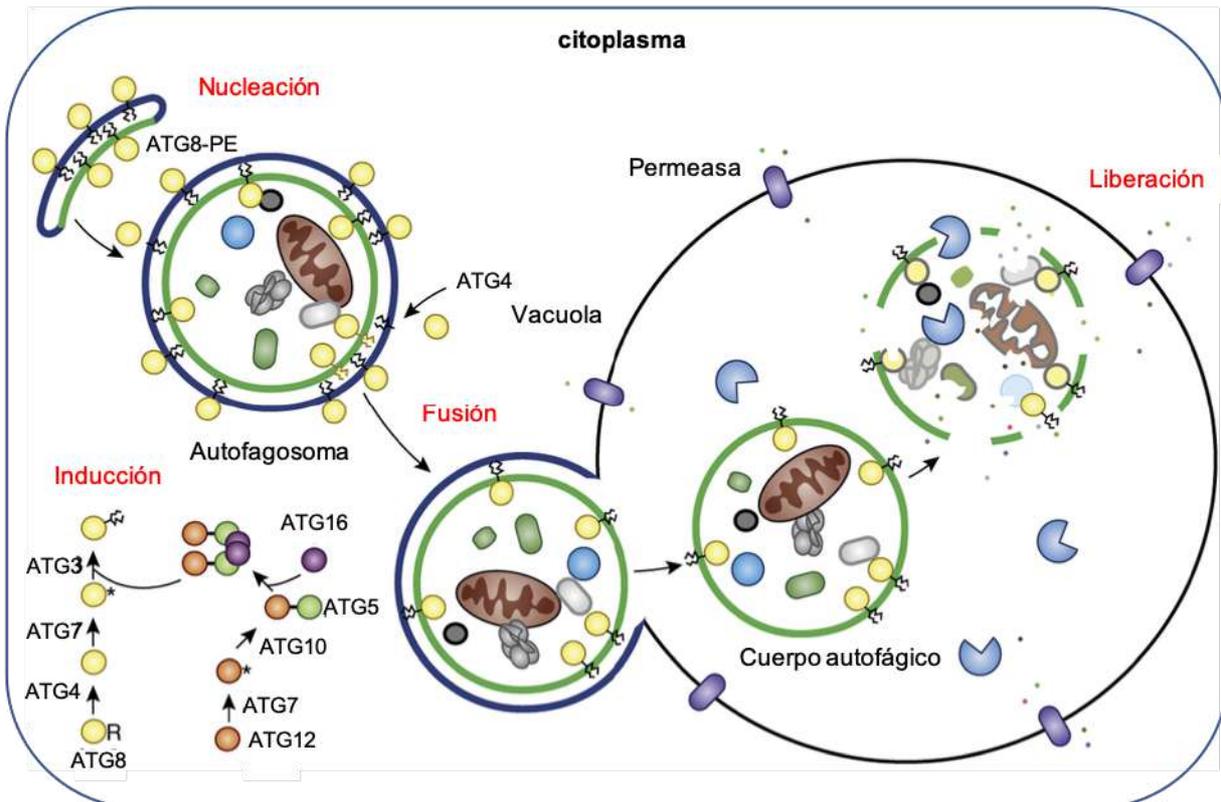


Figura 3. Proceso de autofagia, localización y funciones de las proteínas ATG. Este proceso comienza con la nucleación del fagóforo, donde se inicia la formación de la membrana del autofagosoma. Este paso, así como su expansión, requiere varias proteínas ATG, de las cuales, una de ellas es la proteína ATG8. Una vez desarrollado el fagóforo, se completa la doble membrana del autofagosoma. El autofagosoma se fusiona con la vacuola liberando su contenido envuelto en la membrana interna denominada cuerpo autofágico. Este cuerpo autofágico es posteriormente degradado y reciclado por la célula. La proteína ATG8 está presente en ambas membranas del autofagosoma, externa e interna, por lo que se emplea como un marcador estable a lo largo de todo el proceso de autofagia. Adaptado de Klionsky and Schulman, 2014.

La conjugación de ATG8 con PE es catalizada por la acción secuencial y coordinada de ATG4 (una cisteína proteasa), ATG7 (enzima de activación tipo E1), ATG3 (enzima de activación tipo E2) y el complejo ATG12-ATG5-ATG16 (complejo con actividad ligasa tipo E3) (Figura 4). Todas estas proteínas se agrupan en el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) para iniciar la autofagia. En primer lugar, la proteasa ATG4 corta el residuo conservado Gly de la proteína ATG8 en su extremo C terminal. ATG8 procesada se activa mediante la acción de la enzima ATG7, que la transfiere a la enzima ATG3 para que finalmente la conjugue con PE en la Gly ahora expuesta en una reacción que requiere la intervención del complejo ATG12-ATG5-ATG16 (Mizushima et al., 2011; Feng et al., 2014). La proteína ATG8 se puede reciclar de la membrana del autofagosoma mediante la actividad delipidante de ATG4 que puede cortar el enlace amida entre el residuo de Gly y el PE (Kirisako et al., 2000). De hecho, la proteasa ATG4 presenta ambas actividades: lipidación y delipidación, y la regulación de estas dos actividades antagónicas es esencial para el correcto funcionamiento de la

autofagia (Scherz-Shouval et al., 2007; Nair et al., 2012; Nakatogawa et al., 2012; Yu et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2014, 2016, 2021; Fracchiolla et al., 2017).

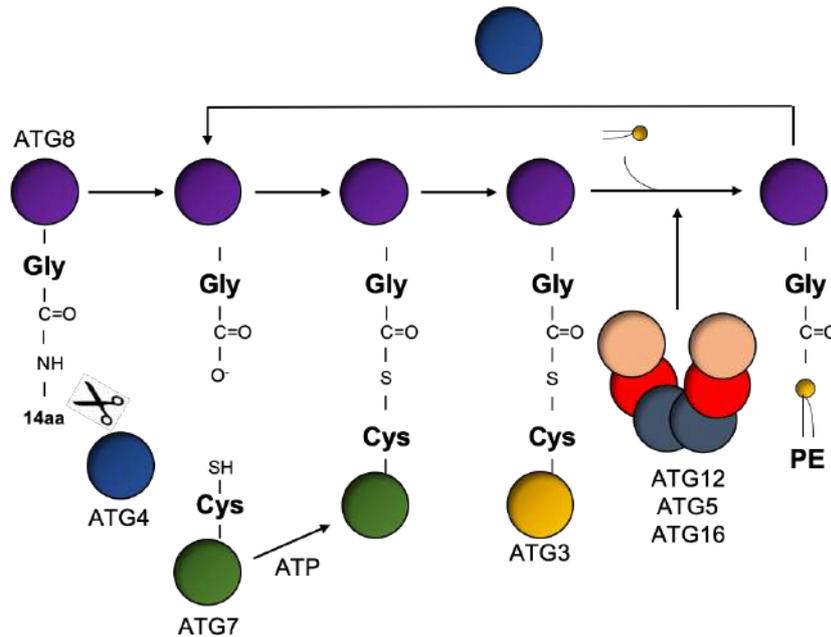


Figura 4. Sistema de lipídación de la proteína ATG8. La proteína ATG8 es procesada por la proteasa ATG4 en la Gly altamente conservada situada en su extremo C-terminal, dejando expuesto este residuo para que sea activado por la enzima ATG7 (tipo E1) utilizando ATP, formando un tioéster intermediario catalítico con su Cys. Posteriormente, ATG8 se transfiere a la enzima ATG3 (tipo E2), la cual conjuga ATG8 mediante un enlace amida al lípido fosfatidiletanolamina (PE). Esta unión es potenciada por el complejo ATG12-ATG5-ATG16 (complejo con actividad ligasa tipo E3). Finalmente, ATG4 puede separar la proteína ATG8 del fosfatidiletanolamina mediante su actividad delipidante, liberando la proteína ATG8 de la membrana del autofagosoma. Adaptado de Pérez-Pérez et al, 2021.

1.2.1. Marcadores de autofagia

1.2.1.1. Lipidación de la proteína ATG8

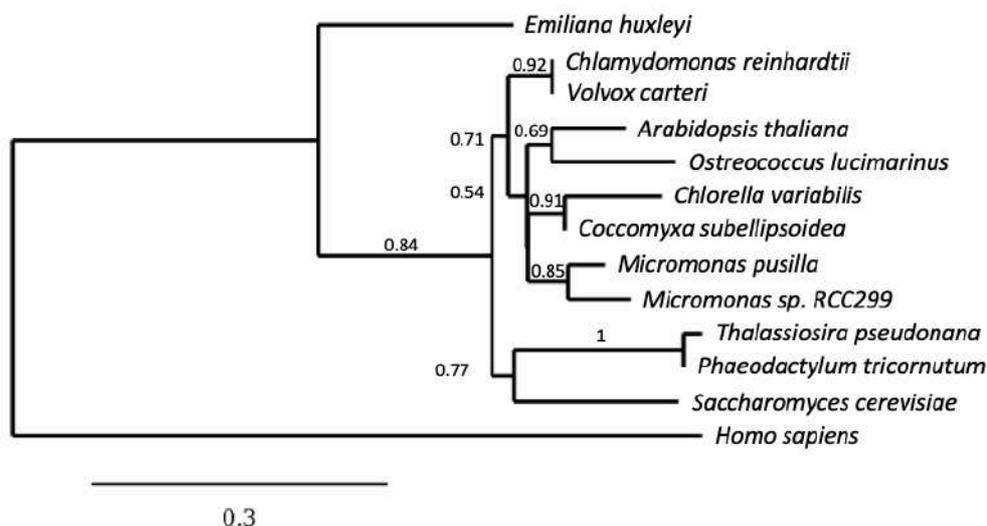
Como se ha mencionado anteriormente, la proteína ATG8 se asocia con ambas membranas del autofagosoma, la interna y la externa, a través de un enlace covalente con PE en un proceso conocido como conjugación o lipídación de ATG8. Por este motivo, la detección de ATG8 lipídada (ATG8-PE) se ha utilizado para monitorizar la autofagia en muchos organismos (Klionsky et al., 2021). El genoma de *Chlamydomonas* contiene un único gen *ATG8* que codifica una proteína de aproximadamente 15 kDa con una región C terminal de 14 aminoácidos después del residuo altamente conservado de Gly (Díaz-Troya et al., 2008a; Pérez-Pérez et al., 2010) (Figura 5). En nuestro laboratorio, se ha generado un anticuerpo específico que reconoce la proteína ATG8 de *Chlamydomonas* libre y lipídada, y ambas isoformas pueden ser claramente distinguidas mediante análisis por western blot (Pérez-Pérez et al., 2010). En condiciones óptimas de crecimiento se detecta

ATG8 libre como una única banda de aproximadamente 15 kDa. Por otro lado, la autofagia se activa cuando las células de *Chlamydomonas* se exponen a diferentes condiciones de estrés y en estas condiciones aumenta la abundancia de la proteína ATG8 y se detecta una banda de menor masa molecular correspondiente a la proteína ATG8-PE (Pérez-Pérez et al., 2010). Esta técnica se ha utilizado para investigar la autofagia en una amplia variedad de condiciones de estrés como la limitación de nutrientes, la inhibición de la ruta de señalización TOR, la presencia de metales en el medio, el estrés oxidativo o el estrés en el retículo (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012b; Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Couso et al., 2018). Además, el anticuerpo frente a la proteína ATG8 de *Chlamydomonas* reconoce proteínas de otros organismos fotosintéticos como la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (Pérez-Pérez et al., 2010) y se ha utilizado para monitorizar la autofagia en plantas (Álvarez et al., 2012; Laureano-Marín et al., 2016; Bao et al., 2020).

A

	10	20	30	40	50	60	
<i>C. reinhardtii</i>	MVGSRPPTFKQEHS	LDKRKAEEAAR	IKEKYPDRI	PVIVEKAER	-SDIPDIDKKKYLVPS	SDL	
<i>V. carteri</i>	MVNTRPLTFKQEHS	IDKRKAEEAAR	IKEKYPDRI	PVIVEKAER	-SDIPDIDKKKYLVPS	SDL	
<i>C. variabilis</i>	--MARTKGFKEEHP	FEKRQAEAAR	IREKYPDRIP	PVIVERADK	-TNIPDIDKKKYLV	PADL	
<i>C. subellipsoidea</i>	-MTARLKSFKEEHP	LEKRQAEAAR	TRDKYPDRIP	PVIVEKAEK	-SDIPDIDKKKYLV	PADL	
<i>M. pusilla</i>	-MSARS-TFKQEHAL	DKRQAEAQR	TRDKYPDRIP	PVIVEKAEK	-SDIPDLDDKKKYLV	PADL	
<i>M. RCC299</i>	-MSARS-TFKQEHP	LDKRQAEAQR	TRTKYPERIP	PVIVERAEK	-SDIPDLDDKKKYLV	PADL	
<i>O. lucimarinus</i>	-MSAKF-AFKQEHP	DKRASESAR	IRGKYNDRVP	PVIVERAEK	-SDAETLDDKKKYLV	PADL	
<i>S. cerevisiae</i>	---MKS-TFKSEYP	FEKRKAESER	IADRFKNRIP	PVICEKAEK	-SDIPEIDKRKYLV	PADL	
<i>T. pseudonana</i>	--MSKS--FKEEHP	LEKRKSEAER	IRAKYPDRVP	PVICEKADR	-SDIPDIDKKKYLV	PADL	
<i>P. tricornutum</i>	--MSKS--FKEEHP	LEKRKSEAER	IRAKYPDRVP	PVICEKADR	-SDIPDIDKKKYLV	PADL	
<i>E. huxleyi</i>	---MS--YRDAHS	FESRRQAL	IRAKHPDRIP	PVIVEKRPRDAT	LELIDKKKFLV	PADL	
<i>A. thaliana</i>	---MKS--FKEQY	TLDERLAESRE	IIAKYPTRIP	PVIAEKYCK	-TDLPAIEKKKFLV	PRDM	
<i>H. sapiens</i>	-MPSEK-TFKQRR	TFEQRVEDVRL	IREQHP	TKIPV	IIERYKGEKQ	LEVLDDTKFLV	PDHV
	70	80	90	100	110	120	
<i>C. reinhardtii</i>	TVGQFVYVIRKRI	KLSPKAI	IFVKN-VLP	PPTAALMSSI	YEDHKDEDGFLY	IITYSGENT	
<i>V. carteri</i>	TVGQFVYVIRKRI	KLSPKAI	IFVKN-VLP	PPTAALMSSI	YEDHKDEDGFLY	IITYSGENT	
<i>C. variabilis</i>	TVGQFVYVIRKR	IRVSPEQAI	FMFVRN-VL	PPTAALMADV	YADHKDEDN	FLYIITYSGENT	
<i>C. subellipsoidea</i>	TVGQFVYVIRKRI	KVSPEKAI	FMFVKN-VL	PPTAALMSDV	YEDHKDEDGFLY	IITYSGENT	
<i>M. pusilla</i>	TVGQFVYVIRKRI	KLSPKAI	FVFN-VLP	PPTAALMSAV	YDDHRDDGFLY	IAYSSENT	
<i>M. RCC299</i>	TVGQFVYVIRKRI	KLSPKAI	FVFN-VL	PPTAALMSSI	YEEHKEEDGFLY	IAYSSENT	
<i>O. lucimarinus</i>	TVGQFVYVIRKRI	KLSPKAI	FVFN-VL	PPTAALMSAV	YEEHKEEDGFLY	VITYSGENT	
<i>S. cerevisiae</i>	TVGQFVYVIRKR	IMLPPEKAI	IFVND-TL	PPTAALMSAI	YQEHKDKDGFLY	VITYSGENT	
<i>T. pseudonana</i>	TVGQFHYVIRKRI	QLAPEKAL	FLFCSN-TI	PPNAALMSTV	YEEQKDEDGFLY	VQYSGEST	
<i>P. tricornutum</i>	TVGQFHYVIRKRI	QLAPEKAL	FLFCSN-TI	PPNAALMSTV	YEEQKDEDGFLY	IQYSGEST	
<i>E. huxleyi</i>	TVGQFVYVIRKR	IALKPEQAI	FLFVSKGTL	PPTVATCQAV	YDSHKDEDGFLY	MTYSGENT	
<i>A. thaliana</i>	SVGQFIYILSAR	LHLSPGKAL	FVFN-TLP	QTAALMSV	YESYKDDDGFLY	MCYSSEKT	
<i>H. sapiens</i>	NMSELIKI	IRRRQLNANQ	AFLLVNGH	SMVSVSTPI	SEVYSEKDEDGFLY	MYASQET	
	130	140					
<i>C. reinhardtii</i>	FG----	AGE-QLQLPVEELAL--					
<i>V. carteri</i>	FGGVAAL	GEGEEQEGNEQLLLQG					
<i>C. variabilis</i>	FG-----						
<i>C. subellipsoidea</i>	FGC-----						
<i>M. pusilla</i>	FGS----	ALD-LDLIALEEDE---					
<i>M. RCC299</i>	FG-----	GLEETA---					
<i>O. lucimarinus</i>	FGG---	E---RASDEDEASVAR					
<i>S. cerevisiae</i>	FG-----	R-----					
<i>T. pseudonana</i>	FGG-----	EELELVEE--					
<i>P. tricornutum</i>	FGD-----	VDAEEEE---					
<i>E. huxleyi</i>	FG-----	TV-----					
<i>A. thaliana</i>	FG-----						
<i>H. sapiens</i>	FG-----	MKLSV-----					

B



C

Organismo	Número de acceso	Clado
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre16.g689650.t1.2	Chlorophyta
<i>Chlorella variabilis</i>	EFN52105.1	Chlorophyta
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	EIE26533	Chlorophyta
<i>Volvox carteri</i>	Vocar.0023s0118.1	Chlorophyta
<i>Micromonas pusilla</i>	EEH53010	Chlorophyta
<i>Micromonas sp. RCC299</i>	ACO68142	Chlorophyta
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	ABO96768	Chlorophyta
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G15580.1	Streptophyta
<i>Emiliana huxleyi</i>	BK008760	Chromalveolata
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	EEC43371	Chromalveolata
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	YBL078C	Chromalveolata
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YBL078C	Ascomycota
<i>Homo sapiens</i>	Q658J6	Metazoa

Figura 5. Conservación de residuos de aminoácidos que son esenciales para la función de la proteína ATG8. A. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ATG8 de algas verdes, cromoalveolados, plantas, levaduras y humanos. La glicina (G) altamente conservada y marcada en rojo, indica el sitio de procesamiento por la proteasa ATG4. Los residuos de aminoácidos idénticos o similares en cada secuencia están sombreados en gris. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el software *ClustalW* versión 2.0 (www.clustalW.com). B. El árbol filogenético se llevó a cabo mediante el software *Phylogeny* (www.phylogeny.fr). C. Tabla con los números de acceso de las proteínas ATG8 utilizadas. Las isoformas empleadas en *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana* son MAP1LC3A y APGH8 respectivamente.

1.2.1.2. Flujo autofágico

El flujo de material celular a través de todo el proceso se conoce como flujo autofágico y refleja la degradación debida a la autofagia dentro de la célula (Klionsky et al., 2021). La droga Concanamicina A (ConcA) es un inhibidor de la ATPasa vacuolar que bloquea el flujo de protones entre la vacuola y el citoplasma, provocando un aumento en el pH vacuolar e impidiendo así la degradación del material celular por las proteasas vacuolares (Huss and Wieczorek, 2009). La detección de ATG8 lipidada es un buen marcador de autofagia, pero su combinación con medidas de flujo autofágico permiten una monitorización más dinámica del proceso (Couso et al., 2018). En *Arabidopsis* existen 9 ortólogos de la proteína ATG8, por ello, la detección de ATG8-PE mediante este ensayo es compleja en plantas superiores comparada con *Chlamydomonas* (Doelling et al., 2002; Chung et al., 2009).

En nuestro laboratorio se ha utilizado la degradación de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37 como marcadores del flujo autofágico. Se ha observado que la abundancia de estas proteínas disminuye en condiciones limitantes tanto de nitrógeno como de fósforo. De hecho, el tratamiento con la droga ConcA unido a estas condiciones de limitación de nutrientes provoca la acumulación de estas proteínas, inhibiendo su degradación e indicando que se degradan vía autofagia (Couso et al., 2018). Por ello, la degradación de RPS6 y RPL37 es un buen indicador del flujo autofágico en *Chlamydomonas* como también se ha descrito para NBR1 en plantas (Svenning et al., 2011; Zientara-Rytter et al., 2011).

1.2.1.3. Localización celular de la proteína ATG8

Se ha analizado la distribución de ATG8 mediante microscopia de fluorescencia en diferentes organismos, utilizando etiquetas fluorescentes unidas al extremo N terminal de esta proteína o anticuerpos específicos (Klionsky et al., 2021). El anticuerpo frente a la proteína ATG8 generado en nuestro laboratorio permite analizar la distribución celular de dicha proteína en *Chlamydomonas* (Pérez-Pérez et al., 2010). De hecho, se han realizado varios estudios de microscopía de fluorescencia para monitorizar el progreso de autofagia en distintas condiciones de estrés en *Chlamydomonas* (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012a, 2016; Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Ramundo et al., 2014; Couso et al., 2018). En células de *Chlamydomonas* cultivadas en medio rico, la proteína ATG8 se detecta como señal débil en puntos discretos y de manera homogénea en la célula. Sin embargo, en células de *Chlamydomonas* en distintas condiciones de estrés, la intensidad de la señal correspondiente a ATG8 aumenta notablemente (Pérez-Pérez et al., 2010).

1.2.1.4. Activación transcripcional de los genes *ATG*

Como se ha descrito anteriormente, tanto la abundancia como la lipidación de la proteína ATG8 aumentan cuando se activa la autofagia en *Chlamydomonas*. Se ha descrito también que la inducción de la autofagia por diferentes condiciones de estrés se correlaciona con un aumento en la transcripción del gen *ATG8* en *Chlamydomonas* (Pérez-Martín et al., 2014, 2015), sugiriendo que los niveles elevados de la proteína ATG8 se deben a un aumento en la transcripción de su gen. En *Chlamydomonas* se ha observado que, en condiciones de estrés como el estrés en el retículo, la toxicidad a metales, el estrés oxidativo o el tratamiento con rapamicina activan la expresión del gen *ATG8* (Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Ramundo et al., 2014).

1.2.2. Autofagia en organismos fotosintéticos

La maquinaria de la autofagia está bien conservada en el reino de plantas, aunque se han descrito algunas diferencias entre plantas superiores y algas. Las plantas superiores como *Arabidopsis*, maíz (*Zea mays*), o arroz (*Oryza sativa*) presentan pequeñas o grandes familias para cada uno de los genes *ATG* del núcleo de la maquinaria de la autofagia (Bassham et al., 2006; Chung et al., 2009; Avin-Wittenberg et al., 2018). Por ejemplo, en *Arabidopsis* existen 9 genes que codifican proteínas ATG8 mientras que en maíz esta familia está constituida por 5 miembros (Michaeli et al., 2016; Avin-Wittenberg et al., 2018; Wang et al., 2018). Probablemente, esta duplicación de genes a lo largo de la evolución se deba a una especialización en las funciones que desempeñan. Sin embargo, todos los genes *ATG* duplicados en plantas superiores, aparecen en copia simple en el genoma de varias especies de algas, incluyendo el alga verde modelo *Chlamydomonas* (Díaz-Troya et al., 2008a; Pérez-Pérez and Crespo, 2014; Shemi et al., 2015; Avin-Wittenberg et al., 2018).

La disponibilidad de colecciones de mutantes en plantas y las técnicas establecidas en el silenciamiento de genes han sido fundamentales para entender el papel de la autofagia en la respuesta a estrés en plantas. La caracterización de mutantes deficientes en genes de la maquinaria central de la autofagia como *ATG3*, *ATG4*, *ATG5*, *ATG7* o *ATG10* en *Arabidopsis* revelaron que la autofagia juega un papel importante en distintas condiciones de crecimiento como la limitación de nutrientes (carbono o nitrógeno), diferentes estreses abióticos o la infección de patógenos (Yoshimoto et al., 2004a; Ishida et al., 2008; Álvarez et al., 2012; Li and Vierstra, 2012; Liu and Bassham, 2012; Farmer et al., 2013; Kim et al., 2013; Shibata et al., 2013; Avila-Ospina et al., 2014; Laureano-Marín et al., 2016, 2020; Michaeli et al., 2016; Minina et al., 2018).

En microalgas, concretamente en *Chlamydomonas*, se ha estudiado la autofagia como respuesta a estrés provocada por diferentes condiciones. La autofagia se activa también en algas

sometidas a limitación de carbono, nitrógeno y fósforo, estrés oxidativo, toxicidad por metales, estrés en el retículo endoplasmático, tratamiento con metil viológeno, norflurazón, cerulenina o infección vírica (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012b; Davey et al., 2014; Goodenough et al., 2014; Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Schatz et al., 2014; Couso et al., 2018; Heredia-Martínez et al., 2018).

1.2.3. Autofagia selectiva

La degradación de componentes celulares vía autofagia es un proceso altamente selectivo dependiendo de la naturaleza del *cargo* que se envía a la vacuola y del daño sufrido por la célula. Las proteínas ATG centrales que median el proceso de autofagia no selectiva son también las responsables de llevar a cabo la autofagia selectiva (Masclaux-Daubresse et al., 2017; Soto-Burgos and Bassham, 2017; Marshall and Vierstra, 2018; Wang et al., 2018; Zess et al., 2019). En la autofagia selectiva el secuestro del *cargo* específico en el autofagosoma tiene lugar mediante el reclutamiento de receptores y adaptadores (conocidos como receptores autofágicos) (Figura 6). Los receptores autofágicos son proteínas capaces de interactuar tanto con el *cargo* de forma directa o indirecta como con la proteína ATG8 a través de un dominio específico (WXXL), denominado región de interacción con LC3 (LIR, LC3-*interacting region*) o motivo de interacción con ATG8 (AIM, ATG8 *interacting motif*) (Noda et al., 2008; Jacomin et al., 2016). Se han caracterizado los procesos que median la degradación específica de distintos componentes celulares en distintas condiciones fisiológicas que activan la autofagia selectiva. Entre otros, se han descrito la pexofagia o degradación selectiva de peroxisomas, la ribofagia o degradación selectiva de ribosomas, la degradación de proteínas mal plegadas y agregadas o la degradación del retículo endoplasmático (Isakson et al., 2013; Masclaux-Daubresse et al., 2017; Avin-Wittenberg, 2019; Stephani and Dagdas, 2020).

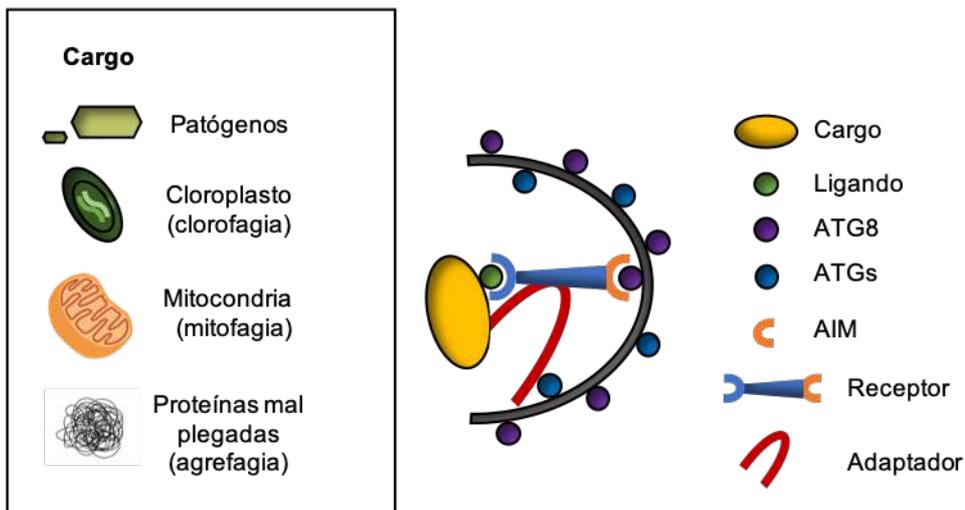


Figura 6. Modelo del proceso de autofagia selectiva. La selección del *cargo* depende del tipo de estrés. La proteína ATG8 se une al *cargo* que se va a degradar en la vacuola por la secuencia de interacción con ATG8 (AIM). Existen receptores y adaptadores específicos para cada *cargo* que junto al resto de proteínas ATG facilitan la formación del autofagosoma. Adaptado de Isakson et al., 2013; Masclaux-Daubresse et al., 2017). Adaptado de Isakson et al., 2013.

La degradación específica de la mitocondria mediante autofagia selectiva fue la primera en ser descrita en un proceso conocido como mitofagia (Kissová et al., 2004; Lemasters, 2005). Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la mitofagia se han identificado en levaduras, donde la proteína ATG32 parece tener un papel importante en el reconocimiento de mitocondrias dañadas (Kanki et al., 2009). En mamíferos, este proceso lo lleva a cabo la proteína Bcl2L13, un homólogo de la proteína ATG32 de levaduras (Murakawa et al., 2015). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos y levaduras, no se han caracterizado aún los receptores y ligandos que median la mitofagia en organismos fotosintéticos (Suzuki et al., 2010; Watanabe et al., 2010; Nakamura et al., 2021).

Por otra parte, en los organismos fotosintéticos la presencia de cloroplastos indica una diferencia respecto a otros organismos. Estos presentan múltiples mecanismos para reparar el aparato fotosintético en el cloroplasto, incluyendo el intercambio de proteínas fotosintéticas dañadas por otras reparadas (Zhang et al., 2016; Nishimura et al., 2017). Estos mecanismos de reparación son esenciales para la protección del cloroplasto, aunque se ha demostrado que cloroplastos dañados por el efecto de la luz son eliminados digestión vacuolar a través de un proceso de autofagia denominado clorofagia (Izumi et al., 2017; Nakamura et al., 2018). Existen estudios donde se ha descrito la degradación de este orgánulo mediante procesos dependientes de vacuola a través de la autofagia en distintas condiciones de estrés como la exposición a alta luz o luz ultravioleta (Ishida et al., 2008; Izumi et al., 2017). En estos estudios se han sometido células del mesófilo de la planta modelo *Arabidopsis* a altas intensidades de luz ($2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y se han observado cloroplastos completos dentro de la vacuola central (Izumi et al., 2017). De la misma forma, se han observado vesículas que contienen material cloroplastídico, mayoritariamente Rubisco (RCB), que son dependientes de proteínas ATG (Wolfe et al., 1997; Park et al., 1999; Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009; Izumi et al., 2010; Nakamura et al., 2018). Por último, se ha descrito en plantas superiores bajo distintas condiciones de estrés como luz UVB, la presencia de cloroplastos con deformaciones e invaginaciones que corresponden a vesículas dependientes de ATG8 (Wolfe et al., 1997; Park et al., 1999). Este proceso de clorofagia ha sido descrito en plantas superiores, pero no en algas unicelulares como *Chlamydomonas*.

1.2.4. Regulación de la autofagia

1.2.4.1. Ruta de señalización TOR

TOR (*Target of Rapamycin*), una Ser/Thr quinasa descrita por primera vez en levaduras, es una proteína de alto peso molecular, de aproximadamente 250 kDa, que forma dos complejos celulares estructural y funcionalmente distintos, denominados TORC1 y TORC2 (Loewith et al., 2002; Díaz-Troya et al., 2008a). La quinasa TOR está altamente conservada y regula el crecimiento y la división celular en todos los eucariotas. En levaduras, el complejo TORC1 está formado por las proteínas TOR, Raptor y LST8. TORC1 es sensible a la droga rapamicina, una molécula que inhibe la actividad del complejo mediante su unión a la proteína FKBP12 (Crespo and Hall, 2002; Loewith et al., 2002). En levaduras también se han identificado dos genes que codifican la quinasa TOR: *TOR1* y *TOR2*, relacionados cada uno de ellos con los complejos TORC1 y TORC2 respectivamente. En mamíferos ambos complejos están conservados, pero sólo TORC1 es sensible a rapamicina (Crespo and Hall, 2002; Loewith et al., 2002). La ruta de señalización TOR se encuentra también conservada en organismos fotosintéticos, desde plantas superiores hasta algas, regulando el crecimiento celular (Díaz-Troya et al., 2008a). En plantas, *Arabidopsis* presenta en su genoma un único gen *AtTOR*, aunque al contrario de lo que sucede en algas, la proteína FKBP12 no se une a la rapamicina (Xu et al., 1998; Menand et al., 2002; Anderson et al., 2005; Díaz-Troya et al., 2008a; Liu and Bassham, 2010). Por otra parte, en el genoma de *Chlamydomonas* existe un único gen *CrTOR*, y se ha demostrado que el complejo TORC1 puede ser inhibido por rapamicina a través de su interacción con la proteína FKBP12 (Crespo et al., 2005). También se ha demostrado en este organismo que TOR y LST8 forman parte del complejo TORC1 y está asociado a membranas del retículo endoplasmático (Díaz-Troya et al., 2008b). Igualmente, este complejo promueve la síntesis de proteínas en *Chlamydomonas* (Díaz-Troya et al., 2011) y, se ha relacionado con el crecimiento celular en base a la disponibilidad de fósforo a través de la proteína LST8 (Couso et al., 2020). Por último, se ha descrito que la asimilación fotosintética de CO₂ activa TOR a través de la síntesis de aminoácidos clave en *Chlamydomonas* (Mallén-Ponce et al., 2022).

En condiciones de suficiencia de nutrientes TORC1 se encuentra activo e inhibe la autofagia (Figura 7). En cambio, en condiciones de limitación de nutrientes TORC1 se inactiva, lo que permite la inducción de la autofagia (Kamada et al., 2000). Al igual que ocurre en mamíferos, en levaduras y plantas TORC1 fosforila a la proteína ATG13 en presencia de nutrientes, lo que desestabiliza al complejo ATG1/ATG13 impidiendo la activación de la autofagia (Figura 7) (Inoue and Klionsky, 2010; Jung et al., 2010). La Ser/Thr quinasa ATG1 es un componente esencial de la autofagia en todos los sistemas, y su actividad catalítica regula este proceso en su fase inicial (Fujioka et al., 2010; Mizushima et al., 2010). Originalmente descubierta en levaduras (Tsukada and Ohsumi, 1993b), ATG1 está conservada a lo largo de la evolución, y se han descubierto ortólogos en un rango

considerable de organismos eucariotas (Meijer et al., 2007). La actividad de la proteína ATG1 ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que esta proteína se asocia a otras proteínas ATG reguladoras como ATG13, que regula positivamente la actividad quinasa ATG1 (Kamada et al., 2000; Hosokawa et al., 2009). En levaduras la actividad de este complejo ATG1/ATG13 está regulado tanto por TORC1 como por otras rutas de señalización nutricional como PKA y SNF1/AMPK (Mizushima et al., 2010; Alers et al., 2012).

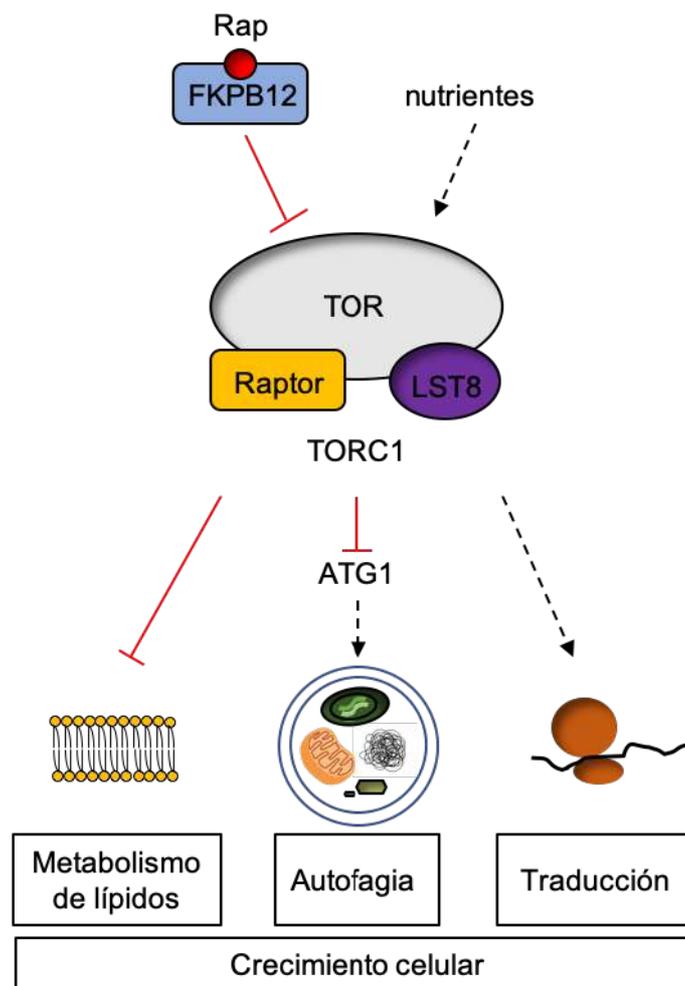


Figura 7. Modelo de la señalización de la ruta TOR en *Chlamydomonas*. El complejo TORC1 sensible a rapamicina (Rap) está compuesto por las proteínas TOR, Raptor y LST8 y está conservado en *Chlamydomonas*. TORC1 controla el crecimiento celular mediante la activación de procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y la inhibición de procesos catabólicos como la autofagia. Las flechas negras indican una relación de inducción mientras las líneas rojas indican inhibición. Figura adaptada de Díaz-Troya et al., 2008a.

El complejo quinasa ATG1/ATG13, así como la ruta de señalización TORC1 se ha conservado en *Arabidopsis* (Robaglia et al., 2012). Se ha demostrado que la ruta de señalización TORC1 regula negativamente la autofagia en plantas y algas. La autofagia se activa en *Chlamydomonas* por el

tratamiento con rapamicina que inhibe la función de la quinasa TOR (Liu and Bassham, 2010; Pérez-Pérez et al., 2010). Estos descubrimientos destacan el importante papel que ejerce TOR en la regulación de la autofagia en organismos fotosintéticos como *Chlamydomonas*.

Se ha descrito que TOR no es el único regulador de la autofagia en organismos fotosintéticos. El complejo que forma la quinasa SnRK1 (*SNF1-related kinase*) es un regulador central de la división celular en respuesta a estrés que al igual que TOR también está conservado en plantas. La quinasa SNF1 (*sucrose non-fermenting 1*) se identificó originalmente en levaduras como un regulador central del metabolismo conservado en otros organismos cuyos ortólogos en mamíferos (AMPK) y en plantas (SnRK1) han sido caracterizados en detalle (Liu and Bassham, 2012; Soto-Burgos and Bassham, 2017; van Leene et al., 2019; Mugume et al., 2020). A pesar de los progresos obtenidos en entender el papel de TOR y SnRK1 en la regulación de la autofagia, aún quedan por identificar nuevos reguladores de la autofagia y señalizadores de estas rutas. Se ha demostrado que algunos estreses inducen la autofagia independientemente de las rutas TOR y SnRK1. El análisis de los sustratos de TOR y SnRK1 podrían permitir la identificación de proteínas involucradas en la regulación de la autofagia en organismos fotosintéticos (Liu and Bassham, 2012; Nukarinen et al., 2016; Soto-Burgos and Bassham, 2017; van Leene et al., 2019; Mugume et al., 2020).

1.2.4.2. Estrés oxidativo

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula, así como el proceso de autofagia están relacionados con la señalización y la adaptación celular a distintas condiciones de estrés. Se ha estudiado que algunos tipos de ROS ejercen un papel regulador en el control de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011; Lee et al., 2011; Pérez-Pérez et al., 2012b; Sciarretta et al., 2014). Niveles excesivos de ROS pueden causar un daño irreversible en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, activando distintas rutas de señalización (Apel and Hirt, 2004). Además, bajos niveles de ROS participan en mecanismos de supervivencia celular actuando como segundos mensajeros que transmiten el estrés inicial permitiendo a las células reaccionar y adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Mittler et al., 2011).

Entre los distintos compartimentos celulares, se puede acumular ROS en gran medida en la mitocondria, en el peroxisoma o en la membrana plasmática mediante las oxidasas NADPH (NOX) (Figura 8). Además, en los organismos fotosintéticos el cloroplasto es la principal fuente celular de ROS. Concretamente, el anión superóxido (O_2^-) y el singlete de oxígeno (1O_2) se generan durante la fotosíntesis en la cadena de transporte electrónica y se acumulan en el interior del cloroplasto pudiendo causar un daño oxidativo. De hecho, el anión superóxido se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la especie ROS más estable y más abundante en las células, que es

capaz de difundir entre las membranas cloroplastícas. El singlete de oxígeno se genera mayoritariamente en el PSII, pero tiene una vida media corta, aunque una alta reactividad. De hecho, se ha observado que el singlete de oxígeno puede actuar como molécula señalizadora entre las membranas tilacoidales. Se ha demostrado que, a pesar de sus efectos tóxicos, el singlete de oxígeno es capaz de iniciar cascadas de señalización relacionadas con la regulación de la síntesis de carotenoides, la muerte celular programada, la aclimatación celular, o la expresión de genes específicos (Wagner et al., 2004; Krieger-Liszkay, 2005; Fischer et al., 2007; Ledford et al., 2007; Ramel et al., 2012; Laureano-Marín et al., 2016).

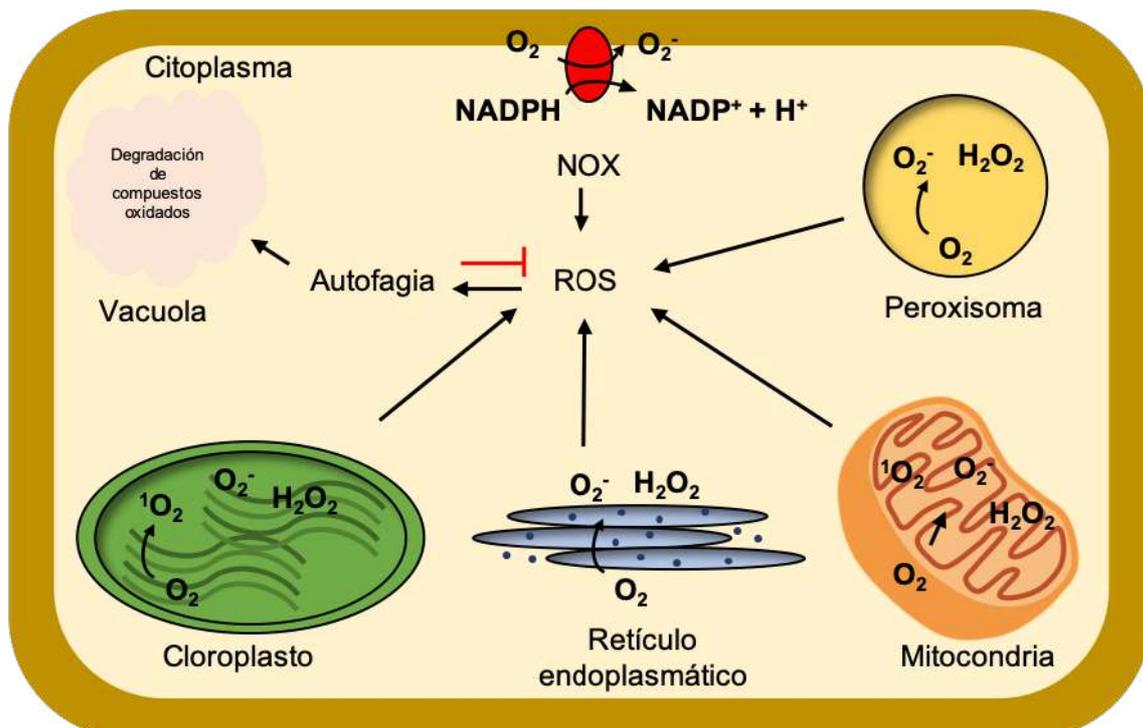


Figura 8. Modelo de la regulación por ROS de la autofagia en plantas y algas. ROS se genera en la membrana plasmática mediante NADPH oxidoreductasa (NOX) y en diferentes orgánulos como el cloroplasto, la mitocondria, el peroxisoma o el retículo endoplasmático. El exceso de ROS induce la autofagia, la cual degrada el material celular dañado e incluso la fuente de ROS mediante autofagia selectiva para disminuir el daño oxidativo. Adaptado de Pérez-Pérez et al., 2012b.

Por otra parte, existe una conexión entre los niveles de ROS y la activación de la autofagia en microalgas (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012a, 2012b, 2014, 2021; Pérez-Martín et al., 2015). Se ha descrito que ROS regula algunas proteínas ATG (Scherz-Shouval et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2014, 2016, 2021). Concretamente, se ha demostrado que tanto la actividad lipídica como la actividad delipidante de la proteasa ATG4, esencial en el proceso de lipídación de la proteína ATG8 y la formación del autofagosoma, está regulada mediante el estado redox de la célula. De hecho, en levaduras y microalgas se ha descrito que la actividad de la proteína ATG4 está regulada por

procesos de oxido-reducción. En humanos, la actividad proteolítica de ATG4A y ATG4B es inhibida por la oxidación del residuo Cys-81, el cual interfiere en la actividad del sitio catalítico Cys-77 (Scherz-Shouval et al., 2007). La actividad proteasa de ATG4 en levaduras también está sujeta a una regulación mediante ROS, aunque los mecanismos moleculares difieren comparado con la regulación en humanos ya que el residuo Cys-81 no está conservado en otros eucariotas como plantas y algas (Woo et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2021). En levaduras, esta regulación se debe a la formación de un puente disulfuro entre los residuos Cys-338 y Cys-394 (Pérez-Pérez et al., 2014). En plantas también se ha descrito que la actividad de ATG4A y ATG4B es inhibida por oxidación (Woo et al., 2014). Por último, se ha demostrado que la proteasa ATG4 presenta una cisteína reguladora, la cual es reducida mediante tioredoxinas. Cuando el residuo de la cisteína se reduce la proteasa ATG4 está activa y es capaz de procesar a la proteína ATG8. Por el contrario, en presencia de ROS, la cisteína reguladora se oxida y forma puentes disulfuro inactivando a la proteasa ATG4. Si el daño oxidativo persiste, la proteasa ATG4 puede formar dímeros y agregados impidiendo su correcto funcionamiento y ejerciendo así una regulación continua entre el estado redox en la célula y la actividad de la autofagia (Pérez-Pérez et al., 2016).

1.3. Cloroplasto

1.3.1. Estructura del cloroplasto

El cloroplasto es un orgánulo que presentan los organismos fotosintéticos y proviene de la endosimbiosis de un protista heterótrofo y una bacteria fotosintética oxigénica, probablemente una cianobacteria. Las plantas superiores presentan varios cloroplastos por célula, mientras que en *Chlamydomonas* y otras algas unicelulares solo existe un único cloroplasto que ocupa gran parte del citoplasma celular (Adl et al., 2005; Harris et al., 2008).

En *Chlamydomonas*, el cloroplasto está rodeado por dos membranas lipídicas paralelas con un espacio intermembrana, siendo el lípido monogalactosil diacilglicerol (MGDG) el mayoritario en estas estructuras (Gounaris and Barber, 1983; Moellering and Benning, 2011). La membrana externa presenta protuberancias desde donde se desarrolla el retículo endoplasmático o los dictiosomas. Dentro del cloroplasto se encuentran los tilacoides, compartimentos membranosos que se distribuyen por la mayor parte del cloroplasto y suelen aparecer agrupados. Estos compartimentos presentan forma de discos o elipse que en plantas superiores se agrupan en granas mientras que en *Chlamydomonas* se distribuyen formando una red interconectada. En estas membranas se encuentran los fotosistemas y gran parte de la cadena transportadora de electrones (Sager and Palade, 1957; Engel et al., 2015). Los tilacoides están embebidos en una matriz continua, el estroma, donde se localizan las proteínas ribosomales o ácidos nucleicos. También se encuentran en el

cloroplasto los gránulos de almidón, grandes estructuras de reserva de carbono que rodean al pirenoide. El pirenoide es una estructura esférica dentro de la cual se concentran las enzimas Rubisco y anhidrasa carbónica cuya finalidad es optimizar la fijación de CO₂ (Mackinder et al., 2016). Por último, existe una estructura conocida como mancha ocular o *eyespot* que se compone principalmente de carotenoides asociados a la membrana del cloroplasto que está especializada en la fotorrecepción y en la movilidad celular (Eitzinger et al., 2015).

Existe una gran variedad de plastidios en función del organismo donde se encuentren, su origen o la función que desempeñen. De esta forma se conocen además del cloroplasto, los proplastos o pequeños plastidios indiferenciados típicos de células embrionarias vegetales, los etioplastos o plastidios diferenciados con pigmentos fotosintéticos inactivos por desarrollo en ausencia de luz y los cromoplastos, que son plastidios diferenciados que almacenan un alto contenido en carotenoides (Grossman et al., 2010).

