

Trabajo de fin de grado



Regulación de la biosíntesis de carotenoides mediada por inositoles polifosfato

Grado en Bioquímica por la Universidad de Sevilla y la Universidad
de Málaga.

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica Vegetal

Autor

Rodrigo Bedera

Tutoría

Dra. Inmaculada Couso

Sevilla,

10 de Junio de 2022

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. IMPORTANCIA DE LOS CAROTENOIDES EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS	3
2.1.1. BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN <i>C. REINHARDTII</i>	4
2.1.2. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES	5
2.2. INOSITOLES POLIFOSFATO Y SU RELACIÓN CON TOR	7
2.2.1 BIOSÍNTESIS Y FUNCIONES DE LOS INOSITOLES POLIFOSFATO	8
2.2.2 MUTANTE <i>VIP1-1</i> : DEFICIENCIA EN INOSITOLES PIRÓFOSFATO Y CONSECUENCIAS DESCRITAS.....	10
3. OBJETIVO	11
4. METODOLOGÍA	11
4.1 CEPAS DE <i>C. REINHARDTII</i> Y SU CULTIVO	11
4.1.1 CEPAS.....	11
4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO	12
4.1.3 TÉCNICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	12
4.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR	13
4.2.1 MEDIDAS ESPECTOFOTOMÉTRICAS.....	13
4.2.2 EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES.....	13
4.2.3 LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	13
4.2.4 SDS-PAGE. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA E INMUNOBLOT	14
4.2.5 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS	15
4.3 NORMALIZACIÓN Y REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS	15
5. RESULTADOS	16
5.1 <i>VIP1-1</i> PRESENTA HIPERSENSIBILIDAD A RAPAMICINA	16
5.2 <i>VIP1-1</i> ES MÁS SENSIBLE AL ESTRÉS POR AUSENCIA DE NITRÓGENO	17
5.3 ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN <i>VIP1-1</i>	18
5.4 LA INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES INCREMENTA MÁS LA AUTOFAGIA EN <i>VIP1-1</i> QUE EN WT	21
5.5 PERFIL METABÓLICO DE <i>VIP1-1</i> EN ALTA LUZ	22
6. DISCUSIÓN	25
7. CONCLUSIONES	27
8. REFERENCIAS	27

1.RESUMEN

Los carotenoides son compuestos orgánicos de creciente interés biotecnológico, y en este sentido las microalgas son candidatas muy interesantes para su producción, pero los mecanismos que controlan la regulación de la biosíntesis de carotenoides no se han elucidado todavía completamente. Por otro lado, a los inositoles polifosfato se les ha atribuído recientemente un papel en la partición del carbono en *Chlamydomonas reinhardtii*¹. En nuestros estudios empleamos el mutante *vip1-1*, deficiente en inositoles polifosfato, para investigar la posible implicación de estas moléculas en la regulación de la biosíntesis de carotenoides. De esta forma, detectamos una activación del ciclo de las xantofilas, que puede bien ser producto de la modulación directa de los inositoles polifosfato o bien estar provocado indirectamente por un mayor estrés oxidativo. Además, nuestros resultados sugieren que la ruta de las pentosas fosfato y en el ciclo de Krebs podrían ser nuevas dianas de la modulación ejercida por estas moléculas, lo que resultaría de interés para una supuesta ingeniería metabólica. Por tanto, este trabajo propone nuevas dianas de los inositoles polifosfato, que podrán ser investigadas en profundidad en estudios venideros.

Summary

The carotenoides are organic compounds of growing biotechnological interest, and the microalgae are interesting candidates for its production, but the mechanisms that govern the biosynthesis of carotenoids remain uncompletely elucidated yet. On the other hand, inositol polyphosphates have recently been assigned a function in carbon partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*¹. In our studies we used the mutant *vip1-1*, defficient in inositol polyphosphates, to investigate the implication these molecules might have in carotenoids biosynthesis. This way, we detected an activation of the xanthophyll cycle, which might be product of direct modulation performed by inositol polyphosphates, or might be caused indirectly by oxidative stress. Furthermore, our findings suggested the Krebs cycle and the pentoses phosphate cycle might be new targets of the inositol polyphosphates modulation, which could be of interest regarding a potential metabolic engineering. Therefore, this work proposes new targets of the inositol polyphosphates which could be further investigated in forthcoming studies.

2. INTRODUCCIÓN

La mitigación del CO₂ es uno de los mayores retos que los gobiernos han enfrentado en la última década. Tanto es así que la Unión Europea ha propuesto como objetivo una reducción del 40% de sus emisiones para 2030 en su último marco legislativo sobre el Clima y la Energía, y pretende ser neutral con respecto a estas emisiones para el año 2050 (<https://ec.europa.eu/clima/policies/strategies>). En este sentido, la captura biológica del carbono y su regulación molecular es un proceso clásicamente estudiado que necesita ser revisado para ayudar a reducir la emisión neta de CO₂ a la atmósfera. Las rutas del flujo del carbono fotosintético que lo dirigen hacia la formación de moléculas de reserva o hacia su metabolismo (lo que conocemos como la partición del carbono) son de interés tanto científico como agronómico, puesto que los cambios en estas rutas afectan a distintas propiedades tanto a nivel celular como a nivel del organismo.

Recientemente, el uso de microorganismos fotosintéticos ha cobrado especial relevancia para el estudio, captación de carbono y biosíntesis de distintos compuestos de interés. Así, en consonancia con las medidas comentadas, estos organismos ofrecen una alternativa sostenible para la producción de compuestos como los biofueles, las poliaminas o los carotenoides²⁻⁴.

En este contexto, el alga unicelular verde *Chlamydomonas reinhardtii* cobra especial relevancia por haber sido ampliamente utilizada como organismo modelo en estudios sobre fotosíntesis⁵⁻⁸, biología molecular⁹⁻¹³ y biosíntesis de carotenoides¹⁴⁻¹⁶, entre otros muchos campos. La publicación de su genoma nuclear completo¹⁷ amplió aún más las posibilidades que ya ofrecía este organismo, y desde entonces se han realizado estudios de análisis ómicos que han aumentado nuestro conocimiento sobre su biología¹⁸⁻²⁰

2.1. Importancia de los carotenoides en organismos fotosintéticos

Los carotenoides son moléculas esenciales para todos los organismos fotosintéticos, gracias a sus propiedades fotoprotectoras y antioxidantes²¹, así como estructurales²². Los carotenoides se clasifican en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. Su principal diferencia consiste en la presencia de grupos funcionales oxigenados en las xantofilas, de los que carecen los llamados carotenos, que sólo tienen una estructura hidrocarbonada. Estos compuestos están presentes en las antenas de los fotosistemas I y II (PSI, PSII)²³. En especial, las xantofilas como la violaxantina o la zeaxantina desempeñan un papel importante en el control sobre la energía lumínica asimilada. De esta forma, ciertos carotenoides como la zeaxantina son capaces de recibir energía de clorofila a excitada, evitando posibles daños oxidativos²⁴.

Sin embargo, su utilidad no sólo queda restringida a funciones antioxidantes. Se ha observado que los carotenoides son importantes para la estructura de los fotosistemas²⁵. Así, dependiendo de las condiciones, la fluidez de las membranas cloroplásticas puede ser modificada por la composición de carotenoides, alterando su termoestabilidad y sus propiedades difusivas, entre otras²⁶. En consonancia con estas funciones descritas, se ha hallado que defectos en la síntesis de carotenoides en *C. reinhardtii* tienen como consecuencia una activación de la autofagia, proceso relacionado con el reciclaje de componentes celulares dañados²⁷, aunque inicialmente esto ha sido atribuido a un incremento de los daños oxidativos.

Además de las funciones mencionadas en organismos fotosintéticos, los carotenoides están cobrando importancia en el sector alimenticio gracias a sus propiedades, beneficiosas para la salud. Se han atribuido a estos pigmentos efectos protectores contra algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, y su escasez en la dieta puede provocar enfermedades como la ceguera nocturna²⁸. El crecimiento de los carotenoides en dicho sector ha provocado especial interés en optimizar los métodos de producción de carotenoides para su comercialización. *Dunaliella salina* tiene gran potencial para la producción de β -caroteno, debido a que acumula hasta un 13% de β -caroteno en peso seco y que presenta la capacidad de crecer en aguas

con gran salinidad²⁹. Por otro lado, en cultivos optimizados de *Chlorella saccharophila* se han obtenido altos niveles de zeaxantina (11,2 mg g⁻¹ peso seco) y β -caroteno (4,98 mg g⁻¹ peso seco)³⁰.

A pesar de que *Chlamydomonas reinhardtii* no se encuentra entre las microalgas más adecuadas para la producción de carotenoides, la posibilidad de manipularla genéticamente y su uso extendido en los laboratorios la convierte en un buen organismo para el estudio y modificación de la ruta de carotenogénesis. Así, es de gran interés la investigación sobre métodos para potenciar la producción de carotenoides, y aprovechar esa información para mejorar la carotenogénesis en *C. reinhardtii* o en otras microalgas más eficientes.

2.1.1. Biosíntesis de carotenoides en *C. reinhardtii*

La ruta de biosíntesis de carotenoides (**Fig.1**) comienza con la activación de una molécula de isopreno (5C), dando lugar a dos isómeros: isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato. A través de reacciones sucesivas, 6 isopentenil difosfato y 2 dimetilalil difosfato se condensan en una molécula de fitoeno (40C), reconocido como el primer carotenoide de la ruta. Este fitoeno es transformado en licopeno (40C) a través de reacciones catalizadas por diversas enzimas, entre la que se encuentra la fitoeno desaturasa (PDS)^{21,31}.