1.3.2. Función del cloroplasto

El cloroplasto es el orgánulo donde tiene lugar la fotosíntesis y la fijación de carbono, procesos emparejados que convierten la energía lumínica en energía bioquímica y llevan a cabo la incorporación de CO₂ y la producción de O₂. Tanto en plantas superiores como en algas los fotones son absorbidos por el PSII que se encuentra en las membranas de los tilacoides y a través de la cadena transportadora de electrones se genera poder reductor (NADPH⁺) en el estroma del cloroplasto (Aro et al., 2005; Komenda et al., 2012). Este proceso combinado con la rotura de la molécula de agua en O₂ y H⁺, concentra H⁺ dentro del lumen tilacoidal. El gradiente de protones resultante a través de la membrana de los tilacoides se emplea para generar ATP en el estroma del cloroplasto, donde se producen las reacciones de fijación de carbono independientes de luz (Figura 9). Las reacciones del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) utilizan el ATP y NADPH como combustible para incorporar el carbono del CO₂ en el azúcar de tres carbonos gliceraldehido-3-fosfato (G3P). Finalmente, este ciclo se utiliza para generar intermediarios centrales en el metabolismo del carbono y almidón como molécula de reserva, el cual se acumula en el cloroplasto (Sager and Palade, 1957; Ral et al., 2006; Goodenough et al., 2014; Shpilka et al., 2015). El paso de fijación de CO₂ se cataliza mediante la enzima Rubisco, la cual se distribuye en plantas superiores de manera homogénea por el estroma del cloroplasto y tiene acceso al CO₂ gaseoso. Sin embargo, las algas han desarrollado un mecanismo que les permite concentrar CO₂ denominado CCM (*carbon concentrating mechanism*) para facilitar su asimilación ya que la disponibilidad de este gas en medios acuáticos es menor. El CCM mejora la actividad fotosintética al aumentar la concentración de CO₂

en torno al pirenoide, donde se localiza la Rubisco y la anhidrasa carbónica (Wang et al., 2015; Santhanagopalan et al., 2021).

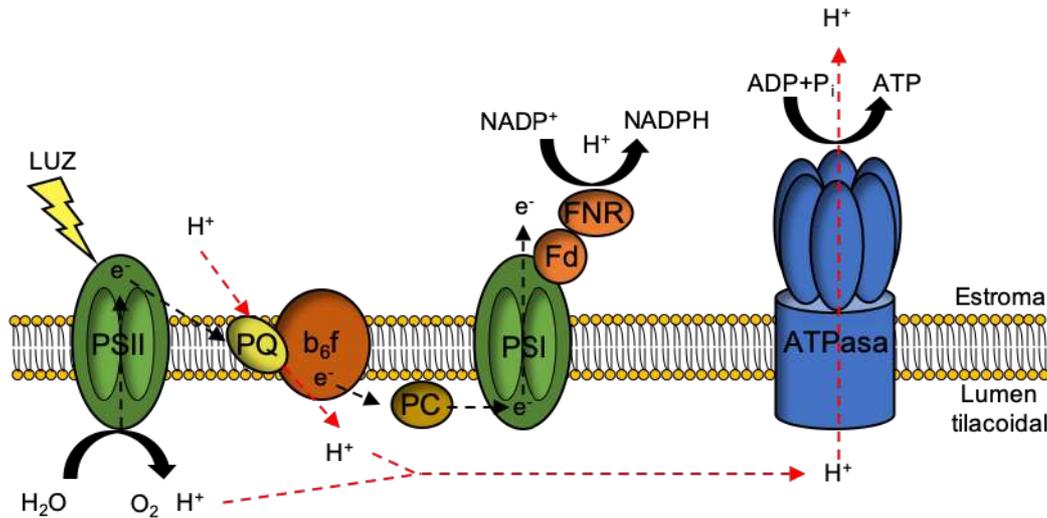


Figura 9. Representación esquemática del proceso de fotosíntesis en cloroplastos de *Chlamydomonas*. Flujo de electrones a lo largo de la membrana del tilacoide (flecha discontinua negra) y gradiente de protones en la cadena transportadora de electrones (flecha discontinua roja) para obtener energía y poder reductor a partir de la luz. PSII, fotosistema II; PQ, *pool* de plastoquinonas; b_{6f} , citocromo b_{6f} ; PC, plastocianina; PSI, fotosistema I; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina- NAD^+ reductasa; ATPasa, ATP sintasa (Burlacot et al., 2019).

Las reacciones fotosintéticas que se realizan en el cloroplasto requieren la participación de varios complejos proteicos y sus cofactores, incluyendo metales, lípidos y pigmentos como la clorofila y los carotenoides (Murchie and Niyogi, 2011; Rochaix, 2011a, 2011b). Al igual que la clorofila, los carotenoides son esenciales para los organismos fotosintéticos debido a sus propiedades antioxidantes. Existen distintos tipos de carotenoides como los carotenos y las xantofilas que son sintetizados en el cloroplasto tanto de plantas como de algas (Niyogi et al., 1997; Grossman et al., 2004; Lohr et al., 2005).

Otro de los procesos que se lleva a cabo en el cloroplasto es la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, que en plantas y algas se realiza en el estroma de este orgánulo (Ohlrogge et al., 1979), donde el acetil-coenzima A (acetil-CoA) es el primer intermediario (Schwender et al., 2004; Alonso et al., 2007; Troncoso-Ponce et al., 2009). El acetil-CoA es generado a partir del complejo piruvato deshidrogenasa, y se cataliza como ácido graso mediante la actividad de la ácido graso sintasa (FAS). La enzima FAS es una proteína dimérica del cloroplasto cuya función es sintetizar ácidos grasos. Los ácidos grasos se utilizan para generar lípidos plastídicos que son esenciales para la estructura y función del cloroplasto (Liu and Benning, 2013; Li-Beisson et al., 2015, 2019). Además, algunos de estos lípidos son etiquetados para su posterior transporte a distintas membranas de la

célula donde son necesarios, como las membranas de la mitocondria o la membrana plasmática (Li-Beisson et al., 2015).

Por último, la función del cloroplasto ha sido relacionada con las dos rutas degradativas más importantes entre los organismos eucariotas: la autofagia y el proteasoma. En plantas, la autofagia está relacionada con el cloroplasto ya que este orgánulo puede ser objeto de degradación parcial o completa mediante clorofagia bajo condiciones específicas de estrés como limitación de nutrientes, senescencia o alta luz (Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009; Izumi et al., 2010, 2017; Nakamura et al., 2018). Por otro lado, el proteasoma se encarga de degradar proteínas citoplasmáticas dañadas o mal plegadas para mantener la proteostasis celular. Mediante este proceso se identifican proteínas selectivamente para su degradación debido al marcaje de las mismas con ubiquitina a través de una cascada en la que intervienen tres enzimas. Entre ellas existen las enzimas de activación tipo E1, las enzimas de conjugación E2, y las ligasas E3 las cuales reconocen a la proteína y median su ubiquitinación (Figura 10). Se necesita una proteína poliubiquitinada para su posterior degradación por el complejo proteasoma (Ling et al., 2012; Ling and Jarvis, 2013, 2015). En respuesta a situaciones de estrés específico en el cloroplasto, se expresan proteínas de choque térmico y proteasas que identifican proteínas dañadas y las marcan para su posterior degradación. Estas proteasas cloroplásticas están implicadas en el incremento de la actividad del proteasoma, localizado en el citoplasma, aunque no sean participantes directos del proceso.

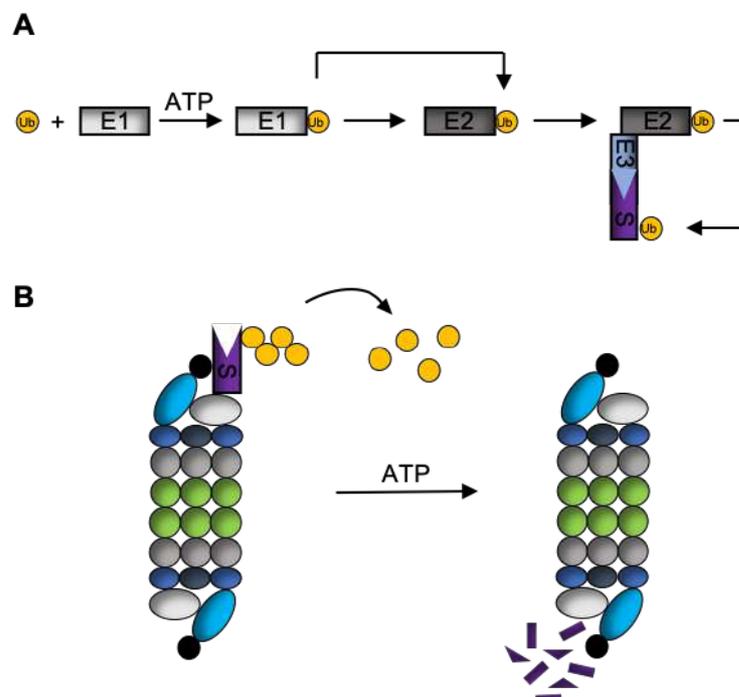


Figura 10. Esquema del sistema de degradación del proteasoma. A. Sistema de ubiquitinación sobre una diana (S) mediante las enzimas de activación E1, conjugación E2 y ligasas E3. **B.** Modelo de degradación de la diana ubiquitinada mediante el proteasoma (Ling and Jarvis, 2015).

1.3.3. Estrés en el cloroplasto

En el cloroplasto de los organismos fotosintéticos se llevan a cabo muchas funciones esenciales como la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos y otros metabolitos secundarios (Chan et al., 2016). La alta tasa metabólica en este orgánulo o distintas condiciones de estrés como la alta luz, provocan una sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones del aparato fotosintético y la consecuente acumulación de ROS en un proceso denominado foto-inhibición (Fischer et al., 2007). En plantas y algas, este proceso relacionado con la producción de ROS daña proteínas que conforman los complejos fotosintéticos, por lo que las células de estos organismos necesitan remplazar estas proteínas por otras (Xie et al., 2015; Theis and Schroda, 2016).

En estas condiciones los organismos fotosintéticos han desarrollado múltiples mecanismos de reparación que incluyen el intercambio de proteínas fotosintéticas, la respuesta a proteínas mal plegadas (cpUPR), y mecanismos de control de calidad del cloroplasto (Aro et al., 1993; Ramundo et al., 2014; Rochaix and Ramundo, 2017; Llamas et al., 2017; Rodriguez-Concepcion et al., 2019). La cpUPR activa genes específicos del cloroplasto que traducen proteínas conocidas como *Heat Shock Proteins*, chaperonas, proteasas, y proteínas involucradas en la biogénesis del cloroplasto. Proteínas como, por ejemplo, VIPP1 y VIPP2, que se inducen en condiciones de alta luz o daño oxidativo para reorganizar las membranas tilacoidales y cambiar la distribución de proteínas fotosintéticas en los tilacoides del cloroplasto (Nordhues et al., 2012; Zhang et al., 2012, 2016; Ramundo et al., 2014; Llamas et al., 2017). Otro de los procesos controlados por este mecanismo es el ciclo de reparación del PSII, donde la proteína central del PSII, D1, acumula daño oxidativo en condiciones de alta luz y es rápidamente degradada por la proteasa FtsH, y reemplazada por otra proteína D1 sintetizada de nuevo (Kato et al., 2012; Muranaka et al., 2016).

Además de estas proteínas, otras rutas como la autofagia o el proteasoma se activan para mitigar el estrés en el cloroplasto y el daño oxidativo (Ramundo et al., 2014; Rochaix and Ramundo, 2017). Se ha demostrado que la acumulación de ROS en la célula activa los mecanismos de la autofagia. De hecho, se han analizado mutantes en *Chlamydomonas* deficientes en la síntesis de carotenoides que muestran niveles elevados de ROS en el cloroplasto lo que promueve la activación de este proceso (Pérez-Pérez et al., 2012a).

En *Chlamydomonas*, el cpUPR se induce después de la inactivación de la proteasa Clp, la cual degrada proteínas del cloroplasto mal plegadas o agregadas en el estroma de este orgánulo. Estas agregaciones o proteínas mal plegadas son las causantes de daño en el cloroplasto, así como de la acumulación de ROS (Ramundo et al., 2014; Perlaza et al., 2019). Algo similar ocurre en plantas superiores, donde mutantes con niveles reducidos de las proteasas Clp y FtsH presentan estructuras

alteradas en sus tilacoides y una actividad elevada de las chaperonas del cloroplasto: Cpn60, Hsp70, Hsp90, Hsp100. Además, se inducen varias proteínas relacionadas con el tráfico lipídico y las rutas de ubiquitinación (Figura 10) y de la autofagia (Lamas et al., 2017; Dogra and Kim, 2019; Perlaza et al., 2019; Rodriguez-Concepcion et al., 2019).

Además de esta respuesta general, las células vegetales también necesitan sistemas de defensa enzimáticos concretos para la detoxificación de ROS como superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasa, tiorredoxinas y peroxirredoxinas. Igualmente, existen moléculas antioxidantes o *scavengers* como glutatión, ascorbato y carotenoides capaces de reducir los niveles de ROS (Ledford et al., 2007; Xiong et al., 2007; Chang et al., 2014; Blaby et al., 2015). De esta forma, se pueden utilizar algunos genes relacionados con los mecanismos de defensa como glutatión-S-transferasa (*GSTS1*), glutatión peroxidasa (*GPXH*) o L-ascorbato peroxidasa (*APX1*), esenciales en los procesos de detoxificación de ROS, para el seguimiento del estado redox de la célula (Fischer et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2014; Blaby et al., 2015).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Estudiar la conexión entre la autofagia y el metabolismo de lípidos mediante la inhibición de la enzima ácido graso sintasa (FAS) con la droga cerulenina en *Chlamydomonas*.
2. Estudiar la respuesta a estrés en el cloroplasto de células de *Chlamydomonas* por la inhibición de la enzima FAS.
3. Generar un mutante deficiente en autofagia mediante la técnica de edición génica *CRISPR/Cas9* en el gen *ATG8* de *Chlamydomonas*.
4. Caracterizar el fenotipo del mutante *atg8* de *Chlamydomonas* en distintas condiciones de estrés.
5. Análisis transcriptómico y proteómico cuantitativo del mutante *atg8* de *Chlamydomonas*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Organismos y métodos de cultivo

3.1.1. *Chlamydomonas*

Chlamydomonas ha sido el organismo modelo empleado durante esta tesis. Las estirpes utilizadas están detalladas en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla1. Estirpes de *Chlamydomonas* utilizadas en esta tesis

Estirpe	Descripción	Procedencia
WT4A+ mt+	Estirpe silvestre capaz de metabolizar acetato como fuente de carbono	CC-4051. Chlamydomonas Resource Center (http://www.chlamycollection.org)
WT6C+ mt+	Estirpe silvestre capaz de utilizar acetato como fuente de carbono	Estirpe obtenida del laboratorio del Prof. Jean-David Rochaix (Universidad de Ginebra)
Sta6.1 mt+	Estirpe mutante en BAFJ5 <i>sta6</i> sobre el parental WT21 gr (CC-1690)	CC-5374. Chlamydomonas Resource Center (http://www.chlamycollection.org)
CW15 4B+ mt+	Estirpe de rápido crecimiento que no presenta pared celular	Estirpe obtenida del laboratorio del Prof. Jean-David Rochaix (Universidad de Ginebra)
OL-Rps6	Estirpe que presenta la proteína ribosomal RPS6 etiquetada por el antígeno OLLAS	(Couso et al., 2018)
<i>atg8</i>	Estirpe mutante sobre el parental WT4A+ que presenta una inserción en el gen <i>ATG8</i> . Esta estirpe no presenta niveles apreciables de la proteína ATG8	Estirpe mutante generada durante esta tesis empleando el método <i>CRISPR/Cas9</i>
<i>atg8:pST-ATG8</i>	Estirpe complementante del mutante <i>atg8</i> . Esta estirpe presenta el gen <i>ATG8</i> insertado mediante el plásmido pStATG8 que contiene el promotor del gen <i>psaD</i> y la etiqueta StrepII	Este estudio

3.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las células de *Chlamydomonas* presentan una gran flexibilidad metabólica, por ello, son capaces de crecer en condiciones mixotróficas, heterotróficas y autotróficas, y esto les confiere una ventaja para su utilización en el laboratorio. En condiciones de crecimiento mixotróficas, las células se cultivan según se describe en (Harris et al., 1989), utilizando luz con un rango en su radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 40-60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y acetato como fuente de carbono externo. Para esta condición, el medio empleado es TAP (Tris Base-Acetato-Fosfato), donde el acetato y los oligoelementos necesarios para el correcto crecimiento de *Chlamydomonas* se encuentran disueltos. Por otra parte, para crecer células de *Chlamydomonas* en condiciones heterotróficas, estas se mantienen en ausencia de luz y acetato como fuente externa de carbono. Igualmente, se emplea el medio de cultivo TAP que contiene acetato y los oligoelementos necesarios para el correcto desarrollo de las células de *Chlamydomonas*. Por otro lado, los ensayos de crecimiento donde las células crecieron de forma autótrofa, se utilizó la luz PAR (40-60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como única fuente de energía y se empleó el medio de cultivo HSM (*High Salt Medium*) llamado Medio Mínimo que contiene los oligoelementos necesarios para el crecimiento de *Chlamydomonas*. En todas las condiciones de cultivo descritas se utilizaron 25°C de temperatura y agitación suave a 100 rpm. Finalmente, para el cultivo en medio sólido, las condiciones y medios de cultivo fueron los mencionados anteriormente, pero en una concentración de 12 g/l de agar (Bacto-agar, Difco). Todo el material y medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclavado a 120°C y una atmósfera de sobrepresión durante 20 min.

-Medio TAP: 25 ml/l de solución 40X Beij, 10 ml/l de solución Tris-Acetato, 1 mM de KPO_4 (pH 7) y 1 ml/l de elementos traza.

-HSM: 25 ml/l de solución 40X Beij, 1 mM de KPO_4 (pH 7), 2.4 g/l de Tris-Base y 1 ml/l de elementos traza. El pH se ajustó a 7 con HCl.

-Solución Tris-Acetato: 20 mM de Tris-Base y 17 mM de ácido acético glacial.

-Solución 40X Beij: NH_4Cl a 16 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a 2 g/l y $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 4 g/l.

-Elementos traza: En 550 ml de H_2O se disuelven los siguientes oligoelementos; 11.4 g de H_3BO_3 , 22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5.06 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ y 1.1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Por otro lado, 50 g de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ en 250 ml de H_2O se añaden a la primera solución. Se filtra antes de su utilización.

3.2. Biología molecular

3.2.1. Análisis de ADN

3.2.1.1. Aislamiento de ADN genómico de *Chlamydomonas*

Para el aislamiento de ADN genómico a partir de células de *Chlamydomonas* se necesitaron 15 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento (2×10^6 cél/ml) que se centrifugaron a 3000 g

durante 5 min. Las células recogidas se lavaron con 2 ml de tampón de extracción de ADN. Posteriormente se le añadieron 250 μ l de este tampón, 25 μ l de *proteasa K* (1 mg/ml) y 25 μ l de SDS al 10%. Esta mezcla se incubó durante 2 h a 50°C. Tras esta incubación, se añadieron 300 μ l de fenol/cloroformo/isoamil alcohol, se agitaron las muestras 2 min y se centrifugaron durante 3 min a 15000 g. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante y se añadieron 10 μ l de NaCl 5 M y 480 μ l de etanol 95%, se mezclaron por inversión y se centrifugaron durante 10 min a 15000 g a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 100 μ l de agua mQ, 4 μ l de *RNasa A* (10 mg/ml) y se incubó durante 10 min a 37°C. Finalmente se añadieron 50 μ l de acetato de amonio 7.5 M y las muestras se incubaron durante 10 min a 4°C para centrifugar a baja velocidad durante 30 s y quedarnos con el sobrenadante.

-Tampón de extracción de ADN: 10 mM de Tris-HCl (pH 8), 10 mM de EDTA y 10 mM de NaCl.

3.2.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo según (Sambrook et al., 1989). Para ello se utilizaron geles de agarosa al 0.7-1.5% (p/v) preparados en tampón TBE diluido al 50% y bromuro de etidio a 0.5 μ g/ml. A cada muestra de ADN se le añadió 1/10 del volumen de tampón de carga. Las electroforesis se realizaron en aparatos *ADN Mini Sub Cell GT* (Bio-Rad). Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis, se utilizó el marcador *1 kb ladder plus* (Invitrogen; 10787018). Tras la electroforesis, el ADN se visualizó por iluminación con luz UV de 302 nm, utilizando para ello un transiluminador *GelDoc XR+ Molecular Imager* (Bio-Rad). Los geles se fotografiaron utilizando el sistema *Image Lab Software* (Bio-Rad).

-Tampón TBE 1X: 90 mM de Tris-borato y 2 mM de EDTA (pH 8).

-Tampón de carga: Azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno-cianol 0.25% (p/v) y glicerol 50% en agua.

3.2.1.3. Purificación de fragmentos de ADN

En la purificación de fragmentos de ADN procedentes de geles de agarosa o ADN en solución se utilizó el sistema comercial *ilustra GFX PCR and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación del ADN resultante se utilizó el sistema *NanoVue Plus UV-Vis Spectrophotometer* (GE Healthcare).

3.2.1.4. Manipulación enzimática del ADN

Las manipulaciones enzimáticas de ADN se llevaron a cabo según se describe en Sambrook J et al. (1989). Las digestiones de ADN se realizaron con endonucleasas de restricción suministradas por *Takara* (www.takara-bio.eu). En las preparaciones de ADN se eliminó el ARN por tratamiento con *RNasa A* (Sigma-Aldrich; R6513), utilizada simultáneamente con las correspondientes enzimas de restricción. Los extremos de vectores abiertos con enzimas de restricción se defosforilaron para evitar religaciones entre ellos con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche; 10713023001).

3.2.1.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un termociclador *T-personal* (Biometra) o un *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl que contenía: 2.5 U de ADN polimerasa *i-Taq* (iNtRON; 25021) o *Velocity DNA polimerasa* (Bioline; 21098), tampón 1X (suministrado con la enzima correspondiente), MgCl₂ 1.5 mM en los casos que lo indicara el fabricante, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a concentración final de 0.2 mM cada uno, 1.5 ng de ADN molde y 50 pmol de cada oligonucleótido específico para cada fragmento de ADN que se quería amplificar. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 2.

El programa de amplificación que se utilizó consiste en un primer ciclo de desnaturalización del ADN a 95°C durante 2 min, seguido de 25-30 ciclos de reacción y un ciclo final de polimerización a 72°C durante 10 min. Cada ciclo de reacción constaba de una etapa de desnaturalización a 95°C (1 min), una etapa de renaturalización, cuya temperatura dependía de los oligonucleótidos utilizados, y que solía variar entre 48°C y 65°C (1 min) y una etapa de polimerización a 72°C (1 min por cada kb a amplificar). Los fragmentos de ADN amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron según lo descrito anteriormente.

3.2.1.6. Secuenciación del genoma nuclear

La secuenciación del genoma nuclear se realizó para comprobar la integridad del gen *ATG8* en la estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas*. En primer lugar, se aisló ADN genómico de la estirpe *atg8* para demostrar la presencia de una inserción en el gen *ATG8* provocada por el sistema de edición genética *CRISPR/Cas9*. Finalmente, para comprobar las secuencias de ADN, se secuenciaron de manera semiautomática en el servicio de secuenciación comercial de la empresa

STABvida (<http://www.stabvida.com>), donde se produce una mezcla de los fragmentos a secuenciar y los oligonucleótidos correspondientes.

3.2.1.7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para análisis por PCR y qPCR, así como sus principales características y referencias se detallan en la siguiente tabla (Tabla 2):

Tabla2. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Nombre	secuencia (5'-3')	Características	Referencia
a a'	cgttgccatagaactgcc ccggcactcactggaattc	Amplifica fragmento en el sitio de corte <i>CRISPR</i>	Este estudio
b b'	caaaccgccagatcctcgtc gtttgtcaagggtggcagctc	Amplifica fragmento del gen <i>APHVIII</i>	Este estudio
c c'	gtggtcagcgggtatttgg ggcagttctatgggcaacg	Amplifica aguas arriba del sitio de corte <i>CRISPR</i>	Este estudio
d d'	gaattccagtgagtgccgg gaggcacggctagcactag	Amplifica aguas abajo del sitio de corte <i>CRISPR</i>	Este estudio
5'ATG8' 3'ATG8'	ctcgaatacggcagctttt ttcggctctgggtacttctcc	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>ATG8</i>	(Pérez-Martín et al., 2014)
5'CBLP 3'CBLP	cttctcgccatgaccac cccaccaggtgttctcag	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>CBLP</i>	(Pootakham et al., 2010)
5'ATG8 3'ATG8	tccccgatatcgacaagaag tgccgatgacgtacacaaat	Oligonucleótidos para el sitio de corte en <i>ATG8</i>	Este estudio
5'GSTS1 3'GSTS1	cagaggtgaaaggcggatac gtgttgcaatggacttcagc	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>GSTS1</i>	(Fischer et al., 2012)
5'VIPP2 3'VIPP2	catcatgcatttggcaggctctc aatgagaggtgacgacgaccaac	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>VIPP2</i>	(Ramundo et al., 2014)
5'VIPP1 3'VIPP1	ttcaatccaacgggtgtaggg cgccaattcattcgtgcctacc	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>VIPP1</i>	(Ramundo et al., 2014)
5'HSP22F 3'HSP22F	caggtcttcaacggcaactgt atcgcccccttgccat	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>HSP22F</i>	(Strenkert et al., 2011)
5'DEG11 3'DEG11	agcactggtgcacattgatccg ggaaggcggaacacaacacaac	Oligonucleótidos para qPCR del gen <i>DEG11</i>	(Strenkert et al., 2011)

3.2.2. Análisis de ARN

3.2.2.1. Tratamiento del material

Todo el material utilizado durante el proceso de extracción y manipulación de ARN se sometió a un tratamiento para evitar la posible degradación del mismo por acción de RNasas. Las soluciones

utilizadas durante la extracción y manipulación del ARN se prepararon con agua bidestilada tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1% durante 16 h a 37°C para posteriormente autoclavarlas a 120°C y una atmósfera de sobrepresión durante 20 min para inactivar el DEPC. El material utilizado se esterilizó por calentamiento en un horno (Selecta) a 200°C durante 2 h o por lavados con H₂O₂ 33% (v/v) durante 15 min. El material de plástico empleado, se esterilizó mediante su autoclavado. Además, se utilizaron productos comerciales libres de RNasas. Todos los procesos se realizaron bajo 4°C de temperatura y con el empleo de guantes en el menor tiempo posible para no contaminar ni degradar el ARN.

3.2.2.2. Aislamiento de ARN total de *Chlamydomonas*

Para el aislamiento de ARN total de las células de *Chlamydomonas* se recogieron 10 ml de cultivo en fase exponencial (2×10^6 cél/ml) mediante centrifugación a baja velocidad (3000 g durante 5 min). El pellet de células se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y una vez congeladas las células se resuspendieron en 500 µl de tampón de rotura y se sometieron a repetidas extracciones con 500 µl de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (Sigma-Aldrich; 77619). Se precipitó el ARN con 1/3 de volumen de LiCl 8 M a 4°C durante 16 h. Tras precipitar, se centrifugó la muestra y el pellet se resuspendió en 100 µl de agua. Se añadieron 3 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de volumen de NaAc 3 M (pH 5.2), durante 30 min a -20°C. El precipitado de ARN se centrifugó y resuspendió en un volumen adecuado de agua.

-Tampón de rotura: 10 mM de EDTA (pH 8), 100 mM de Tris-HCl (pH 8), 600 mM de NaCl y SDS al 4%.

3.2.2.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa

La separación y visualización de fragmentos de ARN de *Chlamydomonas* se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook et al., 1989). Los geles se prepararon en tampón TBE 0.5X con una concentración de agarosa 0.7-1.5% (p/v). A las distintas muestras se les añadió 1/10 de su volumen con tampón de carga para ARN. Los aparatos utilizados para la electroforesis fueron *Mini Sub Cell GT* (Bio-Rad) en tampón TBE 0.5X.

-Tampón TBE 1X: 90mM de Tris-borato y 2 mM de EDTA (pH 8).

-Tampón de carga: Azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno-cianol 0.25% (p/v) y glicerol 50% en agua tratada con DEPC.

3.2.2.4. Retrotranscripción

El ADN complementario a partir de ARN de *Chlamydomonas* se generó utilizando *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad; 170-8891) en un volumen de reacción de 20 μ l con 1 μ g de ARN total y 25 pmol de oligonucleótidos dT siguiendo las indicaciones del fabricante (Bio-Rad; 170-8891).

3.2.2.5. Cuantificación de ADN complementario mediante PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR se llevó a cabo para cuantificar la expresión génica a partir de ADN complementario de *Chlamydomonas* empleando el sistema *iCycler IQ real-time* (Bio-Rad). Las reacciones de PCR contenían un volumen de 18 μ l de mezcla *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad; 172-5271), 1 μ l de la reacción de retrotranscripción (ADN complementario), 250 nM de cada oligonucleótido (Tabla 2) y agua mQ hasta un volumen final de 20 μ l. Se utilizó el programa de amplificación que aparece a continuación:

-Incubación: 95°C durante 10 min

-Desnaturalización (x 40 ciclos): 95°C durante 15 segundos

-Hibridación final y Elongación: 58 - 62°C (en función del gen objeto de estudio) durante 60 segundos.

La expresión del gen *CBLP*, un gen expresado constitutivamente que codifica una proteína homóloga de la subunidad β de la proteína-G, se utilizó como control interno para la normalización de los datos. Todas las reacciones se realizaron con un mínimo de tres réplicas biológicas con al menos tres réplicas técnicas.

3.2.2.6. Análisis transcriptómico

Se llevó a cabo un análisis transcriptómico de las estirpes WT4A+ y mutante *atg8* tratadas con cerulenina. Para ello, las células de ambas estirpes se trataron con distintas concentraciones de cerulenina (5 o 10 μ M) y a distintos tiempos (0, 4 y 8 h). Las células de estas estirpes crecieron según se describe en el apartado 3.1.2. de Materiales y Métodos. El ARN empleado en este análisis se obtuvo a partir de un proceso de extracción por fenol/cloroformo/isoamil alcohol según se detalla en el apartado 3.2.3.2. de Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos en el estudio transcriptómico fueron analizados por la empresa *STABvida* (<http://www.stabvida.com>). Para ello, en primer lugar, se verificó la calidad de las muestras de ARN mediante un *Bioanalyzer* (Bio-Rad). Las librerías de ADN complementario se obtuvieron a partir del *Kapa Stranded mRNA Library Preparation Kit* (Roche). Se secuenciaron mediante un sistema *Illumina*

HiSeq 4000 platform utilizando de molde secuencias de pequeña longitud (150 pb). Las secuencias generadas se analizaron por el programa *CLC Genomics Workbench 10.1.1* (Qiagen). Las lecturas de alta calidad obtenidas se mapearon con la versión de ensamblaje 5.5 del genoma de *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007) (phytozome: https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html/Org_Creinhardtii). La estimación en la expresión de los genes se obtuvo para cada muestra individual en unidades de lectura por kilobase de exón modelo, como ha sido descrito previamente (Mortazavi et al., 2008). Los principales componentes del análisis se identificaron gracias a muestras únicas como medida de control de calidad. Finalmente, el análisis de expresión diferencial se realizó utilizando un enfoque de modelo lineal generalizado mediante el sistema multifactorial *edgeR* (Robinson et al., 2010). El análisis funcional de los genes anotados se realizó mediante el *Algal Functional Annotation Tool* (<http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/index>).

3.2.3. Manipulación genética en *Chlamydomonas*

3.2.3.1. Transformación de *Chlamydomonas*

Para transformar las células de *Chlamydomonas* se empleó el método de electroporación. Para ello, se utilizaron células en fase exponencial (2×10^6 cél/ml) y se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad (3000 *g* durante 5 min). Las células recogidas se concentraron 100 veces utilizando medio TAP suplementado con 60 mM de sacarosa. De este concentrado celular, se emplearon 250 μ l para cada electroporación utilizando cubetas específicas de 0.4 cm de separación entre electrodos y se añadió 1 μ g del ADN transformante lineal en un volumen aproximado de 10 μ l. La cubeta con la mezcla celular y el ADN transformante se mantuvo en hielo de 10 a 30 min, tras este paso, se realizó un pulso con los siguientes parámetros: 800 V (2000 V/cm) y 25 μ F sin resistencia, utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell* (Bio-Rad). Tras el pulso, se transfirieron las células a 10 ml de medio TAP suplementado con 60 mM de sacarosa durante 16 h a 25°C y una agitación de 30 rpm. Después de este período se recogieron las células por centrifugación durante 3 min a 3000 *g*, se resuspendieron en 500 μ l de medio TAP para sembrarlas en medio TAP sólido con 10 μ g/ml de Paramomicina (Sigma-Aldrich; P2997-1G) y dejarlas crecer en condiciones de iluminación continua (40-60 μ E m⁻² s⁻¹) y 25°C hasta que aparecieron colonias transformantes (5-7 días).

3.2.3.2. Obtención de un mutante *atg8* en *Chlamydomonas* mediante CRISPR/Cas9

La estirpe silvestre WT4A+ de *Chlamydomonas* se transformó utilizando una secuencia de cadena simple de ARN denominada ARN guía (ARNsg) y la endonucleasa Cas9. Como ARN guía para la generación de un mutante *knock out* (KO) del gen *ATG8*, se empleó la secuencia 5'-

CCGACCCCCGACATTCAAGCAGG-3' obtenida a partir de un análisis *in silico* y manufacturada por la empresa *ToolGen, Inc.* (República de Corea) siguiendo el protocolo descrito por Shin et al., 2016. Este ARNsg es complementario al gen *ATG8*. El ARNsg guía a la endonucleasa Cas9 hasta el sitio de corte específico de *ATG8* (Figura 11). Por otra parte, se utilizó el plásmido pSL18, que presenta un gen de resistencia a paramomicina (*APHVIII*) y un sitio de inserción multiclonal cuya expresión está regulada por el promotor del gen *psaD* (Lemaire S and Rochaix JD, no publicado). Este plásmido se introdujo en las células de *Chlamydomonas* mediante electroporación junto al ARNsg y la endonucleasa Cas9, por ello, existe probabilidad de que el plásmido pSL18 se inserte en el sitio donde corta Cas9, en este caso, en el gen *ATG8*.

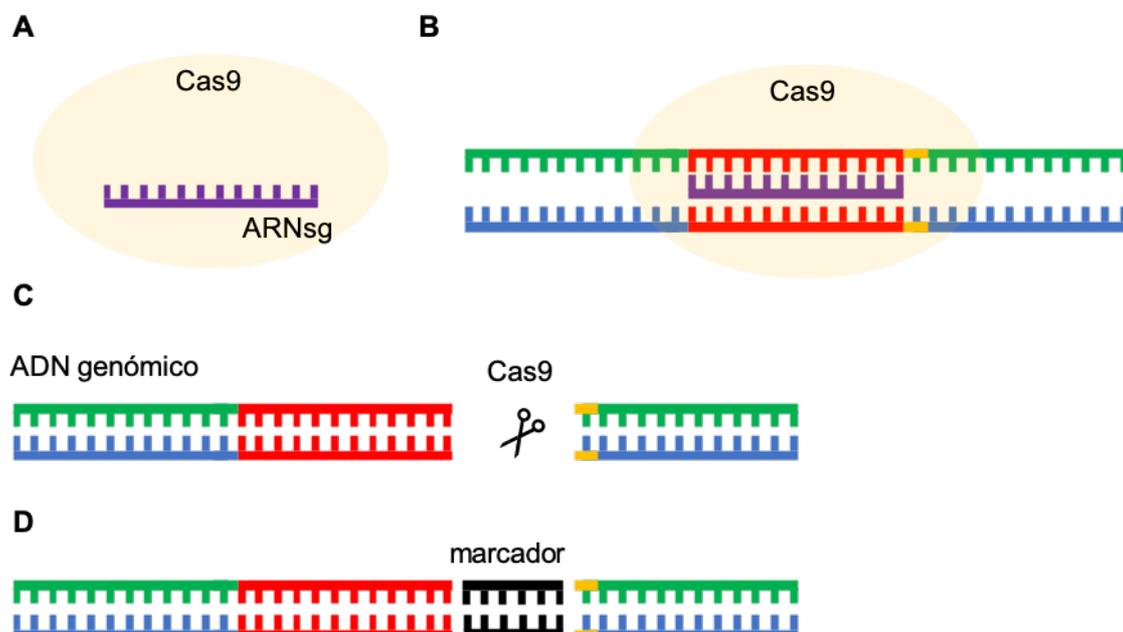


Figura 11. Esquema del sistema de edición genética CRISPR/Cas9. **A.** La proteína Cas9 forma un complejo junto al ARN guía (ARNsg). **B.** Este complejo se une al ADN genómico en la región complementaria al ARNsg. **C.** El complejo Cas9-ARNsg corta la doble cadena de ADN. **D.** El marcador de selección se inserta en el genoma.

Las células de *Chlamydomonas* en fase exponencial (2×10^6 cél/ml) crecidas en medio TAP se recogieron por centrifugación (5 min a 4000 g). Las células se concentraron 100 veces en TAP+60 mM de sacarosa. La mezcla de 20 μ g de proteína Cas9 y 25 μ g de ARNsg se incubó a 37°C durante 30 min. En paralelo, 250 μ l de células concentradas (2×10^8 cél/ml) junto a 1 μ g del plásmido pSL18 linearizado se incubaron en una cubeta de 0.4 cm de separación entre electrodos (Bio-Rad) durante 15 min en hielo. Tras estos 15 min, la mezcla conteniendo Cas9 junto al ARNsg se mezcló con las células y el plásmido para ser directamente electroporadas utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell* (Bio-Rad). Las células se transfirieron inmediatamente a medio fresco TAP suplementado con

60 mM de sacarosa durante 16 h en luz tenue ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a una agitación continua (30 rpm). Tras su recuperación, las células se sembraron en TAP sólido con $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de paramomicina (Sigma-Aldrich; P2997-1G). Las colonias resistentes se sometieron a distintas concentraciones crecientes de paramomicina (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las colonias resistentes a paramomicina que finalmente se seleccionaron, se analizaron por inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-ATG8 (Pérez-Pérez et al., 2010). Las colonias con niveles indetectables de ATG8 se eligieron para ser analizadas genéticamente y para su posterior caracterización.

3.3. Métodos bioquímicos

3.3.1. Preparación de extractos celulares de *Chlamydomonas*

3.3.1.1. Extracción de fracciones solubles de proteínas

Para obtener extractos totales de proteína soluble a partir de células de *Chlamydomonas* se utilizó el protocolo que se explica a continuación. Se recoge un volumen determinado de cultivo (50 ml) en fase exponencial de crecimiento (2×10^6 cél/ml) y se centrifuga durante 5 min a 3000 g. Se lavan las células con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5). La suspensión celular resultante se sometió a dos ciclos consecutivos de congelación a -80°C durante al menos 2 h y descongelación a temperatura ambiente. Finalmente, para separar el extracto soluble de la fracción insoluble se centrifugó a 15000 g durante 20 min a 4°C .

3.3.1.2. Extracción de fracciones totales de proteína

Para obtener extractos totales de proteína tanto soluble como del cloroplasto o de membrana a partir de células de *Chlamydomonas*, se empleó el protocolo descrito en este apartado. Se recoge un volumen determinado (50 ml) de cultivo en fase exponencial de crecimiento (2×10^6 cél/ml) mediante centrifugación durante 5 min a 3000 g. Las células obtenidas se congelaron mediante inmersión rápida en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C . Las células recogidas se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón de rotura y se incubaron durante 30 min a 30°C . Tras este proceso, se centrifugaron las muestras durante 20 min a 15000 g y 4°C para separar las fracciones celulares.

-Tampón de rotura: 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM de EDTA (pH 8), 2% de SDS y 1X del cocktail de inhibidores de proteasas *cOmplete Mini* (ROCHE; 11836153001).

3.3.2. Cuantificación de proteínas

3.3.2.1. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas obtenidas a partir de los extractos solubles de células de *Chlamydomonas* se lleva a cabo mediante el método Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad; 5000006). Mediante este proceso los grupos ácidos o básicos de las proteínas de la muestra interaccionan con los grupos orgánicos del reactivo para dar lugar a precipitados que absorben a una longitud de onda de 595 nm.

Se preparó una dilución 1:5 de este reactivo y se mezcló 1 ml de esta preparación con unos μl determinados de muestra. Se incubó en oscuridad durante 10 min para finalmente medir la absorbancia de la reacción a 595 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón utilizando como referencia concentraciones conocidas crecientes (0, 2, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de la proteína comercial seroalbúmina bovina (BSA).

3.3.2.2. Método de ácido bicinconínico (BCA)

La cuantificación de proteínas obtenidas a partir de los extractos totales que incluyen proteínas del cloroplasto y de membrana a partir de células de *Chlamydomonas*, se llevó a cabo mediante el método de ácido bicinconínico (BCA), el cuál utiliza una solución de este ácido (Sigma-Aldrich; B9643-1L) y sulfato de cobre. Este método se caracteriza porque los iones de Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Para este proceso, se utiliza una mezcla de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (AppliChem; 131270) al 4% en agua mQ y reactivo básico BCA con una proporción 1:50. Se le añade 1 ml de esta preparación a unos μl determinados de muestra para posteriormente incubarlo a 37°C durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm. Se realiza en paralelo un ensayo con distintas concentraciones crecientes (0, 2, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de la proteína comercial seroalbúmina bovina (BSA) para obtener la recta patrón.

3.3.2.3. Análisis cuantitativo del proteoma

El análisis de proteómica cuantitativa se llevó a cabo en colaboración con el profesor Michael Schroda de la Universität Technische Kaiserslautern (Alemania). Para realizar dicho análisis proteómico, se utilizaron células de las estirpes de *Chlamydomonas* silvestre (WT4A+) y mutante (*atg8*) cultivadas en luz continua (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en medio TAP con 7.5 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como fuente de

nitrógeno (^{15}N de aquí en adelante). Los cultivos crecieron hasta una densidad de 5×10^6 cél/ml. Ambas estirpes se trataron con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina y se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h para su posterior análisis proteómico utilizando tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas cada una. Como control de referencia, se utilizaron cultivos de ambas estirpes tomando muestras a los mismos tiempos sin tratamiento con la droga cerulenina (Figura 12).

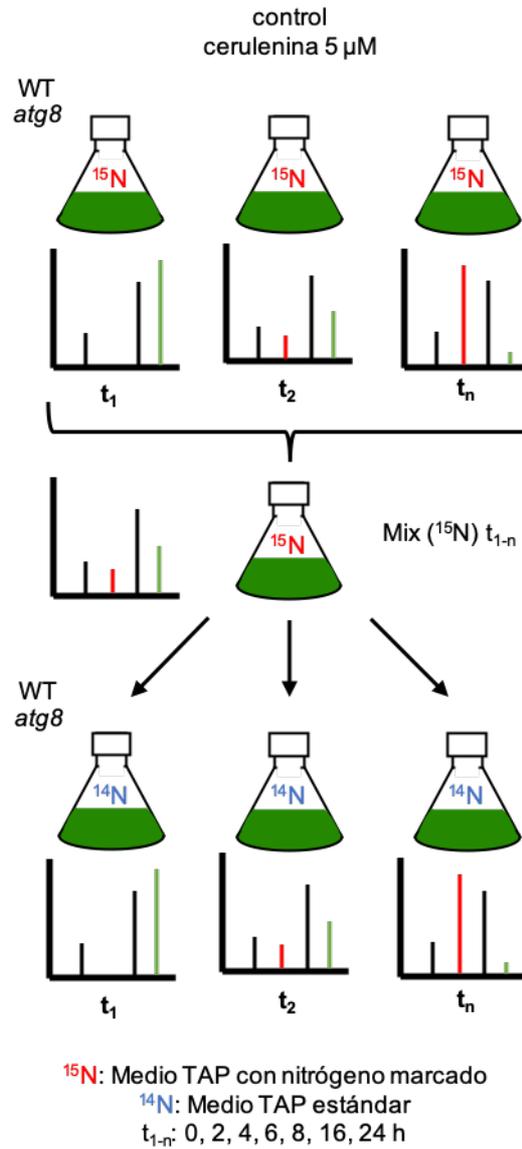


Figura 12. Esquema del análisis proteómico cuantitativo de células WT y mutante *atg8* tratadas con cerulenina. Representación gráfica del proceso de recogida de muestras de las estirpes silvestre y *atg8* tratadas con cerulenina para el estudio cuantitativo de sus proteomas. Se tomaron muestras de ambas estirpes tratadas con cerulenina $5 \mu\text{M}$ durante 0, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h. Se recogieron muestras de ambas estirpes a los mismos tiempos sin tratamiento como control. Para normalizar las muestras como referencia estándar, se utilizó medio de cultivo TAP con nitrógeno marcado (^{15}N) en paralelo. Se utilizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Finalmente, se identificaron los péptidos de cada muestra mediante espectrometría de masas.

Las muestras recogidas en medio TAP enriquecido con ^{15}N (> 98%; *Cambridge Isotope laboratories*, Andover, MA; NLM-467) se mezclaron con muestras en las mismas condiciones y a los mismos tiempos realizados con TAP estándar (referido como ^{14}N en este apartado) en una proporción $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ de 0.8 y 0.4 basado en el contenido de clorofila. La mezcla de células resultante se rompió mediante dos ciclos de congelación/descongelación y un total de 200 μg de proteína soluble se precipitó con acetona al 80% durante 16 h a -80°C . Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 6 M de urea y 2 M de tiourea, siendo posteriormente tratadas con 0.24 mM de ditiotreitól a 25°C durante 30 min y carboamidometiladas con 1 mM de iodacetamida a 25°C durante 20 min en oscuridad. Tras este paso, las muestras se diluyeron con 40 mM de hidrógeno carbonato amónico y 4 M de urea y se digirieron con 0.5 μg de endoproteinasa Lys C (Roche; 11420429001) durante 16 h en agitación suave a 37°C . La digestión se diluyó con 2 M de urea, 20 mM de hidrógeno carbonato amónico y 5% de acetonitrilo y se digirió de nuevo con 10 mM de tripsina inmovilizada (*Poroszyme immobilized trypsin*, 2-3127-00, *Applied Biosystems*) durante 16 h a 37°C en agitación suave. La mezcla de péptidos resultante se diluyó con 20 mM de hidrógeno carbonato amónico y la muestra se dejó con una concentración final de acetonitrilo de 2.5%. A continuación, se concentraron las muestras utilizando una placa de extracción en fase sólida SPEC-C18 (Varian) y se secaron en una bomba *SpeedVac*. Finalmente, los péptidos extraídos se resuspendieron en 24 μl de acetonitrilo al 2% y se acidificaron con 0.5% de ácido acético (Mühlhaus et al., 2011).

Se utilizaron 4 μl en triplicado para cada muestra de péptidos extraídos y se realizó una separación por fase mediante nanoLC (*EASY-nLC*; *Proxeon Biosystems*) utilizando una columna de capilaridad (RP-18e;150-0.1mm; Merck) y un gradiente lineal de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 350 nl/min. El gradiente se inició directamente después de aplicar a las muestras las soluciones A y B al 65% y 35% respectivamente (A, 2% de acetonitrilo y 0.5% de ácido acético; B, 80% de acetonitrilo y 0.5% de ácido acético) durante 100 min. Posteriormente, se cambió el gradiente al 60% de solución B durante 110 min, y finalmente 100% de solución B durante 115 min. Entre estos gradientes, se realizaron lavados intermedios de 20 min utilizando gradientes lineales de 0% hasta 80% de solución B. Los péptidos separados se atraparon mediante un espectrómetro de masas de cuadrupolo orbital (*Thermo Scientific*) gracias a un *noncoated silica electrospray emitter* (PicoTip, FS360-20-10-N-20; *New Objective*, Woburn, MA) e ionizado a 2 kV. El análisis mediante espectrómetro de masas se realizó en un único ciclo escaneando el espectro completo de masas (*Orbitrap*, 300-1800 m/z) con una resolución de 30000 hasta 400 m/z (masa/carga), seguido de varios pasos consecutivos por el espectrómetro de masas (MS^2) de los cinco picos más intensos. El análisis mediante MS^2 se realizó normalizando al 35% la energía de colisión en la trampa de iones lineal y utilizando una longitud de onda de activación y una dinámica de exclusión de 20 s. Todos los iones de carga simple se excluyeron. Los datos brutos se descargaron utilizando el programa

ProteomeCommons.org: / CJRJNP pkfUDFDiXNV Fcnq5a5N6uiF1/1VO6gN + TZV xgw DIp EUP JIOcNlkhcuCCU3W uxvs FW8 E78fnSPQDiHOMUp0BUAAAAAABOYg (Mühlhaus et al., 2011).

Las proteínas identificadas a partir de los péptidos obtenidos del espectrómetro de masas se compararon utilizando el programa *ProteomeCommons.org* y se identificaron mediante la base de datos de *UniProt* para *Chlamydomonas* analizando un número total de 10.522 proteínas. El análisis estadístico se realizó utilizando sólo aquellas proteínas identificadas que presentaron al menos un péptido en 5 de los 7 puntos de la cinética, presentes en todas las réplicas biológicas y técnicas. Para este estudio, se realizó un test ANOVA de dos vías utilizando los parámetros de tiempo, tratamiento con cerulenina e interacción entre ambos con objeto de identificar las proteínas cuya abundancia cambió significativamente, seleccionando aquellas con un valor p inferior a 0.05. El estudio se realizó utilizando las proteínas identificadas en las estirpes WT y *atg8* en presencia y ausencia de cerulenina. Los resultados del test ANOVA mostraron que un total de 715 proteínas para la estirpe WT y 733 proteínas para la estirpe mutante mostraron cambios estadísticamente significativos en su abundancia en nuestro experimento. A continuación, estas proteínas se representaron mediante un diagrama de *Venn* para identificar aquellas que presentaban una relación entre los parámetros empleados en el test estadístico, tiempo y tratamiento con cerulenina. Las proteínas cuya abundancia cambió significativamente en función de ambos parámetros, así como los grupos de proteínas solapantes, se utilizaron para realizar un estudio de tendencia mediante el algoritmo de la media k y el coeficiente de correlación de *Pearson* para la distancia métrica.