A partir del fitoeno, la ruta biosintética diverge hacia el α -caroteno, que podrá ser transformado en luteína y linoxantina; y hacia el β -caroteno, precursor de los componentes del ciclo de las xantofilas (zeaxantina, anteraxantina y violaxantina). La zeaxantina puede convertirse en anteraxantina, y ésta en violaxantina, a través de reacciones de epoxidación catalizadas por la zeaxantina epoxidasa (ZEP). Estas reacciones son reversibles, de forma que la violaxantina puede transformarse de vuelta en zeaxantina por acción de la violaxantina de-epoxidasa (VDE). La violaxantina también puede dar lugar a neoxantina.

En *C. reinhardtii*, los carotenoides más abundantes son β -caroteno, violaxantina, neoxantina, luteína y linoxantina²¹. Sin embargo, en condiciones de estrés lumínico, se produce una reordenación de las proporciones de carotenoides, a través de la

activación del ciclo de las xantofilas. Mediante reacciones de des-epoxidación reversibles, parte de la violaxantina es convertida en zeaxantina. A la zeaxantina se le ha atribuido la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno³². Además, la energía del estado mínimo excitado de singlete de la zeaxantina es menor que la de la clorofila a³³, lo que permite a este compuesto actuar como un agente fotoprotector, al recibir el exceso de energía de la clorofila a y disiparla en forma de calor^{24,34}.

2.1.2. Regulación de la biosíntesis de carotenoides

Los carotenoides son moléculas de gran importancia biotecnológica, gracias a sus aplicaciones en farmacia, nutracéutica, cosméticos y ganadería, entre otros campos^{3,35,36}. En años recientes, se ha empezado a prestar atención a las microalgas como fuente de producción de estos compuestos gracias a su rápido crecimiento y a la versatilidad metabólica, lo que suscita aún más interés en descubrir los mecanismos de regulación que gobiernan la biosíntesis de carotenoides³⁷.

Si bien se han dedicado grandes esfuerzos a conocer la importancia de las distintas especies de carotenoides en la fotosíntesis y la fotoprotección, también es de gran relevancia desvelar la señalización que hace posible los cambios en la biosíntesis previamente mencionados. Pese a las investigaciones dedicadas a ello, los mecanismos de regulación de la carotenogénesis no están totalmente elucidados.

La fitoeno sintasa (PSY) es considerada como la enzima más limitante de esta biosíntesis, debido a su posición como punto de entrada del carbono en esta ruta biosintética. Cazzonelli y Pogson³⁸ explican cómo en algunas plantas como *Arabidopsis* sólo existe un gen codificante de esta enzima, mientras que en otras como *Zea mays* o *Triticum aestivum* existen dos o más homólogos, con función redundante pero expresados en distintos tejidos. Adicionalmente, la expresión del gen codificante de PSY se encuentra sujeta a distintos estímulos como ácido abscísico, sequía o fotoperiodo. En otro estudio³⁹ se descubrió una regulación postraduccional del gen a manos del regulador ORANGE en *Arabidopsis thaliana*. Se describió que ORANGE y PSY interaccionan físicamente en los plastos, y una sobreexpresión de ORANGE provoca un aumento de la cantidad de PSY activa.

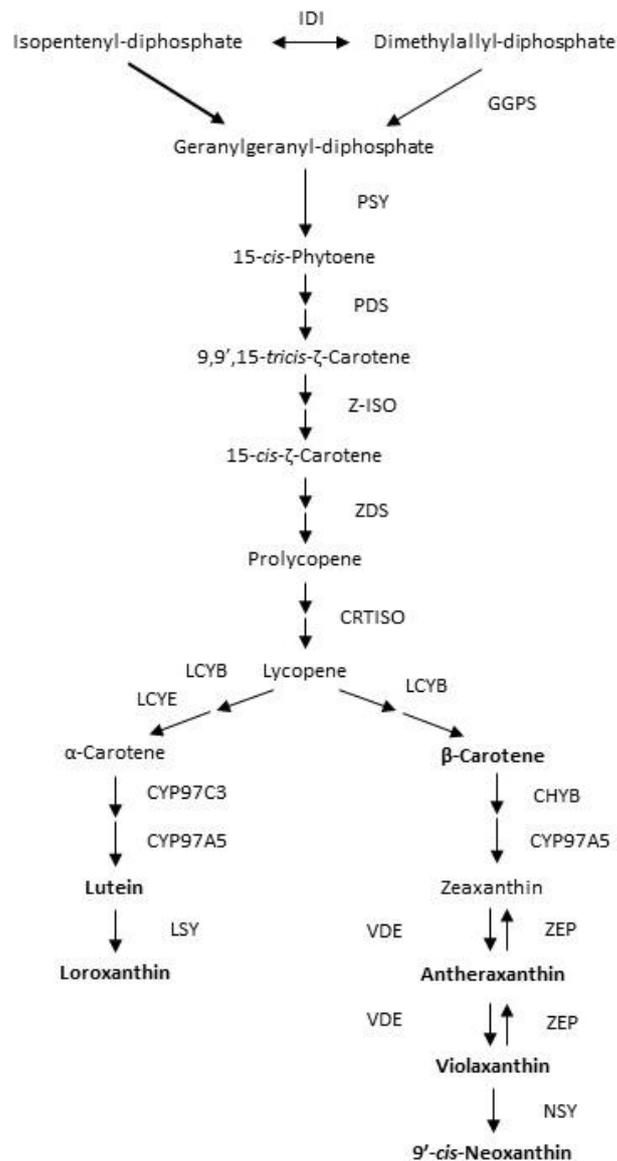


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en *C. reinhardtii*. Junto a cada flecha se encuentra la actividad enzimática responsable de la reacción. En negrita se muestran los carotenoides que más se acumulan en células vegetativas. IDI (isopentenil-difosfato delta-isomerasa), GGPS (geranylgeranyl-difosfato sintasa), PSY (fitoeno sintasa), PDS (fitoeno desaturasa), Z-ISO (ζ -isomerasa), ZDS (ζ -caroteno desaturasa), CRTISO (carotenoide isomerasa), LCYB (licopeno β -ciclasa), LCYE (licopeno ϵ -ciclasa), CYP97C3 (caroteno ϵ -hidroxilasa), CYP97A5 (caroteno β -hidroxilasa), LSY (loroxantina sintasa), CHYB (caroteno β -hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa) (adaptado de Lohr, 2009)²¹.

Como se ha comentado anteriormente, existen observaciones en lo referente a regulación para otros puntos de la ruta. Por ejemplo, el estrés lumínico es capaz de aumentar la cantidad de zeaxantina¹⁵. Esto es consistente con datos obtenidos de plantas, donde altas irradiancias inducen la formación de mRNA de la caroteno β -hidroxilasa⁴⁰, y un pH ácido (producido por el proceso fotosintético) aumenta la actividad de la VDE⁴¹. También se ha detectado una activación del ciclo de las xantofilas en estrés por ausencia de nitrógeno, y por inhibición de la fitoeno desaturasa (PDS)^{42,43}. Las enzimas responsables del ciclo de las xantofilas en *C. reinhardtii* fueron finalmente elucidadas en 2016, cuando se detectó el gen de la VDE en este organismo. Curiosamente, la VDE de la microalga no es homólogo al gen de plantas, sino que está relacionado con el de bacterias fotosintéticas, y la localización de la proteína es también distinta a los vegetales superiores (en plantas está en el lumen tilacoidal, mientras que en *C. reinhardtii* se localiza hacia el estroma)⁴⁴. No obstante, a pesar de los esfuerzos, no se ha conseguido establecer un modelo genérico para la regulación de la carotenogénesis, ni siquiera en plantas⁴⁵.

A pesar de ello, se han encontrado conexiones con controladores maestros del crecimiento como es la quinasa TOR (Target of Rapamycin)⁴⁶. En este estudio sobre el fosfoproteoma de *C. reinhardtii* se identificó a la licopeno ciclasa (Cre04.g221550.t1.2) como una diana de fosforilación de esta quinasa, encontrándose aguas abajo del control ejercido por este regulador. De hecho, el tratamiento con rapamicina (RAP) de cultivos de *Chlamydomonas*, que es un inhibidor químico de la actividad quinasa de TOR, resultó en un aumento significativo de la síntesis de carotenoides, indicando así la implicación de esta quinasa en el control de esta ruta biosintética. Esto abre las puertas a nueva investigación sobre cómo está regulada la biosíntesis de carotenoides en los organismos fotosintéticos.

2.2. Inositoles polifosfato y su relación con TOR

Los inositoles polifosfato son un grupo de moléculas caracterizadas por presentar un inositol como estructura central. Sobre los grupos hidroxilos de este polialcohol de 6 carbonos se producen fosforilaciones, que en ocasiones pueden tratarse de pirofosforilaciones. Así, se pueden generar moléculas de inositol con hasta 8 grupos fosfato asociadas (4 fosfatos y 2 pirofosfatos).

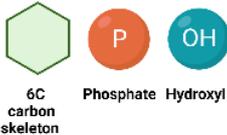
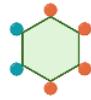
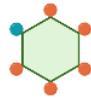
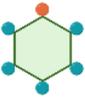
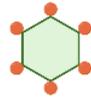
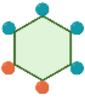
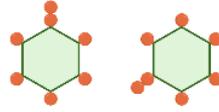
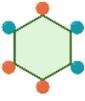
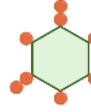
Common name	Representation	Common name	Representation
Legend	 6C carbon skeleton Phosphate Hydroxyl	Inositol 1,3,4,5-phosphate (IP4)	
Inositol, Ins (I)		Inositol pentakisphosphate (IP5)	
Inositol 1-phosphate (IP)		Inositol hexakisphosphate or Phytic acid (IP6)	
Inositol 4,5-phosphate (IP2)		1-PP-InsP5 and 5-PP-InsP5 (IP7)	
Inositol 1,4,5-phosphate (IP3)		1,5-PP-InsP4 (IP8)	

Figura 2. Algunas especies químicas de inositoles polifosfato. El hexágono representa un esqueleto cíclico de 6 carbonos. Las esferas azules representan un grupo hidroxilo en ese carbono. Las esferas naranjas representan un grupo fosfato en ese carbono. Los grupos pirofosfato se indican con dos esferas naranjas. Los nombres comunes de cada molécula son sucedidos por la abreviación típicamente usada, entre paréntesis.