Para el análisis estadístico de los términos de ontología génica (términos GO) se ha utilizado la plataforma PANTHER (pantherdb.org) a través de la web de recursos *Gene Ontology* (geneontology.org). Previamente, se crearon listas de proteínas con valores p inferiores a 0.05, y la nomenclatura de todos los genes identificados se modificó utilizando su *UniProt* ID. Los términos GO obtenidos se clasificaron según los procesos biológicos a los que están relacionados y los componentes celulares donde se encuentran. Finalmente, se utilizó la herramienta ReviGO (Supek et al., 2011) para eliminar la redundancia existente en la clasificación de los términos GO, seleccionando de esta forma términos GO cuyo FDR, que es un parámetro estadístico que indica la probabilidad de que una hipótesis nula acierte habiendo sido rechazada por el test estadístico, sea menor a 0.05.

3.3.3. Electroforesis unidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida

La separación analítica de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de SDS-PAGE según lo descrito por Sambrook et al., 1989. Se utilizaron aparatos *Mini-PROTEAN Tetra System* (Bio-Rad) o *SE 260 Mini Vertical Gel*

Electrophoresis Unit (GE Healthcare). La concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) utilizada en los geles de separación fue de entre el 12% y el 15% (v/v) dependiendo de la masa molecular de las proteínas a analizar. Para desnaturalizar las muestras, se añadió tampón de carga para proteínas 1X y se calentaron durante 5 min a 65°C. Como marcador de masa molecular se utilizó el patrón comercial *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad; 1610374).

-Gel de empaquetamiento: 117 mM de Tris-HCl (pH 6.8), poliacrilamida al 3.7% (v/v), SDS al 0.1% (p/v), APS al 0.14% y Temed al 0.2% (v/v) en agua destilada purificada.

-Gel de separación: 374 mM de Tris-HCl (pH 8.8), poliacrilamida al 12% o 15% (v/v), SDS al 0.1% (p/v), APS al 0.07% y Temed al 0.1% (v/v) en agua destilada purificada.

-Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina y SDS al 0.1% (p/v).

-Tampón de carga para proteínas: 125 mM de Tris-HCl (pH 6.8), glicerol al 20% (v/v), SDS al 4% (p/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0.005% (p/v).

3.3.4. Inmunodetección de proteínas mediante western blot

La detección de proteínas se realizó mediante inmunodetección frente anticuerpos específicos. En primer lugar, se sometieron extractos de proteína total a análisis por electroforesis unidimensional según lo descrito en el apartado 3.3.3 de Materiales y Métodos cargando entre 5 y 20 μ g de proteína. A continuación, las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m *Amersham Protran Premium 0.45 μ m NC* (GE Healthcare; 10600003) o fluoruro de polivinilideno *Immun-Blot PVDF Membranes for Protein Blotting* (Bio-Rad; 1620177) según la proteína. La transferencia se llevó a cabo con el sistema semi-seco *TE 77 PWR* (GE Healthcare) durante 1 h a 1 mA/cm².

Una vez transferido el gel de poliacrilamida a la membrana, esta se bloquea a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada *Nonfat dried milk powder* (PanReac AppliChem; A0830) al 5% (p/v) durante 1 h. Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en la solución de bloqueo durante 16 h a 4°C. A continuación, se lava la membrana 4 veces con tampón de lavado durante 15 min. Tras este paso, la membrana se incuba con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de conejo o de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich; A6154 y A4416, respectivamente) diluido 1:10000 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lava de nuevo la membrana 4 veces con tampón de lavado durante 15 min. Finalmente, se incuba la membrana 5 min con *Immobilon Crescendo Western HRP Substrate* (Millipore; WBLUR0500) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detectó la señal de las membranas utilizando el sistema *ChemiDoc Imaging System* (Bio-Rad). Como control interno de carga, se utiliza el anticuerpo frente a la proteína FKBP12 (Crespo et al., 2005).

- Tampón PBS:** 136 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 9 mM de KH₂PO₄.
- Solución de bloqueo:** leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y Tween 20 (A4974, Applichem) al 0.1% (v/v) en tampón PBS.
- Tampón de lavado:** Tween 20 (A4974, Applichem) al 0.1% (v/v) en tampón PBS.

Tabla3. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
anti-ATG8	1:3000	(Pérez-Pérez et al., 2010)
anti-VIPP1	1:1000	Laboratorio del Prof. M. Schroda
anti-VIPP2	1:1000	Laboratorio del Prof. M. Schroda
anti-HSP70B	1:10000	AS06175 (Agrisera)
anti-FKBP12	1:5000	(Crespo et al., 2005)
anti-OLLAS	1:1000	MA5-16125 (Thermo Scientific)
anti-RPS6	1:2000	(Couso et al., 2020)
anti-RPL37	1:10000	AS122115 (Agrisera)
anti-PsbA	1:20000	AS05084 (Agrisera)
anti-PsbB	1:4000	AS04038 (Agrisera)
anti-PsbC	1:5000	AS111787 (Agrisera)
anti-PsaC	1:2000	AS10939 (Agrisera)
anti-RbcL	1:10000	AS03037 (Agrisera)
anti-Lhcb5	1:15000	AS09407 (Agrisera).
anti-V-ATPasa	1:10000	AS07213 (Agrisera)
anti-Arf1	1:3000	AS08325 (Agrisera)

3.3.5. Preparación de células de *Chlamydomonas* para su análisis por microscopía

3.3.5.1. Microscopía óptica y confocal

Los cultivos en fase exponencial (2×10^6 cél/ml) de *Chlamydomonas* crecidos en distintas condiciones se recogieron mediante centrifugación 5 min a 3000 g. Estas células se procesaron para su posterior análisis en el microscopio. Para ello, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón PBS. Estas células se fijaron con 2.5% (v/v) de glutaraldehído (Sigma-Aldrich; G5882) en 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5) durante 1 h a 25°C. Una vez fijadas, las células se lavaron 4 veces con 50 mM de

tampón PBS (pH 7.5). Una vez lavadas se resuspendieron en el mismo tampón. Las células se examinaron con un microscopio óptico *AXIO Scope A1* (Zeiss), equipado con óptica DIC. Las imágenes se registraron con una cámara *Axiocam 105* (Zeiss) y procesadas con el software *ZEN 2.3* (Zeiss).

La autofluorescencia del cloroplasto se detectó con un microscopio confocal *LSM 7 DUO* (Zeiss) utilizando una longitud de excitación de 633 nm y una emisión de 670 nm. Los datos del análisis confocal se procesaron con el software *ZEN2011* (Zeiss). La metodología llevada a cabo con el microscopio confocal se realizó gracias al servicio de microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

3.3.5.2. Microscopía electrónica

Se estudió la estructura de las células de *Chlamydomonas* en distintas condiciones de crecimiento. Las células se analizaron en el servicio de microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para ello, se recogieron los cultivos en fase exponencial (2×10^6 cél/ml) mediante centrifugación durante 5 min a 3000 g. Estas células se fijaron con 2.5% de glutaraldehído (Sigma-Aldrich; G5882) en 0.1 M de tampón cacodilato sódico (pH 7.4) durante 2 h a 25°C. Después de la fijación, las células se lavaron 5 veces en el mismo tampón a 25°C. A continuación, las muestras se fijaron en 1% de tetraóxido de osmio y 0.1 M de tampón cacodilato sódico (pH 7.5) durante 1 h a 4°C. Tras varios lavados con 0.1 M de tampón cacodilato sódico (pH 7.4) durante 2 h a 25°C, las muestras se sumergieron en 2% de acetato uranil. Se deshidrataron con un gradiente de acetona (50%, 70%, 90% y 100% v/v) y posteriormente se integraron en la resina *Spurr* (Spurr, 1969). Con una hoja de cristal se cortaron secciones semi-finas (300 nm de grosor) a partir del bloque de resina. Estas secciones se tiñeron con 1% (p/v) de Azul de Toluidina para localizar las células dentro de la sección utilizando un microscopio óptico convencional. Una vez orientada el área de la sección, se realizaron varios cortes ultrafinos (70 nm de grosor) utilizando un ultramicrotomo *UC7* (Leica) equipado con una hoja de diamante (Diatome) y colocados en una malla de rejillas de cobre. Finalmente, las secciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión *Libra 120* (Zeiss) y digitalizadas (2.048 A – 2.048 A – 16 bits) utilizando una cámara *TRS* montada sobre eje.

3.4. Extracción y análisis de metabolitos

3.4.1. Análisis de lípidos y ácidos grasos

La cuantificación y el análisis de los triacilgliceroles (TAGs) y los ácidos grasos en *Chlamydomonas* se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio del Profesor Enrique Martínez Force (Instituto de La Grasa-CSIC).

La extracción de lípidos totales se obtuvo a partir de 5 mg de peso seco de células de *Chlamydomonas* (Li et al., 2010). En este protocolo se utilizó triheptadecanoin (C17 o TAG) como estándar interno (Un-Chek Prep) (Couso et al., 2018). Para el fraccionamiento de los lípidos, los extractos totales se evaporaron con gas nitrógeno. Los residuos se disolvieron en 5 ml de cloroformo (CHCl₃, AnalaR NORMAPUR; 22711.324). La solución resultante se fraccionó en 0.5 g de una columna *Lichrolut* (Merck) de gel de sílice utilizando una cámara de vacío. Posteriormente se equilibró con 2 ml de cloroformo según lo descrito por Nash and Frankel, 1986. La solución de los lípidos totales se cargó en una columna. Esta columna se lavó con 15 ml de cloroformo para separar los lípidos neutrales de la columna. A continuación, la columna se lavó con 15 ml de metanol para recuperar los lípidos polares. Los lípidos polares se evaporaron con gas nitrógeno para después disolverlos en 1.5 ml de hexano:2-propanol (3:2). Los lípidos polares se analizaron y se cuantificaron mediante HPLC (Salas et al., 2006). La separación por HPLC se llevó a cabo por un módulo *Waters 2695* equipado con un *Waters 2420 ELSD*. Los lípidos neutros y polares se separaron a 30°C utilizando una columna *Lichrospher 100 Diol 254-4* (5 μm) (Merck) o una columna de fase normal *Lichrocart 250-4* (5 μm) (Merck). Los datos obtenidos se procesaron por el software *Empower* y los ELSD se calibraron utilizando los estándares comerciales de alta pureza para cada lípido.

Para determinar la composición total de los ácidos grasos se añadió un volumen de 3.3 ml de metanol: tolueno: dimetoxipropano: ácido sulfúrico (39:20:5:2) y 1.7 ml de heptano. Esta mezcla se calentó a 80°C durante 1h. El sobrenadante generado que contenía los ácidos grasos de ésteres metílicos se traspasó a un nuevo tubo para lavarlos con 6.7% de sulfato de sodio. Se evaporaron y se secaron con nitrógeno. Los ésteres metílicos se disolvieron en un volumen adecuado de heptano y se analizaron mediante cromatografía gas-líquido (Serrano-Vega et al., 2005). Los distintos ésteres metílicos se identificaron por la comparación en su tiempo de retención con aquellos estándares conocidos.

3.5. Ensayos celulares

3.5.1. Determinación del número de células en *Chlamydomonas* con la cámara de Neubauer

La determinación del número de células en cultivos de *Chlamydomonas* para definir la fase de crecimiento se realizó mediante contaje utilizando la cámara de Neubauer. Para fijar las células e impedir su movimiento, se utilizó yodina (Sigma-Aldrich; I3380) a una concentración final del 0.03%. Las células se visualizaron con un microscopio óptico (Leica DMLB) utilizando el campo claro. Se contaron las células de todos los campos de la cámara de Neubauer, y para determinar la concentración celular se aplicó la fórmula donde se divide el número total de células entre 16 (número de cuadrantes de la cámara):

$$(\text{n}^\circ \text{ total de células} / 16) \times \text{FD} \times 5 \times 1000 = \text{células/ml}$$

FD: Factor de dilución

3.5.2. Citometría de flujo

Las estirpes WT4A+ y mutante *atg8* de *Chlamydomonas* utilizadas en esta tesis se analizaron mediante citometría para estudiar comparativamente su crecimiento bajo distintas condiciones de estrés. Este análisis se realizó en la Unidad de Citometría del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Para ello las células se fijaron con 2% (v/v) de paraformaldehído (Sigma-Aldrich; 158127) durante 20 min en hielo y posteriormente se lavaron 4 veces con 50 mM de tampón PBS (pH 7.5). Una vez fijadas, las muestras se analizaron con un citómetro de flujo *FACSCalibur Cytometry System* (BD). La intensidad relativa en la fluorescencia se detectó por un fotomultiplicador en una excitación de 480 nm y una emisión de 670 nm. La dispersión existente en la muestra se utilizó para ver diferentes poblaciones celulares según el área de la superficie celular y su tamaño. Los datos obtenidos se procesaron con el software *CellQuest ProV5.2.1* (BD).

3.5.3. Determinación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular en *Chlamydomonas* se utilizó la tinción con *Evans Blue* (Sigma-Aldrich; E2129) ya que este colorante sólo penetra en las células no viables (Pérez-Martín et al., 2014). Las células no viables, no presentan integridad en la membrana y por ello, no son capaces de seleccionar que sustancias la traspasan. De esta forma se puede cuantificar el número de células

viables, que son aquellas que no han integrado el colorante. Se incubaron 450 μl de cultivo con una concentración de *Evans Blue* de 0.1% (p/v) durante 5 min. Se lavaron las células con medio TAP para eliminar el exceso de colorante y se resuspendieron en el mismo volumen inicial. Finalmente se visualizaron en el microscopio óptico (Leica DMLB) y se cuantificó el porcentaje de células viables frente a las no viables.

3.5.4. Medidas de parámetros fotosintéticos

Las características del aparato fotosintético en células de *Chlamydomonas* se estudiaron utilizando el fluorómetro *Imaging-PAM*. Para ello, las células crecidas en distintas condiciones de estrés se recogieron mediante centrifugación durante 5 min a 3000 *g*. Estas células se lavaron una vez con medio TAP y se concentraron 50 veces. Las células se normalizaron por densidad óptica a 750 nm. Los parámetros fotosintéticos se midieron basándose en sus características fluorescentes utilizando el aparato *Imaging-PAM Chlorophyll Fluorometer* (IMAG-MAX/L) equipado con una cámara *IMAG-K7* (Heinz Walz). Se utilizó una placa multipocillo con 96 pocillos (Thermo Scientific; 137101). Se midieron los parámetros F_v/F_m , el cual define la máxima capacidad fotosintética del PSII, y el flujo de electrones a lo largo del aparato fotosintético o ETR a distintas intensidades lumínicas. El ETR se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{ETR} = \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0.5 \times \text{Absorción}$$

El ETR se midió en distintas intensidades de luz actínica (PAR: radiación fotosintéticamente activa) desde 0 hasta 1251 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Antes de cada medida, las células se aclimataron durante 10 min en oscuridad.

3.5.5. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las células crecidas en distintas condiciones se utilizaron para medir el nivel de ROS (especies reactivas de oxígeno). Este proceso se realizó utilizando la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA) (Invitrogen; D-399). El compuesto H2DCFDA se convierte en diclorofluoresceína al unirse al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la especie reactiva del oxígeno más estable y por ello más abundante, adquiriendo así fluorescencia (Pérez-Pérez et al., 2012b). Según el protocolo establecido, se utilizan 200 μg de extracto total de proteínas provenientes de células de *Chlamydomonas*. Cada muestra se utilizó para dos alícuotas idénticas, siendo una de ellas tratada con 100 mM de ascorbato (Sigma-Aldrich; A5960) para ser utilizada como señal umbral. Las muestras se incubaron durante 15 min a 25°C y posteriormente se utilizó el compuesto

H₂DCFDA preparado en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich; D8418) a una concentración de 25 μ M. A continuación, se incubaron durante 30 min a 30°C. Finalmente, se midió la fluorescencia emitida mediante un espectrofotómetro de fluorescencia *Varioskan Lux* (ThermoFisher) con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 525 nm respectivamente (Joo et al., 2005). Se tomaron tres muestras independientes con al menos tres réplicas técnicas cada una. Los valores obtenidos se representaron como unidades de fluorescencia relativa por microgramo de proteína.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Inhibición de la enzima ácido graso sintasa (FAS) en *Chlamydomonas*

4.1.1. La inhibición de la enzima FAS activa la autofagia

La mayoría de los lípidos que se encuentran en las células de *Chlamydomonas* proceden de la síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto (Li-Beisson et al., 2015). Para investigar una posible conexión entre el metabolismo de lípidos y la autofagia en *Chlamydomonas*, se analizó el papel de la síntesis de ácidos grasos en la regulación de este proceso catabólico. Para ello, se bloqueó la síntesis *de novo* de los ácidos grasos en el cloroplasto utilizando la droga cerulenina, un inhibidor específico para la actividad de la enzima FAS (Figura 13A). La cerulenina se ha utilizado para inhibir la actividad de la enzima FAS en distintos organismos incluyendo bacterias, levaduras, plantas y algas entre otros (Koo et al., 2005; Liu et al., 2012; Shpilka et al., 2015; Yang et al., 2015a). En *Chlamydomonas* se ha demostrado que 10 μM es una concentración óptima de cerulenina para prevenir la síntesis de triacilglicerolos (TAGs) en células sometidas a condiciones de deficiencia de nitrógeno (Fan et al., 2011). Por este motivo, se utilizó esta concentración para bloquear la síntesis de ácidos grasos en nuestros experimentos. En primer lugar, mediante ensayos de crecimiento en medio líquido (Figura 13B) y diluciones seriadas en medio sólido (Figura 13C), se demostró que 10 μM de cerulenina inhibe el crecimiento celular de *Chlamydomonas*.

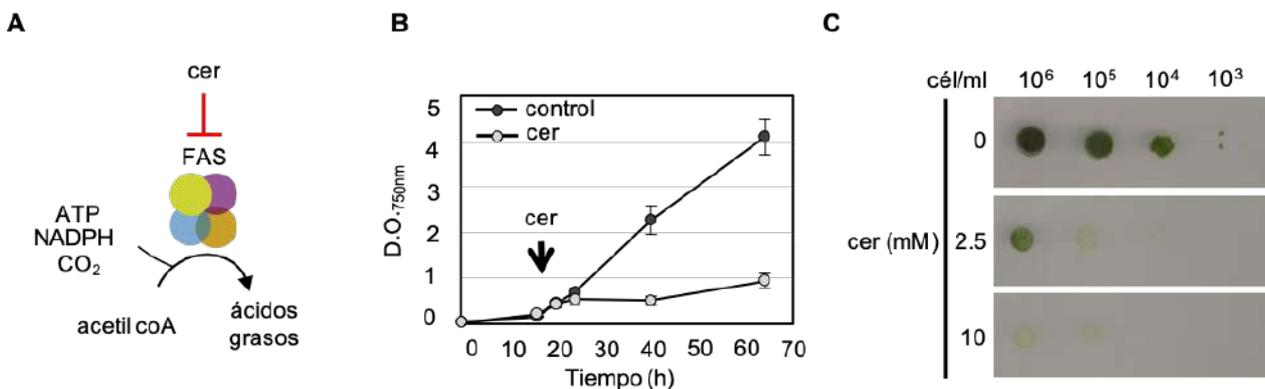


Figura 13. Efecto de la inhibición de la enzima FAS en el crecimiento celular de *Chlamydomonas*. **A.** Representación esquemática del efecto de la droga cerulenina (cer) sobre la enzima FAS. **B.** Curva de crecimiento de cultivos de *Chlamydomonas* en ausencia (células control en negro) y presencia (células tratadas en gris) de cerulenina (10 μM). La flecha indica el tiempo de adición de cerulenina al cultivo. En cada punto se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm ($D.O_{750\text{nm}}$). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas de cada una. **C.** Diluciones seriadas de células de *Chlamydomonas* se sembraron en placas de medio TAP con la concentración de cerulenina indicada (0, 2.5 o 10 μM). Las placas se incubaron a 25°C en condiciones de iluminación continua (25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 5 días.

Para caracterizar el efecto de la cerulenina sobre la inhibición de la enzima FAS en *Chlamydomonas* se analizaron las posibles consecuencias sobre el proceso de autofagia cuya activación ocurre en condiciones de estrés (Pérez-Pérez et al., 2012a). Para ello, se examinaron los niveles de la proteína ATG8 mediante inmunodetección con anticuerpos específicos (Pérez-Pérez et al., 2010) en células de *Chlamydomonas* en fase exponencial tratadas con cerulenina. Se observó que el tratamiento con cerulenina produce tanto un aumento en los niveles de ATG8 como la detección de la proteína ATG8 lipidada (ATG8-PE) a las 4 h de inhibición con la droga, que fue más pronunciado después de 8 h de tratamiento (Figura 14A). Por otro lado, se ha demostrado que la ConcA, un inhibidor específico de la ATPasa vacuolar (Couso et al., 2018), bloquea el flujo autofágico y previene la degradación de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37 en células de *Chlamydomonas* con deficiencia de nitrógeno o fósforo (Couso et al., 2018). Con objeto de investigar el efecto de la cerulenina cuando se inhibe el flujo autofágico, se analizaron los niveles de estas proteínas en células tratadas con cerulenina en ausencia o presencia de ConcA. Nuestros resultados demostraron que la abundancia de RPS6 y RPL37 disminuye en células tratadas con cerulenina, mientras que la adición de ConcA impide la degradación de dichas proteínas (Figura 14B).

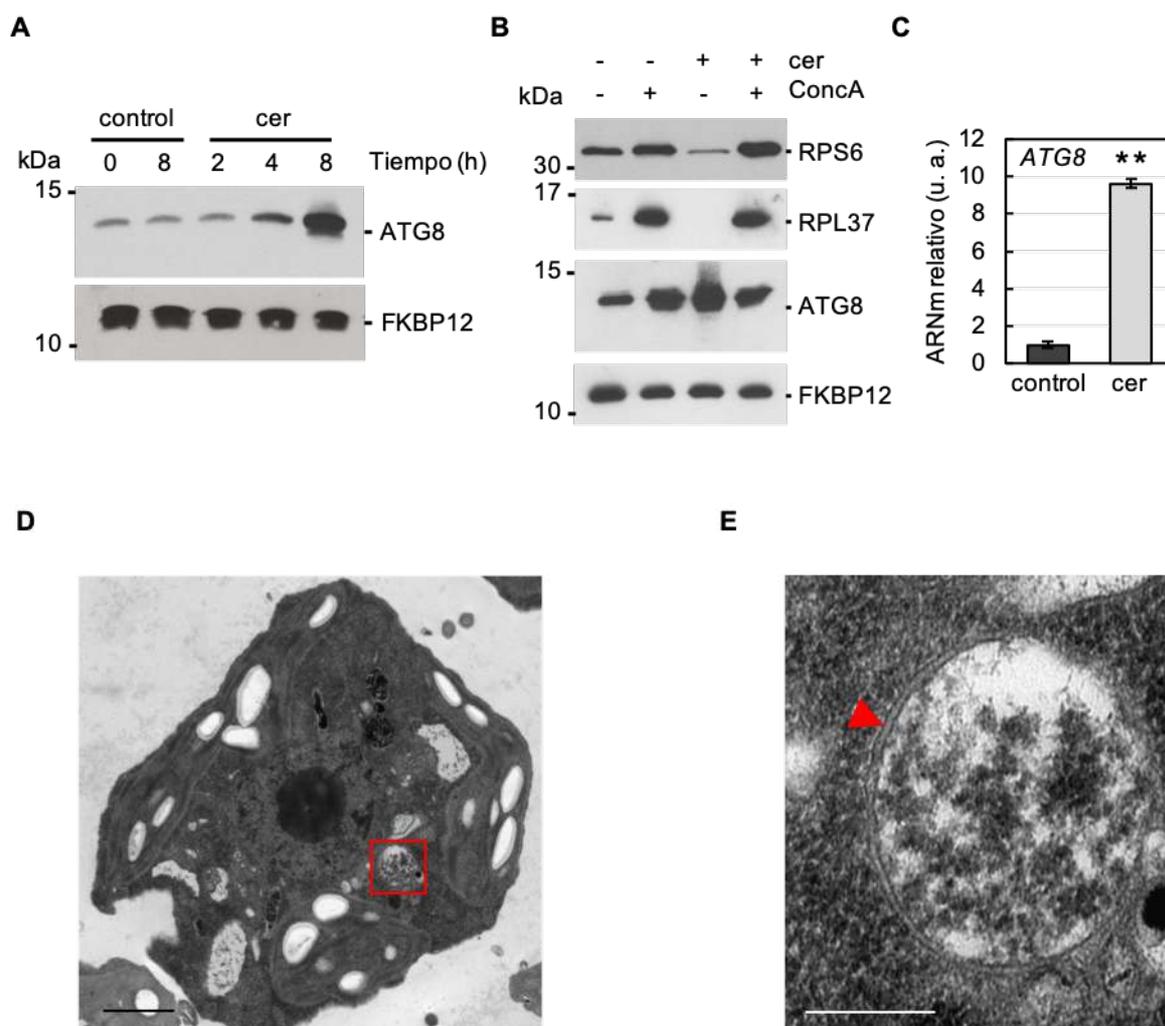


Figura 14. Activación de la autofagia en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. **A.** Cultivos de *Chlamydomonas* en fase exponencial se trataron con 10 μM de cerulenina (cer) durante 0, 2, 4 y 8 h. Células sin tratar crecidas durante 0 h y 8 h se utilizaron como control. Quince μg de extracto total de proteínas se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE y posteriormente a análisis por western blot utilizando anticuerpos anti-ATG8 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se utilizó como control de carga. **B.** Cultivos de *Chlamydomonas* se trataron durante 8 h con 10 μM de cerulenina y/o 0.1 μM de ConcA. Quince μg de extracto total de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12% (RPS6) o al 15% (RPL37, ATG8, y FKBP12) para posteriormente realizar un análisis por western blot con los anticuerpos anti-OLLAS, anti-RPL37, anti-ATG8, y anti-FKBP12. **C.** Análisis de la expresión del gen *ATG8* mediante PCR cuantitativa (qPCR) en células de *Chlamydomonas* tras 8 h de tratamiento con 10 μM de cerulenina (u. a., unidades arbitrarias). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una se utilizaron en cada condición. Las barras de error indican la desviación estándar. **, $P < 0.01$. **D.** Imagen de microscopía electrónica de una célula de *Chlamydomonas* tratada con cerulenina (10 μM). **E.** Detalle de un autofagosoma en **D** señalado por un cuadro rojo. Escala: 1 μm y 500 nm, respectivamente.

Para profundizar en el efecto de la cerulenina sobre la autofagia en *Chlamydomonas*, se analizó la expresión del transcrito *ATG8* que se induce bajo condiciones de estrés (Goodenough et al., 2014; Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Ramundo et al., 2014; Schmollinger et al., 2014). Para ello, se analizó mediante qPCR la abundancia de los niveles de ARNm del gen *ATG8* en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Nuestros datos indicaron que los niveles de expresión de este gen, relacionado con la maquinaria central de la autofagia, aumentó considerablemente después de 8 h de tratamiento (Figura 14C). Por último, se detectó mediante microscopía electrónica la aparición de vesículas de doble membrana, una característica morfológica de los autofagosomas, en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina (Figura 14D y E). Por tanto, nuestros resultados demuestran que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos activa la autofagia en *Chlamydomonas*.

4.1.2. La inhibición de la enzima FAS disminuye los niveles del lípido de membrana monogalactosil diacilglicerol (MGDG)

Para investigar el mecanismo por el cual la inhibición de la síntesis de ácidos grasos activa la autofagia en *Chlamydomonas*, se estudio el efecto de la cerulenina en el contenido de lípidos polares de membrana. Nuestros resultados indicaron una disminución en la abundancia de los niveles de monogalactosil diacilglicerol (MGDG), el lípido más abundante en las membranas tilacoidales (Gounaris and Barber, 1983; Moellering and Benning, 2011), y un aumento en los niveles de sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) (Figura 15A). No se observaron efectos significativos en los niveles de digalactosil diacilglicerol (DGDG), por lo que el tratamiento con cerulenina produjo una alteración en la relación MGDG/DGDG (Figura 15A). Dicha relación representa un parámetro esencial para la estabilidad de las membranas tilacoidales y el correcto funcionamiento de los fotosistemas (Dörmann and Benning, 2002; Moellering and Benning, 2011). También se determinó

el perfil de los ácidos grasos en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. La abundancia relativa de los ácidos grasos C16 no cambió. Sin embargo, sí se detectaron algunas alteraciones en los ácidos grasos C18. Concretamente, disminuyeron los ácidos grasos C18:1^{Δ9} y C18:2^{Δ9,12}, mientras que aumentaron los C18:1^{Δ11} y C18:3^{Δ9,12,15} (Figura 15B).

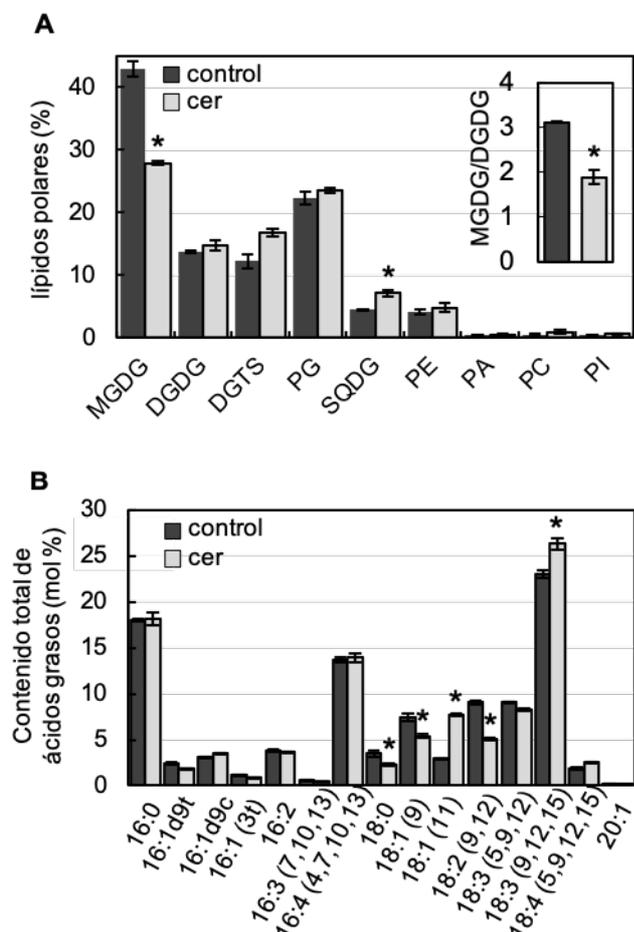


Figura 15. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre el contenido en lípidos polares y ácidos grasos en *Chlamydomonas*. Células creciendo exponencialmente en medio TAP se trataron con 10 μ M de cerulenina (cer) durante 16 h. Se cuantificaron los niveles de lípidos polares (**A**) y ácidos grasos (**B**) a partir de células de *Chlamydomonas* en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de cerulenina. El panel insertado en **A** muestra la relación entre los lípidos MGDG/DGDG en condiciones control y tratadas con cerulenina. Tres réplicas biológicas se analizaron para cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$.

4.1.3. El tratamiento con cerulenina produce un daño en el cloroplasto de células de *Chlamydomonas*

Para obtener más información a nivel celular sobre el efecto en la inhibición de la enzima FAS, se llevó a cabo un estudio de microscopía y citometría de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina durante 8, 24 y 48 h. Por un lado, se analizó mediante microscopía diferencial de contraste (DIC) la morfología y el tamaño celular. Nuestros resultados muestran un tamaño celular superior en aquellas células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina (Figura 16A). También se observó mediante microscopía óptica una disminución del cloroplasto en las células tratadas con cerulenina durante 24 h que se hizo más evidente después de 48 h (Figura 16A). Para confirmar los efectos visualizados en el cloroplasto realizamos un ensayo mediante microscopía de fluorescencia

confocal en células tratadas con 10 μM de cerulenina. Estos resultados indican que tanto la fluorescencia como el tamaño del cloroplasto disminuyen tras la inhibición de la enzima FAS (Figura 16B).

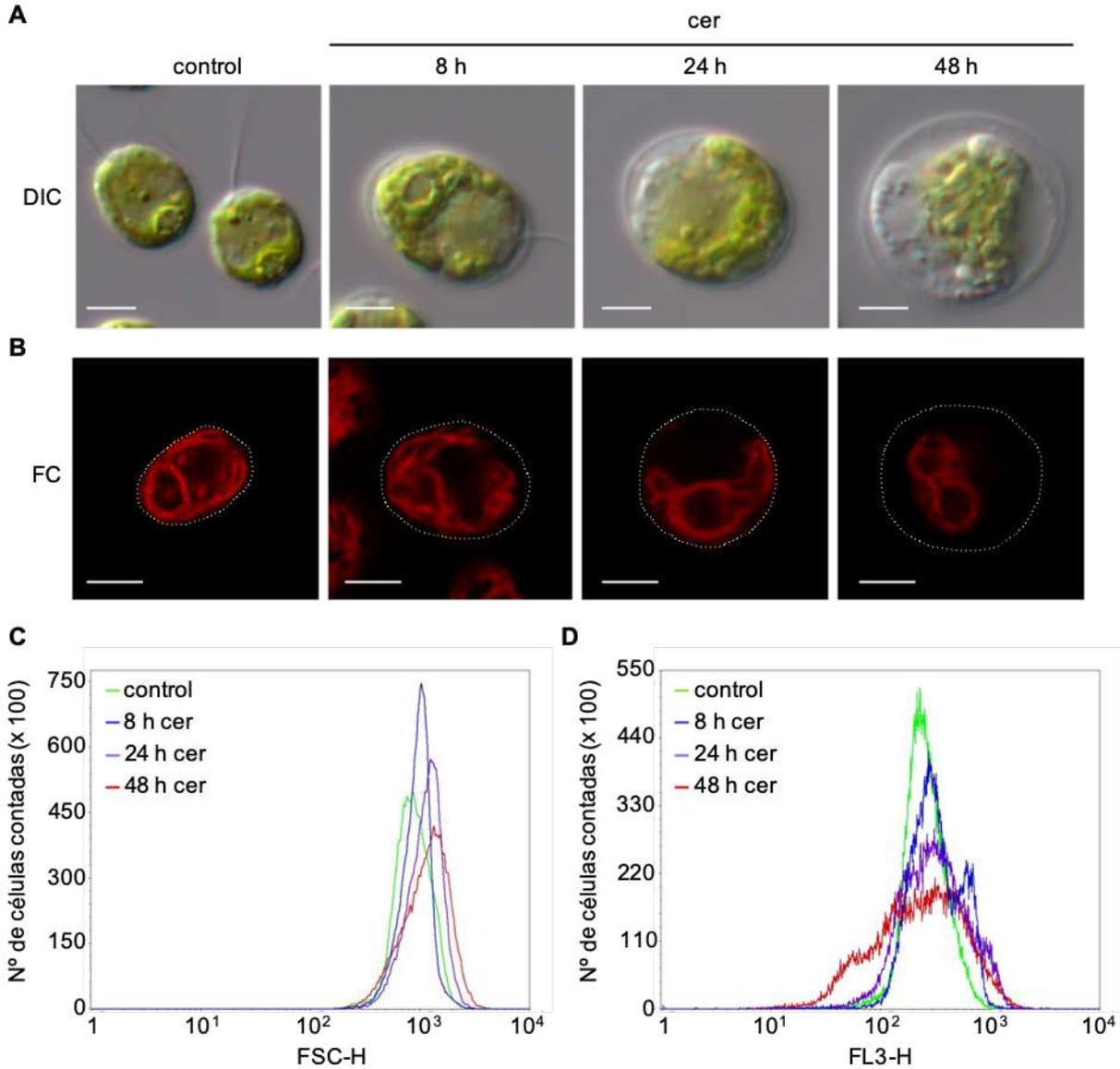


Figura 16. Efecto de la cerulenina sobre la morfología celular de *Chlamydomonas*. **A.** Imágenes de microscopía diferencial de contraste (DIC) de células de *Chlamydomonas* en fase exponencial de crecimiento tratadas con 10 μM de cerulenina (cer) durante 8, 24 y 48 h. **B.** Imágenes de microscopía confocal mostrando la fluorescencia de la clorofila (FC) de células individuales tratadas con 10 μM de cerulenina durante 8, 24 y 48 h. Células sin tratar se utilizaron como control (primer panel en **A** y en **B**). Barra de escala: 5 μm . Se cuantificaron mediante citometría de flujo tanto el tamaño (**C**) como la fluorescencia de la clorofila (**D**) en cultivos en fase exponencial a una concentración de 5×10^4 cél/ml y tratados con 10 μM de cerulenina durante 8, 24 y 48 h. Como control se emplearon células en fase exponencial de crecimiento sin tratar. FSC-H, *Forward-scattered light* (tamaño); FL3-H, fluorescencia.

Por último, utilizando un citómetro de flujo se estudiaron tanto el tamaño como la complejidad celular y se cuantificó la fluorescencia del cloroplasto para confirmar los resultados anteriores. Los datos obtenidos por citometría de flujo demostraron que existe un aumento gradual en el tamaño celular que se aprecia después de 8 h de tratamiento con cerulenina (Figura 16C). Además, las células de *Chlamydomonas* tratadas con 10 μ M de cerulenina presentan una pérdida significativa en la fluorescencia de las clorofilas del cloroplasto en condiciones de inhibición de la enzima FAS (Figura 16D). Todos estos resultados muestran que el estrés causado por la inhibición de la enzima FAS en *Chlamydomonas* tiene un fuerte impacto en la morfología de células tratadas durante 24 y 48 h con cerulenina a una concentración de 10 μ M, aunque sus efectos son visibles incluso tras 8 h de tratamiento.

4.1.4. El tratamiento con cerulenina de células de *Chlamydomonas* produce el apilamiento de las membranas tilacoidales

Con el fin de identificar un efecto temprano en el tratamiento con cerulenina, se realizó un análisis ultraestructural de células de *Chlamydomonas* tratadas durante 8 h mediante microscopía electrónica. Las imágenes de células sin tratar presentan una arquitectura típica con un único cloroplasto que ocupa gran parte de la célula (Figura 17A) a diferencia de las células tratadas (Figura 17B). En las imágenes de microscopía, se ha indicado (Figura 17A) y ampliado (Figura 17C y E) la zona que muestra las membranas tilacoidales como láminas planas o en forma de disco que pueden aparecer solas o agrupadas en una célula sana (Goodenough and Levine, 1969). Por otra parte, en el análisis ultraestructural de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina (10 μ M) se identificaron varias regiones en el cloroplasto donde las membranas tilacoidales presentan un alto grado de empaquetamiento (Figura 17D y F).

Igualmente, el número de membranas tilacoidales apiladas fue significativamente superior en células tratadas con cerulenina comparadas con las células sin tratamiento (Figura 17G). Estos empaquetamientos de membrana, típicos en células tratadas no se identificaron en células control, lo que sugiere que el empaquetamiento de las membranas tilacoidales se debe al efecto de la inhibición de la enzima FAS.

Finalmente, se analizaron un gran número de células mediante microscopía electrónica de transmisión para poder identificar y cuantificar el número de membranas tilacoidales por apilamiento y obtener imágenes de estas regiones del cloroplasto con alto grado de empaquetamiento en los tilacoides (Figura 18).

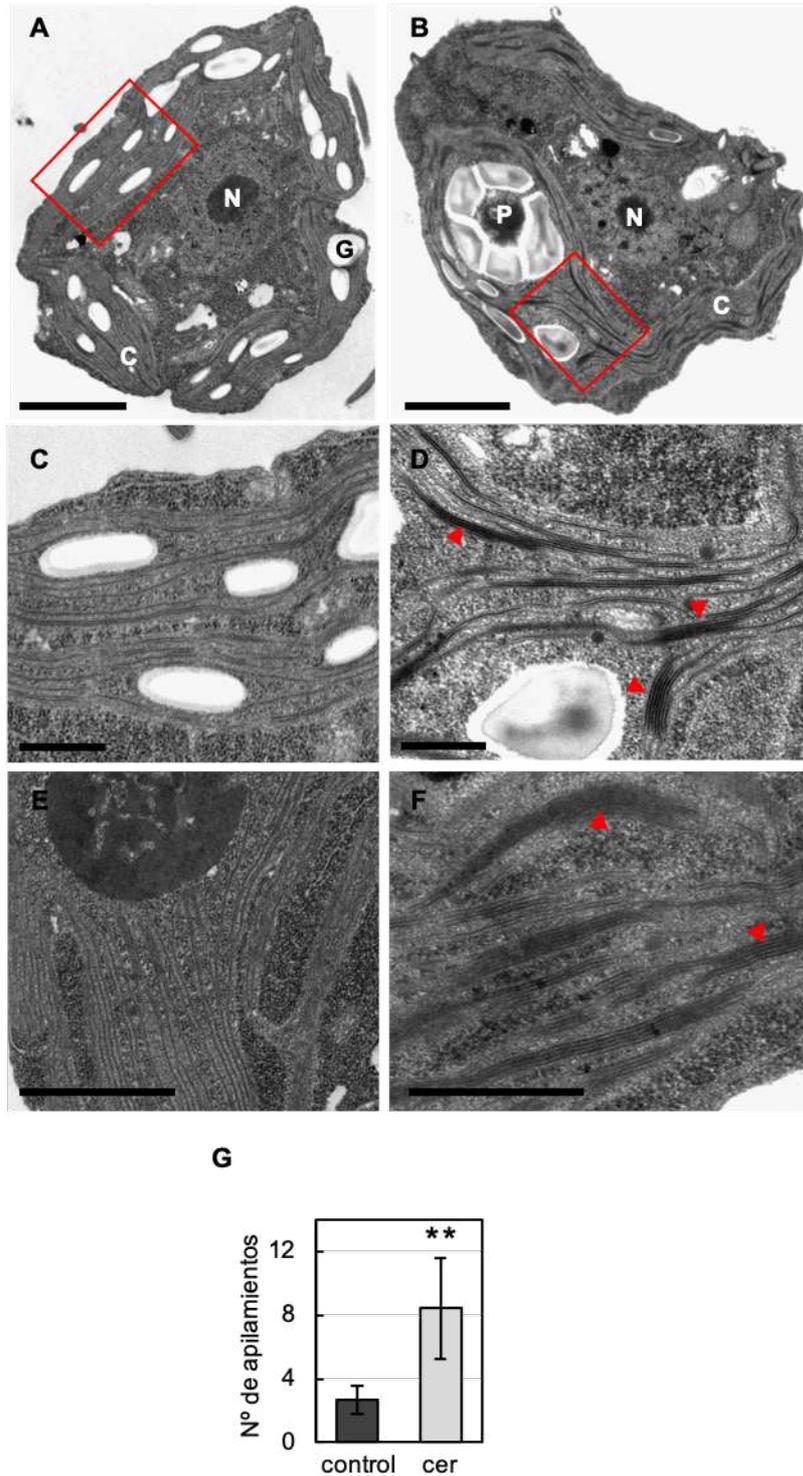


Figura 17. Análisis estructural de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Imágenes de microscopía electrónica de células de *Chlamydomonas* creciendo en ausencia (A) o presencia (B) de 10 μM de cerulenina (cer) durante 8 h. C, cloroplasto; N, núcleo; P, pirenoide; V, vacuola; G, gránulos de almidón. Los paneles C y D muestran una ampliación de las zonas marcadas en A y B, respectivamente. Los paneles E y F muestran ampliaciones de células de *Chlamydomonas* creciendo en ausencia y presencia de cerulenina. Las flechas rojas señalan las membranas tilacoidales con un alto grado de empaquetamiento. G. Cuantificación del número de membranas por apilamiento en células sin tratar (color negro) y tratadas (color gris) con cerulenina (10 μM). **, $P < 0.01$; $n_{\text{control}} = 129$; $n_{\text{cer}} = 105$. Escala: A, 2 μm ; B, 1 μm ; C y D, 500 nm; E y F, 1 μm .

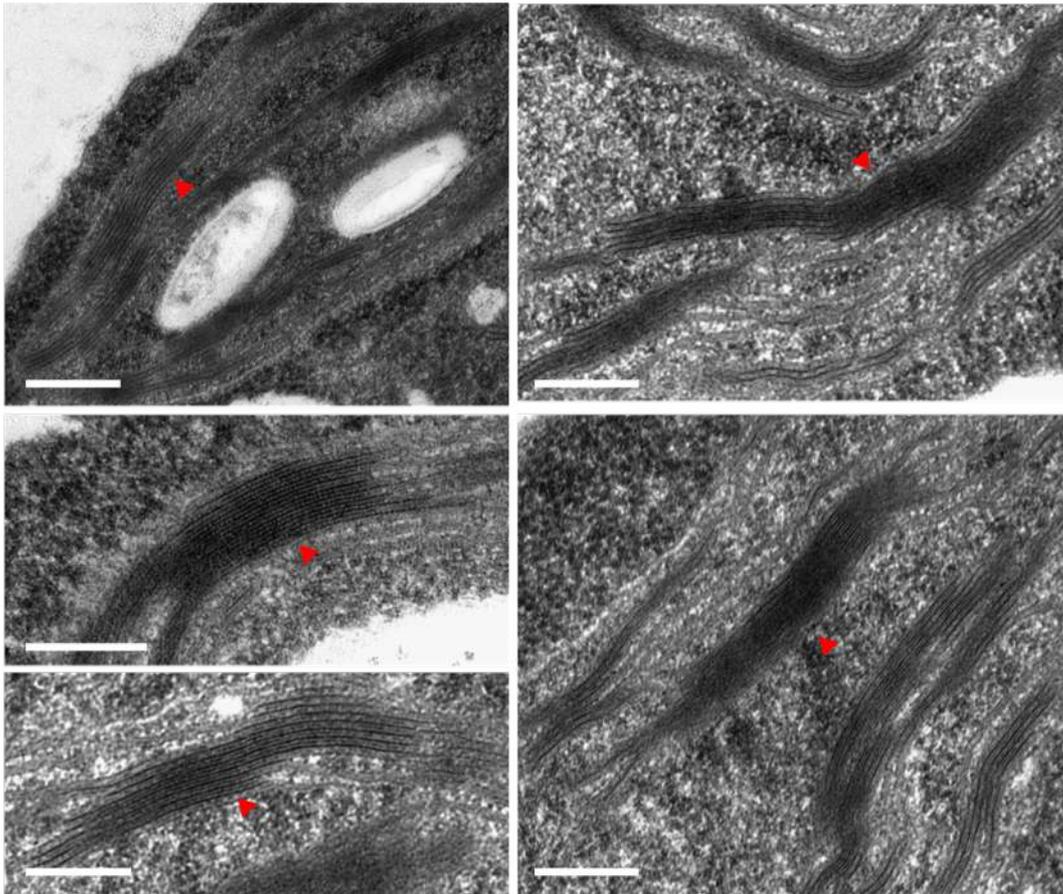


Figura 18. Apilamientos de membranas tilacoidales en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Imagen de microscopía electrónica donde se observan ampliaciones de células de *Chlamydomonas* tratadas con 10 μM de cerulenina durante 8 h. Las flechas rojas señalan las membranas tilacoidales con un alto grado de empaquetamiento. Escala: 1 μm .

4.1.5. Las células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina presentan una activación de la respuesta a estrés del cloroplasto y una disminución en la eficiencia fotosintética

Nuestros resultados indicaron que el tratamiento de células de *Chlamydomonas* con cerulenina tiene un profundo impacto en el cloroplasto incluyendo una disminución en los niveles de MGDG (Figura 15A), una disminución en el tamaño y la fluorescencia del cloroplasto (Figura 16) y un alto grado de empaquetamiento de las membranas tilacoidales (Figura 17 y Figura 18). Basándonos en estos resultados, se analizó si la inhibición de la enzima FAS mediante la droga cerulenina tiene algún efecto en la actividad fotosintética. Para ello, se determinó la eficiencia fotosintética de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina a diferentes tiempos utilizando un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (PAM). Por un lado, se analizó el flujo de la cadena transportadora de electrones (ETR) en cultivos tratados con cerulenina a una concentración 10 μM .

Mediante el análisis del ETR, se demostró que la actividad fotosintética disminuye tras 8 h de tratamiento con cerulenina y es casi indetectable después de 24 h (Figura 19A). Sin embargo, no se detectaron efectos en células tratadas durante 4 h (Figura 19A). También se determinó la eficiencia fotoquímica máxima del PSII, medida como la variable de la máxima fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m), en células tratadas con cerulenina. Se observó una disminución de la eficiencia del PSII después de 8 h que fue incluso menor tras 24 h de tratamiento (Figura 19B). La baja eficiencia fotosintética detectada en células tratadas con cerulenina podría deberse a una alteración en la abundancia de proteínas fotosintéticas. Para demostrarlo, se analizaron los niveles de proteína que pertenecen a los complejos PSI y PSII y algunas proteínas citosólicas fueron utilizadas como control. Este análisis mediante inmunodetección reveló una disminución gradual en la abundancia de las proteínas del PSII (PsbA, PsbB, PsbC, y Lhcb5) y del PSI (PsaC) en células tratadas con cerulenina (Figura 19C). No se detectaron cambios significativos en proteínas citosólicas como Arf1 o FKBP12 (Figura 19C). Como se ha indicado anteriormente (Figura 14), la inhibición de la enzima FAS produce un aumento en los niveles de ATG8, así como la aparición de su forma lipídada (Figura 19C).

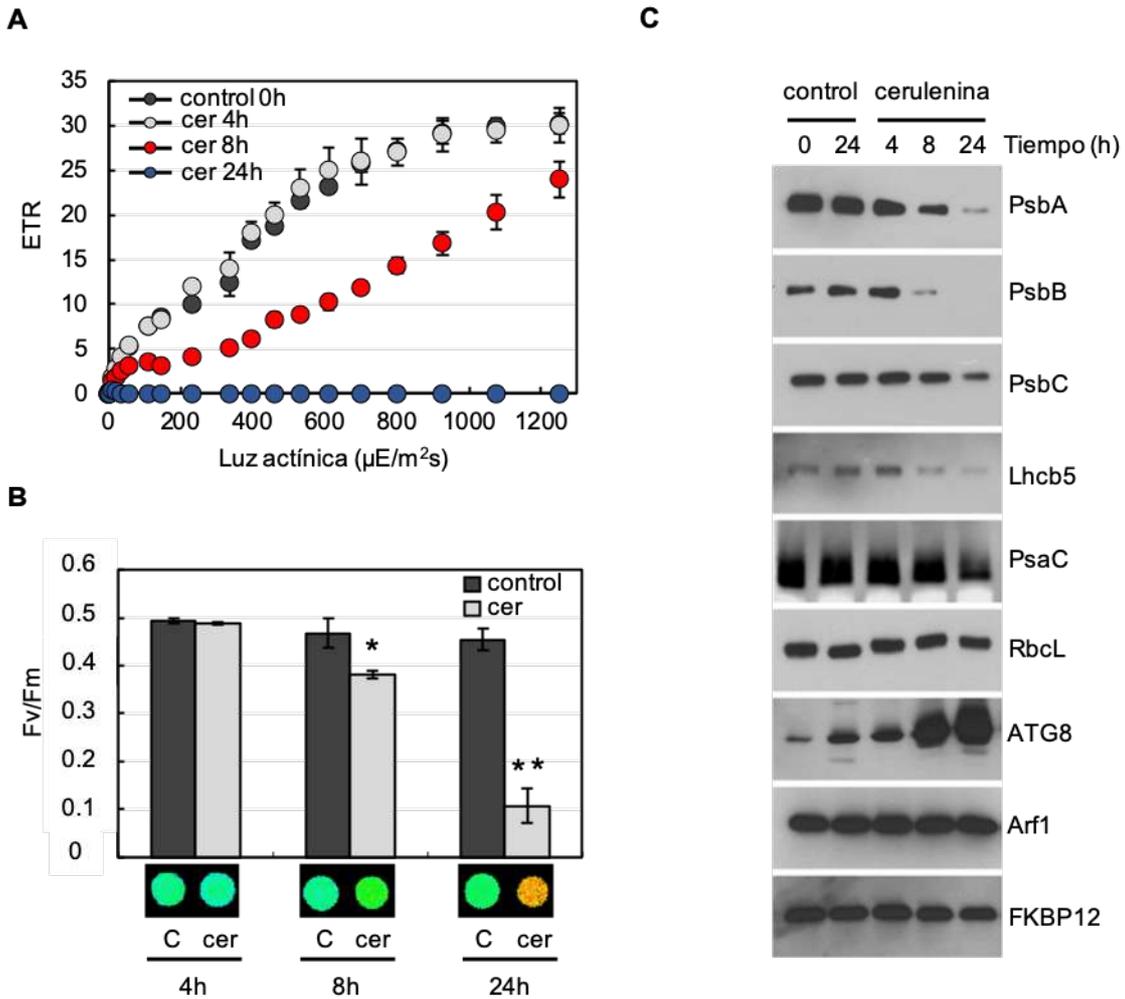


Figura 19. Efecto de la inhibición de la enzima FAS en las propiedades fotosintéticas de *Chlamydomonas*. **A.** Se muestra la tasa de transporte electrónico (ETR) relativa a la intensidad de luz actínica ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de cultivos sin tratamiento (círculos negros) o tratadas con 10 μM de cerulenina (cer) (círculos grises, 4 h; círculos azules, 8 h; círculos rojos, 24 h). Los cultivos se normalizaron a una longitud de onda de 750 nm. **B.** Valores F_v/F_m de células en presencia (cer, columna gris) o ausencia (C, columna negra) de la droga cerulenina 10 μM durante 4, 8 o 24 h. Los valores indican las medias de tres experimentos independientes incluyendo al menos tres réplicas técnicas de cada uno de ellos. *, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$. Se muestran adjunto a **B** puntos de color correspondiente a los experimentos típicos de F_v/F_m . **C.** Análisis mediante western blot de proteínas cloroplastídicas y citosólicas en ausencia y presencia de cerulenina. Células de *Chlamydomonas* en fase exponencial se trataron con 10 μM de cerulenina y se recogieron a los tiempos indicados. Veinte μg de extracto total de proteína se resolvieron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE seguidos de inmunodetección con los anticuerpos indicados, excepto por las proteínas PsbA y RbcL, donde se utilizaron 5 μg de extracto.

El efecto observado en la actividad fotosintética de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina demuestra que existe un daño en el cloroplasto. Por este motivo, se analizaron los niveles de proteínas marcadoras de estrés en el cloroplasto en células tratadas con cerulenina. Mediante inmunodetección con anticuerpos específicos se detectó un aumento en la abundancia de las proteínas VIPP1, VIPP2 y HSP70B (Figura 20A) las cuales también se inducen en condiciones de estrés por alta luz en *Chlamydomonas* (Nordhues A et al., 2012). No se detectaron cambios significativos en proteínas citosólicas como FKBP12 (Figura 20A). Por otra parte, se analizó mediante qPCR la abundancia de genes marcadores de estrés en el cloroplasto. Mediante este análisis se detectó un aumento en los niveles de ARNm de los genes *VIPP1*, *VIPP2*, *HSP22F* y *DEG11* (Figura 20B-E). Estos resultados indican que la inhibición de la enzima FAS por el tratamiento con cerulenina disminuye la actividad fotosintética e induce los genes de respuesta a estrés en el cloroplasto en *Chlamydomonas*.

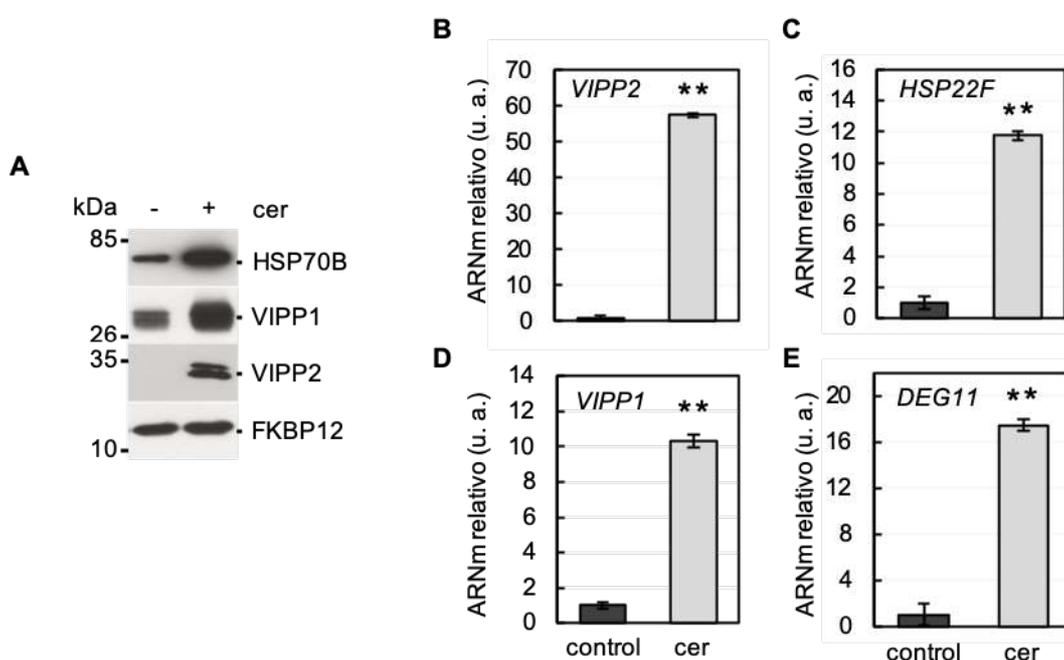


Figura 20. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre proteínas marcadoras de la respuesta a estrés en el cloroplasto. **A.** Se trataron cultivos en fase exponencial de *Chlamydomonas* con 10 μ M de cerulenina (cer) durante 8 h. Cultivos sin tratar se utilizaron como control. Cinco μ g de extracto total de proteína se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE y posteriormente a análisis por western blot utilizando anticuerpos anti-HSP70B, anti-VIPP1, anti-VIPP2 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se utilizó como control de carga. Se muestra el análisis de expresión de la abundancia del ARNm de los genes *VIPP2* (**B**), *HSP22-F* (**C**), *VIPP1* (**D**) y *DEG11* (**E**) en células tratadas con 10 μ M de cerulenina durante 8 h (u. a., unidades arbitrarias). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas fueron analizadas en cada condición. Las barras de error indican la desviación estándar sobre la media. **, $P < 0.01$.

4.1.6. La inhibición de la enzima FAS provoca un aumento en los niveles de ROS en células de *Chlamydomonas*

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con cerulenina tiene efectos negativos en el cloroplasto y debido a que este orgánulo es uno de los principales generadores de ROS en plantas y algas, se investigó si el tratamiento con cerulenina produce estrés oxidativo. Para ello, se cuantificó la producción de ROS en células tratadas con cerulenina (10 μ M) a lo largo del tiempo mediante el marcador 2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H2DCFDA), el cual se une a las especies reactivas del oxígeno y cambia a una molécula fluorescente de diclorofluoresceína (Joo et al., 2005; Pérez-Pérez, et al., 2012).

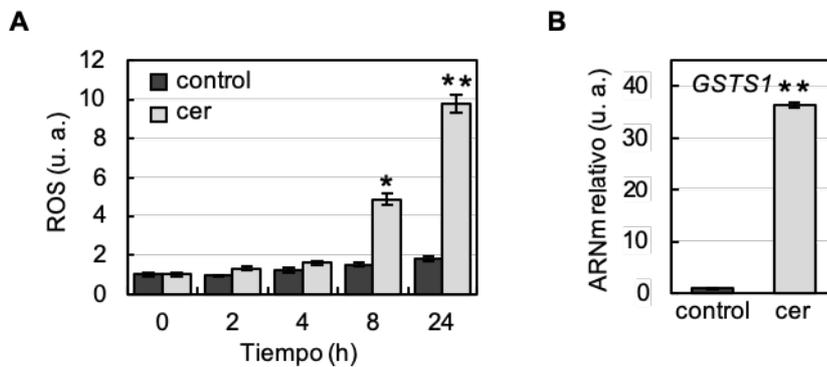


Figura 21. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). **A.** Niveles de ROS en respuesta al tratamiento con 10 μ M de cerulenina (cer) en cultivos de *Chlamydomonas*. Se determinó la acumulación de ROS en células tratadas con cerulenina durante 2, 4, 8 y 24 h (u. a., unidades arbitrarias). Se utilizaron como control células sin tratar durante los mismos tiempos. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes. **B.** Se representó el nivel de expresión del gen marcador de estrés oxidativo, *GSTS1*, por qPCR. Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una se analizaron para cada condición. Las barras de error indican la desviación estándar sobre la media. *, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$.

Nuestros resultados indicaron que los niveles de ROS aumentaron después de 8 h de tratamiento y fueron incluso mayores después de 24 h (Figura 21A). Para profundizar en el estudio

de la conexión entre el daño en el cloroplasto, el estrés oxidativo y el estrés inducido por la cerulenina, se analizó la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo como *Glutati6n-S-transferasa1* (*GSTS1*) en células tratadas con cerulenina. La proteína que codifica este gen juega un papel importante en la detoxificación de ROS y su expresión corresponde a la presencia de distintas formas de ROS en *Chlamydomonas* (Ledford et al., 2007; Fischer et al., 2007, 2012). Se analizó mediante qPCR la abundancia del ARNm y se observó que los niveles de expresión del gen *GSTS1* aumentaron notablemente en células tratadas con cerulenina comparadas con células control (Figura 21B). Estos datos indican que la inhibición de la enzima FAS por cerulenina aumenta la producción de ROS y activa una respuesta a estrés en el cloroplasto de *Chlamydomonas*.

4.1.7. Análisis transcriptómico de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina

Para entender el impacto global en la inhibición de la actividad de la enzima FAS, se realizó un análisis transcriptómico del genoma completo de células de *Chlamydomonas* tratadas con 10 μM de cerulenina. Se utilizaron para este experimento muestras de 0, 4 y 8 h tras la adición de cerulenina con el fin de entender la respuesta celular primaria a la inhibición de la enzima FAS. Basándonos en el leve efecto de la cerulenina sobre la eficiencia fotosintética y la producción de ROS a las 4 h de tratamiento (Figura 19 y Figura 21) discutimos que en esos tiempos podría ocurrir la respuesta transcripcional. Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada muestra y de acuerdo con el análisis de componentes principales todas las muestras tenían concordancia con sus respectivos grupos (Figura 22).

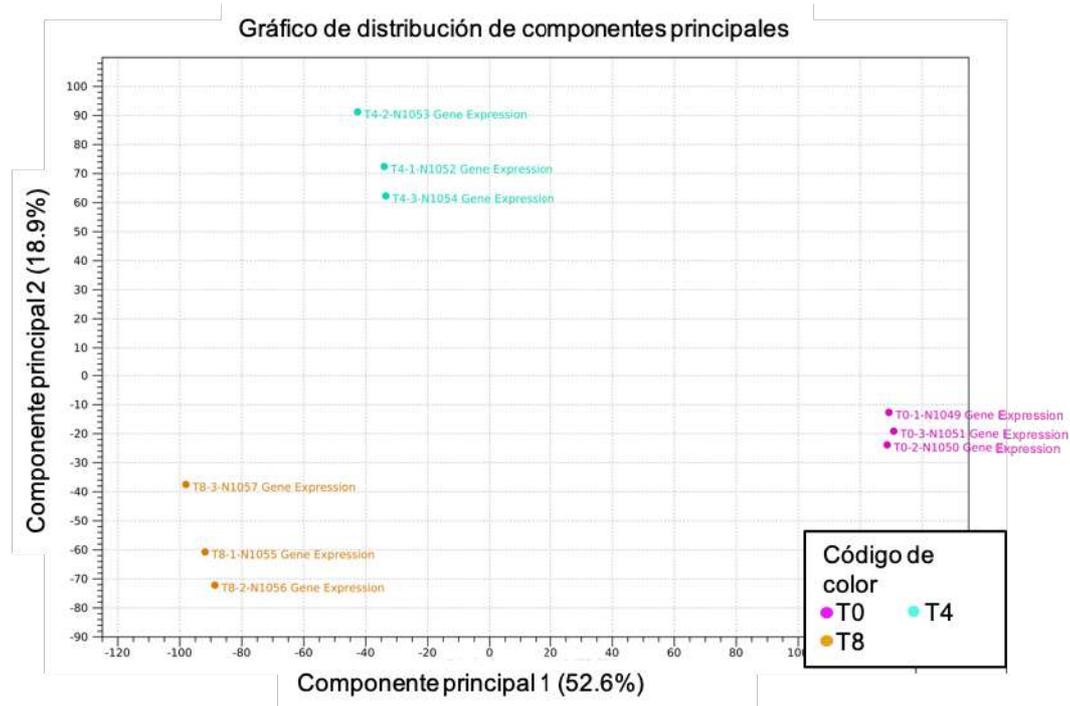


Figura 22. Distribución de los datos del estudio de la expresión génica de cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Se utilizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una para analizarlas en cada tiempo tras la adición de cerulenina 10 μ M: T0=0 h, T4=4 h y T8=8 h. Se ha empleado un código de colores para indicar los diferentes tiempos. El componente principal se muestra en el eje de abscisas X mientras que el segundo componente se muestra en el eje de ordenadas Y. Las muestras se correlacionan perfectamente en concordancia con sus respectivos grupos.

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con la versión 5.5 del genoma de *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007) (phytozome: https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html/Org_Creinhardtii) y se analizó la expresión de 17.741 genes. El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando solo los genes que cambiaron su expresión más del doble y solo se consideraron aquellos cuyo cambio era estadísticamente significativo. Entre 0 y 4 h, 4030 transcritos mostraron cambios significativos en su expresión, mientras que el número de transcritos ascendió a 5.503 entre 0 y 8 h. Los genes se categorizaron mediante la herramienta *Algal Functional Annotation Tool* (<http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/index.html>) y mediante anotación manual (Figura 23).

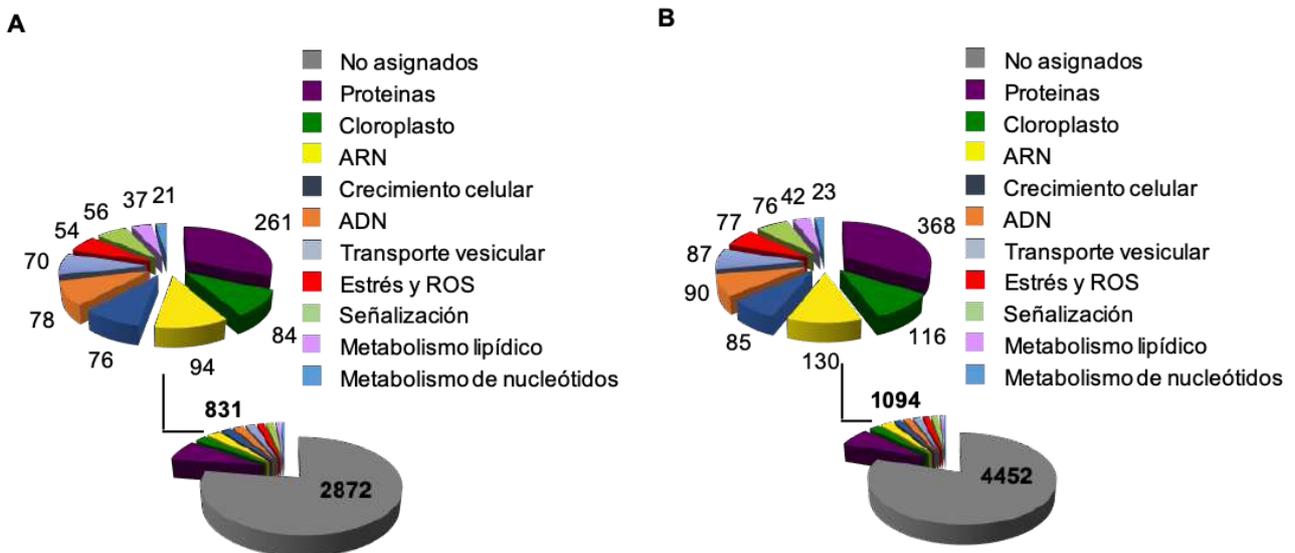


Figura 23. Estudio funcional de los transcritos relacionados con la respuesta a estrés celular de cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Se realizó una caracterización funcional sobre la expresión diferencial de genes entre 0 y 4 (A) y entre 0 y 8 h (B) utilizando cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina (10 μ M). Se ha empleado un código de colores para indicar las diferentes categorías de genes por su funcionalidad o localización. Los genes inducidos y reprimidos entre 0, 4 h y 8 h de tratamiento están en el ANEXO 1.

Se analizaron mediante *MapMan ontology* los genes de *Chlamydomonas* cuya expresión había cambiado y se anotaron en distintas categorías. Las categorías más enriquecidas entre 0 y 4 h están relacionadas con el metabolismo de proteínas, el metabolismo tanto del ARN como del ADN

y el transporte vesicular (Figura 23A). El cloroplasto y la respuesta a estrés también se encuentran entre las categorías más representadas en los grupos funcionales (Figura 23A). Las mismas categorías se encontraron entre 0 y 8 h, aunque el número de genes en cada grupo fue superior, indicando que el efecto de la cerulenina después de 8 h aumentó respecto a 4 h (Figura 23B). Se llevó a cabo una representación más detallada sobre las categorías de genes que aumentaron la expresión: la degradación de proteínas, el transporte vesicular, la biología del cloroplasto, el estrés oxidativo y el metabolismo de lípidos. Por otro lado, las categorías de genes que mostraron una disminución en su abundancia incluían mayoritariamente genes implicados en el metabolismo de los nucleótidos y la división celular (Figura 24). Todos estos resultados reflejan que el tratamiento con cerulenina en *Chlamydomonas* promueve una respuesta a estrés y bloquea la división celular.

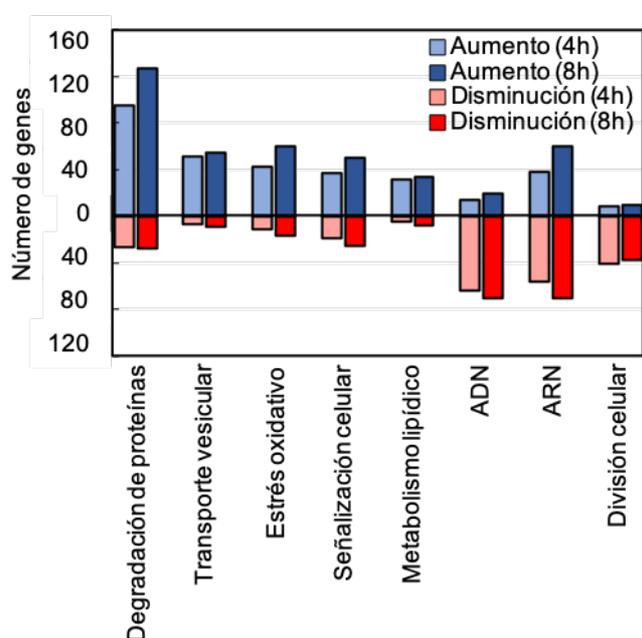


Figura 24. Clasificación de los transcritos relacionados con la respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Gráfica con el número de genes que aparecen en cada categoría después de 4 y 8 h de tratamiento con cerulenina (10 μ M). El aumento o la disminución en el número de genes por categoría se muestra en la gráfica mediante los colores azul (azul claro para 4 h y azul oscuro para 8 h) y rojo (rojo claro para 4 h y rojo oscuro para 8 h) respectivamente.

Los transcritos que más fuertemente aumentaron su abundancia por el tratamiento con cerulenina fueron genes que codificaban chaperonas del cloroplasto y proteínas de respuesta a estrés. Entre estos genes figuran las proteínas de respuesta a estrés térmico HSP22C, HSP22E y HSP22F, la chaperona del estroma del cloroplasto HSP70B y las proteasas CLPB3 y CLPS1 (Figura 25A). Las co-chaperonas CGE1, CDJ1, CDJ2 y CDJ3, así como VIPP1 y VIPP2 también aumentaron su expresión en células tratadas con cerulenina (Figura 25A).

Varios genes que codificaban proteínas del cloroplasto relacionadas con la detoxificación de ROS se indujeron en condiciones de tratamiento con cerulenina. Se incluye en este grupo los genes *glutación-S-transferasa* (*GSTS1*), *glutación peroxidasas* (*GPX5*), *glutarredoxinas* (*GRX3*), y *peroxirredoxinas* (*PRX6*) (Figura 25B). Algunos de estos genes como *GSTS1* se inducen bajo distintas condiciones de estrés, incluyendo la alta luz (Blaby et al., 2015; Chang et al., 2014; Fischer et al., 2007, 2012; Ledford et al., 2007). Además, los niveles del transcrito *NTRC*, el cual juega un

papel importante en la protección del cloroplasto contra el estrés oxidativo (Pérez-Ruiz et al., 2006), también aumentaron en células tratadas con cerulenina (Figura 25B). La identificación de genes de respuesta a estrés y relacionados con la eliminación de ROS en este análisis transcriptómico concuerda con los efectos observados en resultados anteriores sobre el cloroplasto (Figura 21) y confirman que la inhibición de la enzima FAS produce daños severos en el cloroplasto de las células de *Chlamydomonas*.

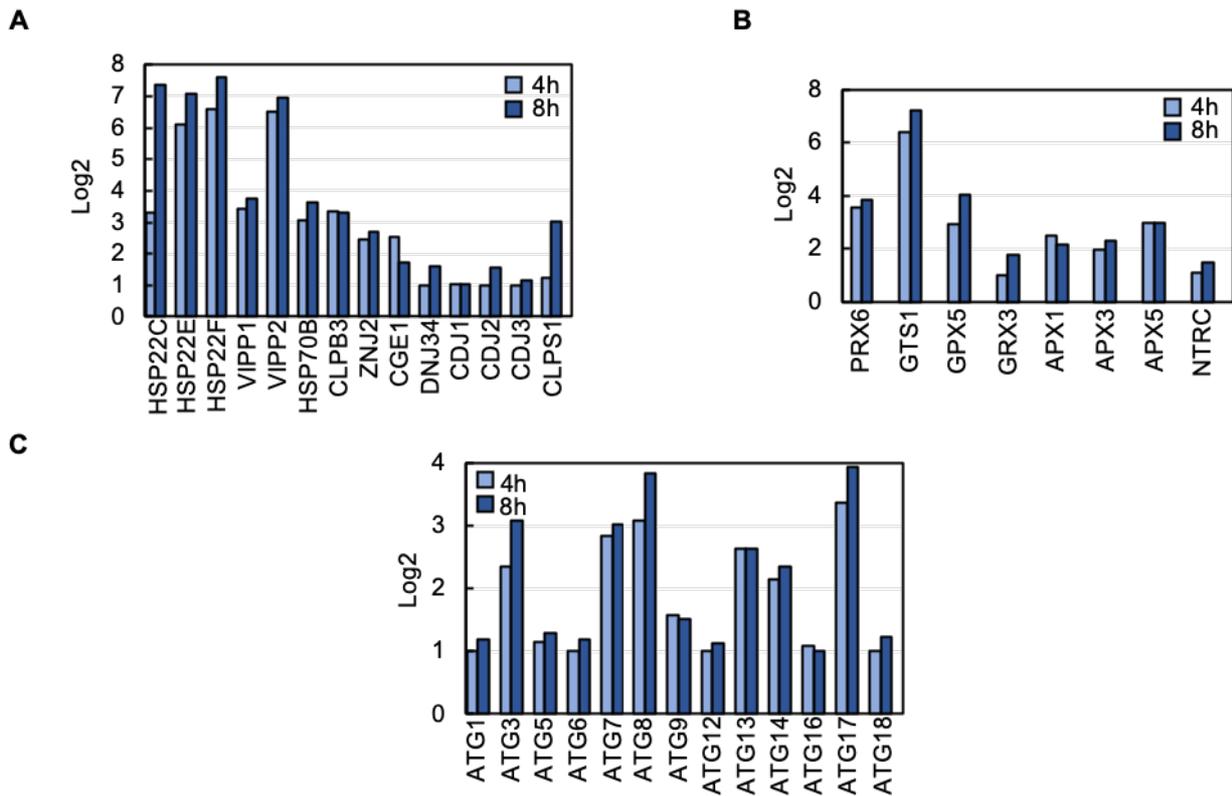
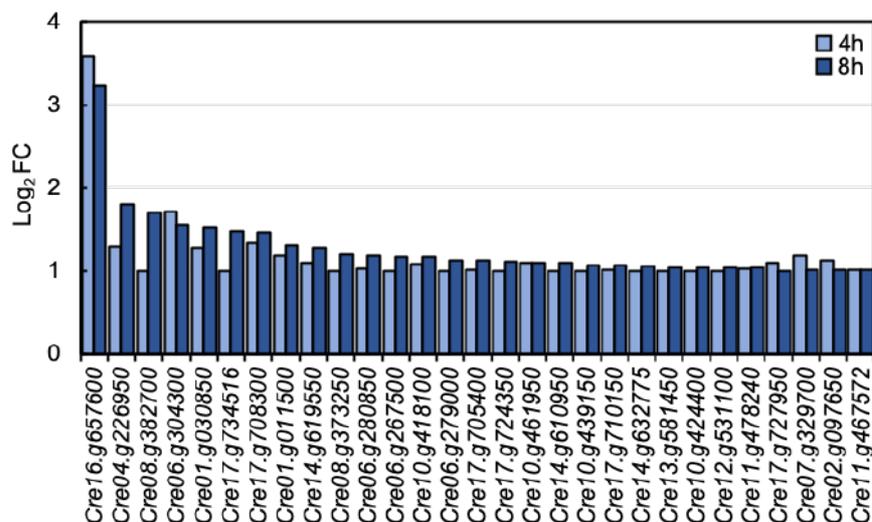


Figura 25. Abundancia relativa del ARNm en distintos grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Estudio de la abundancia relativa del ARNm correspondiente a los grupos de genes que codifican chaperonas y proteínas de estrés en el cloroplasto (A), marcadores de estrés oxidativo (B) y proteínas pertenecientes a la maquinaria central de la autofagia (C) relacionados con la respuesta a estrés por cerulenina (10 μ M) y expresados como \log_2 y normalizados sobre cultivos sin tratamiento (0 h). Los niveles de expresión a 4 y 8 h de tratamiento están indicados en azul claro y azul oscuro respectivamente.

En consonancia con los resultados descritos en el primer bloque de esta tesis donde se demuestra la activación de la autofagia por el tratamiento con cerulenina (Figura 14), el estudio transcriptómico revela un incremento en la expresión de transcritos que codifican proteínas que participan en las dos rutas de degradación más importantes en células eucariotas, la autofagia y el proteasoma. Doce genes ATG de la maquinaria central de la autofagia aumentaron su expresión en células tratadas con cerulenina (Figura 25C), confirmando la activación de este proceso degradativo

en respuesta a la inhibición de la enzima FAS en *Chlamydomonas*. Los genes ATG identificados codifican proteínas involucradas en la formación de la estructura precursora del autofagosoma (ATG13, ATG14 y ATG17) y la expansión y formación del autofagosoma (ATG3, ATG7 y ATG8) (Figura 25C). Además de los genes relacionados con la autofagia, se identificaron 29 transcritos que codificaban subunidades del proteasoma (Figura 26A) y 22 genes relacionados con el proceso de ubiquitinación (Figura 26B).

A



B

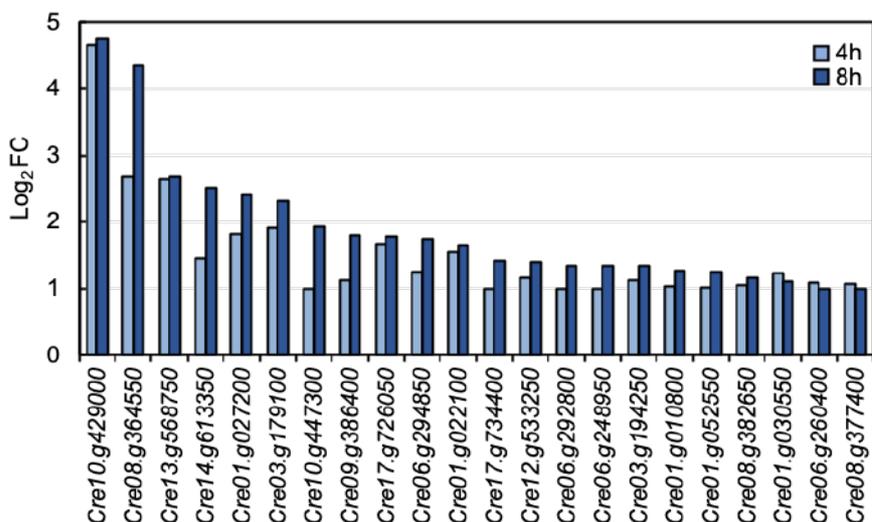


Figura 26. Abundancia relativa del ARNm relacionado con procesos degradativos en respuesta a estrés celular en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina. Estudio de la abundancia relativa del ARNm correspondiente a los grupos de genes que codifican componentes del proteasoma (A) y proteínas relacionadas con el proceso de la ubiquitinación (B) en respuesta al tratamiento con cerulenina (10 μ M) y expresados como log₂ y normalizados sobre cultivos sin tratamiento (0 h). Los niveles de expresión a 4 y 8 h de tratamiento están indicados en azul claro y azul oscuro respectivamente.

4.2. Efecto de la cerulenina en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

La enzima FAS se encuentra en el cloroplasto, y la síntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva a cabo en este orgánulo (Li-Beisson et al., 2015). De hecho, nuestros resultados anteriores indican un efecto específico en el cloroplasto y un aumento en los niveles de ROS mayoritariamente generado en el cloroplasto de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Con objeto de profundizar en la conexión entre el metabolismo de lípidos y la autofagia independientemente del proceso de fotosíntesis, una de las principales fuentes de ROS y estrés para el cloroplasto, se empleó la droga cerulenina en células de *Chlamydomonas* crecidas en oscuridad. Los resultados demostraron mediante ensayos de crecimiento en medio líquido (Figura 27A) y diluciones seriadas en placas (Figura 27B), ambas con acetato como fuente de carbono y crecidas en oscuridad, que el tratamiento con 10 μM de cerulenina inhibe el crecimiento celular de *Chlamydomonas*.

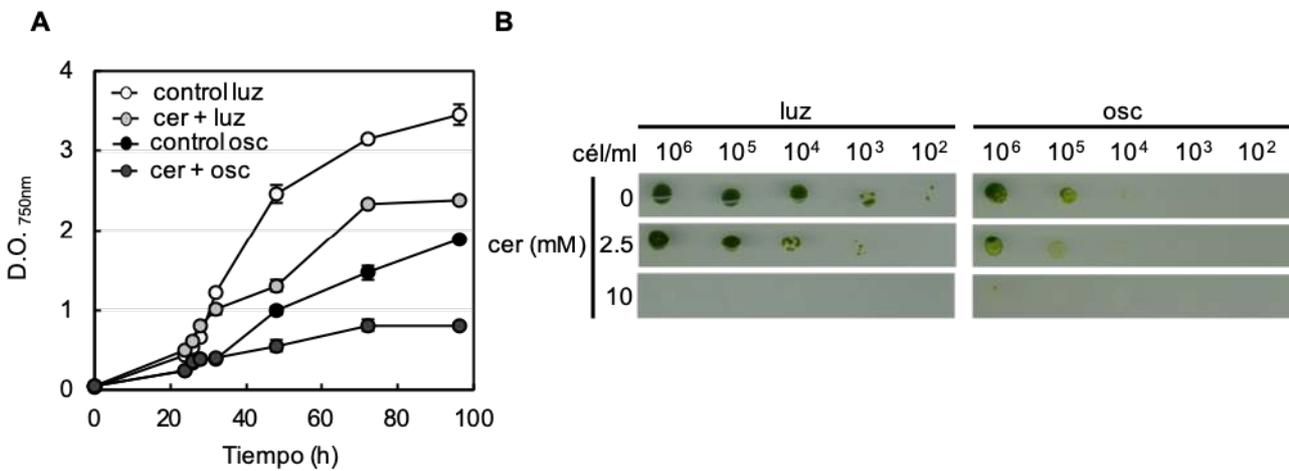


Figura 27. Efecto de la cerulenina sobre el crecimiento celular en cultivos de *Chlamydomonas* creciendo en luz u oscuridad. **A.** Curva de crecimiento de cultivos de *Chlamydomonas* en condiciones mixotróficas (acetato y luz) y heterotróficas (acetato y oscuridad) en ausencia y presencia de cerulenina (cer) a una concentración 10 μM . La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 750 nm (D.O. $_{750\text{nm}}$). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. **B.** Diluciones seriadas de células de *Chlamydomonas* se sembraron en placas de medio TAP con la concentración de cerulenina indicada (0, 2.5 o 10 μM). Las placas se incubaron a 25°C en condiciones de iluminación continua, 25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz) o en oscuridad (osc).

4.2.1. Efecto de la inhibición en la enzima FAS sobre el flujo autofágico en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

Para obtener más información sobre el efecto de la inhibición de la enzima FAS en *Chlamydomonas*, se examinaron los niveles de la proteína ATG8 mediante inmunodetección utilizando anticuerpos específicos en células creciendo en oscuridad tratadas con 10 μM de cerulenina. Nuestros resultados muestran una acumulación en los niveles de la proteína ATG8, así

como la detección de ATG8-PE después de 8 h de tratamiento con la droga cerulenina tanto en células crecidas en luz como en oscuridad (Figura 28A).

Por otro lado, se cuantificaron los niveles de expresión del transcrito correspondiente al gen *ATG8* en las mismas condiciones anteriormente descritas para comprobar si la autofagia está activa. Los resultados obtenidos mediante qPCR indican un aumento en la abundancia del transcrito *ATG8* en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina y crecidas en oscuridad. Cabe mencionar que la inducción del gen *ATG8* es mayor en células en presencia de cerulenina creciendo en luz después de 8 h (Figura 28B). Por tanto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con cerulenina en oscuridad provoca la inducción del proceso de autofagia (Figura 28), aunque en menor medida que la obtenida en condiciones de luz (Figura 14).

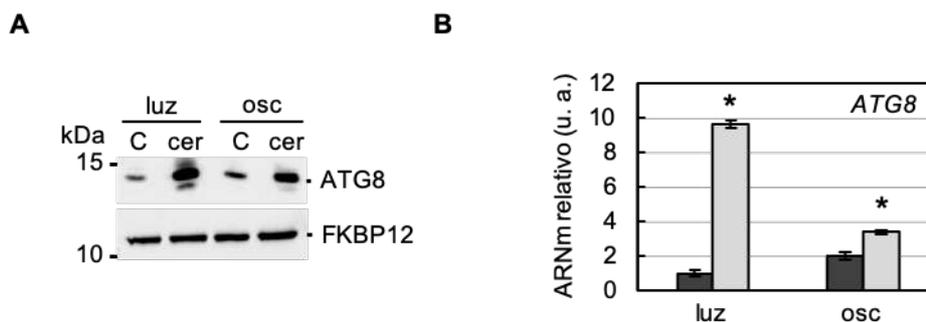


Figura 28. Activación de la autofagia en cultivos de *Chlamydomonas* tratados con cerulenina en oscuridad. **A.** Cultivos de *Chlamydomonas* en fase exponencial se trataron con 10 μ M de cerulenina (cer) durante 8 h en condiciones de luz u oscuridad (osc). Células sin tratar se utilizaron como control. Quince μ g de extracto total de proteínas se resolvieron por electroforesis en geles SDS-PAGE y se analizaron por western blot utilizando anticuerpos anti-ATG8 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se utilizó como control interno. **B.** Análisis de la expresión del gen *ATG8* mediante qPCR en células de *Chlamydomonas* en luz y en oscuridad, ambas condiciones en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de cerulenina 10 μ M durante 8 h (u. a., unidades arbitrarias). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una se utilizaron en cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$.

4.2.2. Las células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina y creciendo en condiciones de oscuridad presentan un daño en el cloroplasto

Chlamydomonas presenta un único cloroplasto y el efecto que produce la cerulenina en este orgánulo en células crecidas en luz se ha discutido en esta tesis (Figura 15-19). Los resultados descritos indican que el tratamiento con cerulenina causa un daño en el cloroplasto. Por ello, estudiamos el efecto que se produce en el cloroplasto independiente de la fotosíntesis y la luz tratando con cerulenina células de *Chlamydomonas* crecidas en oscuridad.

Para profundizar en el efecto de la cerulenina en oscuridad se analizaron los niveles de ARNm de genes que codifican proteínas específicas de respuesta a estrés en el cloroplasto. Para ello, se realizaron ensayos de qPCR y se cuantificó la abundancia de los transcritos relacionados con chaperonas del cloroplasto como *DEG11*, *VIPP1*, *HSP22F* y *VIPP2* (Ramundo et al., 2014; Theis et al., 2019). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de los transcritos de estas chaperonas del cloroplasto aumentó en células tratadas con cerulenina crecidas en oscuridad, aunque en menor medida que en condiciones de luz (Figura 29A-D). Se ha descrito que los niveles del gen que codifica la chaperona del cloroplasto *VIPP2* aumentan en células sometidas a distintas condiciones de estrés como alta luz en plantas superiores y algas (Nordhues et al., 2012; Rochaix and Ramundo, 2017; Perlaza et al., 2019). De hecho, nuestros resultados demuestran que este transcrito está inducido en células tratadas con cerulenina crecidas en oscuridad, aunque la inducción de este gen sigue siendo mayor en células tratadas con cerulenina en presencia de luz (Figura 29D).

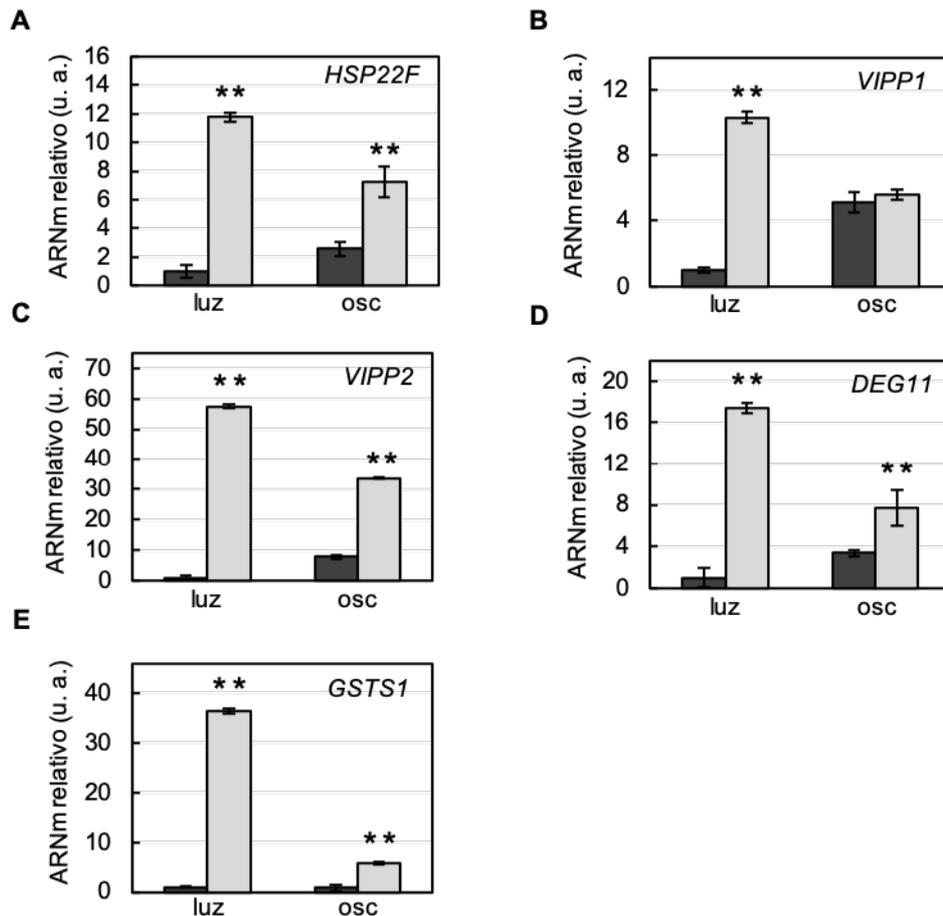


Figura 29. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre la expresión de genes de respuesta a estrés celular en *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad. Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes marcadores de estrés en el cloroplasto y de estrés oxidativo *HSP22F* (A), *VIPP1* (B), *VIPP2* (C), *DEG11* (D) y *GSTS1* (E) en cultivos de *Chlamydomonas* en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de cerulenina (10 μ M) durante 8 h creciendo en luz y oscuridad (osc) (u. a., unidades arbitrarias). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas se analizaron en cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar. **, $P < 0.01$.

Para mostrar la conexión existente entre el daño en el cloroplasto, el estrés oxidativo y el estrés inducido por cerulenina se analizó la expresión del gen relacionado con el estrés oxidativo *Glutación-S transferasa1 (GSTS1)*. Este gen se utiliza como marcador de estrés oxidativo ya que la proteína que codifica se acumula y juega un papel importante en el procesamiento de diferentes formas de ROS (Fischer et al., 2007, 2012; Ledford et al., 2007; Blaby et al., 2015). De acuerdo con esto, nuestros resultados indican que la abundancia del ARNm de este transcrito aumenta en células crecidas en oscuridad tratadas con cerulenina, mientras que, en presencia de luz mantiene niveles mayores de transcrito (Figura 29E). Por tanto, estos resultados sugieren que la inhibición en la actividad de la enzima FAS provoca un daño en el cloroplasto que activa genes de respuesta a estrés en el cloroplasto y estrés oxidativo para mantener la integridad de las membranas cloroplastídicas como ocurre en *Chlamydomonas* y *Arabidopsis* (Nordhues et al., 2012; Zhang et al., 2012) aún en ausencia de luz.

4.2.3. Las células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina y creciendo en oscuridad conservan la respuesta a estrés en el cloroplasto

El tratamiento con la droga cerulenina produce un profundo impacto en el cloroplasto que se sigue observando en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad. En concordancia con los resultados anteriores, se ha analizado mediante qPCR el aumento en la expresión de genes que codifican chaperonas específicas del cloroplasto en células creciendo en oscuridad. Concretamente, se observó un mayor aumento en la abundancia de los transcritos de *VIPP1* y *VIPP2* en células crecidas tanto en luz como oscuridad. Además, se ha estudiado que las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en la respuesta a estrés por altas intensidades de luz en *Chlamydomonas* (Nordhues et al., 2012; Rochaix and Ramundo, 2017; Perlaza et al., 2019).

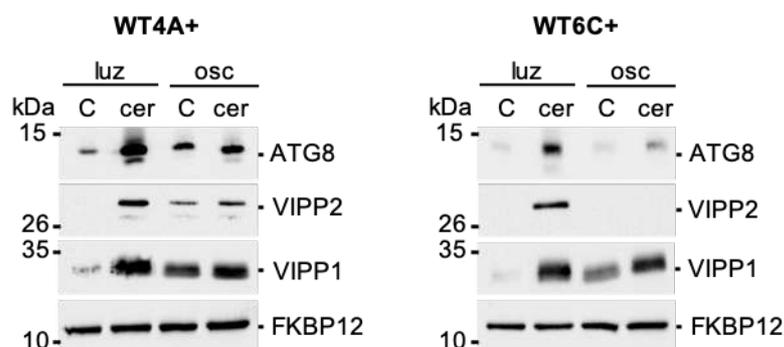


Figura 30. La respuesta a estrés en el cloroplasto está conservada en *Chlamydomonas* creciendo en presencia de cerulenina y en oscuridad. Se trataron dos estirpes silvestres de *Chlamydomonas* (WT4A+, izquierda; y WT6C+, derecha) en fase exponencial con 10 μM de cerulenina (cer) durante 8 h. Ambas estirpes crecieron en presencia y ausencia de luz (osc), además, se emplearon cultivos sin tratar a los mismos tiempos para ser utilizados como control (C). Quince μg de extracto total de proteínas se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE para posteriormente analizarlos mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-ATG8, anti-VIPP1, anti-VIPP2 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se utilizó como control de carga interno.

Para comprobar si el tratamiento con cerulenina en oscuridad tiene algún efecto en los niveles de proteínas relacionadas con la fotoprotección y el estrés por alta luz, se analizaron los niveles de las proteínas VIPP1 y VIPP2 en dos estirpes silvestres de *Chlamydomonas* tales como WT4A+ y WTC6+. Nuestros resultados indicaron que la abundancia de estas proteínas aumentó en ambas estirpes de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina y creciendo tanto en luz como en oscuridad (Figura 30). Estos datos sugieren que el cloroplasto activa mecanismos de respuesta a estrés en condiciones de inhibición de la enzima FAS y ausencia de luz, donde la fotosíntesis está desactivada.

4.2.4. La inhibición de la enzima FAS en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad provoca un efecto en la estructura del cloroplasto

Nuestros resultados indican que el tratamiento con cerulenina en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad provoca la inhibición del crecimiento celular (Figura 27), la activación de la autofagia (Figura 28), así como un efecto en el cloroplasto que activa la respuesta a estrés (Figura 29). En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de la enzima FAS está provocando un daño en el cloroplasto, aunque en menor medida que el observado en células creciendo en luz.

Basándonos en estos datos, se analizó la estructura del cloroplasto mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes obtenidas muestran que las células crecidas en luz sin tratamiento presentan la arquitectura típica del cloroplasto (Figura 31A), mientras que las células crecidas en oscuridad presentan acumulaciones de almidón, una característica estudiada en estas condiciones (Ral et al., 2006; Burlacot et al., 2019) (Figura 31B). Por el contrario, el tratamiento con cerulenina provoca el empaquetamiento de las membranas tilacoidales del cloroplasto, tanto en las células crecidas en luz como en oscuridad (Figura 31C-F). Estos resultados sugieren que la inhibición de la enzima FAS sigue generando un daño específico en el cloroplasto incluso en aquellas células crecidas en oscuridad.