2.2.1 Biosíntesis y funciones de los inositoles polifosfato

La biosíntesis de los inositoles polifosfato involucra la acción de diversas enzimas tipo quinasa, que a través de sucesivas fosforilaciones dan lugar al conocido como ácido fítico o fitato. Sin embargo, una molécula de inositol puede presentar hasta 8 fosfatos, debido a la actividad de dos tipos de proteínas (**Fig.3**). En plantas, las primeras reciben el nombre de InsP₆ quinasa (IP6Ks), y son las responsables de introducir una pirofosforilación en el carbono 1 fosforilado del fitato. El segundo tipo es conocido bajo el nombre de difosfoinositol pentakisfosfato quinasa (PPIP5Ks), o también VIP quinasa. Su función es introducir una pirofosforilación en el carbono 5 fosforilado. Así,

la acción combinada de ambas quinasas permite la formación de un inositol con 4 fosforilaciones y 2 pirofosforilaciones, el 1,5PP-InsP₄ o InsP₈^{47,48}.

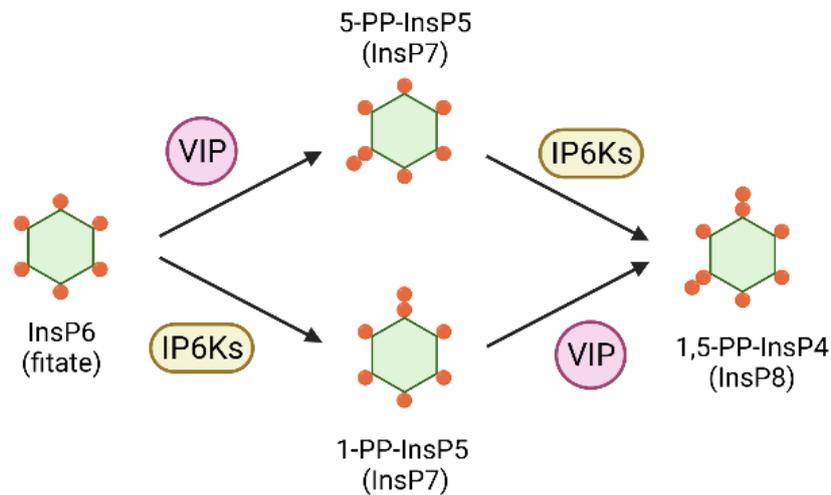


Figura 3. Reacciones catalizadas por las enzimas IP6Ks y las enzimas VIP (también llamadas PPIP5Ks). Se indica con un hexágono el esqueleto cíclico de 6 carbonos, y con esferas naranjas los grupos fosfato. Los grupos pirofosfato se indican con dos esferas.

A lo largo de los años, se le han atribuido a los inositoles polifosfato funciones de diversos tipos. La más evidente de estas moléculas es proporcionar una reserva de P, en forma de fitato. En algunas especies, como los cereales, el fitato puede representar el 80% del contenido total de P de las semillas⁴⁹.

Por otro lado, se han descrito funciones de señalización citoplásmica para varios inositoles polifosfato. El más estudiado es el IP₃, responsable de la liberación de calcio a través de la ruta de señalización de la fosfolipasa C (PLC). Para ello, existen proteínas canal receptoras en el retículo endoplásmico, que en respuesta a IP₃ liberan Ca²⁺ al citoplasma, lo que controla procesos como la transducción de la señal en la unión neuromuscular o la sinapsis entre neuronas⁵⁰⁻⁵². Otro ejemplo es el inositol pirofosfato IP₇ (inositol heptakisfosfato), que tiene un efecto inhibitorio sobre la ruta de señalización para presencia de fosfato en levaduras, viéndose aumentada su concentración 7 veces en ausencia de fosfato⁵³. En otros estudios sobre el hongo *Cryptococcus neoformans*, se observó que el IP₇ es importante para su patogenicidad. Al eliminar la actividad de la enzima responsable de la síntesis de IP₇

aumentó la susceptibilidad del organismo a fármacos y disminuyó la carga fúngica en las infecciones provocadas a ratones⁵⁴.

Sin embargo, estas moléculas parecen poseer además otro tipo de papel relacionado con la interacción de proteínas. En células humanas se cristalizó la enzima ADAR2, responsable de la edición del mRNA y se observó la presencia de IP₆, en la estructura. Se determinó que en este caso el IP₆ actúa como cofactor, necesario para la actividad enzimática de ADAR2⁵⁵. Otro caso similar fue expuesto por Sheard y sus colaboradores, en sus investigaciones sobre la respuesta a jasmónico en *Arabidopsis thaliana*⁵⁶. Al analizar la estructura del complejo de respuesta, encontraron que el IP₅, concretamente la isoforma Ins(1,2,4,5,6)P₅, era un cofactor necesario para la actividad del co-receptor COI1-JAZ, responsable de la respuesta a jasmónico.