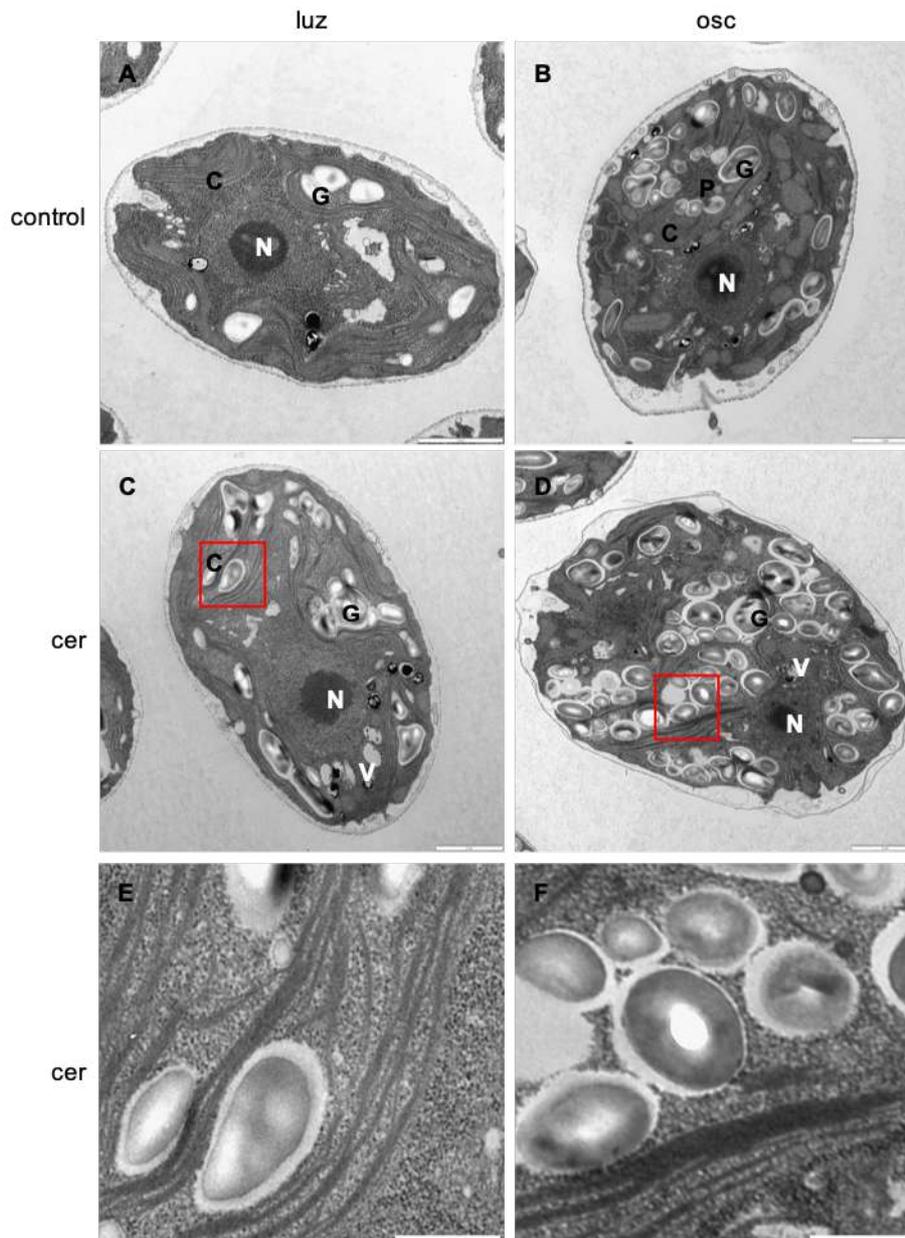


Figura 31. Análisis estructural de células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina en oscuridad. Imágenes de microscopía electrónica de células de *Chlamydomonas* creciendo en luz (A y C) y en oscuridad (B y D). En ambas condiciones las células se trataron con una concentración de 10 μ M de cerulenina (cer) durante 8 h (C, en luz y D, en oscuridad). Los paneles E y F muestran una ampliación de las zonas marcadas en C y D, respetivamente. Se utilizaron muestras sin tratar a los mismos tiempos como control. C, cloroplasto; N, núcleo; P, pirenoide; V, vacuola; G, gránulos de almidón. Barra de escala: A-D, 2 μ m; E y F, 500 nm.

4.3. Generación y caracterización de un mutante deficiente en autofagia

4.3.1. Generación de un mutante *atg8* de *Chlamydomonas* mediante el método *CRISPR/Cas9*

Para profundizar en el estudio de la inhibición de la enzima FAS y su conexión con la autofagia en *Chlamydomonas*, se generó un mutante del gen *ATG8* mediante el método *CRISPR/Cas9* (Baek et al., 2016; Shin et al., 2016) como herramienta para el laboratorio.

Se han estudiado varios métodos para manipular genéticamente las células de *Chlamydomonas* y entre ellos, el sistema *CRISPR/Cas9* ha superado a otros como el ARNm i y el complejo Argonauta (Voshall et al., 2017; Yamasaki and Cerutti, 2017) o la edición del genoma mediante dedos de zinc (Sizova et al., 2013; Greiner et al., 2017). Esto se debe a la especificidad de su diana, una molécula de ARN de cadena simple que funciona como guía (ARNsg) para la nucleasa Cas9. La nucleasa Cas9 corta la cadena de ADN genómico en una localización concreta determinada por la secuencia del ARNsg, y esto facilita la elección de los genes a editar. Además, el vector de selección utilizado tiene probabilidad de insertarse en el sitio de corte de Cas9. En conjunto, una buena herramienta frente a otros sistemas de edición del genoma que se ha comprobado en un amplio rango de organismos incluyendo *Chlamydomonas* (Doudna and Charpentier, 2014).

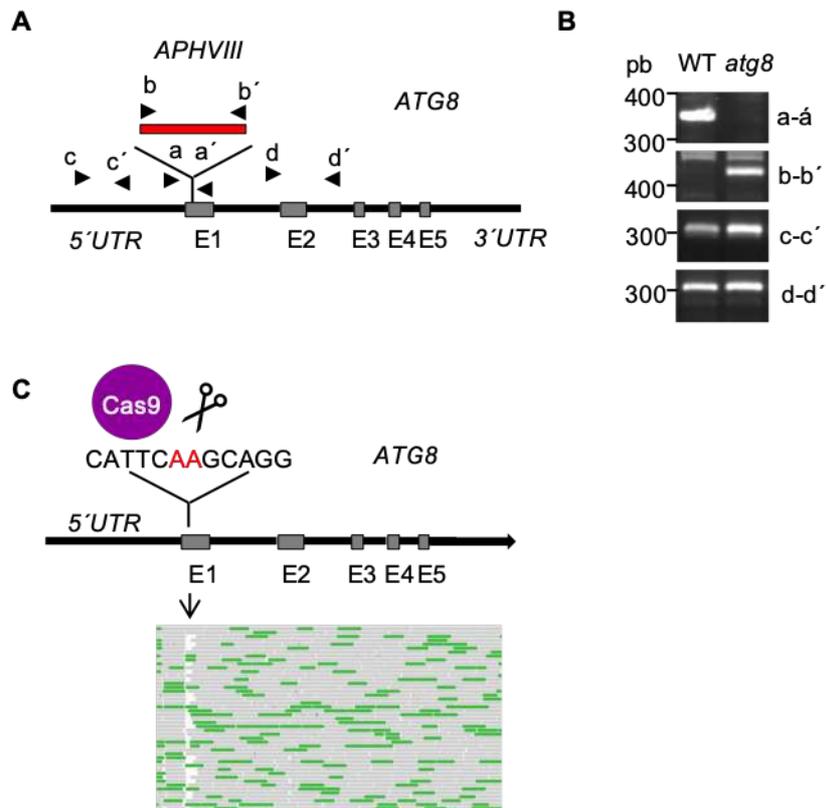


Figura 32. Obtención del mutante *atg8* de *Chlamydomonas* mediante CRISPR/Cas9. **A.** Representación esquemática del gen *ATG8* (número de acceso en phytozome: Cre 16.g689650.t1.2) mostrando los cinco exones (E1-E5), las regiones 5'UTR y 3'UTR y el gen de resistencia a paramomicina (*APHVIII*) insertado. Las parejas de cebadores (*a/a'*, *b/b'*, *c/c'* y *d/d'*) se han empleado para comprobar la correcta inserción del gen *APHVIII*. Las flechas señalan la orientación de los cebadores. **B.** Fragmentos obtenidos a partir de PCR mostrando el estado del gen *ATG8* (*a/a'*, *c/c'* y *d/d'* para el gen endógeno) y *APHVIII* (*b/b'*). El tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb) se indica a la izquierda. **C.** Representación esquemática del gen *ATG8* mostrando la secuencia diana y los dos nucleótidos (AA, subrayados en rojo) donde actúa la proteasa Cas9. La secuenciación del genoma muestra una inserción en el gen *ATG8* que coincide con el sitio de corte de Cas9. Las barras blancas muestran la ausencia de alineamiento, mientras que las barras grises y verdes indican un alineamiento XX e YY, respectivamente.

Para la obtención del mutante se ha empleado la estirpe WT4A+ como estirpe silvestre parental. El mutante *atg8* se obtuvo utilizando el ARNsg 5'-CCG ACC CCC GAC ATT CAA GCA GG-3' y la proteína recombinante Cas9. El sitio de corte específico de la endonucleasa se analizó previamente *in silico* y la diana se situó en el primer exón del gen *ATG8* (Figura 32A). Por otra parte, se utilizó como vector el plásmido pSL18 que contiene el gen de resistencia a paramomicina (*APHVIII*). Para comprobar el estado del gen editado se analizó mediante PCR la estirpe mutante *atg8* confirmando que el gen *ATG8* no posee integridad y que en el genoma de esta estirpe se encuentra el gen de resistencia *APHVIII* (Figura 32B). Además, realizamos la secuenciación del genoma de la estirpe mutante *atg8* para confirmar su genotipo. Nuestros resultados confirmaron la existencia de una inserción del gen *APHVIII* localizada en el sitio de corte de Cas9 en el gen *ATG8* (Figura 32C).

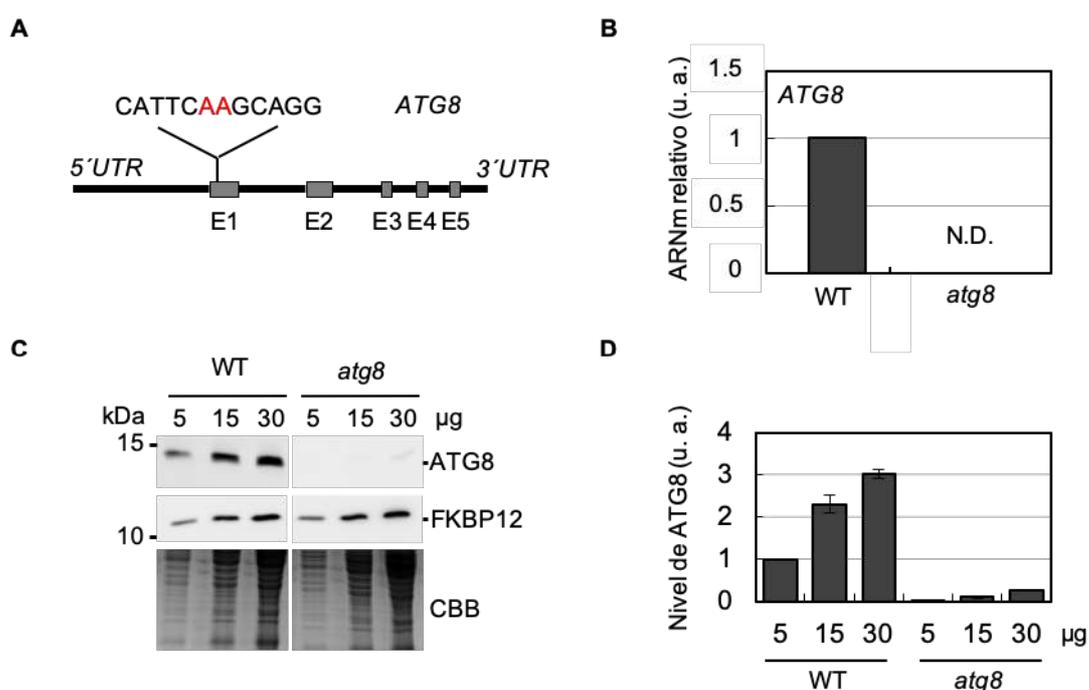


Figura 33. El mutante *atg8* de *Chlamydomonas* no presenta niveles apreciables de ATG8. **A.** Representación esquemática del gen *ATG8*. Se muestran los cinco exones (E1-E5) y los extremos 5'UTR y 3'UTR. La secuencia diana y los dos nucleótidos (AA, subrayados en rojo) donde corta la proteasa Cas9 se indican en dicho esquema. **B.** Análisis mediante qPCR de la abundancia de ARNm correspondiente al gen *ATG8* de las estirpes silvestre WT4A+ (WT) y mutante (*atg8*) de *Chlamydomonas* (u. a., unidades arbitrarias). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una se utilizaron para analizar cada estirpe. Las siglas N.D. (No Detectado) se han utilizado para señalar las muestras con una abundancia de ARNm indetectable. **C.** Diferentes cantidades (5, 15 y 30 µg) de extracto total de proteínas de ambas estirpes (WT y *atg8*) se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE y posteriormente se analizaron mediante western blot. La proteína ATG8 endógena se detectó utilizando el anticuerpo anti-ATG8. El anticuerpo anti-FKBP12 y un gel SDS-PAGE teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) cargado con las mismas cantidades de extracto de proteínas se utilizaron como controles de carga. **D.** Cuantificación de los niveles de ATG8 en las estirpes WT y *atg8* a partir de **C**. Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas se analizaron para cada muestra (u. a., unidades arbitrarias). Las barras de error representan la desviación estándar sobre la media.

Para cuantificar los niveles de transcrito del gen *ATG8*, cuyo esquema aparece en la Figura 33A, realizamos un ensayo mediante qPCR del ARNm correspondiente a este gen. Como resultado no se detectaron valores de este transcrito en la estirpe *atg8* (Figura 33B). Por último, analizamos mediante inmunodetección con anticuerpos específicos la abundancia de la proteína ATG8. De acuerdo con los resultados obtenidos no se detectaron niveles apreciables de la proteína ATG8 en la estirpe mutante (Figura 33C-D). Por tanto, la estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas* no presenta niveles apreciables de ATG8.

4.3.2. El mutante *atg8* presenta niveles alterados de proteínas ribosomales

Se ha descrito que el análisis de la abundancia de la proteína ATG8 y el seguimiento del flujo autofágico mediante la acumulación de las proteínas RPS6 y RPL37 en células tratadas con ConCA son buenos marcadores de la autofagia en *Chlamydomonas* (Couso et al., 2018). De hecho, nuestros resultados indican que los niveles de RPS6 y RPL37 disminuyen en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina, aunque estos niveles se acumulan en presencia de ConCA, un inhibidor específico de la ATPasa vacuolar (Couso et al., 2018), que impide la degradación vía autofagia (Figura 14B). De acuerdo con estos datos, se ha determinado la activación de la autofagia siguiendo el comportamiento de estas proteínas ribosomales. Por ello, se cuantificó la abundancia de estas proteínas ribosomales mediante inmunodetección con anticuerpos específicos frente a RPS6 y RPL37 en las estirpes silvestre y *atg8*. De esta forma, uno de los efectos observados en la estirpe *atg8* es la acumulación de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37 creciendo en condiciones estándar de luz y temperatura (Figura 34). Estos resultados sugieren que existe un desajuste celular en la estirpe *atg8* de *Chlamydomonas* incluso en condiciones estándar de crecimiento.

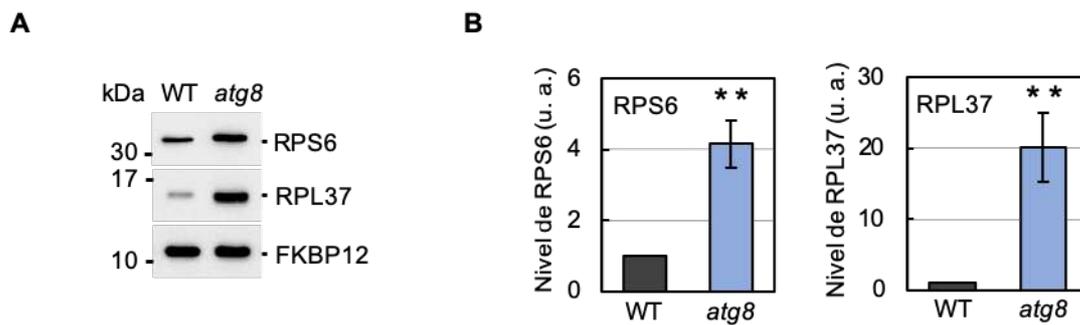


Figura 34. El mutante *atg8* presenta niveles alterados de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37. **A.** Análisis inmunológico para comprobar los niveles de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL37 en las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas*. Veinte μ g de proteína total para cada estirpe se resolvieron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE para posteriormente analizarlas por western blot utilizando los anticuerpos específicos anti-RPS6, anti-RPL37 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se empleó como control interno. **B.** Cuantificación de los niveles de las proteínas RPS6 (gráfica izquierda) y RPL37 (gráfica derecha) en las estirpes WT y *atg8*. Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas se analizaron en cada condición (u. a., unidades arbitrarias). Las barras de error representan la desviación estándar. **, $P < 0.001$.

4.3.3. Caracterización del mutante *atg8* en distintas condiciones de estrés y limitación de nutrientes

La autofagia es un proceso catabólico mediante el cual las células eucariotas mantienen la homeostasis celular y se adaptan a condiciones limitantes o de estrés. ATG8 es una de las proteínas ATG de la maquinaria central de autofagia encargada, entre otras cosas, de la formación del autofagosoma. Por ello, la estirpe mutante *atg8* es una herramienta muy útil para investigar el papel de la autofagia en la respuesta de las células a distintas condiciones de estrés. Por este motivo se realizaron ensayos de crecimiento con las estirpes WT y mutante *atg8* mediante diluciones seriadas en placas de medio con acetato y con deficiencia de nitrógeno (TAP-N) (Figura 35A) o fósforo (TA) (Figura 35B). Nuestros resultados indican que ambas estirpes no presentan diferencias en su crecimiento en estas condiciones de limitación de nutrientes. En segundo lugar, se realizaron diluciones seriadas en placas de medio TAP con el compuesto oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o níquel (Ni^{2+}), debido a que estudios previos han demostrado que la autofagia se activa en condiciones de estrés oxidativo y en presencia de metales (Scherz-Shouval et al., 2007; Pérez-Martín et al., 2014, 2015; Pérez-Pérez et al., 2016). Nuestros resultados indicaron que en ambas condiciones no se detectaron diferencias entre la estirpe mutante *atg8* y la estirpe silvestre (Figura 35C y D).

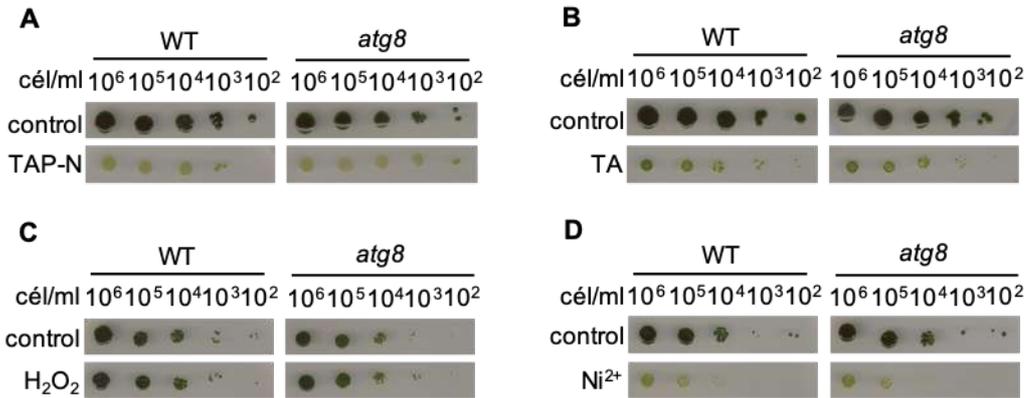


Figura 35. Ensayos de sensibilidad en el crecimiento de las estirpes WT y *atg8* en condiciones limitantes o de estrés. Diluciones seriadas de células en fase exponencial de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* se sembraron en placas con deficiencia de nitrógeno (TAP-N) (A), deficiencia de fósforo (TA) (B) o en placas de medio TAP suplementadas con 1 mM de H₂O₂ (C) o 300 μM de Ni²⁺ (D). Las placas se incubaron a 25°C en condiciones de iluminación continua (25 μE m⁻² s⁻¹) durante 5 días.

Por otra parte, se analizó mediante inmunodetección con anticuerpos específicos la abundancia de la proteína ATG8 en células WT y *atg8* en condiciones limitantes de los nutrientes nitrógeno y fósforo (Figura 36A y B) o tratadas con H₂O₂ y níquel (Figura 36C y D). Nuestros resultados indicaron un aumento en los niveles de la proteína ATG8 en la estirpe silvestre en todas las condiciones de estrés mencionadas, como se ha descrito previamente, mientras que en la estirpe *atg8* no se detectaron niveles de la proteína ATG8 (Figura 36A-D). Estos resultados demuestran que la estirpe mutante *atg8* no presenta un fenotipo de hipersensibilidad en estas condiciones de estrés estudiadas, aunque no muestre niveles de la proteína ATG8.

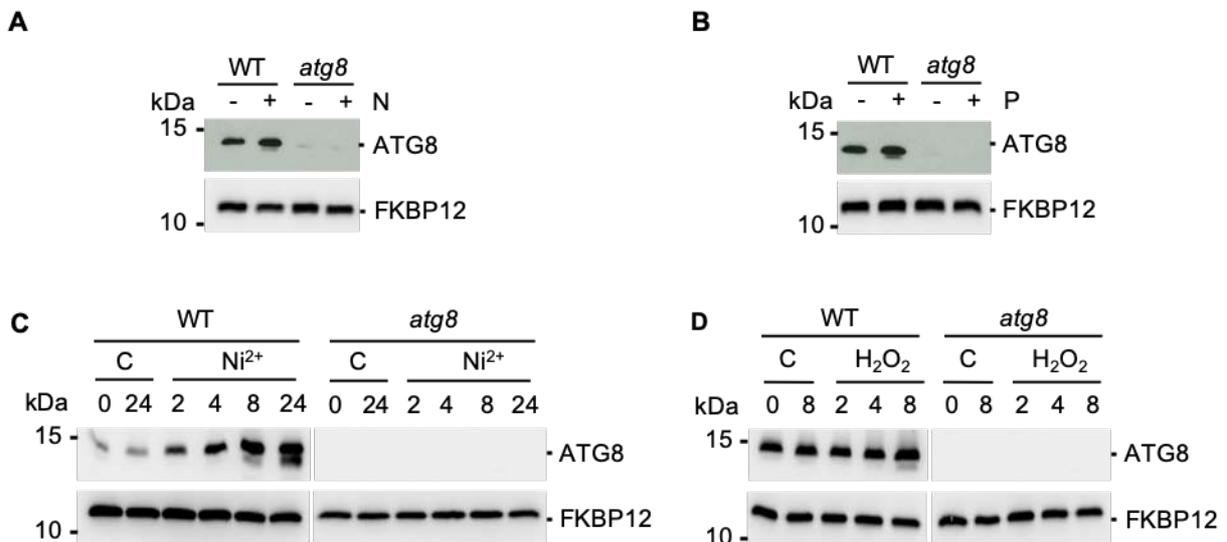


Figura 36. Análisis de los niveles de la proteína ATG8 en las estirpes WT y *atg8* en deficiencia de nutrientes y condiciones de estrés. Cultivos de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* creciendo en fase exponencial en medio TAP se transfirieron a un medio con déficit de nitrógeno (N) o déficit de fósforo (P) durante 24 h. Cultivos crecidos en TAP durante el mismo tiempo se emplearon como control. Células de las estirpes WT y *atg8* en fase exponencial en medio TAP se trataron con 150 μM de Ni^{2+} o 1 mM de H_2O_2 durante 2, 4, 8 y 24 h y 2, 4 y 8 h, respectivamente. Cultivos sin tratar se utilizaron como control (C). Quince μg de extracto total de proteína para cada estirpe se resolvieron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE para posteriormente analizarlos por western blot utilizando los anticuerpos anti-ATG8 y anti-FKBP12 en ausencia de nitrógeno (A) o fósforo (B) y en presencia de Ni^{2+} (C) o H_2O_2 (D). La proteína FKBP12 se ha utilizado como control de carga interno.

4.3.4. El mutante *atg8* en fase estacionaria tardía presenta un defecto en el crecimiento

El ciclo de vida en *Chlamydomonas* se ha estudiado ampliamente y como organismo modelo presenta una tasa de crecimiento rápido, ya que se duplica cada 8 h en condiciones óptimas de crecimiento (Cross and Umen, 2015). En la curva de crecimiento existen varias fases: la fase adaptativa o de aclimatación, donde las células no se duplican, pero si están metabólicamente activas; la fase exponencial o logarítmica, donde las células se duplican en mayor número por unidad de tiempo; y la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes en el medio.

Se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido con la estirpe mutante *atg8* utilizando medio mínimo, es decir, en condiciones autotróficas de crecimiento. Para realizar este experimento, células de las estirpes WT, *atg8* y *atg8:pST-ATG8*, estirpe complementante que presenta la proteína recombinante ATG8 etiquetada con StrepII sobre la estirpe *atg8*, crecieron en medio de cultivo sólido en condiciones de luz continua a 25°C de temperatura hasta alcanzar la fase estacionaria (60 días). En fase de crecimiento exponencial las tres estirpes presentaron el mismo comportamiento (Figura 37A). Por el contrario, nuestros resultados indicaron un déficit en el crecimiento de las células de la estirpe *atg8* comparada con las estirpes WT y *atg8:pST-ATG8* en fase estacionaria, donde ambas estirpes no presentaron ningún defecto en el crecimiento (Figura 37A).

Por otra parte, se determinó la eficiencia fotosintética de las células de estas estirpes en fase estacionaria utilizando el fluorómetro PAM. Mediante el análisis de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m), se demostró que la actividad fotosintética en células de la estirpe mutante en fase estacionaria disminuyó comparada con las estirpes silvestre y complementante, donde no se observaron efectos (Figura 37B). Estos resultados demuestran que la estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas* presenta un retraso en el crecimiento en fase estacionaria tardía.

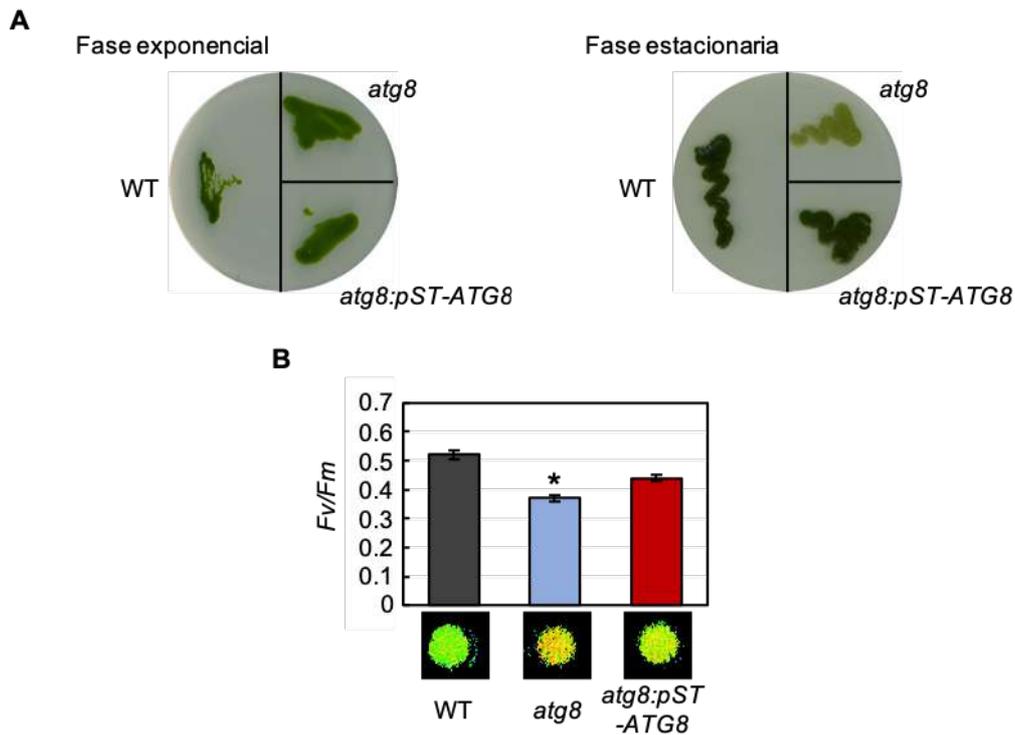


Figura 37. Defecto en el crecimiento de la estirpe *atg8* en fase estacionaria. **A.** Crecimiento de las estirpes WT, *atg8* y *atg8:pST-ATG8* (complementante) de *Chlamydomonas* en medio mínimo y luz actínica ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 6 días (fase exponencial, placa izquierda) o 60 días (fase estacionaria, placa derecha). **B.** Valores de F_v/F_m de las estirpes WT (color negro), *atg8* (color azul) y complementante (color rojo) cultivadas durante 8 días en medio mínimo. Se muestran adjunto a **B** puntos de color correspondiente a los experimentos típicos de F_v/F_m . Se utilizaron en **B** tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada una. Las barras de error representan la desviación estándar sobre la media. *, $P < 0.05$.

4.3.5. El mutante *atg8* es hipersensible al tratamiento con la droga cerulenina

4.3.5.1. El mutante *atg8* en condiciones de inhibición de la enzima FAS presenta un retraso en su crecimiento

Para investigar el mecanismo por el cual la inhibición de la síntesis de ácidos grasos activa la autofagia en *Chlamydomonas* se utilizó la estirpe *atg8* que presenta el gen que codifica la proteína ATG8 truncado, una de las proteínas principales en la maquinaria de la autofagia (Ichimura et al., 2000; Xie et al., 2008).

Nuestros resultados han demostrado que $10 \mu\text{M}$ de cerulenina provoca daños severos en el cloroplasto de células de *Chlamydomonas* (Figura 16-20). Para obtener más información de la conexión entre el metabolismo de los lípidos y la autofagia en *Chlamydomonas*, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en medio líquido (Figura 38A) y diluciones seriadas en medio sólido (Figura

38B) con las estirpes WT y *atg8* utilizando concentraciones sub-letales de la droga cerulenina ($5 \mu\text{M}$). Nuestros resultados demostraron que el mutante *atg8* es más sensible a la droga cerulenina que la estirpe WT, tanto en condiciones de crecimiento mixotrófico (TAP) como autotrófico (HSM) (Figura 38).

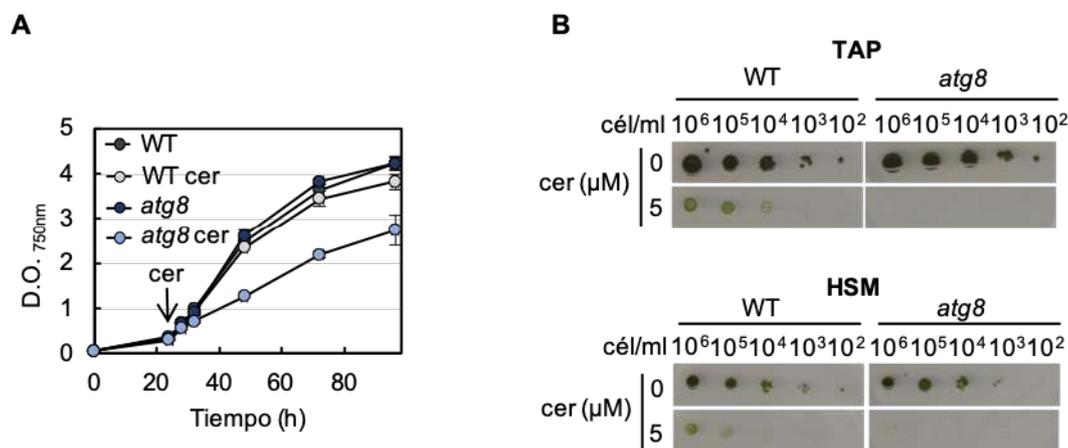


Figura 38. El mutante *atg8* es hipersensible a la inhibición de la enzima FAS por el tratamiento con cerulenina. **A.** Curva de crecimiento de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* en ausencia (círculos negros y círculos azules, respectivamente) y presencia (círculos grises y círculos azul claro, respectivamente) de la droga cerulenina (cer) ($5 \mu\text{M}$). En cada punto se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm ($D.O._{750\text{nm}}$). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. **B.** Diluciones seriadas de células creciendo en fase exponencial de las estirpes WT y *atg8* se sembraron en placas de medio TAP o medio mínimo (HSM) con la concentración de cerulenina indicada (0 o $5 \mu\text{M}$). Las placas se incubaron en condiciones de iluminación continua ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 25°C de temperatura durante 5 días.

Para profundizar en el efecto de la cerulenina en la estirpe mutante *atg8* se examinaron los niveles de la proteína ATG8 mediante inmunodetección con anticuerpos específicos en células en fase exponencial tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina. Nuestros resultados demostraron que los niveles de la proteína ATG8 en células de la estirpe mutante después de 8 h de tratamiento fueron indetectables (Figura 39A). Por el contrario, se observó un aumento en los niveles de ATG8, así como la detección de ATG8-PE en células de la estirpe silvestre tratada con concentraciones sub-letales de cerulenina (Figura 39A). Por otro lado, se examinaron los niveles de expresión del transcrito *ATG8* en células de las estirpes silvestre y mutante tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina. Para ello, se analizó mediante qPCR la abundancia del ARNm correspondiente al gen *ATG8* de ambas estirpes demostrando que los niveles de expresión de *ATG8* aumentan en la estirpe WT, mientras que no se detectan en la estirpe *atg8* (Figura 39B).

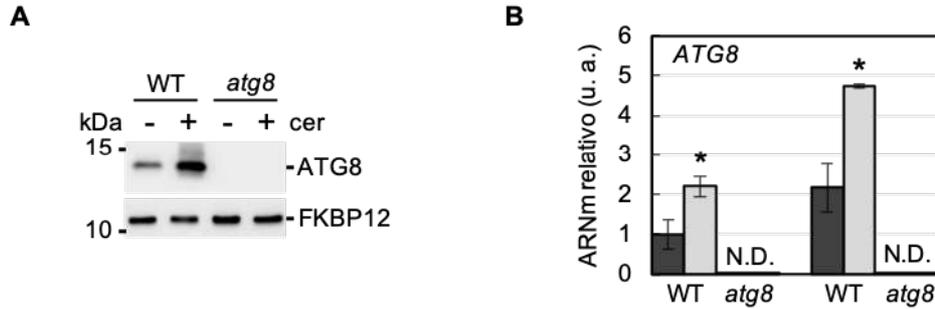


Figura 39. Efecto de la inhibición de la enzima FAS sobre los niveles de ATG8 en las estirpes WT y *atg8*. **A.** Quince μg de extracto total de proteína de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina (cer) durante 8 h se resolvieron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE para posteriormente analizarlos por western blot utilizando los anticuerpos anti-ATG8 y anti-FKBP12. La proteína FKBP12 se ha utilizado como control interno. Cultivos sin tratar se utilizaron como control. **B.** Análisis transcriptómico de la abundancia del ARNm del gen *ATG8* de las estirpes WT y *atg8*. Ambas estirpes en ausencia (color negro) o presencia (color gris) de cerulenina ($5 \mu\text{M}$) durante 2 h (Izquierda) y 4 h (derecha). Tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas se analizaron para cada muestra (u. a., unidades arbitrarias). Las siglas N.D. (No Detectado) se utilizaron para indicar las muestras con niveles de ARNm indetectables. Las barras de error representan la desviación estándar sobre la media. *, $P < 0.05$.

4.3.5.2. El mutante *atg8* tratado con cerulenina presentan una disminución en la eficiencia fotosintética

Nuestros resultados indican que el tratamiento de células de *Chlamydomonas* con cerulenina presenta un profundo impacto en el cloroplasto. Basándonos en estos datos, se comprobó si la inhibición de la enzima FAS provoca algún efecto en la actividad fotosintética en células de la estirpe *atg8*. Para ello, se determinó de forma comparativa la eficiencia fotosintética en células de las estirpes WT y mutante tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina utilizando el fluorómetro PAM.

En primer lugar, se analizó el parámetro fotoquímico F_v/F_m , relacionado con la variable de la máxima fluorescencia de la clorofila. Se observó una disminución de la eficiencia del PSII en células de la estirpe mutante después de 8 h de tratamiento comparada con la estirpe WT (Figura 40A). En segundo lugar, mediante el análisis del ETR, se detectó una disminución en la actividad fotosintética en la estirpe *atg8* comparada con la estirpe WT (Figura 40B). Estos resultados indican que la inhibición de la enzima FAS por la droga cerulenina en concentraciones no letales disminuye la actividad fotosintética en la estirpe *atg8* de *Chlamydomonas*.

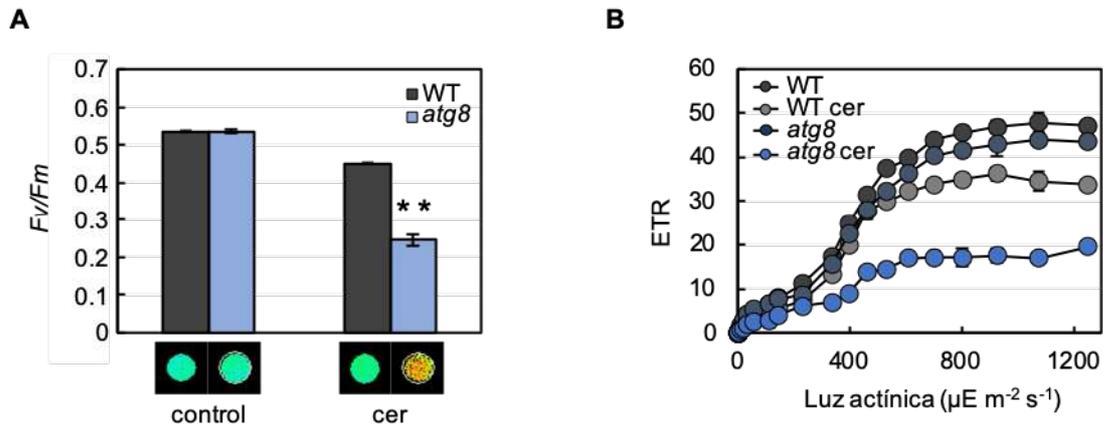


Figura 40. Efecto del tratamiento con concentraciones sub-letales de cerulenina en las propiedades fotosintéticas de las estirpes WT y mutante *atg8*. **A.** Valores F_v/F_m de las estirpes WT (color negro) y *atg8* (color azul) de *Chlamydomonas* en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de la droga cerulenina $5 \mu\text{M}$ (cer) durante 8 h. Se muestran adjuntos puntos de color correspondientes a los experimentos típicos de F_v/F_m . **B.** Se muestra el ETR relativo a la intensidad de luz actínica ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de las estirpes WT (color negro) y *atg8* (color azul) tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina durante 8 h (color gris y azul claro, respectivamente). Los cultivos se normalizaron a una misma longitud de onda a 750 nm . Los valores en ambas gráficas indican las medias de tres experimentos independientes incluyendo al menos tres réplicas técnicas de cada uno de ellos. Las barras de error representan la desviación estándar sobre la media. **, $P < 0.01$.

4.3.5.3. El tratamiento con la droga cerulenina en el mutante *atg8* aumenta los niveles de ROS

Dado que el tratamiento con cerulenina en la estirpe silvestre de *Chlamydomonas* provocó un aumento en los niveles de ROS, se estudió si la estirpe *atg8* también acumula estrés oxidativo en presencia de la droga. Para ello, se midieron los niveles de ROS mediante el marcador fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H2DFCDA) en células de las estirpes WT y *atg8* tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina durante 24 h (Joo et al., 2005; Pérez-Pérez et al., 2012b). Nuestros resultados indicaron que los niveles de ROS aumentan notablemente después de 24 h de tratamiento en la estirpe mutante comparado con la acumulación presente en la estirpe WT (Figura 41A). Además, se utilizó como control el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) para demostrar que la acumulación de ROS en estas condiciones se debía específicamente al tratamiento con cerulenina (Figura 41A).

Por otro lado, se midió la viabilidad celular de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con $5 \mu\text{M}$ de cerulenina durante 24 h mediante la tinción con *Evans Blue*. Por medio de esta tinción se determinó que la supervivencia celular de la estirpe *atg8* tratada con cerulenina disminuye comparada con la estirpe WT (Figura 41B). Estos datos, junto con los del apartado anterior, indican que la inhibición de la enzima FAS utilizando una concentración de $5 \mu\text{M}$ de cerulenina aumenta la producción de ROS e inhibe la actividad fotosintética en la estirpe *atg8* de *Chlamydomonas* que no

presenta actividad autofágica, lo que disminuye la viabilidad celular de esta estirpe comparada con la estirpe silvestre.

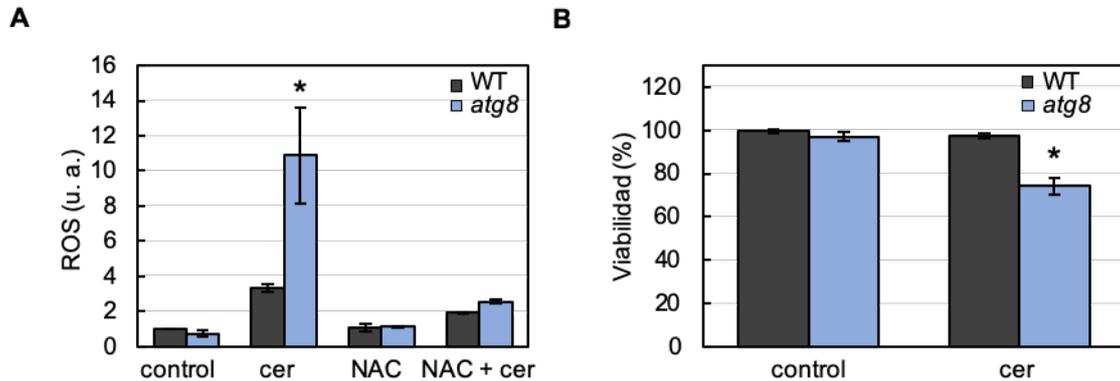


Figura 41. Efecto de la droga cerulenina sobre la producción en los niveles de ROS y la viabilidad celular en las estirpes WT y atg8. **A.** Niveles de ROS en respuesta al tratamiento con 5 μM de cerulenina (cer) y/o 5 mM de N-acetil cisteína (NAC) durante 24 h (u. a., unidades arbitrarias) en las estirpes WT y atg8 de *Chlamydomonas*. Se utilizaron como control cultivos sin tratar durante el mismo tiempo. **B.** Cuantificación (en %) de la viabilidad celular mediante el ensayo de tinción con *Evans Blue*. Se realizó esta tinción sobre las estirpes WT (color negro) y atg8 (color azul) en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de cerulenina 5 μM durante 24 h. Los valores en **A** y **B** corresponden a la media de tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas para cada una. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$.

4.3.5.4. La inhibición de la enzima FAS en el mutante atg8 presenta un efecto en la estructura del cloroplasto

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la enzima FAS por la droga cerulenina produce apilamientos en las membranas tilacoidales del cloroplasto en células WT de *Chlamydomonas*. Para seguir estudiando este efecto, se realizó un análisis estructural en el cloroplasto de células de las estirpes WT y atg8 tratadas durante 8 h con 5 μM de cerulenina. La integridad del cloroplasto se analizó mediante microscopía electrónica, donde se aprecia en células sin tratamiento una composición celular típica con un único cloroplasto que ocupa gran parte de la célula (Goodenough and Levine, 1969) (Figura 42A y B). Por el contrario, en células tratadas con 5 μM de cerulenina, se observan varias regiones del cloroplasto marcadas (Figura 42C y D) y ampliadas (Figura 42E y F) que muestran apilamientos en las membranas tilacoidales. Aunque las células WT tratadas con 5 μM de cerulenina también presentan apilamientos en las membranas tilacoidales, el número de membranas apiladas fue significativamente superior en células de la estirpe atg8 (Figura 42E y F).

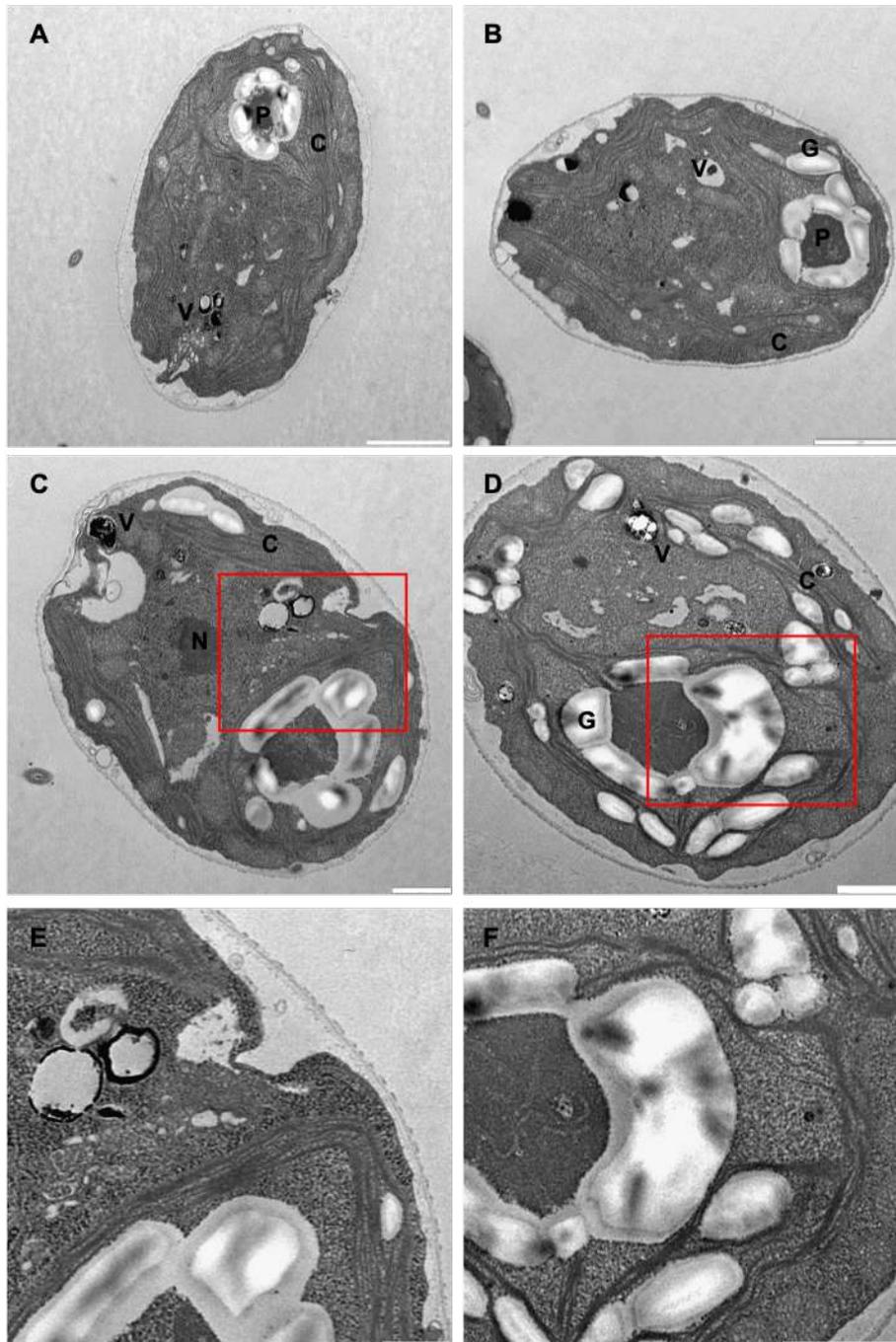


Figura 42. Efecto de la cerulenina sobre la estructura celular de las estirpes WT y *atg8*. Imágenes de microscopía electrónica de células de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* creciendo en ausencia (A y B, respectivamente) o presencia (C y D, respectivamente) de cerulenina 5 μ M durante 8 h. C, cloroplasto; N, núcleo; P, pirenoide; V, vacuola; G, gránulos de almidón. Los paneles E y F muestran una ampliación de las zonas marcadas en C y D, respectivamente. Escala: A y B, 2 μ m; C y D, 1 μ m; E y F, 500 nm.

Por otro lado, se cuantificó la relación entre el área que ocupa el cloroplasto respecto al área total de células tratadas en ambas estirpes (Figura 43A y B). Los resultados demuestran que las células de la estirpe mutante tratadas con 5 μ M de cerulenina durante 24 h presentaron una disminución en el tamaño, así como en la integridad de la estructura del cloroplasto comparada con lo observado en las células de la estirpe silvestre (Figura 43C). Los resultados indicaron que esta disminución en la superficie del cloroplasto en las células de la estirpe mutante respecto a la estirpe silvestre estaba presente en las primeras 4 h de tratamiento, siendo aún mayor su diferencia después de 8 h e incluso tras 24 h de tratamiento con 5 μ M de cerulenina. Estos datos sugieren que la estirpe *atg8* no es capaz de mantener la integridad del cloroplasto en presencia de concentraciones sub-letales de la droga cerulenina, siendo la autofagia un proceso necesario para mantener la homeostasis general de este orgánulo.