2.2.2 Mutante *vip1-1*: deficiencia en inositoles pirofosfato y consecuencias descritas

Dentro de la regulación celular de eucariotas se ha descrito a TOR como un regulador maestro encargado de integrar señales como la disponibilidad de nutrientes y controlar el crecimiento celular. Así, en un intento de comprender mejor cómo se regula la partición del carbono en los organismos fotosintéticos, en 2016 se realizó un “*screening*” con el fin de identificar nuevos mutantes hipersensibles de *C. reinhardtii* a RAP¹. Mediante este procedimiento, al encontrar nuevos elementos implicados en el sistema de regulación gobernado por TOR en *Chlamydomonas*, se esperaba clarificar cómo esta microalga controla el flujo de carbono hacia los distintos sumideros en la célula. Uno de los mutantes aislados fue *vip1-1*, que presenta una inserción en el gen codificante para la quinasa VIP1. Como se ha explicado en apartados anteriores, VIP1 es una quinasa que cataliza la biosíntesis de los InsP₇ e InsP₈. Entre los fenotipos asociados encontrados en *vip1-1*, se observó que produce una acumulación exacerbada de triacilgliceroles, (TAGs)¹. Curiosamente, la biosíntesis de estos lípidos en *C. reinhardtii* ha sido descrita como una diana de la quinasa TOR⁵⁷. De esta forma, la hipersensibilidad de *vip1-1* a RAP y su acumulación de TAGs sugieren una sinergia entre las dianas de TOR y los inositoles pirofosfato que no habían sido descritas hasta la fecha en ningún otro organismo¹, aunque recientemente se está ampliando su estudio a mamíferos y levaduras.

En posteriores estudios se realizó el análisis del fosfoproteoma de *C.reinhardtii* en busca de posibles dianas de los InsP. En concreto, se detectó que los inositoles pirofosfato están implicados en la regulación de la fotosíntesis, ya que son necesarios para la correcta fosforilación de muchas de las proteínas del fotosistema II⁵⁸. Como consecuencia, el mutante *vip1-1* deficiente en inositoles pirofosfato presenta modificaciones en la transición al flujo electrónico cíclico y en el mecanismo fotoprotector NPQ. De hecho, al comprobar la viabilidad de *vip1-1* en alta luz, se observó que presenta hipersensibilidad a irradiancias elevadas.

3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es identificar el efecto que los inositoles polifosfato (InsP) tienen sobre la biosíntesis de carotenoides en *C. reinhardtii*, con la intención de realizar descubrimientos que contribuyan a optimizar la producción de carotenoides en microalgas, así como como identificar posibles dianas de la regulación ejercida por estos InsP. Para ello, nos basamos en los descubrimientos realizados por Couso y colaboradores^{1,58}, que describen una modulación del metabolismo a manos de los InsP y una sinergia con las dianas de TOR. Por ello, puesto que Werth y colaboradores⁴⁶ encontraron una conexión entre TOR y la ruta biosintética de carotenoides, decidimos emplear como herramienta de estudio el mutante *vip1-1*, con deficiencias en la síntesis de InsP, para revelar la implicación de estas moléculas en la carotenogénesis mediante distintas técnicas analíticas y de biología molecular.

4. METODOLOGÍA

4.1 Cepas de *C. reinhardtii* y su cultivo

4.1.1 Cepas

Como cepa silvestre se usó la cepa *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1690mt+ (Sager 21gr)⁵⁹. La cepa mutante definida en el texto como *vip1-1* es *vip1-1:OLLASVIP1*. OLLAS es un epítipo empleado para confirmar la expresión de la proteína VIP1 de forma exógena, bajo el promotor y terminador de la subunidad pequeña de la

RUBISCO y el promotor de HSP70A. *vip1-1* se trata de un mutante insercional de CC-1690, con una inserción del gen de resistencia a higromicina *aph7*.

4.1.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo Tris Acetate Phosphate fue empleado para los experimentos, y en la Tabla I se detalla su preparación.

Tabla I. Elaboración de medio TAP

Compuestos	Cantidad
H ₂ O	975 mL
40x beijerinck	25 mL
Tris	2,42 g
1 M KPO ₄ pH 7,0	1 mL
Trazas	1 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Esta solución se iguala hasta pH 7. Se añadió agar al 1,5% para elaborar TAP agar. En el medio de TAP -N se empleó beijerinck -N, que no contiene NH₄Cl en su preparación. La rapamicina se preparó en un stock de 1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y se añadió al medio para una concentración final de 500 nM. El norflurazón se preparó en un stock de 10 mM, y se añadió al medio hasta una concentración final de 20 µM.

4.1.3 Técnicas y condiciones de cultivo

A partir de cultivos en placa, se prepararon preinóculos que se dejaron en agitación a 25°C y luz continua durante tres días. Para ensayar el crecimiento bajo efecto de rapamicina, se preparó el medio TAP con agar y rapamicina como se explica en “medios de cultivo”. Los inóculos fueron diluidos en una proporción 1/5 de forma sucesiva para cada columna (**Fig.4**).

Para elaborar la curva de crecimiento se realizaron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Los inóculos crecieron en medio TAP y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante. Tras un lavado con el medio

correspondiente, (TAP para control, TAP -N para hambre de nitrógeno), se resuspendieron en dicho medio.

En la extracción de carotenoides, los cultivos fueron mantenidos en agitación a 25°C en luz continua. La alta luz corresponde a 1000 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ durante 24 h, mientras que el norflurazón se aplicó como se describe en “medios de cultivo” durante 24 h. En los cultivos para la extracción de metabolitos, el estrés por alta luz corresponde a 1000 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ durante 24 h. En este caso, se suministró aireación con CO₂ al 1%, y la biomasa fue liofilizada para su posterior tratamiento.

4.2 Técnicas experimentales y de biología molecular

4.2.1 Medidas espectrofotométricas

Las medidas fueron tomadas con Amersham Biosciences Ultrospec 3100 Pro. Para la curva de crecimiento, los inóculos iniciales presentaron una OD₇₅₀ de: 0,239 (WT TAP), 0,248 (WT TAP -N), 0,217 (*vip1-1* TAP) y 0,205 (*vip1-1* TAP -N). Las medidas fueron realizadas durante 3 días, hasta obtener una OD₇₅₀ final de 2,160 (WT TAP), 0,578 (WT TAP -N), 2,265 (*vip1-1* TAP) y 0,428 (*vip1-1* TAP -N). Para valores de absorbancia superiores a 0,9 las muestras fueron diluidas convenientemente.

4.2.2 Extracción de carotenoides

Para la extracción de carotenoides se emplearon 3 réplicas biológicas de cada condición. Los inóculos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 0,5 mL de TAP. Tras ello se aplicó un choque térmico a 90°C durante 3 minutos y se añadieron 2 mL de acetona. La extracción se realizó durante 15 minutos a 8000 rpm. Se descartó el pellet, y el sobrenadante (acetona) fue evaporado en atmósfera de nitrógeno. Los carotenoides fueron cuantificados mediante HPLC-diode array.

4.2.3 Lisis celular y extracción de proteínas

Los inóculos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se realiza un lavado con tampón tris-HCl 50 mM pH 7,5. Tras volver a centrifugar se resuspende en el mismo tampón y se congelan a -80°C durante 2 h.

Transcurrido ese tiempo se descongelan y se vuelven a congelar. Para extraer las proteínas, se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm.

4.2.4 SDS-PAGE. Transferencia de proteínas a membrana e inmunoblot

Se cargaron 20 µg de proteína de cada muestra y 4 µL de tampón de carga 4x en 25 µL de volumen final para cada carril, tras someter a las muestras a un choque térmico de 65°C durante 5 minutos. El gel se preparó al 15% de acrilamida con SDS. La electroforesis se realizó empleando el sistema mini-PROTEAN (BioRad) a un voltaje constante de 170 V.

Tras la electroforesis, se transfirió la proteína a una membrana de PVDF de 0,45 µm (Immobilon-P de Millipore) previamente activada con metanol durante 30 s en agitación. La transferencia se llevó a cabo utilizando el sistema de transferencia semihúmedo Invitrogen Power Blotter (Thermo Fisher Scientific), con tampón de transferencia y 3 capas de papel Whatman a ambos lados del gel y la membrana de PVDF, a una intensidad de corriente constante de 25 A durante 40 minutos. Se continuó con un bloqueo de membrana en 5 mL de leche en polvo desgrasada (AppliChem) al 5% durante 45 minutos en agitación. Posteriormente, tras 3 lavados en agitación durante 10 minutos con tampón PBS y Tween 20 al 0,1%, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Rabbit anti-ATG8 de Agrisera) en leche desgrasada al 5% a una concentración de 1:2000, en cámara fría durante toda la noche. Una vez incubado, se lavó 3 veces más y se incubó 45 minutos en agitación con el anticuerpo secundario en leche 5% a concentración 1:10000. El revelado fue realizado tras incubar 5 minutos en oscuridad con Luminata Cresciendo (Millipore), en Amersham Imager 680.

El control de carga se realizó tiñendo el gel con azul de Coomassie (Brilliant Blue R-250 de BioRad) durante 45 minutos en agitación, tratando con solución de-staining (50% H₂O 40% metanol 10% acético glacial) durante 30 minutos y finalmente con H₂O_d durante la noche.