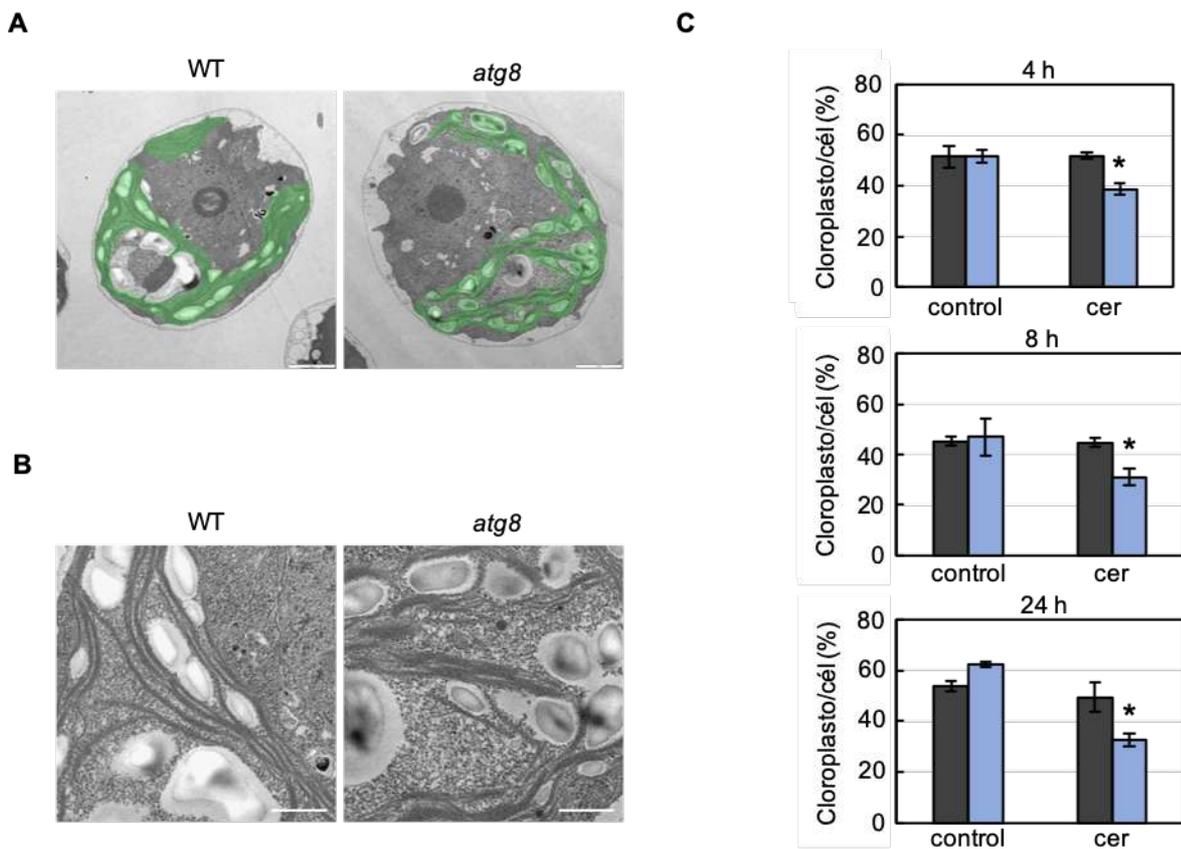


Figura 43. Cuantificación de la superficie del cloroplasto en las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina. **A.** Relación del área que ocupa el cloroplasto, marcado en verde, con el área total celular de las estirpes WT (izquierda) y *atg8* (derecha) de *Chlamydomonas* en presencia de cerulenina (5 μ M). **B.** Detalle de apilamientos en **A.** **C.** Cuantificación (en %) del área del cloroplasto por área total celular de las estirpes WT y *atg8* después de 4, 8 y 24 h en presencia o ausencia de cerulenina (cer) 5 μ M. Las barras de error indican la desviación estándar (N>100 muestras por ensayo). *, $P<0.05$. Escala: **A**, 2 μ m; **B**, 500 nm.

4.3.5.5. Análisis transcriptómico del mutante *atg8* tratado con cerulenina

Para investigar la respuesta global de células silvestres (WT4A+) y mutantes *atg8* a la inhibición de la enzima FAS, se realizó un análisis transcriptómico del genoma completo de ambas estirpes tratadas con una concentración sub-letal de cerulenina (5 μ M). Para ello, se tomaron muestras tras 0 y 4 h de la adición de cerulenina, utilizando para cada punto tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con la versión 5.5 del genoma de *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007) y se analizó la expresión de 14.066 genes.

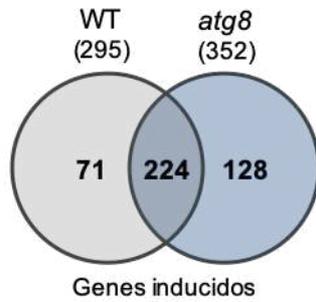
Para el análisis de expresión diferencial se utilizaron aquellos genes cuya expresión había aumentado más de 1.5 veces y solo se consideraron de este grupo los genes estadísticamente significativos, aquellos que presentaron un valor *p* ajustado (FDR) inferior de 0.05. Entre 0 y 4 h, 295 transcritos aumentaron su expresión significativamente en la estirpe WT, mientras que 352 genes aumentaron su expresión en la estirpe *atg8*. Se representaron mediante diagrama de *Venn* los genes inducidos presentes en ambas estirpes para seleccionar aquellos que podrían estar relacionados con la respuesta al tratamiento con cerulenina (Figura 44A).

Los resultados mostraron que ambas estirpes compartían 224 transcritos cuya expresión había aumentado significativamente. A continuación, para entender el comportamiento de estos genes tras 4 h de tratamiento se representaron mediante diagrama de violín utilizando la abundancia relativa de los transcritos como \log_2 (Figura 44B). Además, se realizó el test estadístico de distribución *t-Student* para comprobar si ambas poblaciones de datos, WT y *atg8*, eran independientes. Como resultado, el valor *p* obtenido fue inferior a 0.0001 (**), demostrando que la inducción de los genes seleccionados fue superior en la estirpe mutante comparada con la estirpe WT ambas tratadas con cerulenina durante 4 h (Figura 44B).

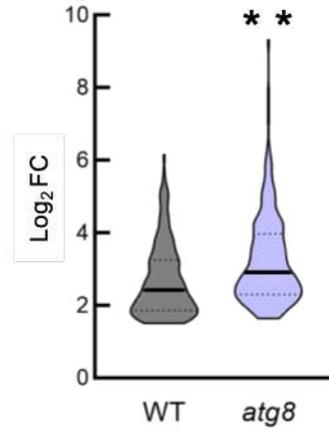
Por otra parte, se seleccionaron los genes más representativos de entre los 224 transcritos y se agruparon en los procesos biológicos que llevan a cabo (Figura 44C). De este modo, podemos observar que entre los grupos de genes más representados se encuentran aquellos relacionados con la respuesta a estrés en el cloroplasto, como las chaperonas y co-chaperonas del cloroplasto *HSP22E*, *DEG11*, *VIPP2* y *CLPB3*, las cuales presentan niveles superiores de transcritos en la estirpe *atg8* (Figura 44C). Igualmente, los genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo como *GSTS1*, *GPX5* y *APX1* aumentaron su expresión en mayor medida en la estirpe mutante tratada con cerulenina (Figura 44C). Finalmente, se representaron los genes sin anotación cuyos niveles de expresión diferencial fueron más elevados en la estirpe *atg8* comparada con la estirpe WT (Figura 44D). De este modo, aunque estos genes aún no hayan sido estudiados, merece la pena

mencionar su inducción en la estirpe *atg8* comparada con la estirpe WT, ambas tratadas con concentraciones sub-letales de cerulenina.

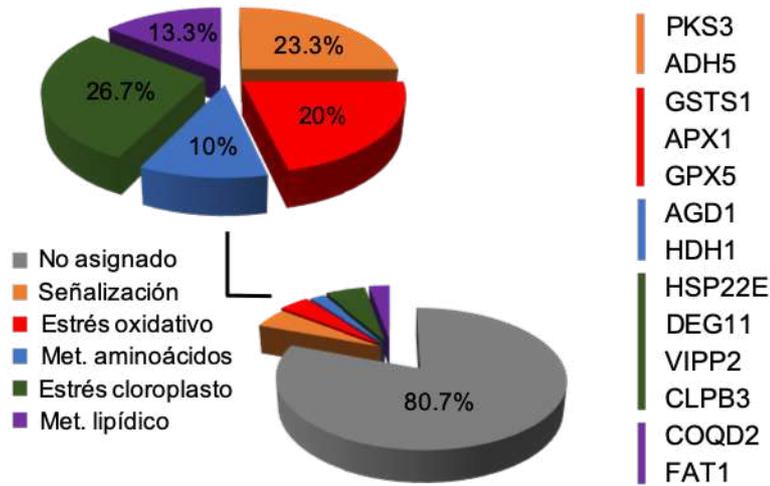
A



B



C



D

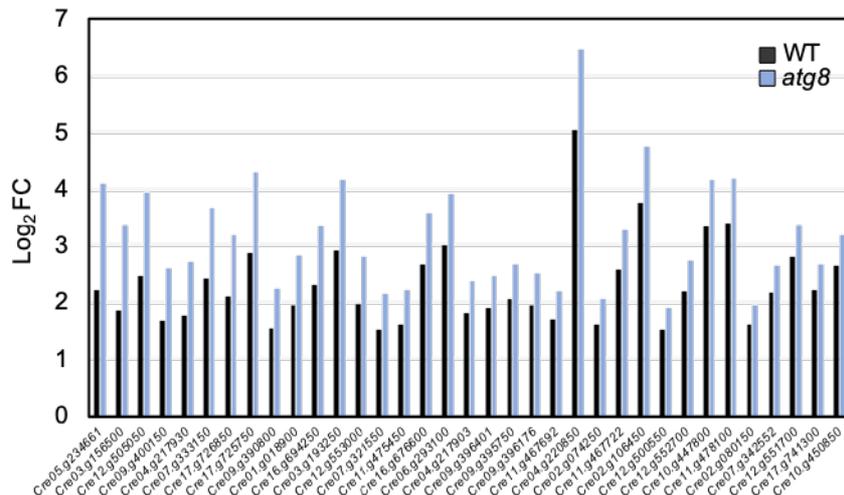


Figura 44. Análisis transcriptómico de las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina. Se realizó una caracterización funcional sobre la expresión diferencial de genes entre 0 y 4 h utilizando las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas*. **A.** Representación mediante diagrama de Venn de la abundancia relativa de los genes inducidos en ambas estirpes. **B.** Representación de la distribución de los genes inducidos en ambas estirpes mediante diagrama de violín. **C.** Genes cuya abundancia relativa aumentó significativamente entre ambas estirpes distribuidos por sus funciones biológicas. **D.** Genes cuya abundancia aumentó significativamente entre ambas estirpes y cuya función es desconocida. La abundancia de los genes que cambiaron significativamente en presencia de cerulenina tras 4 h de tratamiento en las estirpes WT y *atg8* se han representado en función del \log_2 a partir de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas cada una. Todos los genes presentan un valor p ajustado inferior de 0.05. **, $p < 0.01$.

4.3.5.6. Análisis proteómico del mutante *atg8* tratado con cerulenina

Para profundizar en el estudio de la hipersensibilidad del mutante *atg8* al tratamiento con cerulenina se realizó un estudio cuantitativo del proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con una concentración sub-lethal de cerulenina (5 μ M), tomando muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 16, y 24 h tras la adición de la droga. Los datos obtenidos de este análisis proceden de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Las proteínas identificadas a partir de los péptidos obtenidos del espectrómetro de masas se analizaron mediante el programa *ProteomeCommons.org* y se identificaron mediante la base de datos *UniProt* para *Chlamydomonas*, contabilizándose un número total de 10.522 proteínas. El análisis de los datos del estudio de proteómica cuantitativa se realizó utilizando las proteínas identificadas que presentaron al menos un péptido en 5 de los 7 puntos de la cinética y únicamente se consideraron aquellas proteínas cuyo valor p fuese menor a 0.05 (Figura 45A).

Con el fin de evaluar el efecto de múltiples variables en el proteoma de *Chlamydomonas* se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA de dos vías para identificar aquellas proteínas cuya abundancia cambió en función de los siguientes parámetros: tiempo, tratamiento con cerulenina y la interacción entre ambos. El análisis estadístico ANOVA de dos vías permite estudiar el efecto de dos factores independientes (tiempo de cultivo y tratamiento) teniendo en cuenta la influencia de cada factor sobre el proteoma y determina, por tanto, si su interacción es significativa. Este estudio se realizó con las proteínas identificadas en las estirpes WT y *atg8*, de las cuales, se seleccionaron 715 y 733 proteínas, respectivamente, que experimentaron un cambio significativo en su abundancia en función de al menos uno de los parámetros establecidos para el test estadístico (Figura 45A). La lista completa de las proteínas identificadas mediante el test ANOVA aparecen en el ANEXO2.

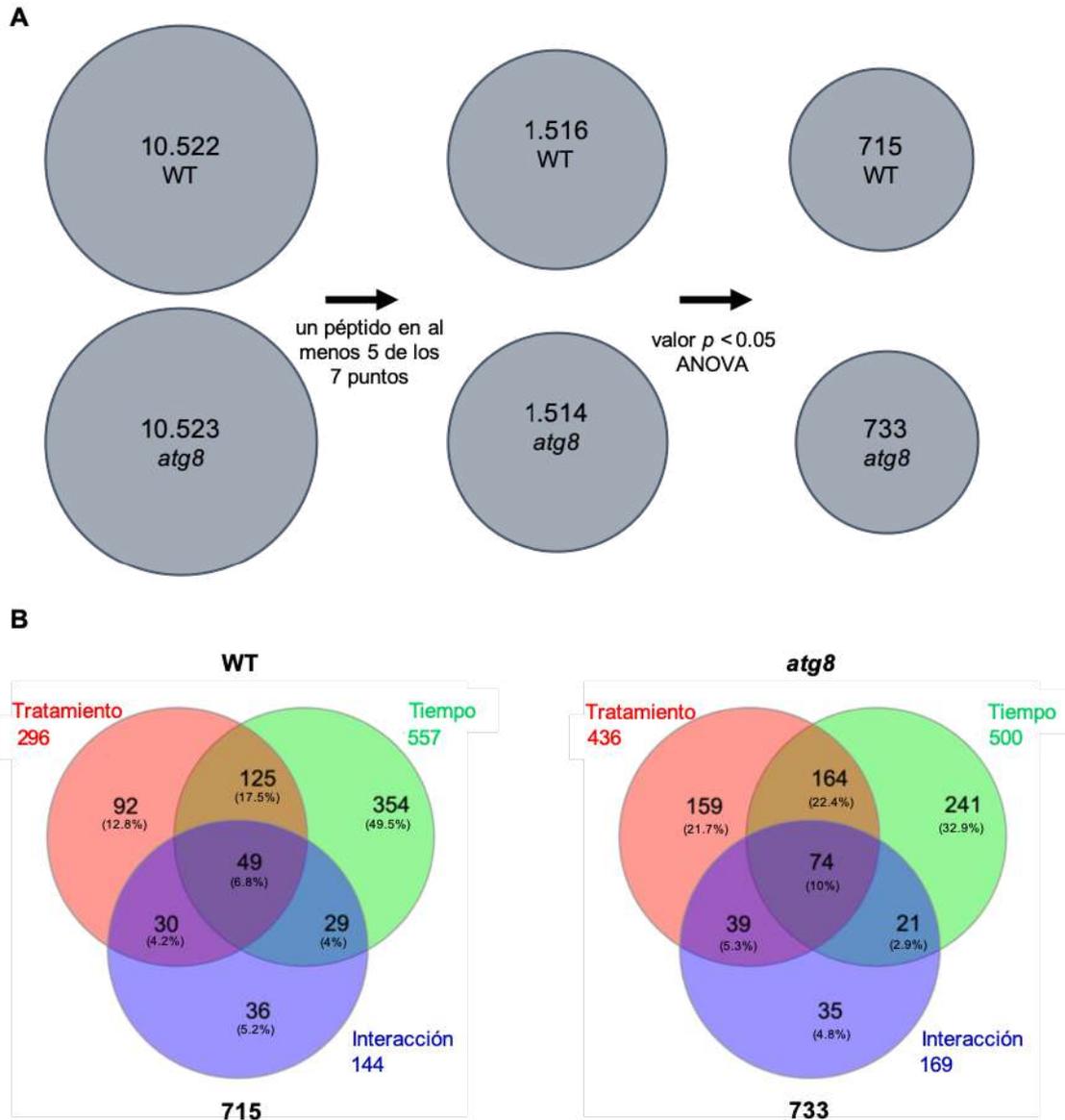


Figura 45. Análisis estadístico del proteoma de las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina en *Chlamydomonas*. **A.** Representación de las proteínas identificadas en el estudio proteómico y los parámetros de selección empleados para el posterior análisis. **B.** Representación mediante diagrama de Venn de los resultados del test estadístico ANOVA de dos vías relacionando las proteínas que cambian respecto a las variables de tiempo, tratamiento con cerulenina y la interacción entre ambas en las estirpes WT y *atg8*.

En la estirpe silvestre se identificaron 296 proteínas cuya abundancia cambió significativamente por el tratamiento con cerulenina, 557 proteínas cambiaron a lo largo del tiempo de cultivo y 144 proteínas cambiaron por la interacción de ambos factores (Figura 45B). Igualmente, en la estirpe mutante *atg8* se identificaron un total de 436 proteínas cuya abundancia cambió

significativamente por el tratamiento con cerulenina, 500 proteínas cambiaron a lo largo del tiempo de cultivo y 169 proteínas se afectaron por la interacción de ambos factores (Figura 45B). Para entender el efecto de la cerulenina sobre el proteoma, se eliminaron las proteínas que cambiaron significativamente solo a lo largo del tiempo. De entre las proteínas identificadas mediante el análisis ANOVA de dos vías, 354 y 241 proteínas cambiaron solo en función del tiempo en las estirpes WT y *atg8*, respectivamente. En el caso de las proteínas relacionadas con la interacción de los parámetros tratamiento y tiempo, sólo 36 proteínas de las 144 en el caso de la estirpe WT y 35 proteínas de las 169 en la estirpe *atg8*, no compartían solapamientos entre los parámetros de tiempo y tratamiento, presentando un comportamiento en su abundancia de interés. Además, aquellas proteínas que solaparon entre los tres factores (125, 49, 30 y 29 proteínas en el caso de la estirpe WT y 164, 74, 39 y 21 proteínas en la estirpe mutante) también presentaron patrones de interés para el estudio que realizamos. La mayoría de proteínas identificadas en ambas estirpes mediante este análisis ANOVA estaban relacionadas con los procesos biológicos de la fotosíntesis, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de aminoácidos, la respuesta a estrés, la traducción y el proteasoma.

Entre las proteínas seleccionadas para el estudio, cambiaron significativamente su abundancia en función del tratamiento con la droga cerulenina 296 proteínas en la estirpe WT y 436 proteínas en la estirpe *atg8* (Figura 45B). Las proteínas que cambiaron su abundancia en la estirpe *atg8* en función del tratamiento con cerulenina y que no aparecen en la estirpe WT (159 proteínas) están relacionadas con el estrés oxidativo y el estrés en el cloroplasto, incluyendo chaperonas, co-chaperonas, proteínas estructurales del PSI y PSII y proteínas relacionadas con la síntesis de clorofila o el sistema de concentración de CO₂. En conjunto, estos resultados apoyan que la estirpe mutante *atg8* es hipersensible al tratamiento con cerulenina.

Por otro lado, las proteínas cuya abundancia cambió en función de ambos parámetros en las estirpes WT y *atg8*, representadas en color azul (144 proteínas en la estirpe silvestre y 169 proteínas en la estirpe mutante) en los diagramas de *Venn* (Figura 45B), las proteínas que cambiaron significativamente en función del tratamiento, representados en rojo (296 y 436 proteínas en las estirpes WT y *atg8*, respectivamente), así como los grupos de proteínas presentes en todos los solapamientos, se emplearon para realizar un estudio de tendencia utilizando el algoritmo de la media *k* y el coeficiente de correlación de *Pearson* para la distancia métrica. De esta forma, se identificaron ocho grupos de proteínas (*clusters*) cuyos niveles mostraron distintas tendencias en respuesta al tratamiento con cerulenina tanto en la estirpe WT (Figura 46A) como en la estirpe mutante *atg8* (Figura 46B). Los *clusters* representados en la Figura 46 detallan el comportamiento general en la abundancia de ciertas proteínas durante el tratamiento con cerulenina. De los ocho grupos de proteínas identificados en cada estirpe, sólo presentaron proteínas de interés para nuestro estudio aquellos cuyas tendencias eran ascendentes (*cluster* WT-1 en la estirpe silvestre y *clusters atg8-1* y *atg8-8* en la estirpe mutante) o descendentes (*clusters* WT-3, WT-5, WT-7 y WT-8 en la estirpe

silvestre y *clusters atg8-4* y *atg8-5* en la estirpe mutante). Entre las proteínas que presentan un aumento significativo se encuentran aquellas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo, la degradación de proteínas o el transporte vesicular, todas ellas presentes en los *clusters* WT-1, *atg8-1* y *atg8-8*. Por el contrario, proteínas relacionadas con la fotosíntesis o la traducción, se encuentran entre las que experimentan una disminución en su abundancia, representadas mayoritariamente en los *clusters* WT-5, WT-8, *atg8-4* y *atg8-5*. Por otra parte, proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos, el ciclo del ácido tricarboxílico, la ruta de las pentosas fosfato y el metabolismo de aminoácidos se encuentran homogéneamente distribuidos por los ocho *clusters*, indicando que el efecto de la cerulenina produce un desajuste metabólico (ANEXO 3).

Las proteínas cuya abundancia aumentó significativamente en ambas estirpes por el tratamiento con cerulenina incluyen chaperonas del cloroplasto y proteínas de respuesta a estrés. Entre estas, figuran las proteínas de respuesta a estrés térmico HSP22E y HSP22F, la chaperona del estroma HSP70B y la chaperona CLPB3, todas ellas presentes en el *cluster* WT-1 de la estirpe silvestre y el *atg8-1* de la estirpe mutante. Las co-chaperonas DEG1C y VIPP1 también presentaron un aumento en su abundancia, pero sólo en la estirpe *atg8* en el *cluster atg8-1*. Por último, las proteínas relacionadas con el proteasoma y la degradación de proteínas UBQ1, UBQ2, FTSH2 y EIF6 aparecen en el *cluster* WT-1 de la estirpe WT, mientras que las proteasas SIR1, SIR4 y PREP1 aparecen en los *clusters atg8-1* y *atg8-8* de la estirpe mutante, aumentando todas ellas su abundancia. Además, las proteasas ASP1 y TSD2 aparecen exclusivamente en el *cluster atg8-1* de la estirpe *atg8* tratada con cerulenina (ANEXO 3).

Varias proteínas localizadas en el cloroplasto relacionadas con la detoxificación de ROS y la regulación redox aumentaron su abundancia en ambas estirpes en condiciones de tratamiento con cerulenina. Se incluyen en este grupo las proteínas GSTS1, GST2 y GPX5, todas ellas presentes en los *clusters* WT-1 y *atg8-1*, mientras que aumentaron aún más en la estirpe mutante *atg8* las proteínas GPX1, FSD1, PDI2 y APX1, localizadas en los *clusters* 1 y 8 de esta estirpe. Por otra parte, las proteínas relacionadas con la fotosíntesis disminuyeron su abundancia en ambas estirpes tratadas con cerulenina. Entre estas proteínas, se encuentran algunas de la sub-familia LHC (LHCBM8 y LHCA4), el complejo de concentración de carbono (PHC1-24), proteínas relacionadas con la síntesis de ATP (*atpA-F*) y proteínas de los fotosistemas (PETC, TEF8 y PSB28), presentes en los *clusters* WT-7 y WT-8. Igualmente, además de las proteínas mencionadas en la estirpe silvestre, se identificaron en la estirpe *atg8* proteínas estructurales de ambos fotosistemas (PsaA-L y PsbA-E), así como proteínas relacionadas con la síntesis de clorofila y complejos antena del cloroplasto como las familias LHCB y LHCA, todas ellas presentes en los *clusters atg8-4* y *atg8-5* de la estirpe mutante (ANEXO 3).

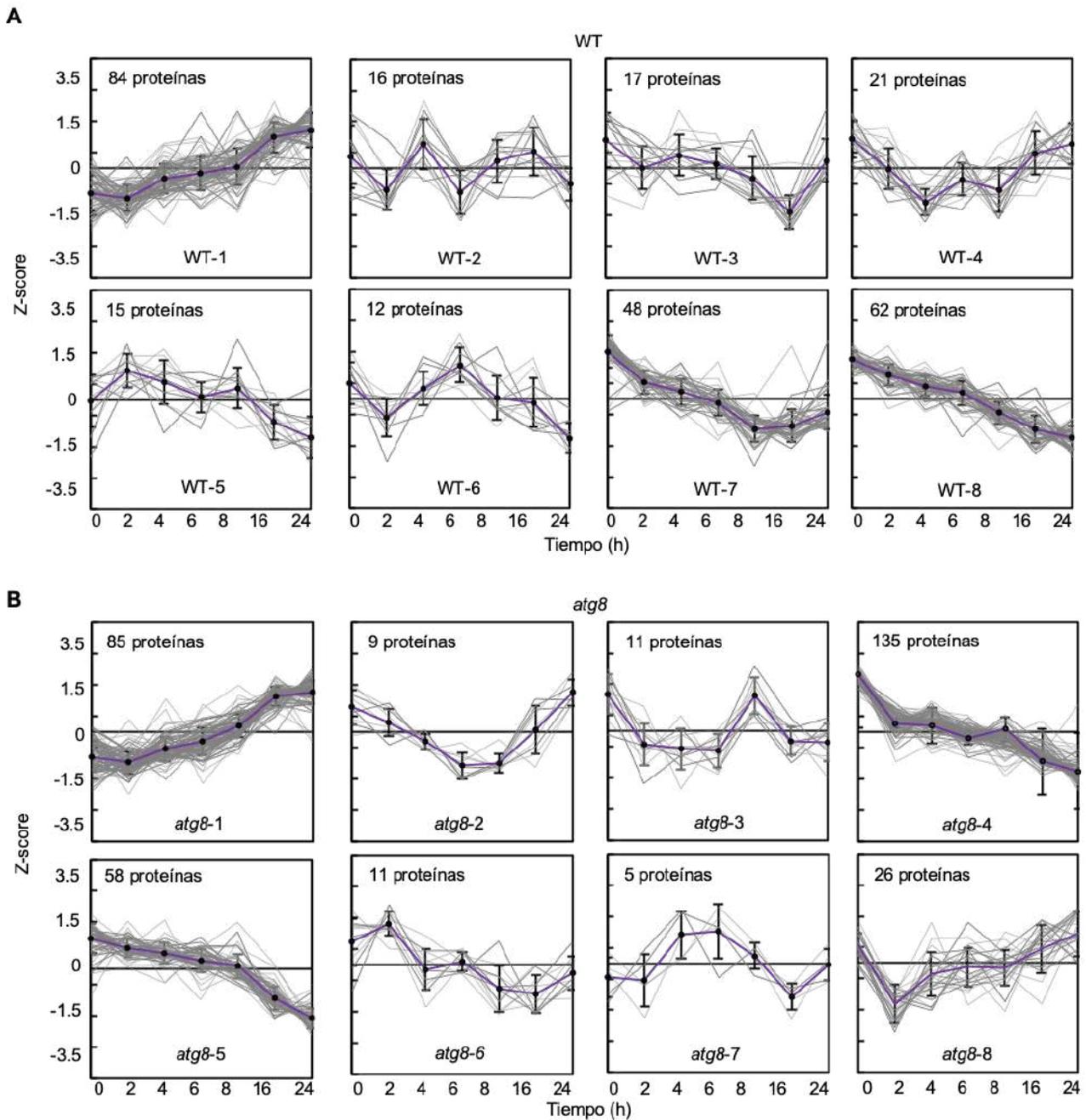


Figura 46. Análisis proteómico de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Identificación de ocho tendencias utilizando las proteínas seleccionadas en las estirpes WT (**A**) y *atg8* (**B**) a partir de los resultados obtenidos en el test ANOVA de dos vías mediante el valor p ajustado, el algoritmo de la media k y la correlación de *Pearson*. Los distintos *clusters* se numeraron del 1 al 8, tanto en la estirpe WT como en la estirpe mutante *atg8*. Se muestra en morado la media de todas las proteínas que presentan la misma tendencia.

Entre las proteínas analizadas en este estudio, hemos observado un cambio en la abundancia de proteínas relacionadas con diferentes procesos biológicos en ambas estirpes tratadas con cerulenina. Aunque la respuesta al tratamiento ha sido similar en ambas estirpes, el cambio

significativo en la abundancia de proteínas identificadas en la estirpe mutante *atg8* tratada con cerulenina ha sido superior. Por ello, algunas de las proteínas identificadas en los *clusters* de mayor interés se representaron agrupadas en los procesos biológicos con los que están relacionados en distintos gráficos (Figura 47). En estos gráficos se representó la abundancia relativa de las proteínas de interés en ambas estirpes tratadas con cerulenina después de 24 h.

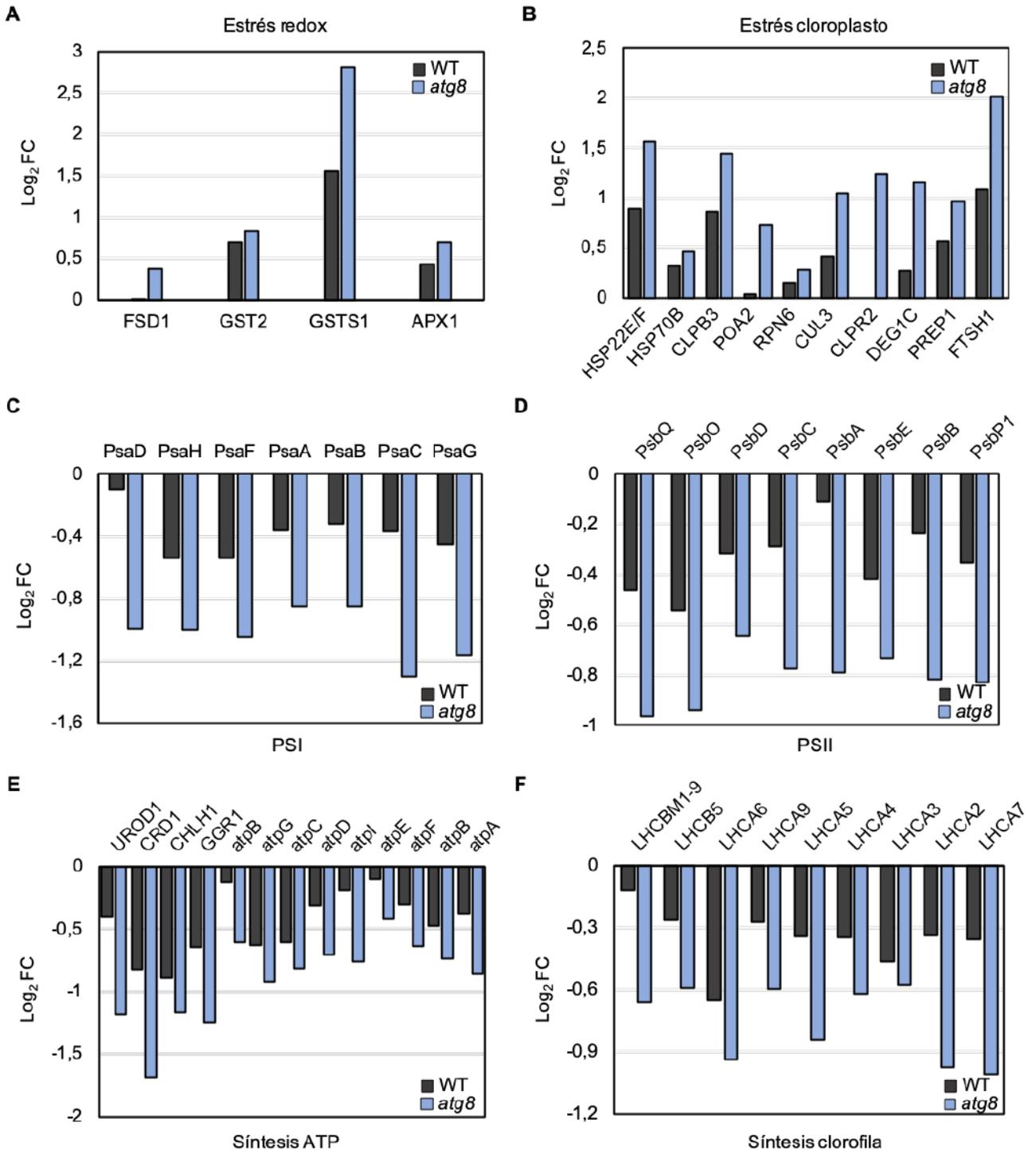


Figura 47. Análisis de las proteínas que presentan un cambio significativo en su abundancia en las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Representación gráfica de la abundancia relativa de proteínas que cambiaron en presencia de cerulenina (5 μ M) después de 24 h de tratamiento en las estirpes WT (negro) y *atg8* (azul). **A.** Abundancia relativa de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. **B.** Abundancia de proteínas de respuesta a estrés específico en el cloroplasto. Abundancia de proteínas estructurales presentes en el PSI y PSII en **C** y **D**, respectivamente. Abundancia relativa de proteínas relacionadas con la síntesis de ATP y pigmentos fotosintéticos se representaron en **E** y **F**, respectivamente. La abundancia de las proteínas que cambiaron significativamente en presencia de cerulenina tras 24 h de tratamiento se han representado en función del \log_2 utilizando tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Todas las proteínas representadas presentan un valor *p* ajustado inferior de 0.05.

De este modo, podemos observar el comportamiento de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo como FSD1, GST2, GSTS1 y APX1, las cuales presentan una acumulación superior en la estirpe *atg8* respecto a la estirpe WT (Figura 47A). Igualmente, las chaperonas y co-chaperonas HSP22E, HSP22F, HSP70B y DEG1C, presentan niveles de proteína superiores en la estirpe mutante en comparación con la estirpe WT (Figura 47B). Además, las proteínas relacionadas con el proteasoma POA2, CUL3, RPN6 o proteínas relacionadas con la degradación de proteínas CLPB3, PREP1, CLPR2 y FTSH1 aumentaron en mayor medida en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina (Figura 47B). Por el contrario, proteínas localizadas en el cloroplasto como las proteínas estructurales del PSI (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD y PsaF, PsaG y PsaH) (Figura 47C) y proteínas del PSII (PsbA, PsbB, PsbC, PsbD, PsbE, PsbO, PsbQ y PsbP1) disminuyeron tras 24 h de tratamiento en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina (Figura 47D). Además, proteínas relacionadas con el complejo ATP sintasa y la síntesis de pigmentos fotosintéticos también disminuyeron en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina respecto a la estirpe silvestre en las mismas condiciones (Figura 47E). Por último, las proteínas relacionadas con la síntesis de clorofila entre las que se encuentran las sub-familias LHCB (LHCB5 y LHCBM1-9) y LHCA (LHCA2, LHCA3, LHCA4, LHCA5, LHCA6, LHCA7 y LHCA9) disminuyeron tras 24 h de tratamiento en la estirpe *atg8* (Figura 47F). Estos resultados demuestran que la inhibición de la enzima FAS activa una respuesta a estrés en ambas estirpes y disminuye la abundancia de proteínas asociadas a la fotosíntesis y a la obtención de energía. Además, esta respuesta es mayor en la estirpe *atg8* debido a su incapacidad de activar la autofagia, por tanto, necesita inducir otros procesos degradativos como el proteasoma o proteasas específicas del cloroplasto en compensación, un evento que se acentúa después de 24 h de tratamiento.

Como se ha demostrado en el estudio proteómico, la cerulenina provoca un efecto en las células de *Chlamydomonas* tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe mutante *atg8*. Dicho efecto está relacionado con la respuesta a estrés por un daño específico en el cloroplasto y es evidente tras 24 h de tratamiento (Figura 47). Además, la acumulación de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés ha sido mayor en la estirpe mutante comparada con la estirpe WT, sobre todo a las 24 h de

tratamiento. Por ello, se analizaron mediante la herramienta PANTHER (pantherdb.org) las proteínas de *Chlamydomonas* cuya abundancia había cambiado en ambas estirpes tratadas con cerulenina durante 24 h y se anotaron en distintas categorías de ontología génica (términos GO) para comprender los procesos biológicos en los que participan dichas proteínas (Figura 48).

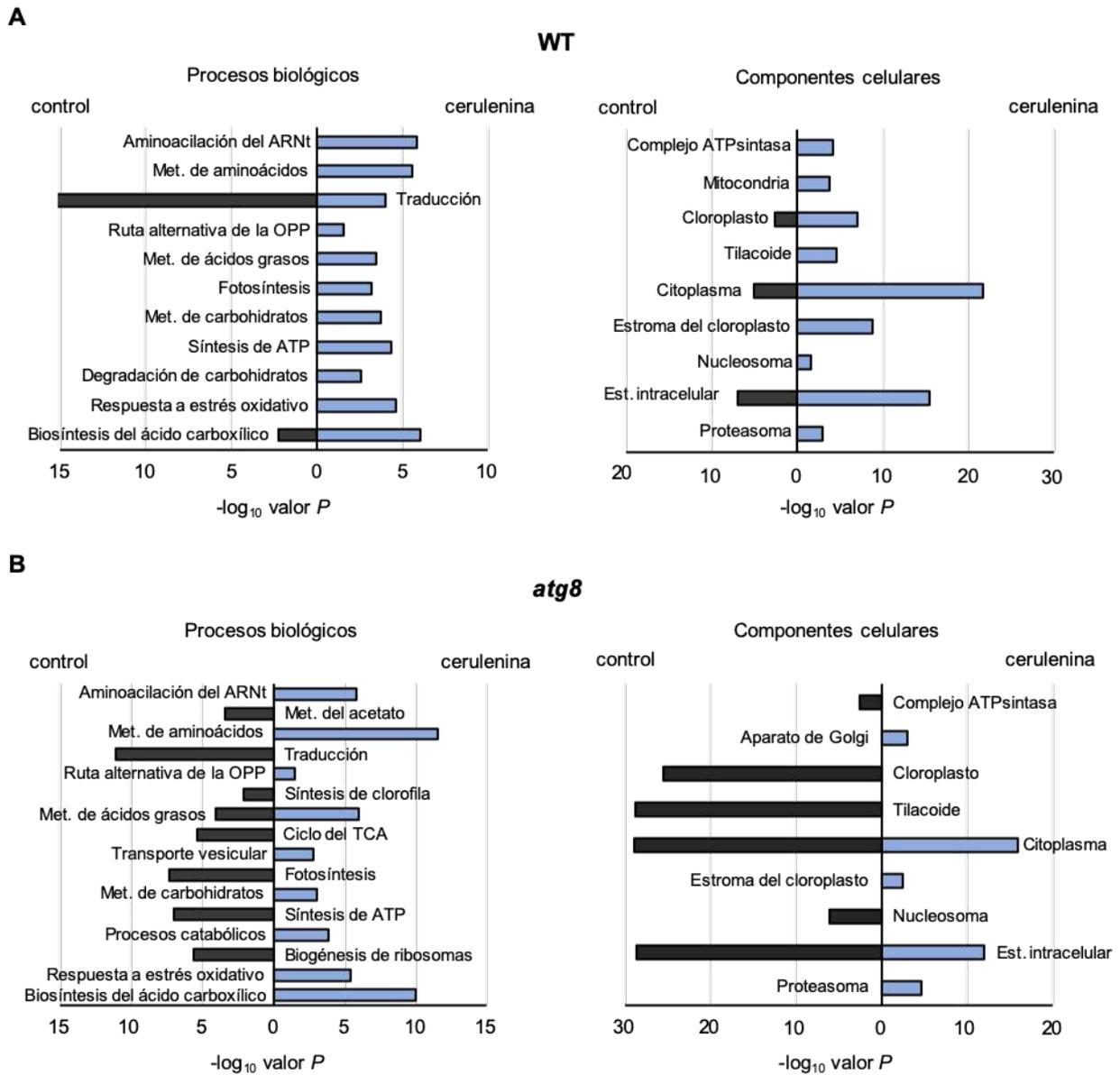


Figura 48. Análisis por categorías funcionales del proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Las proteínas que cambiaron significativamente en las estirpes WT y *atg8* tratadas con cerulenina 5 μ M se anotaron en distintas categorías de la ontología génica (términos GO). El enriquecimiento/disminución de las proteínas analizadas mediante el \log_{10} del valor p se representó utilizando las subcategorías de “procesos biológicos” y “compartimentos celulares” dentro de las categorías de la ontología génica en las estirpes WT (**A**) y *atg8* (**B**). Met., metabolismo; Est., estructura.

Se llevó a cabo una representación de los procesos biológicos más enriquecidos comparando las estirpes WT (Figura 48A) y *atg8* (Figura 48B) en condiciones de ausencia y presencia de cerulenina, así como los componentes celulares en los cuales las proteínas identificadas están localizadas. Las categorías más enriquecidas en ambas estirpes están relacionadas con el metabolismo del ARN, el metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de los ácidos grasos y la fotosíntesis (Figura 48). La respuesta a estrés oxidativo, procesos catabólicos y degradación de proteínas, así como el transporte vesicular también se encuentran entre las categorías más representadas en los grupos funcionales (Figura 48). Por otro lado, los términos GO que presentaron un enriquecimiento en la abundancia de proteínas en ambas estirpes en ausencia de cerulenina incluían procesos relacionados con la traducción, la síntesis de clorofila y la biogénesis de los ribosomas (Figura 48). Igualmente, los componentes celulares más enriquecidos están relacionados con la localización celular de los procesos identificados, por ejemplo, el citoplasma o el cloroplasto, donde se encuentran las proteínas más relevantes en los procesos metabólicos afectados en el tratamiento con cerulenina.

Finalmente, para comprender las diferencias existentes entre la abundancia de las proteínas identificadas en las estirpes WT y *atg8* se compararon los procesos biológicos más enriquecidos entre ambas estirpes tratadas con cerulenina durante 24 h, cuando la diferencia entre ambas estirpes es mayor y los procesos celulares relacionados con la respuesta a estrés están completamente activos. En primer lugar, se representaron mediante gráficas *volcano* la diferencia entre la abundancia de proteínas en ambas estirpes en ausencia (azul) y presencia (rojo) de cerulenina (Figura 49A). Los resultados indican que un total de 70 proteínas cambiaron significativamente entre las estirpes WT y *atg8* en condiciones normales de crecimiento, mientras que 259 proteínas cambiaron significativamente entre ambas estirpes tratadas con cerulenina (Figura 49A).

A continuación, se analizaron los términos GO de las proteínas cuya abundancia cambió significativamente en ambas estirpes tratadas con cerulenina. Los datos obtenidos mostraron un desajuste en los procesos de la fotosíntesis, la síntesis de clorofila, el metabolismo del ácido carboxílico y el metabolismo de ácidos grasos en ambas estirpes, mientras que los procesos con un enriquecimiento mayor en la estirpe mutante *atg8* estaban relacionados con procesos catabólicos como el proteasoma y la degradación de proteínas, la respuesta a estrés oxidativo, la ruta oxidativa de las pentosas fosfato y el metabolismo de los aminoácidos (Figura 49B y C). En conjunto, estos resultados reflejan que el tratamiento con cerulenina en ambas estirpes promueve una respuesta a estrés en *Chlamydomonas* que está intensificada en la estirpe mutante, que parece presentar un desajuste metabólico general relacionado con el flujo del carbono.

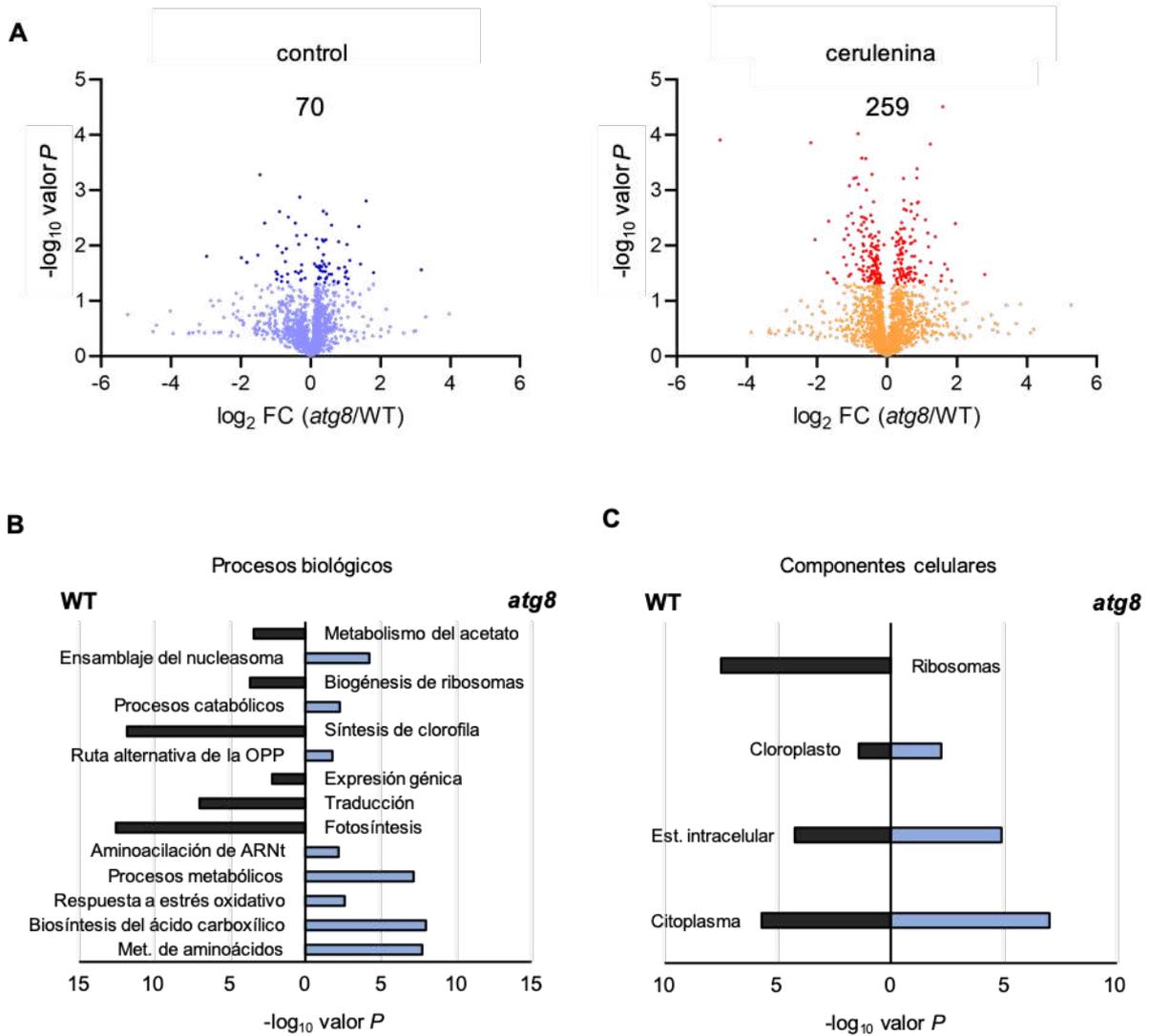


Figura 49. Efecto en el proteoma de las estirpes WT y *atg8* de *Chlamydomonas* por el tratamiento con cerulenina. **A.** La abundancia de proteínas totales analizadas mediante espectrometría de masas en las estirpes WT y *atg8* en ausencia (azul) y presencia (rojo) de cerulenina durante 24 h se representaron mediante gráficas *volcano* utilizando el \log_2 FC (*atg8* / WT) y el $-\log_{10}$ del valor *p* obtenido a partir de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. El enriquecimiento/disminución de las proteínas analizadas mediante el \log_{10} del valor *p* se representó utilizando las subcategorías de “procesos biológicos” (**B**) y de “compartimentos celulares” (**C**) dentro de las categorías de ontología génica. Met., metabolismo; Est., estructura.

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. La inhibición de la enzima FAS activa la autofagia

La síntesis *de novo* de los ácidos grasos en plantas y algas se realiza en el cloroplasto y el bloqueo parcial o total de este proceso tiene efectos perjudiciales para la célula. Durante esta tesis se ha realizado un estudio detallado de la respuesta de células de *Chlamydomonas* a la inhibición de la enzima FAS utilizando la droga cerulenina, que bloquea específicamente la síntesis de ácidos grasos (Johansson et al., 2008) (Figura 13). Nuestros resultados indican que el tratamiento con cerulenina de células de *Chlamydomonas* activa la autofagia, uno de los principales procesos catabólicos en organismos eucariotas. Gracias al estudio utilizando los marcadores específicos para la autofagia se confirmó la activación de este proceso degradativo en células tratadas con cerulenina. Concretamente, el tratamiento con cerulenina promueve la lipidación de la proteína ATG8 y la degradación de las proteínas citosólicas ribosomales RPS6 y RPL37, marcadores de la activación del flujo autofágico en *Chlamydomonas* (Pérez-Pérez et al., 2010; Couso et al., 2018). Además, se ha detectado mediante microscopía electrónica la aparición en células tratadas con cerulenina de vesículas de doble membrana, una característica morfológica de los autofagosomas, encargadas de transportar el material a degradar en la vacuola (Figura 14). Finalmente, el análisis del transcriptoma completo (ARNseq) de células tratadas mostró un aumento en la expresión de genes *ATG*, relacionados con el núcleo de la maquinaria central de la autofagia, así como la inducción en la expresión de genes del proteasoma (Figura 25 y Figura 26). En levaduras, la cerulenina bloquea la activación de la autofagia en condiciones limitantes de nitrógeno (Shpilka et al., 2015), pero los mecanismos por los cuales la síntesis de ácidos grasos regula este proceso degradativo en organismos no fotosintéticos puede ser distinta.

5.2. La inhibición de la enzima FAS genera estrés oxidativo

Existen estudios en *Chlamydomonas* relacionando la activación de la respuesta a estrés del cloroplasto con el aumento en la producción de ROS en condiciones de alta luz o mediante la disminución del contenido en carotenoides. Se ha demostrado que en ambas condiciones de estrés aumentan los niveles de ROS y activan los genes de respuesta a estrés del cloroplasto, lo que resulta en una activación del proceso de autofagia (Pérez-Pérez et al., 2012b). En otros estudios, la represión de un gen esencial para el mantenimiento del cloroplasto, *CLPP1*, el cual codifica la subunidad catalítica de la proteasa plastídica ClpP, activa la autofagia en *Chlamydomonas* (Ramundo et al., 2014). La activación del proceso de autofagia en *Chlamydomonas* por estrés oxidativo se ha conectado con la producción de ROS en un proceso que implica la oxidación y la inhibición de la proteasa ATG4 (Pérez-Pérez et al., 2012b, 2016, 2021). De acuerdo con el estudio

realizado en esta tesis que demuestra que los niveles de ROS aumentan en células tratadas con cerulenina, la activación de la autofagia está relacionada con el daño en el cloroplasto y la acumulación de ROS en las células.

En base a nuestros resultados, hemos propuesto un modelo en el que la inhibición de la enzima FAS por tratamiento con cerulenina provoca una disminución en el lípido del cloroplasto MGDG, alterando la proporción MGDG/DGDG, que tiene un importante papel en mantener la integridad de las membranas del cloroplasto. Este desequilibrio en la composición de lípidos produce un mayor apilamiento de las membranas tilacoidales, una desregulación de la fotosíntesis y un aumento en los niveles de ROS. Este daño en el cloroplasto es señalizado al núcleo, donde se activa la respuesta a estrés que implica la activación de los procesos de degradación celulares tales como la ruta del proteasoma y el proceso de autofagia (Figura 50).

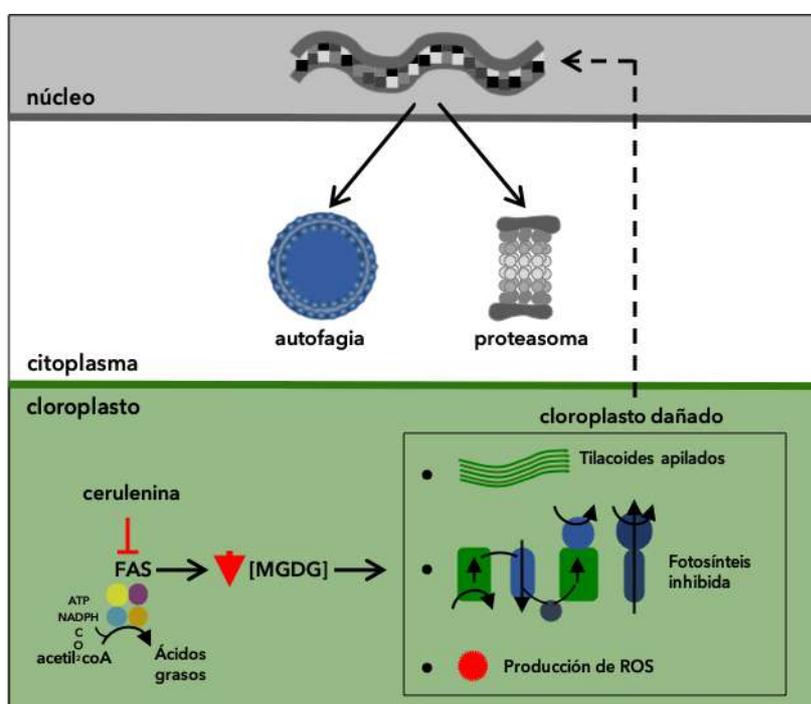


Figura 50. Modelo hipotético del efecto de la cerulenina sobre las células de *Chlamydomonas*. La inhibición de la enzima FAS debido al tratamiento con cerulenina produce una bajada en los niveles de los lípidos MGDG. Esto cambia la proporción existente entre los lípidos MGDG y DGDG alterando la estructura de los tilacoides, desregulando la fotosíntesis e incrementando la producción de ROS. Este daño en el cloroplasto activa una señalización retrograda desde el cloroplasto hacia el núcleo (línea discontinua) para aumentar la expresión de genes relacionados con rutas degradativas incluyendo genes de la maquinaria del proteasoma o proteínas centrales en el proceso de la autofagia, para finalmente mantener la homeostasis celular.

5.3. La inhibición de la enzima FAS genera daños específicos en el cloroplasto

¿Cómo genera la inhibición de la enzima FAS daños en el cloroplasto? Nuestros resultados revelaron que la síntesis de lípidos es necesaria para mantener la integridad y el funcionamiento del

cloroplasto en condiciones normales de crecimiento. En células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina existe una disminución del lípido más abundante en los tilacoides del cloroplasto, el MGDG (Figura 15) (Gounaris and Barber, 1983). El impacto de la cerulenina sobre el contenido lipídico también se ha estudiado en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina e incubadas en condiciones limitantes de nitrógeno donde se observó la disminución del ácido graso C18:1^{Δ9}, así como el aumento del C18:1^{Δ11} (Liu et al., 2016a). Por otra parte, existen estudios en plantas tratadas con cerulenina que muestran un efecto negativo en el cloroplasto durante la germinación de la cebada y una disminución en el contenido de lípidos plastídicos, incluyendo el lípido MGDG (Laskay et al., 1985).

En nuestro estudio, el tratamiento con cerulenina sobre células de *Chlamydomonas* disminuye los niveles de luteína (Heredia-Martínez et al., 2018). Además, las estirpes *lor1* y *npq1*, incapaces de sintetizar carotenoides (Niyogi et al., 1997), presentan mutaciones en la ruta de biosíntesis de los mismos, presentan hipersensibilidad a la cerulenina (Heredia-Martínez et al., 2018). Estas estirpes mutantes mostraban un crecimiento similar a la estirpe silvestre en condiciones de baja luz, pero eran sensibles a altas intensidades lumínicas debido a la incapacidad de sintetizar los carotenoides zeaxantina, anteraxantina y luteína (Heredia-Martínez et al., 2018). En *Arabidopsis*, el transporte vesicular y la degradación en la vacuola de cloroplastos completos mediante clorofagia, un proceso de degradación específico del cloroplasto vía autofagia, se ha estudiado en plantas cultivadas en condiciones de alta luz o expuestas a luz UV (Izumi et al., 2010, 2017; Nakamura et al., 2018; Wada et al., 2009). Por otra parte, no existen mecanismos similares en *Chlamydomonas* ya que este organismo presenta un único cloroplasto.

5.4. El tratamiento con la droga cerulenina produce daños en el cloroplasto y en la estructura celular

Nuestros resultados indican que la morfología celular de *Chlamydomonas* cambió por la inhibición de la síntesis de ácidos grasos mediante el tratamiento con cerulenina. Entre estos cambios, se detectó el aumento del tamaño celular, la disminución del cloroplasto y la pérdida de fluorescencia en la clorofila (Figura 16). Para confirmar estos resultados, las células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión. De esta forma, los datos obtenidos mostraron un efecto en la estructura del cloroplasto, apoyando que la inhibición de la enzima FAS genera daños específicos en el cloroplasto. En las células tratadas con cerulenina se observaron apilamientos de las membranas tilacoidales, detectándose en algunos casos un elevado número de membranas por empaquetamiento. Igualmente, resultados previos demostraron que la disminución del lípido MGDG en células tratadas

con cerulenina puede ser la causa del apilamiento detectado en estas estructuras. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que la disminución de MGDG en plantas y algas afecta a la estructura del cloroplasto. Concretamente, se ha demostrado que el tratamiento de plántulas de *Arabidopsis* con cerulenina disminuye el nivel de MGDG en sus cloroplastos e impide la formación de granas en los orgánulos de las plántulas tratadas (Laskay et al., 1985). También se han llevado a cabo mutaciones en el gen *MGD1* de *Arabidopsis*, que codifica la enzima MGDG sintasa, lo que causa una disminución del desarrollo del cloroplasto y la ausencia de las estructuras internas de las membranas plastídicas (Jarvis et al., 2000; Kobayashi et al., 2007). En otros estudios se trataron plántulas de *Arabidopsis* con galvestina-1, un inhibidor de la actividad MGDG sintasa, bajando el contenido de MGDG y que resultó en un desarrollo incompleto de los cloroplastos (Botté et al., 2011). En algas, se ha descrito que mutantes de la enzima ácido graso elongasa en *Nannochloropsis* presentan una disminución específica del lípido MGDG y una estructura alterada en las membranas tilacoidales (Dolch et al., 2017). Además, se ha demostrado que una estirpe mutante de *Chlamydomonas* que presenta una deficiencia en la proteína PGD1, una lipasa específica para MGDG, presenta un aumento en los niveles de MGDG y apilamientos en los tilacoides (Du et al., 2018). Estos estudios sugieren que no es el contenido en MGDG lo que define la integridad del cloroplasto si no más bien la proporción entre los lípidos MGDG y DGDG. Esta proporción es un parámetro crítico para mantener la estructura de este orgánulo y debe estar finamente regulado (Dörmann and Benning, 2002). Debido a sus propiedades biofísicas, el lípido MGDG no forma bicapas lipídicas (Gounaris and Barber, 1983). Por el contrario, el lípido DGDG es un lípido formador de bicapas (Webb and Green, 1991). Por todo ello, nuestra hipótesis defiende que el alto grado de apilamientos en las membranas tilacoidales en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina está relacionado con la disminución del ratio MGDG/DGDG, lo que afecta a la estabilidad y la fluidez de las membranas fotosintéticas.

5.5. Estudio transcriptómico del efecto de la inhibición de la enzima FAS en células de *Chlamydomonas*

5.5.1. Efecto global del tratamiento con cerulenina en las chaperonas y proteínas de respuesta a estrés en el cloroplasto de células de *Chlamydomonas*

Mediante el análisis global del transcriptoma en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina se detectó la activación de genes del cloroplasto relacionados con el plegamiento de proteínas, el estrés oxidativo, y la eliminación de ROS (Figura 25 y Figura 26). Durante el tratamiento con cerulenina, algunos de los genes que experimentaron un mayor aumento en sus niveles fueron aquellos relacionados con las chaperonas y proteínas de respuesta a estrés del cloroplasto. Entre ellos, se han identificado transcritos que codifican las proteínas HSP22C, HSP22E, HSP22F y

HSP70B, cuya función está relacionada con la respuesta a estrés térmico, estrés oxidativo y limitación de nutrientes como el azufre o el fósforo (Moseley et al., 2006; Fischer et al., 2007; Schroda and Vallon, 2009; Zhang et al., 2016; Rütgers et al., 2017). Estudios proteómicos y transcriptómicos llevados a cabo en células de *Chlamydomonas* en las que se elimina la proteasa cloroplastídica ClpP mostraron un aumento en las chaperonas HSP22C, HSP22E, HSP22F y otras chaperonas cloroplastídicas como HSP70B también aumentaban (Ramundo et al., 2014). Estos estudios sugieren que las chaperonas cloroplastídicas como HSP70B ejercen un papel importante en el estrés generado por la acumulación de proteínas mal plegadas en el cloroplasto, así como en la protección y reparación del PSII cuando las células están expuestas a altas intensidades de luz. En *Chlamydomonas*, HSP70B interactúa con VIPP1 y las co-chaperonas CGE1, CDJ1, CDJ2 y CDJ3 (Schroda and Vallon, 2009), las cuales participan en la biogénesis de las membranas tilacoidales. Tanto *Chlamydomonas* como otras algas Volvocales presentan dos parálogos para *VIPP*, *VIPP1* y *VIPP2*, y los genes que codifican ambas proteínas aumentaron su expresión en gran medida en condiciones de estrés por alta luz (Nordhues et al., 2012). De acuerdo con estos trabajos, los genes relacionados con la respuesta a estrés en el cloroplasto mencionados en este apartado también aumentaron sus niveles fuertemente en las células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina, sugiriendo que la inhibición de la enzima FAS activa la respuesta a estrés del cloroplasto y el sistema de control de calidad, ambos involucrados en la reparación y el intercambio de proteínas cloroplastídicas dañadas (Rochaix and Ramundo, 2017).

Los resultados descritos hasta ahora indican un daño específico en el cloroplasto, pero ¿existe un efecto oxidativo subyacente? Los transcritos que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo e involucradas con la detoxificación de ROS también aumentaron su expresión notablemente en aquellas células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina. Entre este grupo de genes se encuentran *GSTS1*, *GPX5*, *GRX3*, *APX1*, *APX2*, *APX3*, y *PRX6*. En *Chlamydomonas*, las peroxirredoxinas y las glutatión peroxidasa juegan un papel importante en la protección celular frente al daño oxidativo producido por ROS (Dayer et al., 2008). En otros estudios, la expresión de *GPX5* y *GSTS1* aumentó considerablemente en condiciones de estrés por alta luz (Fischer et al., 2007, 2012; Ledford et al., 2007). Así mismo, el transcrito para NTRC es otro de los genes que aumentó su expresión en el análisis transcriptómico de células tratadas con cerulenina. En plantas, NTRC presenta un papel protector en el cloroplasto reduciendo a la 2-cys peroxirredoxina como una defensa frente al daño oxidativo (Pérez-Ruiz et al., 2006; Pérez-Ruiz et al., 2017). El hecho de que los niveles de este transcrito aumenten en el análisis transcriptómico de aquellas células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina sugiere que NTRC puede tener un papel de protección oxidativo en el cloroplasto de este organismo.

Por otra parte, el apilamiento de membranas tilacoidales detectado en células de *Chlamydomonas* tratadas con cerulenina están relacionadas con la inhibición de la fotosíntesis y el

aumento en la producción de ROS (Figura 19 y Figura 21). En respuesta a distintas condiciones de estrés, las células fotosintéticas adaptan su actividad mediante la movilidad de las proteínas del aparato fotosintético a lo largo de las membranas tilacoidales. Como consecuencia, la falta de plasticidad genera que el exceso de luz no puede ser disipado, favoreciendo la producción de ROS que causa estrés oxidativo y disminuye el crecimiento celular. Nuestra hipótesis mantiene que la generación de ROS en células tratadas con cerulenina está relacionada con el daño estructural de las membranas tilacoidales y la disminución de la eficiencia fotosintética (Figura 50). Por otro lado, la conexión existente entre la inhibición de la fotosíntesis y la producción de ROS se ha estudiado en el doble mutante *npq1lor1* donde las proteínas del PSII se degradan en condiciones de estrés por alta luz aumentando así los niveles de ROS (Baroli et al., 2004). Apoyando nuestros resultados, se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo con cerulenina aumenta la producción de ROS en células de *C. zofingiensis* (Liu et al., 2016b). Además, el daño estructural presente en las membranas tilacoidales en mutantes deficientes de la lipasa PGD1 con menores niveles de MGDG, también mostraron un aumento en los niveles de ROS en el cloroplasto bajo condiciones limitantes de nitrógeno y estrés por alta luz (Du et al., 2018). En conjunto, estos estudios indican que la inhibición de la enzima FAS y el daño estructural en las membranas tilacoidales provocan un aumento en la producción de ROS en algas.

5.5.2. El tratamiento con cerulenina activa la autofagia en células de *Chlamydomonas*

Se ha descrito que las moléculas de ROS también están relacionadas con la señalización celular, siendo moléculas útiles en la señalización retrograda desde el cloroplasto hacia el núcleo (Dietz et al., 2016; Leister, 2019b). Pero ¿verdaderamente está actuando ROS como una molécula señalizadora permitiendo así la activación de la autofagia en condiciones de inhibición de la enzima FAS? Existen estudios que demuestran que ROS está involucrado en el control de la autofagia en *Chlamydomonas* (Pérez-Pérez et al., 2012b) y es capaz de regular la actividad de la proteasa ATG4 en algas y levaduras (Pérez-Pérez et al., 2014, 2016, 2021). Además, nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de los transcritos relacionados con la maquinaria central de la autofagia, demostrando que el tratamiento con cerulenina activa este proceso catabólico en *Chlamydomonas*, así como la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés (Figura 25). Esta inducción de genes tiene lugar en las primeras 4 h de tratamiento, cuando la fotosíntesis y los niveles de ROS aún no parecen estar afectados (Figura 19 y 21). Esto puede deberse a que la inhibición de la actividad FAS tiene un impacto directo en la composición de las membranas plastídicas que podría estar siendo detectado por el núcleo gracias a un mecanismo independiente de ROS para poder activar de manera prematura las rutas de autofagia, proteasoma, chaperonas del cloroplasto, y otros genes de respuesta a estrés necesarios para mantener la homeostasis celular. Sin embargo, no

podemos descartar que esta señalización la estén llevando a cabo moléculas de ROS cuya abundancia se encuentra por debajo de los niveles de detección de nuestros ensayos.

Por otra parte, la respuesta de células tratadas con cerulenina y células con una deficiencia en la proteasa cloroplastídica ClpP es muy similar, ya que en ambas condiciones se activa tanto la autofagia como la respuesta a estrés en el cloroplasto (Ramundo et al., 2014). Además, aunque la inhibición de la enzima FAS por cerulenina y la deficiencia de ClpP pueden tener efectos parecidos, aun no se ha estudiado si ambos procesos están mediados por la misma maquinaria de señalización. Finalmente, la inhibición de la enzima FAS por cerulenina puede llegar a ser una herramienta muy útil con la que investigar la señalización retrograda desde el cloroplasto hacia el núcleo e identificar los sustratos selectivos de la autofagia en células con estrés específico en el cloroplasto.

5.6. Plasticidad metabólica de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad

Chlamydomonas es un organismo con la capacidad de crecer fotoautotrófica, mixotrófica y heterotróficamente. Este comportamiento la convierte en un organismo modelo para estudiar procesos celulares, incluyendo la función y estructura del flagelo (Dutcher, 1995; Cao et al., 2013), la biogénesis y actividad del cloroplasto (Rochaix, 2001), la adaptación celular a condiciones limitantes de nutrientes (Merchant et al., 2006; Pootakham et al., 2010; Couso et al., 2020; Mallén-Ponce et al., 2022), las características del mecanismo de concentración del carbono (Fang et al., 2012; Meyer and Griffiths, 2013) y la biosíntesis de lípidos (Li et al., 2012).

Los organismos fotosintéticos como *Chlamydomonas* pueden obtener energía a partir del metabolismo en oscuridad durante gran parte de su ciclo diario (Perez-Garcia et al., 2011). La disponibilidad de O₂ durante la fase de oscuridad influye en la activación de distintas rutas metabólicas (Figura 51). La mayoría de las microalgas, entre las que se encuentra *Chlamydomonas*, son capaces de fermentar una amplia variedad de sustratos para generar ATP. Aún así, en condiciones de ausencia de luz, estos microorganismos son capaces de respirar reservas de energía como el almidón, almacenado intracelularmente, o el acetato, sustrato extracelular, para generar ATP. En nuestro estudio, se trataron con la droga cerulenina células de *Chlamydomonas* crecidas en oscuridad utilizando acetato como fuente externa de carbono. Nuestros resultados han demostrado que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, proceso que tiene lugar en el cloroplasto, activa la autofagia (Heredia-Martínez et al., 2018). La inducción de este proceso degradativo, necesario para mantener la homeostasis celular, se debe al daño producido en el cloroplasto que en presencia de luz acumula gran cantidad de ROS. Para comprender el efecto de la cerulenina sobre el cloroplasto estudiamos el proceso de autofagia en células creciendo en oscuridad. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento con cerulenina en oscuridad provoca

una inducción en la expresión del gen *ATG8* al igual que una acumulación de la proteína correspondiente (Figura 28). Esto podría ser debido a que, en ausencia de luz, y por tanto de fotosíntesis, aún se produce un daño estructural en las membranas tilacoidales por la inhibición de la enzima FAS, que sería suficiente para producir ROS e inducir la autofagia.

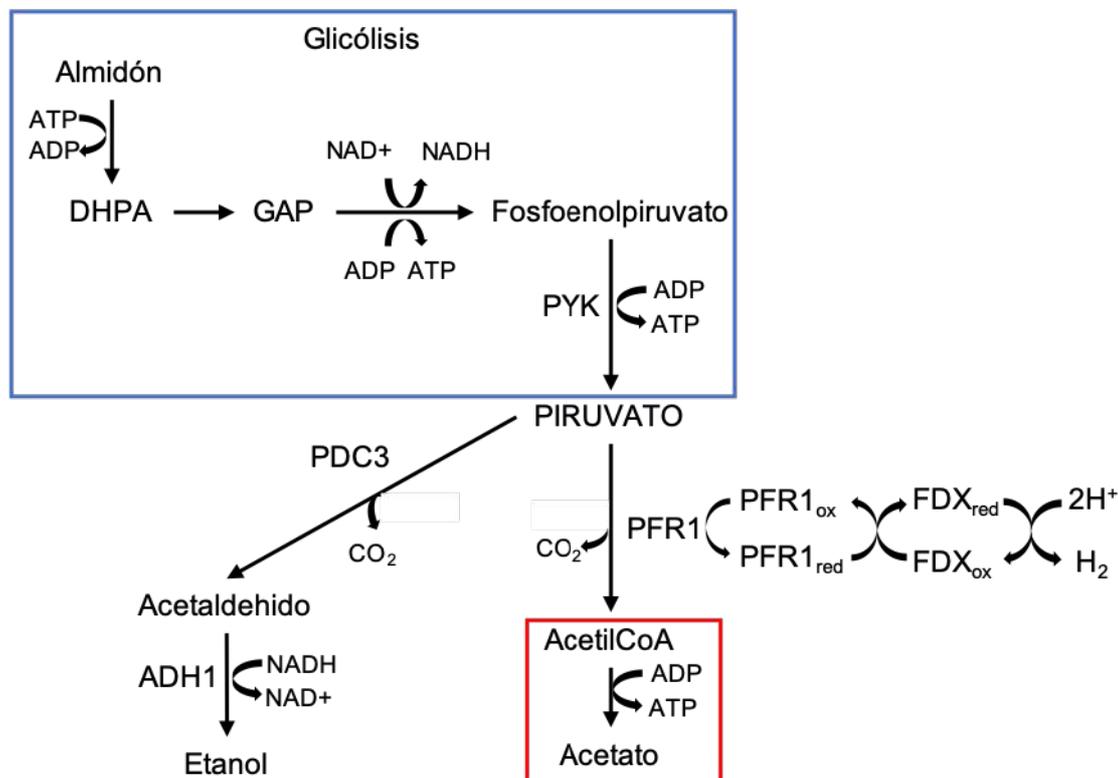


Figura 51. Metabolismo de células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad. La glicólisis (cuadro azul) degrada hexosas provenientes del almidón fotosintético a piruvato. El piruvato puede ser empleado como sustrato para varias enzimas, incluyendo PFR1 para formar acetil-CoA, el cual se utiliza como sustrato en la ruta de síntesis del acetato (cuadro rojo) o para producir bioetanol mediante ADH1 utilizando el acetaldehído como intermediario. PFR1 es una oxidorreductasa que puede reducir FDX durante la conversión del piruvato a CO₂ y acetil-CoA. FDX reducida puede ser utilizada para generar H₂. ADH1, alcohol deshidrogenasa; PDC3, piruvato decarboxilasa; PFR1, piruvato ferredoxina reductasa; PYK, piruvato quinasa. Figura adaptada de Gfeller and Gibbs, 1984.

5.7. El tratamiento con cerulenina en células de *Chlamydomonas* creciendo en oscuridad provoca estrés oxidativo y la reorganización de las membranas del cloroplasto

Como ya se ha comentado durante esta discusión, existen estudios relacionados con el crecimiento de *Chlamydomonas* en condiciones heterotróficas (Badin and Calvin, 1950; Gans and Rebeille, 1990; Klöck and Kreuzberg, 1991; Yang et al., 2014) (Figura 52). Se ha demostrado que el metabolismo de estos organismos durante períodos de oscuridad está relacionado con el aumento de rutas metabólicas fermentativas, así como la respiración de distintos sustratos para obtener ATP

(Gfeller and Gibbs, 1984; Bennoun, 2005; Alric et al., 2010; Catalanotti et al., 2012; Yang et al., 2014) (Figura 51). Igualmente, todos estos procesos que se llevan a cabo en oscuridad provocan estrés oxidativo en el cloroplasto derivado del aumento en la actividad metabólica (Cardol et al., 2009; Dang et al., 2014). Estas condiciones unidas al tratamiento con cerulenina que se ha realizado en células de *Chlamydomonas* muestran un aumento en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y de respuesta a estrés en el cloroplasto (Figura 29).

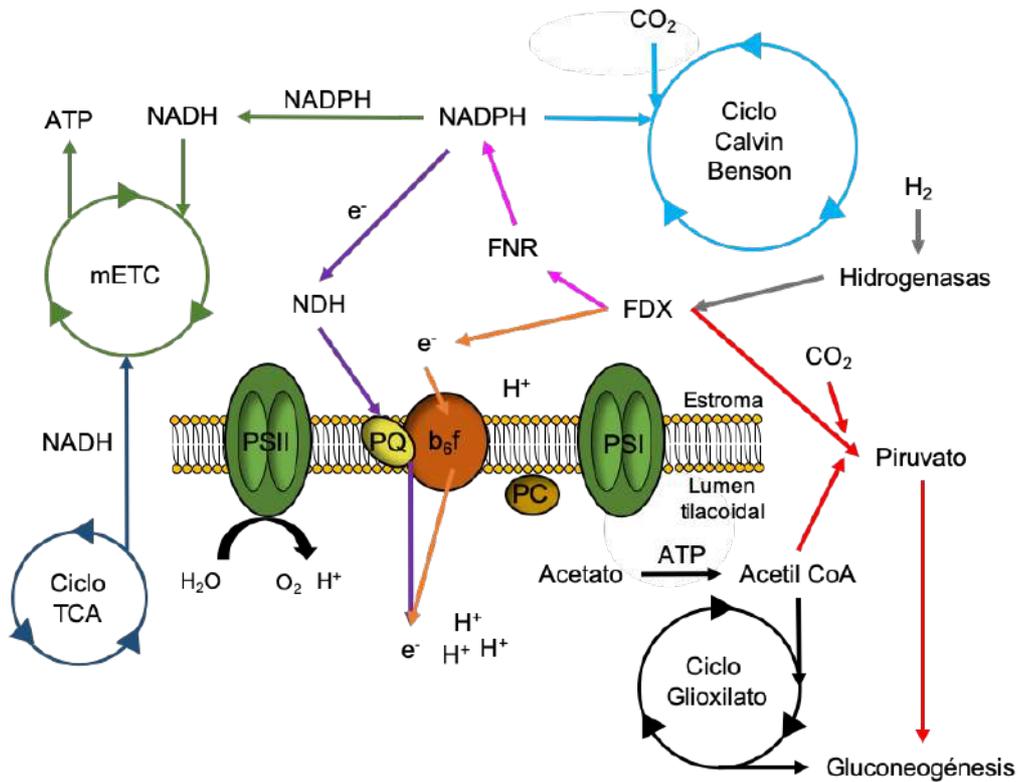


Figura 52. Flujo del transporte electrónico durante el metabolismo en *Chlamydomonas* creciendo en luz. Las flechas y círculos de distintos colores representan las reacciones que tienen lugar en luz. El hidrógeno es oxidado mediante las hidrogenasas y los electrones resultantes son utilizados para reducir al O_2 . Finalmente, las hidrogenasas reducen a las ferredoxinas (línea gris). La ferredoxina reducida sirve como sustrato para FNR, la cual forma NADPH (línea rosa). El NADPH puede incorporarse al ciclo de Calvin-Benson para fijar carbono (línea celeste) o puede convertirse en NADH e incorporarse en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (mETC) para producir ATP (línea verde). El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) produce NADH, el cual es utilizado por la mETC (línea azul). Los electrones provenientes del NADPH pueden reducir el *pool* de quinonas (PQ) para generar un gradiente de electrones hacia el lumen del cloroplasto (línea morada) al igual que los electrones provenientes de las ferredoxinas (línea naranja). La ferredoxina también puede formar piruvato, el cual se emplea directamente en la gluconeogénesis (línea roja). Por último, se puede emplear el acetato para obtener acetil-CoA y utilizarlo en el ciclo del glioxilato (línea negra). Figura adaptada de Yang et al., 2015b.

Durante el período de crecimiento en oscuridad, las células de *Chlamydomonas* cambian su balance metabólico, para lo que se requiere una adaptación en el cloroplasto de estas células (White

and Hooper, 1994; Cardol et al., 2009). Igualmente, las células necesitan un aumento en la actividad de las rutas metabólicas localizadas en la mitocondria, necesaria para respirar sustratos en oscuridad y generar energía (Duby and Matagne, 1999; Cardol et al., 2009). Entre otros cambios se necesita un intercambio de proteínas e información entre ambos orgánulos en condiciones de crecimiento heterotróficas (Kromer, 1995; Cournac et al., 2000; Bennoun, 2005; Houille-Vernes et al., 2011). Nuestra hipótesis defiende que esta situación metabólica unida al tratamiento con la droga cerulenina genera un daño en el cloroplasto apreciable en nuestros resultados. De hecho, el efecto que produce la inhibición de la enzima FAS en células creciendo en oscuridad se asemeja al observado en el tratamiento de estas células con cerulenina creciendo en presencia de luz (Figura 31).

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de lípidos ocurre en el cloroplasto, pero la mitocondria es uno de los orgánulos protagonistas en el metabolismo en oscuridad. De hecho, se ha demostrado que *Chlamydomonas* recicla ácidos grasos de distintas membranas, incluyendo cloroplasto y mitocondria, para mantener estables los niveles de carbohidratos (Li-Beisson et al., 2015). Además, se ha demostrado que existen genes que codifican componentes de la enzima FAS tipo II, los cuales son etiquetados con péptidos diana tanto para el cloroplasto como para la mitocondria (Li-Beisson et al., 2015). Igualmente, los ácidos grasos presentes en el cloroplasto pueden ser etiquetados y redistribuidos a otros compartimentos celulares incluida la mitocondria (Riekhof et al., 2005). Por último, existen estudios en plantas que demuestran que la mitocondria es capaz de sintetizar ácidos grasos de cadena corta como precursores para la síntesis del ácido lipoico (Wada et al., 1997).

5.8. Caracterización de la estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas*

5.8.1. Retraso en el crecimiento del mutante *atg8* en fase estacionaria

Durante el desarrollo de esta tesis se ha generado un mutante en *Chlamydomonas* por edición de su genoma nuclear. Concretamente, hemos insertado un gen de resistencia al antibiótico paramomicina en el gen *ATG8* mediante el método *CRISPR/Cas9* (Baek et al., 2016; Shin et al., 2016). Finalmente, obtuvimos un mutante *atg8* a partir de la estirpe silvestre WT4A+ carente de la proteína ATG8.

La autofagia es un proceso degradativo necesario para mantener la homeostasis celular y se encuentra muy conservado entre los organismos eucariotas. Junto al proteasoma, son las dos rutas catabólicas principales de respuesta a estrés celular ya que se encargan de la degradación y reciclaje de material celular dañado (He and Klionsky, 2009; Y. Liu and Bassham, 2012; Marshall and Vierstra, 2018). Entre las proteínas centrales de la maquinaria de autofagia, ATG8 juega un papel principal en

esta ruta siendo clave tanto en la formación del autofagosoma como en la selección del *cargo* o material celular a degradar en la vacuola (Mizushima et al., 2011; Feng et al., 2014). Debido a la importancia de la proteína ATG8 durante el proceso de la autofagia, estudiamos la respuesta de la estirpe mutante *atg8* a distintas condiciones de estrés. Nuestros resultados mostraron que la estirpe *atg8* presentaba un retraso en el crecimiento en fase estacionaria. Además, se estudió el fenotipo de la estirpe *atg8* bajo distintas condiciones de estrés nutricional, como la deficiencia de nitrógeno o de fósforo, y de estrés oxidativo como la presencia de H₂O₂ y Ni²⁺. Sin embargo, el mutante *atg8* no mostró ningún fenotipo de crecimiento en estas condiciones (Figura 35).

5.8.2. Inhibición de la enzima FAS en el mutante *atg8* de *Chlamydomonas*

5.8.2.1. Efecto del tratamiento con cerulenina en el cloroplasto de células del mutante *atg8*

Existen estudios previos en otros organismos como levaduras, plantas superiores o mamíferos donde se han caracterizado mutantes deficientes en autofagia. Concretamente, en plantas superiores, organismos evolutivamente más cercanos a *Chlamydomonas*, se han descrito varios mutantes relacionados con la autofagia. En la planta modelo *Arabidopsis* se han analizado mutantes de autofagia en los genes *atg7-1*, *atg5-1*, *atg4a4b-1*, *atg9-1*, *AtAPG9*, *atg10-1* o *AtATG12a12b* y se han llevado a cabo estudios mayoritariamente en condiciones de estrés por ausencia de nutrientes (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004b; Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008; Chung et al., 2010). En general, los estudios realizados en ausencia de nitrógeno o carbono demuestran que estos mutantes presentan un retraso en su crecimiento, así como senescencia temprana en las hojas basales y en los cotiledones y un desarrollo lento de las semillas (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004b; Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008; Chung et al., 2010). Existen estudios en otras plantas como el arroz, donde se ha estudiado el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos en mutantes relacionados con la autofagia en ausencia de nitrógeno (McLoughlin et al., 2018). En *Chlamydomonas* se ha demostrado que mutantes de autofagia presentan mayores niveles de TAGs mientras que las reservas de almidón disminuyen tras una ausencia prolongada (6 días) de nitrógeno (Kajikawa et al., 2019). En dicho estudio, se ha propuesto que los mutantes *atg3* y *atg8* de *Chlamydomonas* tienen un bloqueo en la movilización de TAGs debido a que los cuerpos lipídicos no pueden ser catabolizados (Kajikawa et al., 2019).

En esta tesis, se ha obtenido la estirpe mutante *atg8* mediante el método *CRISPR/Cas9* en la microalga *Chlamydomonas*. A diferencia de plantas superiores, *Chlamydomonas* presenta sus genes *ATG* en copia única, lo que supone una ventaja genética a la hora de estudiar mutantes de autofagia

afectados en estos genes. Otra de las principales diferencias entre plantas superiores y *Chlamydomonas* es que este organismo tiene un único cloroplasto y es en este orgánulo donde se localiza la enzima FAS y donde tiene lugar la síntesis de ácidos grasos. Por este motivo, el estudio de la inhibición de la enzima FAS por cerulenina y su efecto en el cloroplasto, así como la relación existente entre el metabolismo de lípidos y la autofagia, presenta ventajas en este organismo. Según nuestros resultados, el tratamiento de la estirpe silvestre con cerulenina provoca un daño estructural en el cloroplasto, inhibe la fotosíntesis, aumenta los niveles de ROS y activa la expresión de genes relacionados con la autofagia y el estrés en el cloroplasto (Figura 50). Pero, ¿qué ocurre en la estirpe *atg8* carente de una de las proteínas centrales en la ruta de la autofagia?

Para responder a esta pregunta, se llevó a cabo un estudio de la respuesta de la estirpe *atg8* a distintas concentraciones de cerulenina (Figura 38). Como resultado, se encontró que la estirpe mutante era hipersensible a una concentración sub-letal de cerulenina (5 μ M), indicando que la proteína ATG8 es necesaria para la respuesta de la célula al estrés que provoca esta droga. Además, se realizó un estudio funcional y estructural del cloroplasto de células mutantes *atg8* al efecto de la cerulenina. Nuestros resultados revelaron que la estirpe mutante presenta menor eficiencia fotosintética que la estirpe WT en respuesta a cerulenina (Figura 40). Durante el tratamiento con cerulenina, en la estirpe mutante se acumularon proteínas de respuesta a estrés y chaperonas del cloroplasto. La proteína VIPP2, una proteína asociada con la respuesta a estrés térmico y estrés por alta luz, aumentó en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina (Nordhues et al., 2012; Rochaix and Ramundo, 2017). Por otra parte, se detectó la acumulación de proteínas de la maquinaria fotosintética en el cloroplasto de células de la estirpe mutante tratadas con cerulenina. Estos resultados relacionan el desajuste en los niveles de proteínas encargadas de llevar a cabo la fotosíntesis con la disminución de la eficiencia fotosintética presente en células de la estirpe *atg8* tratada con cerulenina. Entre estas proteínas se encuentran subunidades esenciales de ambos fotosistemas, así como subunidades de la Rubisco. Igualmente, cabe destacar que existen otras rutas y mecanismos degradativos independientes de ATG8 que pueden reciclar estas proteínas dañadas.

Por otra parte, se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión para estudiar la estructura del cloroplasto. Nuestros resultados demostraron que la estructura del cloroplasto presenta diferencias entre células tratadas y sin tratar, apoyando los datos anteriormente discutidos. Las diferencias detectadas en la arquitectura del cloroplasto en células de la estirpe *atg8* tratadas con cerulenina recuerdan el efecto observado en células silvestres. En ambas estirpes existe un aumento en el número de apilamientos en los tilacoides (Du et al., 2018), así como un aumento en el número de membranas tilacoidales por apilamiento. Este dato, unido a una disminución en la superficie del cloroplasto respecto a la superficie total de la célula en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina, demuestra que existe un daño específico en el cloroplasto mayor que el observado en la

estirpe WT (Figura 43). Por tanto, podemos concluir que el efecto de la cerulenina es más pronunciado en el cloroplasto de la estirpe mutante *atg8* debido a la ausencia de autofagia en dicho mutante, lo que impide el correcto mantenimiento de la homeostasis celular.

5.8.2.2. La inhibición en la enzima FAS en el mutante *atg8* genera estrés oxidativo

El tratamiento con cerulenina se ha caracterizado ampliamente en la estirpe silvestre. La inhibición de la enzima FAS en esta estirpe provoca, entre otros efectos, un aumento en los niveles de ROS y de proteínas de respuesta a estrés (Figuras 16-21). Por otra parte, el tratamiento con concentraciones sub-letales de la droga cerulenina presenta efectos severos en la estirpe mutante *atg8*, mientras que la estirpe silvestre no se ve afectada. En primer lugar, se aprecia un retraso en el crecimiento en presencia de cerulenina tanto en medio TAP como en HSM. En segundo lugar, la viabilidad de las células de la estirpe mutante disminuyó al igual que se detectó un aumento en los niveles de ROS (Figura 41).

Igualmente, debido a que la estirpe *atg8* carece de la proteína ATG8 (Figura 39) no pudimos monitorizar la autofagia utilizando los métodos ya estudiados como la lipidación de ATG8 o su localización celular (Pérez-Pérez et al., 2010, 2017; Mizushima et al., 2011). A pesar de descartar estos métodos para monitorizar la autofagia, la estirpe *atg8* presenta una acumulación de RPS6 y RPL37, proteínas ribosomales que se localizan en el citosol y que se degradan vía autofagia (Couso et al., 2018), lo que indica que el flujo autofágico está reducido en el mutante *atg8*.

5.8.2.3. Estudio transcriptómico del mutante *atg8* tratado con cerulenina

Mediante el análisis global del transcriptoma de las estirpes WT y *atg8* en presencia de concentraciones sub-letales de la droga cerulenina en *Chlamydomonas*, se detectaron algunos de los genes relacionados con la respuesta a estrés en el cloroplasto mencionados durante esta tesis (Figura 44). Entre ellos, destacan genes que codifican proteínas de respuesta a estrés térmico como *HSP22E*, *DEG11*, *VIPP2* y *CLPB3*. Estas chaperonas cloroplastídicas ejercen un papel importante en el estrés generado por la acumulación de proteínas mal plegadas, así como en la protección y reparación del PSII cuando las células están expuestas a altas intensidades de luz, estrés oxidativo y limitación de nutrientes (Moseley et al., 2006; Fischer et al., 2007; Schroda and Vallon, 2009; Ramundo et al., 2014; Zhang et al., 2016; Rütgers et al., 2017). De esta forma, podemos relacionar la inducción de estos genes con una respuesta a estrés específica en el cloroplasto. De acuerdo con nuestros resultados, estos genes aumentan su expresión en células de *Chlamydomonas* tratadas

con la droga cerulenina en ambas estirpes, aunque dicho aumento fue mayor en la estirpe mutante (Figura 44).

Igualmente, los transcritos que codifican proteínas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo también aumentaron su expresión en ambas estirpes tratadas con 5 μ M de cerulenina. Entre este grupo de genes se encuentran *GSTS1*, *GPX5*, *APX1* y *GRX1*, que juegan un papel importante en la detoxificación y eliminación de ROS (Fischer et al., 2007, 2012; Ledford et al., 2007). Además, nuestros resultados indican que la inducción de estos genes es superior en la estirpe *atg8*, lo que apoya la hipersensibilidad de dicho mutante a la cerulenina. Por último, se ha detectado un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados con la autofagia en la estirpe *atg8*, entre ellos *ATG3*, *ATG13*, *ATG14* y *ATG17*, sugiriendo que su expresión responde de manera compensatoria por la pérdida del gen *ATG8* en el mutante. Todos estos resultados, comparados de forma general con el análisis transcriptómico realizado en la estirpe silvestre tratada con 10 μ M de cerulenina, demuestran que la estirpe *atg8* tratada con concentraciones sub-letales de cerulenina (5 μ M) muestra una respuesta a estrés específico en el cloroplasto. Esta respuesta implica un aumento en los genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, un aumento en la expresión de genes relacionados con el proteasoma y un desajuste en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la autofagia, sugiriendo que la pérdida de *ATG8* provoca un problema en el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de inhibición de la enzima FAS.

Finalmente, el análisis transcriptómico de ambas estirpes tratadas con 5 μ M de cerulenina demostró que existen un gran número de transcritos cuya función es aún desconocida que presentan una respuesta muy sustancial al tratamiento con cerulenina (Figura 44). La expresión diferencial de estos genes, superior en la estirpe *atg8*, sugiere que podrían estar involucrados en mecanismos de respuesta a estrés en *Chlamydomonas* aún desconocidos.

5.8.2.4. Estudio proteómico del mutante *atg8* tratado con cerulenina

Para profundizar en el efecto global que produce la inhibición de la enzima FAS sobre la estirpe mutante *atg8* en *Chlamydomonas*, realizamos un estudio proteómico cuantitativo de las estirpes WT y *atg8* tratadas con una concentración sub-letal (5 μ M) de cerulenina. Para ello, se identificaron proteínas mediante espectrometría de masas y se agruparon en distintas categorías funcionales para analizar los procesos biológicos en los que participan dichas proteínas.

Nuestros resultados han demostrado que entre las proteínas cuya abundancia aumentó significativamente en el mutante *atg8* se incluyen aquellas agrupadas en la categoría de respuesta a estrés en el cloroplasto, como HSP22E, HSP22F, HSP70B, CLPB3, DEG1C y VIPP1. Las proteínas

relacionadas con el proteasoma y la degradación de proteínas FTSH1, FAP124, EIF6, UBQ1, UBQ2, SIR1, SIR4, ASP1 y PREP1 también aumentaron más su abundancia en células mutantes *atg8* tratadas con cerulenina. Además, la abundancia de proteínas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo también fue superior en la estirpe *atg8*. Dentro de esta categoría se incluyen las proteínas GSTS1, GST2, GPX5, FSD1 y APX1. Todos estos datos concuerdan con los observados a lo largo de la tesis, demostrando que el tratamiento con cerulenina produce un daño importante en el cloroplasto además de una acumulación de ROS.

Existen trabajos previos en otros organismos fotosintéticos donde se han analizado mutantes deficientes en autofagia mediante estudios proteómicos. En *Arabidopsis*, se han caracterizado varios mutantes relacionados con este proceso degradativo en ausencia de nutrientes. Concretamente, el mutante *atg5* de *Arabidopsis* se ha caracterizado mediante proteómica cuantitativa. Este mutante presentó una disminución en la abundancia de proteínas cloroplastídicas y bajo contenido en galactolípidos en condiciones limitantes de nitrógeno y azufre, sugiriendo que la autofagia está relacionada con el mantenimiento del cloroplasto (Havé et al., 2019). En otras plantas como el arroz, se ha analizado el proteoma de los mutantes deficientes de autofagia *atg12-1* y *atg12-2* en ausencia de nitrógeno, cuyos resultados demostraron que el metabolismo de lípidos y de aminoácidos presentaban cambios drásticos (McLoughlin et al., 2018). Este resultado sugiere que la autofagia tiene un papel importante en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno en plantas.

Estos estudios apoyan los resultados obtenidos en el análisis proteómico cuantitativo del mutante *atg8* de *Chlamydomonas*. En primer lugar, existe un mayor enriquecimiento en las categorías relacionadas con la respuesta a estrés, así como los procesos catabólicos relacionados con la degradación de proteínas y el proteasoma, indicando que el mutante de autofagia presenta problemas para mantener la homeostasis celular en distintas condiciones de estrés. Por otra parte, el análisis proteómico demostró que los términos GO relacionados con el metabolismo del acetato, el metabolismo de aminoácidos, la ruta oxidativa de las pentosas fosfato o el metabolismo de los ácidos grasos, son los procesos biológicos que muestran cambios más significativos en el mutante *atg8* (Figura 49). Estos resultados indican que el mutante presenta un desajuste metabólico general relacionado con la distribución y movilización de carbohidratos de forma similar a lo descrito en los mutantes *atg12-1* y *atg12-2* en arroz (McLoughlin et al., 2018). Igualmente, la desregulación observada en las proteínas fotosintéticas y el desajuste en el metabolismo de lípidos presente en la estirpe mutante *atg8* son datos consistentes con los resultados descritos en el mutante *atg5* de *Arabidopsis* (Havé et al., 2019).

Por otra parte, se ha descrito una disminución en la abundancia de proteínas cloroplastídicas en mutantes deficientes en autofagia. Por ejemplo, los mutantes *atg3* y *atg8* de *Chlamydomonas* presentan niveles reducidos de RbcL, D1 (PsbA) y PsbO del PSII en ausencia de nitrógeno (Kajikawa

et al., 2019), mientras que en las hojas de los mutantes *atg5-1*, *atg7-1* y *atg10-1* de *Arabidopsis* la proteína RbcL fue degradada más rápidamente comparado con la estirpe WT en condiciones de oscuridad o en ausencia de carbono (Doelling et al., 2002; Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008). Los resultados obtenidos en esta tesis están en consonancia con estos estudios ya que la estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas* muestra una disminución en la familia de proteínas LHC relacionada con los complejos antena del PSII (Figura 47 y Figura 49). Además, entre los procesos biológicos que más disminuyeron en el análisis de los términos GO se encuentran la fotosíntesis y la síntesis de clorofila. Finalmente, las proteasas del cloroplasto FTSH1 y CLPB3, que aumentan significativamente su abundancia en la estirpe *atg8* tratada con cerulenina (Figura 47), podrían participar en la degradación de proteínas relacionadas con la fotosíntesis debido al daño generado en el cloroplasto por la inhibición de la enzima FAS (Heredia-Martínez et al., 2018). De hecho, la proteína ATG8 aumentó fuertemente en un mutante de proteasa del cloroplasto ClpP (Ramundo et al., 2014), sugiriendo que la autofagia y la proteólisis del cloroplasto en *Chlamydomonas* están relacionadas.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- I. La inhibición de la enzima ácido graso sintasa (FAS) por cerulenina modifica el contenido de lípidos polares y disminuye los niveles de MGDG, provocando el apilamiento de las membranas tilacoidales y una disminución en la eficiencia fotosintética en *Chlamydomonas*.
- II. El daño estructural y funcional causado en el cloroplasto por el tratamiento con cerulenina activa mecanismos de respuesta a estrés que incluyen la inducción de procesos catabólicos como la autofagia.
- III. El efecto de la cerulenina en la estructura del cloroplasto y la activación de la autofagia en *Chlamydomonas* no es estrictamente dependiente de la luz.
- IV. El método de edición génica *CRISPR/Cas9* puede ser aplicado en *Chlamydomonas* y nos ha permitido generar la estirpe mutante *atg8* deficiente en el proceso de autofagia al carecer de la proteína ATG8.
- V. La estirpe mutante *atg8* de *Chlamydomonas* presenta un defecto en su crecimiento al entrar en fase estacionaria tardía y es hipersensible al tratamiento con cerulenina.
- VI. El tratamiento de células de *Chlamydomonas* con concentraciones sub-letales de cerulenina (5 μ M) aumenta los niveles de transcritos y de proteínas relacionados con el estrés en el cloroplasto y la detoxificación de ROS, que son más acentuados en el mutante *atg8*.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Anderson, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G. U. Y., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., ... Taylor, M. A. X. F. J. R.** (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., and Stork, B.** (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2–11. <https://doi.org/10.1128/MCB.06159-11>
- Alonso, A. P., Goffman, F. D., Ohlrogge, J. B., and Shachar-Hill, Y.** (2007). Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *The Plant Journal*, 52(2), 296–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03235.x>
- Alric, J., Lavergne, J., and Rappaport, F.** (2010). Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (l) aerobic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(1), 44–51.
- Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M. E., Crespo, J. L., Romero, L. C., and Gotor, C.** (2012). Cysteine-Generated Sulfide in the Cytosol Negatively Regulates Autophagy and Modulates the Transcriptional Profile in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(11), 4621–4634. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105403>
- Anderson, G. H., Veit, B., and Hanson, M. R.** (2005). The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-12>
- Apel, K., and Hirt, H.** (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aro, E.-M., Virgin, I., and Andersson, B.** (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143(2), 113–134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2)
- Aro, E.-M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N., and Rintamäki, E.** (2005). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 347–356. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri041>
- Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., and Masclaux-Daubresse, C.** (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3799–3811. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru039>
- Avin-Wittenberg, T., Baluška, F., Bozhkov, P. v, Elander, P. H., Fernie, A. R., Galili, G., Hassan, A., Hofius, D., Isono, E., le Bars, R., Masclaux-Daubresse, C., Minina, E. A., Peled-Zehavi, H., Coll, N. S., Sandalio, L. M., Satiat-Jeunemaitre, B., Sirko, A., Testillano, P. S., and Batoko, H.** (2018). Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *Journal of Experimental Botany*, 69(6), 1335–1353. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery069>
- Avin-Wittenberg, T.** (2019). Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant, Cell and Environment*, 42(3), 1045–1053. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pce.13404>

- Badin, E. J., and Calvin, M.** (1950). The Path of Carbon in Photosynthesis. IX. Photosynthesis, Photoreduction and the Hydrogen—Oxygen—Carbon Dioxide Dark Reaction¹. *Journal of the American Chemical Society*, 72(11), 5266–5270.
- Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J.-S., Jin, E., and Bae, S.** (2016). DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Scientific Reports*, 6(1), 30620. <https://doi.org/10.1038/srep30620>
- Bao, Y., Song, W.-M., Wang, P., Yu, X., Li, B., Jiang, C., Shiu, S.-H., Zhang, H., and Bassham, D. C.** (2020). COST1 regulates autophagy to control plant drought tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(13), 7482–7493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918539117>
- Baroli, I., Gutman, B. L., Ledford, H. K., Shin, J. W., Chin, B. L., Havaux, M., and Niyogi, K. K.** (2004). Photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6337–6344.
- Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., and Yoshimoto, K.** (2006). Autophagy in Development and Stress Responses of Plants. *Autophagy*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.4161/auto.2092>
- Bennoun, P.** (2005). The present model for chlororespiration. *Discoveries in Photosynthesis*, 905–909.
- Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Tourasse, N., Hom, E. F. Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., King, S., Witman, G. B., Stanke, M., Harris, E. H., Goodstein, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Vallon, O., Merchant, S. S., and Prochnik, S.** (2014). The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science*, 19(10), 672–680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.008>
- Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Pérez-Pérez, M. E., Schmollinger, S., Fitz-Gibbon, S., Lemaire, S. D., and Merchant, S. S.** (2015). Genome-wide analysis on *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the impact of hydrogen peroxide on protein stress responses and overlap with other stress transcriptomes. *The Plant Journal*, 84(5), 974–988. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13053>
- Blaby-Haas, C. E., and Merchant, S. S.** (2019). Comparative and Functional Algal Genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 605–638. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095841>
- Boer, P. H., Bonen, L., Lee, R. W., and Gray, M. W.** (1985). Genes for respiratory chain proteins and ribosomal RNAs are present on a 16-kilobase-pair DNA species from *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3340. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3340>
- Botté, C. Y., Deligny, M., Rocchia, A., Bonneau, A.-L., Saïdani, N., Hardré, H., Aci, S., Yamaro-Botté, Y., Jouhet, J., Dubots, E., Loizeau, K., Bastien, O., Bréhélin, L., Joyard, J., Cintrat, J.-C., Falconet, D., Block, M. A., Rousseau, B., Lopez, R., and Maréchal, E.** (2011). Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 7(11), 834–842. <https://doi.org/10.1038/nchembio.658>
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., BShark, K. B., and Sanford, J. C.** (1988). Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. *Science*, 240(4858), 1534–1538. <https://doi.org/10.1126/science.2897716>

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Buchheim, M. A., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F., Merget, B., and Wolf, M.** (2011). Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLOS ONE*, 6(2), e16931-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016931>
- Burlacot, A., Peltier, G., and Li-Beisson, Y.** (2019). Subcellular Energetics and Carbon Storage in *Chlamydomonas*. *Cells*, 8(10), 1154. <https://doi.org/10.3390/cells8101154>
- Cao, M., Meng, D., Wang, L., Bei, S., Snell, W. J., and Pan, J.** (2013). Activation loop phosphorylation of a protein kinase is a molecular marker of organelle size that dynamically reports flagellar length. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12337–12342.
- Cardol, P., Alric, J., Girard-Bascou, J., Franck, F., Wollman, F.-A., and Finazzi, G.** (2009). Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15979–15984.
- Catalanotti, C., Dubini, A., Subramanian, V., Yang, W., Magneschi, L., Mus, F., Seibert, M., Posewitz, M. C., and Grossman, A. R.** (2012). Altered fermentative metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking pyruvate formate lyase and both pyruvate formate lyase and alcohol dehydrogenase. *The Plant Cell*, 24(2), 692–707.
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., and Pogson, B. J.** (2016). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>
- Chang, H.-L., Tseng, Y.-L., Ho, K.-L., Shie, S.-C., Wu, P.-S., Hsu, Y.-T., and Lee, T.-M.** (2014). Reactive oxygen species modulate the differential expression of methionine sulfoxide reductase genes in *Chlamydomonas reinhardtii* under high light illumination. *Physiologia Plantarum*, 150(4), 550–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.12102>
- Chen, Y., and Klionsky, D. J.** (2011). The regulation of autophagy – unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 124(2), 161–170. <https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
- Chung, T., Suttangkakul, A., and Vierstra, R. D.** (2009). The ATG Autophagic Conjugation System in Maize: ATG Transcripts and Abundance of the ATG8-Lipid Adduct Are Regulated by Development and Nutrient Availability . *Plant Physiology*, 149(1), 220–234. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126714>
- Chung, T., Phillips, A. R., and Vierstra, R. D.** (2010). ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *The Plant Journal*, 62(3), 483–493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04166.x>
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M., and Peltier, G.** (2000). Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17256–17262.
- Couso, I., Pérez-Pérez, M. E., Martínez-Force, E., Kim, H.-S., He, Y., Umen, J. G., and Crespo, J. L.** (2018). Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 69(6), 1355–1367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx372>

- Couso, I., Pérez-Pérez, M. E., Ford, M. M., Martínez-Force, E., Hicks, L. M., Umen, J. G., and Crespo, J. L.** (2020). Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 32(1), 69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00179>
- Crespo, J. L., and Hall, M. N.** (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 66(4), 579–591. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.579-591.2002>
- Crespo, J. L., Díaz-Troya, S., and Florencio, F. J.** (2005). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling by Rapamycin in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 139(4), 1736–1749. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070847>
- Cross, F. R., and Umen, J. G.** (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *The Plant Journal*, 82(3), 370–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12795>
- Dang, K.-V., Plet, J., Tolleter, D., Jokel, M., Cuiné, S., Carrier, P., Auroy, P., Richaud, P., Johnson, X., and Alric, J.** (2014). Combined increases in mitochondrial cooperation and oxygen photoreduction compensate for deficiency in cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 26(7), 3036–3050.
- Davey, M. P., Horst, I., Duan, G.-H., Tomsett, E. v, Litvinenko, A. C. P., Howe, C. J., and Smith, A. G.** (2014). Triacylglyceride Production and Autophagous Responses in *Chlamydomonas reinhardtii* Depend on Resource Allocation and Carbon Source. *Eukaryotic Cell*, 13(3), 392–400. <https://doi.org/10.1128/EC.00178-13>
- Dayer, R., Fischer, B. B., Eggen, R. I. L., and Lemaire, S. D.** (2008). The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179(1), 41–57.
- Díaz, S., Francisco, P. de, Olsson, S., Aguilera, Á., González-Toril, E., and Martín-González, A.** (2020). Toxicity, Physiological, and Ultrastructural Effects of Arsenic and Cadmium on the Extremophilic Microalga *Chlamydomonas acidophila*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1650. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051650>
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., and Crespo, J. L.** (2008a). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, 4(7), 851–865. <https://doi.org/10.4161/auto.6555>
- Díaz-Troya, S., Florencio, F. J., and Crespo, J. L.** (2008b). Target of Rapamycin and LST8 Proteins Associate with Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 212–222. <https://doi.org/10.1128/EC.00361-07>
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Pérez-Martín, M., Moes, S., Jenó, P., Florencio, F. J., and Crespo, J. L.** (2011). Inhibition of Protein Synthesis by TOR Inactivation Revealed a Conserved Regulatory Mechanism of the BiP Chaperone in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 157(2), 730–741. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179861>
- Dietz, K.-J., Turkan, I., and Krieger-Liszky, A.** (2016). Redox-and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiology*, 171(3), 1541–1550.
- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R., and Vierstra, R. D.** (2002). The APG8/12-activating Enzyme APG7 Is Required for Proper Nutrient Recycling and Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33105–33114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204630200>

- Dogra, V., and Kim, C.** (2019). Chloroplast protein homeostasis is coupled with retrograde signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 14(11), 1656037. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1656037>
- Dolch, L.-J., Rak, C., Perin, G., Tourcier, G., Broughton, R., Leterrier, M., Morosinotto, T., Tellier, F., Faure, J.-D., Falconet, D., Jouhet, J., Sayanova, O., Beaudoin, F., and Maréchal, E.** (2017). A Palmitic Acid Elongase Affects Eicosapentaenoic Acid and Plastidial Monogalactosyldiacylglycerol Levels in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology*, 173(1), 742–759. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01420>
- Dörmann, P., and Benning, C.** (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science*, 7(3), 112–118. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02216-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02216-6)
- Doudna, J. A., and Charpentier, E.** (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Du, Z.-Y., Lucker, B. F., Zienkiewicz, K., Miller, T. E., Zienkiewicz, A., Sears, B. B., Kramer, D. M., and Benning, C.** (2018). Galactoglycerolipid Lipase PGD1 Is Involved in Thylakoid Membrane Remodeling in Response to Adverse Environmental Conditions in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 30(2), 447–465. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00446>
- Duby, F., and Matagne, R. F.** (1999). Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. *The Plant Cell*, 11(1), 115–125.
- Dutcher, S. K.** (1995). Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Trends in Genetics*, 11(10), 398–404.
- Ehara, T., Osafune, T., and Hase, E.** (1995). Behavior of mitochondria in synchronized cells of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Cell Science*, 499–507.
- Eitzinger, N., Wagner, V., Weisheit, W., Geimer, S., Boness, D., Kreimer, G., and Mittag, M.** (2015). Proteomic Analysis of a Fraction with Intact Eyespots of *Chlamydomonas reinhardtii* and Assignment of Protein Methylation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1085. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.01085>
- Engel, B. D., Schaffer, M., Kuhn Cuellar, L., Villa, E., Plitzko, J. M., and Baumeister, W.** (2015). Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *eLife*, 4, e04889. <https://doi.org/10.7554/eLife.04889>
- Fabry, S., Köhler, A., and Coleman, A. W.** (1999). Intraspecies Analysis: Comparison of ITS Sequence Data and Gene Intron Sequence Data with Breeding Data for a Worldwide Collection of *Gonium pectorale*. *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), 94–101. <https://doi.org/10.1007/PL00006449>
- Fan, J., Andre, C., and Xu, C.** (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 585(12), 1985–1991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S. S., Pellegrini, M., Ladunga, I., Liu, P., and Spalding, M. H.** (2012). Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO₂-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1. *The Plant Cell*, 24(5), 1876–1893.
- Farmer, L. M., Rinaldi, M. A., Young, P. G., Danan, C. H., Burkhart, S. E., and Bartel, B.** (2013). Disrupting Autophagy Restores Peroxisome Function to an *Arabidopsis* *lon2* Mutant and

Reveals a Role for the LON2 Protease in Peroxisomal Matrix Protein Degradation . *The Plant Cell*, 25(10), 4085–4100. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113407>

Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24(1), 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson James T, and Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281(5374), 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>

Fischer, B. B., Dayer, R., Wiesendanger, M., and Eggen, R. I. L. (2007). Independent regulation of the GPXH gene expression by primary and secondary effects of high light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*, 130(2), 195–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00901.x>

Fischer, B. B., Ledford, H. K., Wakao, S., Huang, S. G., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S. S., Koller, A., Eggen, R. I. L., and Niyogi, K. K. (2012). SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), E1302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116843109>

Flowers, J. M., Hazzouri, K. M., Pham, G. M., Rosas, U., Bahmani, T., Khraiweh, B., Nelson, D. R., Jijakli, K., Abdrabu, R., Harris, E. H., Lefebvre, P. A., Hom, E. F. Y., Salehi-Ashtiani, K., and Purugganan, M. D. (2015). Whole-Genome Resequencing Reveals Extensive Natural Variation in the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* . *The Plant Cell*, 27(9), 2353–2369. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00492>

Fracchiolla, D., Zens, B., and Martens, S. (2017). Chapter 22- In Vitro Reconstitution of Atg8 Conjugation and Deconjugation. In L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, and G. Kroemer (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 587, pp. 377–390). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.066>

Fujioka, Y., Noda, N. N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2010). Dimeric Coiled-coil Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and Its Functional Significance in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 285(2), 1508–1515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053520>

Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., and Merchant, S. S. (2015). *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *The Plant Cell*, 27(9), 2335–2352. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00508>

Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Strenkert, D., Purvine, S. O., Pellegrini, M., and Merchant, S. S. (2018). High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *The Plant Journal*, 93(3), 545–565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13788>

Gans, P., and Rebeille, F. (1990). Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1015(1), 150–155.

Gfeller, R. P., and Gibbs, M. (1984). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiology*, 75(1), 212–218.

- Goodenough, U. W., and Levine, R. P.** (1969). Chloroplast Ultrastructure in Mutant Strains of *Chlamydomonas reinhardi* Lacking Components of the Photosynthetic Apparatus 1. *Plant Physiology*, 44(7), 990–1000. <https://doi.org/10.1104/pp.44.7.990>
- Goodenough, U. W., and Heuser, J. E.** (1985). The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *Journal of Cell Biology*, 101(4), 1550–1568. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1550>
- Goodenough, U., Blaby, I., Casero, D., Gallaher, S. D., Goodson, C., Johnson, S., Lee, J.-H., Merchant, S. S., Pellegrini, M., Roth, R., Rusch, J., Singh, M., Umen, J. G., Weiss, T. L., and Wulan, T.** (2014). The Path to Triacylglyceride Obesity in the *sta6* Strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13(5), 591–613. <https://doi.org/10.1128/EC.00013-14>
- Gounaris, K., and Barber, J.** (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(10), 378–381. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90366-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90366-3)
- Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., and Hegemann, P.** (2017). Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *The Plant Cell*, 29(10), 2498–2518. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00659>
- Grossman, A. R., Lohr, M., and Im, C. S.** (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the Landscape of Pigments. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 119–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092328>
- Grossman, A. R., Karpowicz, S. J., Heinnickel, M., Dewez, D., Hamel, B., Dent, R., Niyogi, K. K., Johnson, X., Alric, J., Wollman, F.-A., Li, H., and Merchant, S. S.** (2010). Phylogenomic analysis of the *Chlamydomonas* genome unmasks proteins potentially involved in photosynthetic function and regulation. *Photosynthesis Research*, 106(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9555-7>
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., and Ohsumi, Y.** (2002). Leaf Senescence and Starvation-Induced Chlorosis Are Accelerated by the Disruption of an *Arabidopsis* Autophagy Gene. *Plant Physiology*, 129(3), 1181–1193. <https://doi.org/10.1104/pp.011024>
- Harris, E. H., Burkhart, B. D., Gillham, N. W., and Boynton, J. E.** (1989). Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics*, 123(2), 281–292. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.2.281>
- Harris, E. H.** (2001). CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris, E. H., Stern, D. B., and Witman, G. B.** (2008). *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second Edition). Academic Press.
- Havé, M., Luo, J., Tellier, F., Balliau, T., Cueff, G., Chardon, F., Zivy, M., Rajjou, L., Cacas, J.-L., and Masclaux-Daubresse, C.** (2019). Proteomic and lipidomic analyses of the *Arabidopsis atg5* autophagy mutant reveal major changes in endoplasmic reticulum and peroxisome metabolisms and in lipid composition. *New Phytologist*, 223(3), 1461–1477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.15913>
- He, C., and Klionsky, D. J.** (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>

- Heredia-Martínez, L. G., Andrés-Garrido, A., Martínez-Force, E., Pérez-Pérez, M. E., and Crespo, J. L.** (2018). Chloroplast Damage Induced by the Inhibition of Fatty Acid Synthesis Triggers Autophagy in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 178(3), 1112–1129. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00630>
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., and Mizushima, N.** (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>
- Houille-Vernes, L., Rappaport, F., Wollman, F.-A., Alric, J., and Johnson, X.** (2011). Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20820–20825.
- Huss, M., and Wiczorek, H.** (2009). Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *Journal of Experimental Biology*, 212(3), 341–346. <https://doi.org/10.1242/jeb.024067>
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488–492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- Inoue, Y., and Klionsky, D. J.** (2010). Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(7), 664–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcd.2010.03.009>
- Isakson, P., Holland, P., and Simonsen, A.** (2013). The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 12–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.66>
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., and Mae, T.** (2008). Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an ATG Gene-Dependent Autophagic Process. *Plant Physiology*, 148(1), 142–155. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122770>
- Izumi, M., Wada, S., Makino, A., and Ishida, H.** (2010). The Autophagic Degradation of Chloroplasts via Rubisco-Containing Bodies Is Specifically Linked to Leaf Carbon Status But Not Nitrogen Status in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(3), 1196–1209. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158519>
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., and Hidema, J.** (2017). Entire Photodamaged Chloroplasts Are Transported to the Central Vacuole by Autophagy. *The Plant Cell*, 29(2), 377–394. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00637>
- Jacomin, A.-C., Samavedam, S., Promponas, V., and Nezis, I. P.** (2016). iLIR database: A web resource for LIR motif-containing proteins in eukaryotes. *Autophagy*, 12(10), 1945–1953. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1207016>
- Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C., and Chory, J.** (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8175. <https://doi.org/10.1073/pnas.100132197>
- Jinkerson, R. E., and Jonikas, M. C.** (2015). Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *The Plant Journal*, 82(3), 393–412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12801>

- Johansson, P., Wiltschi, B., Kumari, P., Kessler, B., Vorrhein, C., Vonck, J., Oesterheld, D., and Gringer, M.** (2008). Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12803. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805827105>
- Joo, J. H., Wang, S., Chen, J. G., Jones, A. M., and Fedoroff, N. V.** (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *The Plant Cell*, 17(3), 957–970.
- Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., and Kim, D.-H.** (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1287–1295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Kajikawa, M., Yamauchi, M., Shinkawa, H., Tanaka, M., Hatano, K., Nishimura, Y., Kato, M., and Fukuzawa, H.** (2019). Isolation and Characterization of Chlamydomonas Autophagy-Related Mutants in Nutrient-Deficient Conditions. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 126–138. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy193>
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.** (2000). Tor-Mediated Induction of Autophagy via an Apg1 Protein Kinase Complex. *Journal of Cell Biology*, 150(6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D. J.** (2009). Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Developmental Cell*, 17(1), 98–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.014>
- Kato, Y., Sun, X., Zhang, L., and Sakamoto, W.** (2012). Cooperative D1 Degradation in the Photosystem II Repair Mediated by Chloroplastic Proteases in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159(4), 1428–1439. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199042>
- Kim, J., Lee, H., Lee, H. N., Kim, S.-H., Shin, K. D., and Chung, T.** (2013). Autophagy-Related Proteins Are Required for Degradation of Peroxisomes in Arabidopsis Hypocotyls during Seedling Growth. *The Plant Cell*, 25(12), 4956–4966. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117960>
- Krieger-Liszak, A.** (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 337–346. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh237>
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2000). The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Journal of Cell Biology*, 151(2), 263–276. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.263>
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N.** (2004). Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39068–39074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406960200>
- Klionsky, D. J., and Schulman, B. A.** (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(4), 336–345. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2787>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K.** (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, 17(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>

- Klöck, G., and Kreuzberg, K.** (1991). Compartmented metabolite pools in protoplasts from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: changes after transition from aerobiosis to anaerobiosis in the dark. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1073(2), 410–415.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H.** (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17216. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704680104>
- Komenda, J., Sobotka, R., and Nixon, P. J.** (2012). Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 245–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.017>
- Koo, A. J. K., Fulda, M., Browse, J., and Ohlrogge, J. B.** (2005). Identification of a plastid acyl-acyl carrier protein synthetase in *Arabidopsis* and its role in the activation and elongation of exogenous fatty acids. *The Plant Journal*, 44(4), 620–632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02553.x>
- Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V., and Singh, D. P.** (2013). Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. *Bioresource Technology*, 144, 499–503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.116>
- Kromer, S.** (1995). Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 45–70.
- Laskay, G., Farkas, T., and Lehoczki, E.** (1985). Cerulenin-induced Changes in Lipid and Fatty Acid Content of Chloroplasts in Detached Greening Barley Leaves. *Journal of Plant Physiology*, 118(3), 267–275. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80228-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80228-5)
- Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., Romero, L. C., and Gotor, C.** (2016). Negative Regulation of Autophagy by Sulfide Is Independent of Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology*, 171(2), 1378–1391. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00110>
- Laureano-Marín, A. M., Aroca, Á., Pérez-Pérez, M. E., Yruela, I., Jurado-Flores, A., Moreno, I., Crespo, J. L., Romero, L. C., and Gotor, C.** (2020). Abscisic Acid-Triggered Persulfidation of the Cys Protease ATG4 Mediates Regulation of Autophagy by Sulfide. *The Plant Cell*, 32(12), 3902–3920. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00766>
- Ledford, H. L., Chin, B. L., and Niyogi, K. K.** (2007). Acclimation to Singlet Oxygen Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6(6), 919–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00207-06>
- Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J.** (2011). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 441(2), 523–540. <https://doi.org/10.1042/BJ20111451>
- Leister, D.** (2019a). Genetic Engineering, Synthetic Biology and the Light Reactions of Photosynthesis. *Plant Physiology*, 179(3), 778–793. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00360>
- Leister, D.** (2019b). Piecing the puzzle together: the central role of reactive oxygen species and redox hubs in chloroplast retrograde signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 30(9), 1206–1219.
- Lemasters, J. J.** (2005). Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research*, 8(1), 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>

- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., and Hu, Q.** (2010). Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 258–268.
- Li, F., and Vierstra, R. D.** (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, 17(9), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.006>
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., Kuo, M.-H., and Benning, C.** (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(11), 4670–4686.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., and Riekhof, W.** (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3), 504–522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12787>
- Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E., and Harwood, J. L.** (2019). The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 74, 31–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>
- Lin, H., and Goodenough, U. W.** (2007). Gametogenesis in the *Chlamydomonas reinhardtii* minus Mating Type Is Controlled by Two Genes, MID and MTD1. *Genetics*, 176(2), 913–925. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066167>
- Ling, Q., WHuang, W., Baldwin, A., and Jarvis, P.** (2012). Chloroplast Biogenesis Is Regulated by Direct Action of the Ubiquitin-Proteasome System. *Science*, 338(6107), 655–659. <https://doi.org/10.1126/science.1225053>
- Ling, Q., and Jarvis, P.** (2013). Dynamic regulation of endosymbiotic organelles by ubiquitination. *Trends in Cell Biology*, 23(8), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.008>
- Ling, Q., and Jarvis, P.** (2015). Functions of plastid protein import and the ubiquitin–proteasome system in plastid development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 939–948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.017>
- Liu, Y., and Bassham, D. C.** (2010). TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 5(7), e11883-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011883>
- Liu, Y., and Bassham, D. C.** (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 215–237. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105441>
- Liu, J., Sun, Z., Zhong, Y., Huang, J., Hu, Q., and Chen, F.** (2012). Stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from the oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*: cloning, characterization and transcriptional analysis. *Planta*, 236(6), 1665–1676. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1718-7>
- Liu, J., Han, D., Yoon, K., Hu, Q., and Li, Y.** (2016a). Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis. *The Plant Journal*, 86(1), 3–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13143>
- Liu, J., Mao, X., Zhou, W., and Guarnieri, M. T.** (2016b). Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 214, 319–327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.112>
- Llamas, E., Pulido, P., and Rodriguez-Concepcion, M.** (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein

response to restore protein homeostasis. *PLOS Genetics*, 13(9), e1007022-
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007022>

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N. (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell*, 10(3), 457–468. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6)

Lohr, M., Im, C.-S., and Grossman, A. R. (2005). Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 138(1), 490–515. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056069>

Luykx, P., Hoppenrath, M., and Robinson, D. G. (1997). Structure and behavior of contractile vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma*, 198(1), 73–84. <https://doi.org/10.1007/BF01282133>

Mackinder, L. C. M., Meyer, M. T., Mettler-Altmann, T., Chen, V. K., Mitchell, M. C., Caspari, O., Freeman Rosenzweig, E. S., Pallesen, L., Reeves, G., Itakura, A., Roth, R., Sommer, F., Geimer, S., Mühlhaus, T., Schroda, M., Goodenough, U., Stitt, M., Griffiths, H., and Jonikas, M. C. (2016). A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522866113>

Maiwald, D., Dietzmann, A., Jahns, P., Pesaresi, P., Joliot, P., Joliot, A., Levin, J. Z., Salamini, F., and Leister, D. (2003). Knock-Out of the Genes Coding for the Rieske Protein and the ATP-Synthase δ -Subunit of Arabidopsis. Effects on Photosynthesis, Thylakoid Protein Composition, and Nuclear Chloroplast Gene Expression. *Plant Physiology*, 133(1), 191–202. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024190>

Mallén-Ponce, M. J., Pérez-Pérez, M. E., and Crespo, J. L. (2022). Photosynthetic assimilation of CO₂ regulates TOR activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2115261119>

Marshall, R. S., and Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 173–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606>

Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., and Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 8–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.001>

Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., dePamphilis, C. W., Miller, W., Harris, E. H., and Stern, D. B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats. *The Plant Cell*, 14(11), 2659–2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.006155>

McLoughlin, F., Augustine, R. C., Marshall, R. S., Li, F., Kirkpatrick, L. D., Otegui, M. S., and Vierstra, R. D. (2018). Maize multi-omics reveal roles for autophagic recycling in proteome remodelling and lipid turnover. *Nature Plants*, 4(12), 1056–1070. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0299-2>

Meijer, W. H., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., and Kiel, J. A. K. W. (2007). ATG Genes Involved in Non-Selective Autophagy are Conserved from Yeast to Man, but the Selective Cvt and Pexophagy Pathways also Require Organism-Specific Genes. *Autophagy*, 3(2), 106–116. <https://doi.org/10.4161/auto.3595>

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(9), 6422.
<https://doi.org/10.1073/pnas.092141899>

- Merchant, S. S., Allen, M. D., Kropat, J., Moseley, J. L., Long, J. C., Tottey, S., and Terauchi, A. M.** (2006). Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 578–594.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L.-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. v, Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Grossman, A. R.** (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848), 245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Meyer, M., and Griffiths, H.** (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO₂-concentrating mechanisms: lessons for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(3), 769–786.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R., and Avin-Wittenberg, T.** (2016). Autophagy in Plants What's New on the Menu? *Trends in Plant Science*, 21(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.008>
- Minina, E. A., Moschou, P. N., Vetukuri, R. R., Sanchez-Vera, V., Cardoso, C., Liu, Q., Elander, P. H., Dalman, K., Beganovic, M., Lindberg Yilmaz, J., Marmon, S., Shabala, L., Suarez, M. F., Ljung, K., Novák, O., Shabala, S., Stymne, S., Hofius, D., and Bozhkov, P. v.** (2018). Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *Journal of Experimental Botany*, 69(6), 1415–1432. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery010>
- Mitchell, M. C., Metodieva, G., Metodiev, M. v, Griffiths, H., and Meyer, M. T.** (2017). Pyrenoid loss impairs carbon-concentrating mechanism induction and alters primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3891–3902. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx121>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and van Breusegem, F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B.** (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, 140(3), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y.** (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Moellering, E. R., and Benning, C.** (2011). Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends in Plant Science*, 16(2), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.004>
- Mojica, F. J. M., and Garrett, R. A.** (2013). Discovery and seminal developments in the CRISPR field. In *CRISPR-Cas Systems* (pp. 1–31). Springer.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621–628.
- Moseley, J. L., Chang, C.-W., and Grossman, A. R.** (2006). Genome-Based Approaches to Understanding Phosphorus Deprivation Responses and PSR1 Control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 5(1), 26–44. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.26-44.2006>

- Mugume, Y., Kazibwe, Z., and Bassham, D. C.** (2020). Target of Rapamycin in Control of Autophagy: Puppet Master and Signal Integrator. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8259. <https://doi.org/10.3390/ijms21218259>
- Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., Taneike, M., Misaka, T., Omiya, S., Shah, A. M., Yamamoto, A., Nishida, K., Ohsumi, Y., Okamoto, K., Sakata, Y., and Otsu, K.** (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature Communications*, 6(1), 7527. <https://doi.org/10.1038/ncomms8527>
- Muranaka, L. S., Rütgers, M., Bujaldon, S., Heublein, A., Geimer, S., Wollman, F.-A., and Schroda, M.** (2016). TEF30 Interacts with Photosystem II Monomers and Is Involved in the Repair of Photodamaged Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 170(2), 821–840. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01458>
- Murchie, E. H., and Niyogi, K. K.** (2011). Manipulation of Photoprotection to Improve Plant Photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 86–92. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168831>
- Nair, U., Yen, W.-L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., and Klionsky, D. J.** (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8(5), 780–793. <https://doi.org/10.4161/auto.19385>
- Nakamura, S., Hidema, J., Sakamoto, W., Ishida, H., and Izumi, M.** (2018). Selective Elimination of Membrane-Damaged Chloroplasts via Microautophagy. *Plant Physiology*, 177(3), 1007–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00444>
- Nakamura, S., Hagihara, S., and Izumi, M.** (2021). Mitophagy in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(8), 129916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129916>
- Nakatogawa, H., Ishii, J., Asai, E., and Ohsumi, Y.** (2012). Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8(2), 177–186. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18373>
- Nash, A. M., and Frankel, E. N.** (1986). Limited extraction of soybeans with hexane. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(2), 244–246.
- Nishimura, K., Kato, Y., and Sakamoto, W.** (2017). Essentials of Proteolytic Machineries in Chloroplasts. *Molecular Plant*, 10(1), 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.08.005>
- Niyogi, K. K., Björkman, O., and Grossman, A. R.** (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 14162. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14162>
- Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F.** (2008). Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*, 13(12), 1211–1218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x>
- Noordally, Z. B., and Millar, A. J.** (2015). Clocks in Algae. *Biochemistry*, 54(2), 171–183. <https://doi.org/10.1021/bi501089x>
- Nordhues, A., Schöttler, M. A., Unger, A.-K., Geimer, S., Schönfelder, S., Schmollinger, S., Rütgers, M., Finazzi, G., Soppa, B., Sommer, F., Mühlhaus, T., Roach, T., Krieger-Liszkay, A., Lokstein, H., Crespo, J. L., and Schroda, M.** (2012). Evidence for a Role of VIPP1 in the Structural Organization of the Photosynthetic Apparatus in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 24(2), 637–659. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092692>

- Nukarinen, E., Nägele, T., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W., and Weckwerth, W.** (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6(1), 31697. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
- Ohlrogge, J. B., Kuhn, D. N., and Stumpf, P. K.** (1979). Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), 1194–1198. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1194>
- Park, H., Eggink, L. L., Roberson, R., and Hooper, J. K.** (1999). Transfer of proteins from the chloroplast to vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35(3 II), 528–538. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530528.x>
- Pazour, G. J., and Witman, G. B.** (2009). Chapter 15 - The *Chlamydomonas* Flagellum as a Model for Human Ciliary Disease. In E. H. Harris, D. B. Stern, and G. B. Witman (Eds.), *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)* (pp. 445–478). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00052-6>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., and Bashan, Y.** (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.
- Pérez-Martín, M., Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., and Crespo, J. L.** (2014). Oxidative Stress Contributes to Autophagy Induction in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 166(2), 997–1008. <https://doi.org/10.1104/pp.114.243659>
- Pérez-Martín, M., Blaby-Haas, C. E., Pérez-Pérez, M. E., Andrés-Garrido, A., Blaby, I. K., Merchant, S. S., and Crespo José, J.** (2015). Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 14(9), 964–973. <https://doi.org/10.1128/EC.00081-15>
- Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., and Crespo, J. L.** (2010). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 152(4), 1874–1888. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152520>
- Pérez-Pérez, M. E., Couso, I., and Crespo, J. L.** (2012a). Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy*, 8(3), 376–388. <https://doi.org/10.4161/auto.18864>
- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., and Crespo, J. L.** (2012b). Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae. *Plant Physiology*, 160(1), 156–164. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199992>
- Pérez-Pérez, M. E., and Crespo, J. L.** (2014). Autophagy in Algae. *Perspectives in Phycology*, 1(2), 93–101. <https://doi.org/10.1127/pip/2014/0012>
- Pérez-Pérez, M. E., Zaffagnini, M., Marchand, C. H., Crespo, J. L., and Lemaire, S. D.** (2014). The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy*, 10(11), 1953–1964. <https://doi.org/10.4161/auto.34396>
- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., and Crespo, J. L.** (2016). Control of Autophagy in *Chlamydomonas* Is Mediated through Redox-Dependent Inactivation of the ATG4 Protease. *Plant Physiology*, 172(4), 2219–2234. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01582>

- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., and Crespo, J. L.** (2021). The ATG4 protease integrates redox and stress signals to regulate autophagy. *Journal of Experimental Botany*, 72(9), 3340–3351. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab063>
- Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., and Cejudo, F. J.** (2006). Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. *The Plant Cell*, 18(9), 2356–2368. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041541>
- Pérez-Ruiz, J. M., Naranjo, B., Ojeda, V., Guinea, M., and Cejudo, F. J.** (2017). NTRC-dependent redox balance of 2-Cys peroxiredoxins is needed for optimal function of the photosynthetic apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), 12069–12074.
- Perlaza, K., Toutkoushian, H., Boone, M., Lam, M., Iwai, M., Jonikas, M. C., Walter, P., and Ramundo, S.** (2019). The Mars1 kinase confers photoprotection through signaling in the chloroplast unfolded protein response. *ELife*, 8, e49577. <https://doi.org/10.7554/eLife.49577>
- Phillips, A. R., Suttangkakul, A., and Vierstra, R. D.** (2008). The ATG12-Conjugating Enzyme ATG10 Is Essential for Autophagic Vesicle Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 178(3), 1339–1353. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086199>
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D., and Grossman, A. R.** (2010). Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 153(4), 1653–1668.
- Prochnik, S. E., Umen, J., Nedelcu, A. M., Hallmann, A., Miller, S. M., Nishii, I., Ferris, P., Kuo, A., Mitros, T., Fritz-Laylin, L. K., Hellsten, U., Chapman, J., Simakov, O., Rensing, S. A., Terry, A., Pangilinan, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Salamov, A., ... Rokhsar, D. S.** (2010). Genomic Analysis of Organismal Complexity in the Multicellular Green Alga *Volvox carteri*. *Science*, 329(5988), 223–226. <https://doi.org/10.1126/science.1188800>
- Pröschold, T., Harris, E. H., and Coleman, A. W.** (2005). Portrait of a Species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170(4), 1601–1610. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044503>
- Ral, J.-P., Colleoni, C., Wattebled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z., Morell, M. K., Chibbar, R., Purton, S., d’Hulst, C., and Ball, S. G.** (2006). Circadian Clock Regulation of Starch Metabolism Establishes GBSSI as a Major Contributor to Amylopectin Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 142(1), 305–317. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081885>
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J.-L., and Havaux, M.** (2012). Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiology*, 158(3), 1267–1278. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182394>
- Ramundo, S., Casero, D., Mühlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crèvecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., Pellegrini, M., Perez-Perez, M. E., Crespo, J. L., Schaad, O., Civic, N., and Rochaix, J. D.** (2014). Conditional Depletion of the *Chlamydomonas* Chloroplast ClpP Protease Activates Nuclear Genes Involved in Autophagy and Plastid Protein Quality Control. *The Plant Cell*, 26(5), 2201–2222. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124842>
- Reggiori, F., and Klionsky, D. J.** (2013). **Autophagic Processes in Yeast: Mechanism, Machinery and Regulation.** *Genetics*, 194(2), 341–361. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>
- Reyon, D., Kirkpatrick, J. R., Sander, J. D., Zhang, F., Voytas, D. F., Joung, J. K., Dobbs, D., and Coffman, C. R.** (2011). ZFNGenome: A comprehensive resource for locating zinc finger nuclease target sites in model organisms. *BMC Genomics*, 12(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-83>

- Riekhof, W. R., Sears, B. B., and Benning, C.** (2005). Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 242–252.
- Robaglia, C., Thomas, M., and Meyer, C.** (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 301–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.012>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K.** (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140.
- Rochaix, J.-D.** (1995). CHLAMYDOMONAS REINHARDTII AS THE PHOTOSYNTHETIC YEAST. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001233>
- Rochaix, J.-D.** (2001). Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 127(4), 1394–1398.
- Rochaix, J.-D.** (2011a). Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 878–886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.009>
- Rochaix, J.-D.** (2011b). Assembly of the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiology*, 155(4), 1493–1500. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169839>
- Rochaix, J.-D., and Ramundo, S.** (2017). Chloroplast signaling and quality control. *Essays in Biochemistry*, 62(1), 13–20. <https://doi.org/10.1042/EBC20170048>
- Rodriguez-Concepcion, M., D'Andrea, L., and Pulido, P.** (2019). Control of plastidial metabolism by the Clp protease complex. *Journal of Experimental Botany*, 70(7), 2049–2058. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery441>
- Rütgers, M., Muranaka, L. S., Mühlhaus, T., Sommer, F., Thoms, S., Schurig, J., Willmund, F., Schulz-Raffelt, M., and Schroda, M.** (2017). Substrates of the chloroplast small heat shock proteins 22E/F point to thermolability as a regulative switch for heat acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, 95(6), 579–591.
- Sager, R., and Palade, G. E.** (1957). STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF THE CHLOROPLAST IN CHLAMYDOMONAS: THE NORMAL GREEN CELL. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(3), 463–488. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.3.463>
- Salas, J. J., Martínez-Force, E., and Garcés, R.** (2006). Accumulation of phospholipids and glycolipids in seed kernels of different sunflower mutants (*Helianthus annuus*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(6), 539–545.
- Salinas, T., Duby, F., Larosa, V., Coosemans, N., Bonnefoy, N., Motte, P., Maréchal-Drouard, L., and Remacle, C.** (2012). Co-Evolution of Mitochondrial tRNA Import and Codon Usage Determines Translational Efficiency in the Green Alga *Chlamydomonas*. *PLOS Genetics*, 8(9), e1002946-. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002946>
- Santhanagopalan, I., Wong, R., Mathur, T., and Griffiths, H.** (2021). Orchestral manoeuvres in the light: crosstalk needed for regulation of the *Chlamydomonas* carbon concentration mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 72(13), 4604–4624. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab169>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA.).

- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., and Grossman, A. R.** (2018). From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *ELife*, 7, e39233. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Schatz, D., Shemi, A., Rosenwasser, S., Sabanay, H., Wolf, S. G., Ben-Dor, S., and Vardi, A.** (2014). Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytologist*, 204(4), 854–863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13008>
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z.** (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 26(7), 1749–1760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Schmollinger, S., Mühlhaus, T., Boyle, N. R., Blaby, I. K., Casero, D., Mettler, T., Moseley, J. L., Kropat, J., Sommer, F., Strenkert, D., Hemme, D., Pellegrini, M., Grossman, A. R., Stitt, M., Schroda, M., and Merchant, S. S.** (2014). Nitrogen-Sparing Mechanisms in *Chlamydomonas* Affect the Transcriptome, the Proteome, and Photosynthetic Metabolism. *The Plant Cell*, 26(4), 1410–1435. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122523>
- Schroda, M., and Vallon, O.** (2009). Chaperones and proteases. In *The Chlamydomonas Sourcebook* (pp. 671–729). Elsevier.
- Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J. B., and Shachar-Hill, Y.** (2004). Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature*, 432(7018), 779–782. <https://doi.org/10.1038/nature03145>
- Sciarretta, S., Yee, D., Ammann, P., Nagarajan, N., Volpe, M., Frati, G., and Sadoshima, J.** (2014). Role of NADPH oxidase in the regulation of autophagy in cardiomyocytes. *Clinical Science*, 128(7), 387–403. <https://doi.org/10.1042/CS20140336>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., and Mayfield, S. P.** (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, 82(3), 523–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12780>
- Serrano-Vega, M. J., Martínez-Force, E., and Garcés, R.** (2005). Lipid characterization of seed oils from high-palmitic, low-palmitoleic, and very high-stearic acid sunflower lines. *Lipids*, 40(4), 369–374.
- Shemi, A., Ben-Dor, S., and Vardi, A.** (2015). Elucidating the composition and conservation of the autophagy pathway in photosynthetic eukaryotes. *Autophagy*, 11(4), 701–715. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034407>
- Shepherd, H. S., Boynton, J. E., and Gillham, N. W.** (1979). Mutations in nine chloroplast loci of *Chlamydomonas* affecting different photosynthetic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(3), 1353–1357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.3.1353>
- Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and Nishimura, M.** (2013). Highly Oxidized Peroxisomes Are Selectively Degraded via Autophagy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(12), 4967–4983. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116947>
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.-S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J.-Y., Seo, H., Oh, H.-M., Kim, K.-J., Kim, J.-S., Jeong, W.-J., Chang, Y. K., and Jeong, B.** (2016). CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports*, 6(1), 27810. <https://doi.org/10.1038/srep27810>

- Shpilka, T., Welter, E., Borovsky, N., Amar, N., Mari, M., Reggiori, F., and Elazar, Z.** (2015). Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 34(16), 2117–2131. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embj.201490315>
- Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., and Hegemann, P.** (2013). Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *The Plant Journal*, 73(5), 873–882. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12066>
- Soto-Burgos, J., and Bassham, D. C.** (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 12(8), e0182591-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>
- Soto-Burgos, J., Zhuang, X., Jiang, L., and Bassham, D. C.** (2018). Dynamics of Autophagosome Formation. *Plant Physiology*, 176(1), 219–229. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01236>
- Spurr, A. R.** (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1–2), 31–43.
- Stephani, M., and Dagdas, Y.** (2020). Plant Selective Autophagy—Still an Uncharted Territory With a Lot of Hidden Gems. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 63–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.028>
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Sommer, F., Schulz-Raffelt, M., and Schroda, M.** (2011). Transcription factor-dependent chromatin remodeling at heat shock and copper-responsive promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 23(6), 2285–2301.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., and Šmuc, T.** (2011). REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE*, 6(7), e21800-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., and Ohsumi, Y.** (2010). Selective Transport of Mannosidase by Autophagic Pathways: IDENTIFICATION OF A NOVEL RECEPTOR, Atg34p. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30019–30025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143511>
- Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., and Johansen, T.** (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy*, 7(9), 993–1010. <https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16389>
- Theis, J., and Schroda, M.** (2016). Revisiting the photosystem II repair cycle. *Plant Signaling and Behavior*, 11(9), e1218587. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1218587>
- Theis, J., Lang, J., Spaniol, B., Ferteté, S., Niemeyer, J., Sommer, F., Zimmer, D., Venn, B., Mehr, S. F., Mühlhaus, T., Wollman, F.-A., and Schroda, M.** (2019). The *Chlamydomonas* deg1c Mutant Accumulates Proteins Involved in High Light Acclimation1. *Plant Physiology*, 181(4), 1480–1497. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01052>
- Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., and Vierstra, R. D.** (2005). Autophagic Nutrient Recycling in *Arabidopsis* Directed by the ATG8 and ATG12 Conjugation Pathways. *Plant Physiology*, 138(4), 2097–2110. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060673>
- Troncoso-Ponce, M. A., Kruger, N. J., Ratcliffe, G., Garcés, R., and Martínez-Force, E.** (2009). Characterization of glycolytic initial metabolites and enzyme activities in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 70(9), 1117–1122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.012>

- Tsukada, M., and Ohsumi, Y.** (1993a). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y.** (1993b). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)
- Umen, J. G., and Goodenough, U. W.** (2001). Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes and Development*, 15(13), 1652–1661. <https://doi.org/10.1101/gad.892101>
- Vahrenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B., and Michaelis, G.** (1993). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Current Genetics*, 24(3), 241–247. <https://doi.org/10.1007/BF00351798>
- van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., de Winne, N., Persiau, G., van de Slijke, E., van de Cotte, B., Stes, E., van Bel, M., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K., Vandepoele, K., de Smet, I., and de Jaeger, G.** (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants*, 5(3), 316–327. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>
- Voshall, A., Kim, E.-J., Ma, X., Yamasaki, T., Moriyama, E. N., and Cerutti, H.** (2017). miRNAs in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* are not phylogenetically conserved and play a limited role in responses to nutrient deprivation. *Scientific Reports*, 7(1), 5462. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05561-0>
- Wada, H., Shintani, D., and Ohlrogge, J.** (1997). Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1591–1596.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., and Makino, A.** (2009). Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiology*, 149(2), 885–893. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130013>
- Wang, Y., Stessman, D. J., and Spalding, M. H.** (2015). The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *The Plant Journal*, 82(3), 429–448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12829>
- Wang, P., Mugume, Y., and Bassham, D. C.** (2018). New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 113–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.018>
- Wagner, D., Przybyla, D., op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P., Würsch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E., and Apel, K.** (2004). The Genetic Basis of Singlet Oxygen–Induced Stress Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 306(5699), 1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.1103178>
- Watanabe, Y., Noda, N. N., Kumeta, H., Suzuki, K., Ohsumi, Y., and Inagaki, F.** (2010). Selective Transport of Mannosidase by Autophagic Pathways: STRUCTURAL BASIS FOR CARGO RECOGNITION BY Atg19 AND Atg34. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30026–30033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143545>
- Webb, M. S., and Green, B. R.** (1991). Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1060(2), 133–158.

- White, R. A., and Hooper, J. K.** (1994). Biogenesis of thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* y1 (a kinetic study of initial greening). *Plant Physiology*, 106(2), 583–590.
- Wolfe, O. R., Park, H., Sharp, W. P., and Hooper, J. K.** (1997). LIGHT-HARVESTING COMPLEX AF'OPROTEINS IN CYTOPLASMIC VACUOLES IN CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (CHLOROPHYTA). *Journal of Phycology*, 33(3), 377–386. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00377.x>
- Woo, J., Park, E., and Dinesh-Kumar, S. P.** (2014). Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(2), 863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318207111>
- Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D. J.** (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3290–3298. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1292>
- Xie, Q., Michaeli, S., Peled-Zehavi, H., and Galili, G.** (2015). Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends in Plant Science*, 20(5), 264–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.013>
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., and Bassham, D. C.** (2007). Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(1), 291–299. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092106>
- Xu, Q., Fu, H.-H., Gupta, R., and Luan, S.** (1998). Molecular Characterization of a Tyrosine-Specific Protein Phosphatase Encoded by a Stress-Responsive Gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(5), 849–857. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.5.849>
- Yamano, T., Iguchi, H., and Fukuzawa, H.** (2013). Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(6), 691–694. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.020>
- Yamasaki, T., and Cerutti, H.** (2017). Cooperative processing of primary miRNAs by DUS16 and DCL3 in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Communicative and Integrative Biology*, 10(1), e1280208. <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1280208>
- Yang, Z., and Klionsky, D. J.** (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 12(9), 814–822. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>
- Yang, W., Catalanotti, C., Posewitz, M. C., Alric, J., and Grossman, A. R.** (2014). Insights into algal fermentation. *Low-Oxygen Stress in Plants*, 135–163.
- Yang, W., Catalanotti, C., Wittkopp, T. M., Posewitz, M. C., and Grossman, A. R.** (2015a). Algae after dark: mechanisms to cope with anoxic/hypoxic conditions. *The Plant Journal*, 82(3), 481–503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tbj.12823>
- Yang, Y., Munz, J., Cass, C., Zienkiewicz, A., Kong, Q., Ma, W., Sanjaya, Sedbrook, J., and Benning, C.** (2015b). Ectopic Expression of WRINKLED1 Affects Fatty Acid Homeostasis in *Brachypodium distachyon* Vegetative Tissues. *Plant Physiology*, 169(3), 1836–1847. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01236>
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2004a). Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *The Plant Cell*, 16(11), 2967–2983. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025395>
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2004b). Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *The Plant Cell*, 16(11), 2967–2983. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025395>

- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D. J., Liang, Y., and Xie, Z.** (2012). Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*, 8(6), 883–892. <https://doi.org/10.4161/auto.19652>
- Zess, E. K., Jensen, C., Cruz-Mireles, N., de la Concepcion, J. C., Sklenar, J., Stephani, M., Imre, R., Roitinger, E., Hughes, R., Belhaj, K., Mechtler, K., Menke, F. L. H., Bozkurt, T., Banfield, M. J., Kamoun, S., Maqbool, A., and Dagdas, Y. F.** (2019). N-terminal β -strand underpins biochemical specialization of an ATG8 isoform. *PLOS Biology*, 17(7), e3000373-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000373>
- Zhang, L., Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U. C., and Sakamoto, W.** (2012). Essential Role of VIPP1 in Chloroplast Envelope Maintenance in Arabidopsis . *The Plant Cell*, 24(9), 3695–3707. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103606>
- Zhang, L., Kondo, H., Kamikubo, H., Kataoka, M., and Sakamoto, W.** (2016). VIPP1 Has a Disordered C-Terminal Tail Necessary for Protecting Photosynthetic Membranes against Stress . *Plant Physiology*, 171(3), 1983–1995. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00532>
- Zheng, Y., Xue, C., Chen, H., He, C., and Wang, Q.** (2020). Low-Temperature Adaptation of the Snow Alga *Chlamydomonas nivalis* Is Associated With the Photosynthetic System Regulatory Process. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01233>
- Zientara-Rytter, K., Łukomska, J., Moniuszko, G., Gwozdecki, R., Surowiecki, P., Lewandowska, M., Liszewska, F., Wawrzyńska, A., and Sirko, A.** (2011). Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy*, 7(10), 1145–1158. <https://doi.org/10.4161/auto.7.10.16617>