4.2.5 Extracción de metabolitos

Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada condición, tal y como se explica en “técnicas de cultivo”. Se realizó la extracción usando 1 mL de cloroformo-metanol 3:7 con perlas de vidrio de 0,5 mm, en Mini Beadbeater (BioSpec), y centrifugando a 13000 rpm 5 minutos, recuperando el sobrenadante. Esto fue repetido todas las veces necesarias. Posteriormente se añadió agua miliQ en proporción 1:1 y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones, recuperando el sobrenadante. El sobrenadante fue secado en Speed Vac DNA130 durante la noche. El pellet formado fue resuspendido y centrifugado con las mismas condiciones, y se recuperó el sobrenadante para análisis por HPLC-MS.

4.3 Normalización y representación de los datos

Los resultados obtenidos del análisis de carotenoides y metabolitos fueron normalizados por gramo de peso seco para cada réplica biológica. Para ello, se filtraron 5 mL, en filtros previamente pesados, provenientes de una estufa de 70°C para evitar variaciones de peso por humedad. Los filtros fueron lavados con 15 mL de formato de amonio 0,5 M para retirar las sales, y se guardaron en estufa durante 24 h hasta su pesaje.

En el caso del inmunoblot, las muestras de proteínas fueron cuantificadas mediante el método Bradford. Para ello se empleó una recta patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de BSA, añadiendo 1 mL de reactivo Bradford a 1 µL de muestra proteica.

El análisis de los datos metabólicos y de carotenoides fue realizado mediante RStudio 4.1.1. La representación de los datos de carotenoides fue elaborada mediante Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018), mientras que la representación de los datos de carotenoides fue elaborada mediante Rstudio 4.1.1. La significancia de los datos fue evaluada empleando la t de Student, comprobada la normalidad de los datos.

5. RESULTADOS

5.1 *vip1-1* presenta hipersensibilidad a rapamicina

Previamente se ha descrito la hipersensibilidad que presenta el mutante de *Chlamydomonas reinhardtii vip1-1* a rapamicina (RAP). Debido a eventos de ordenación del genoma, frecuentes en *Chlamydomonas*⁶⁰, procedimos a comprobar la integridad de la cepa silvestre y de *vip1-1*. Para ello, realizamos una evaluación del crecimiento del mutante *vip1-1* en comparación a la cepa silvestre (WT) y al mutante *vip1-1* complementado, en ausencia (**Fig.4a**) o presencia de RAP (**Fig.4b**). En medio de cultivo TAP sin RAP, tanto WT como *vip1-1* y el mutante complementado crecieron de forma similar. Al añadir al medio RAP, observamos que el crecimiento de todas las cepas se ve comprometido, pero *vip1-1* en especial presenta mayores dificultades. Transcurridos 10 días estas dificultades se mantienen en *vip1-1* y, de nuevo, el mutante complementado iguala el crecimiento del WT (**Fig.4c**). Por tanto, el fenotipo de hipersensibilidad de *vip1-1* se mantiene y podemos utilizarlo como nuestro objeto de estudio.

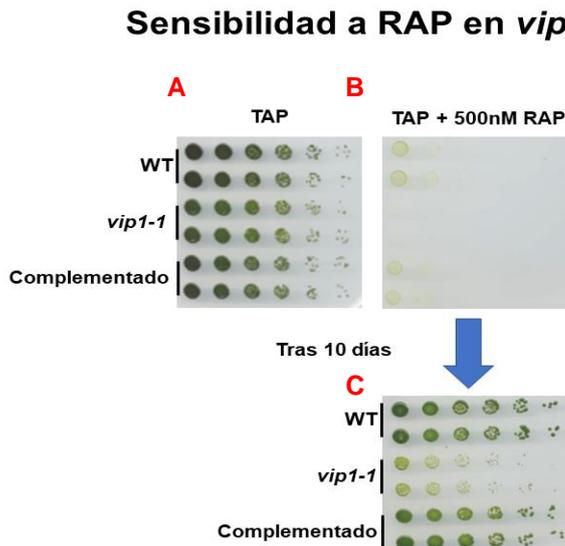


Figura 4. Crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* silvestre (WT), *vip1-1* y *vip1-1* complementado (Complement). Entre las muestras de cada columna y la siguiente se realizó una dilución 1/5. **A)** Crecimiento de dos réplicas biológicas de cada variante en medio TAP con agar al 1,2%. **B)** Crecimiento de dos réplicas biológicas de cada variante en medio de cultivo TAP con agar 1,2% y rapamicina 500 nM. **C)** Crecimiento de **b)** transcurridos 10 días desde la siembra.

5.2 *vip1-1* es más sensible al estrés por ausencia de nitrógeno

Tal y como se ha comentado con anterioridad, el estrés por falta de nitrógeno puede resultar una condición interesante para potenciar la biosíntesis de carotenoides en *Chlamydomonas reinhardtii*¹⁵. Por ello, tras comprobar la integridad y el crecimiento de las variantes WT y *vip1-1*, analizamos el crecimiento en hambre de N de estos organismos a lo largo del tiempo. Debido al gran impacto que la ausencia de nitrógeno tiene en la célula, no es posible su crecimiento desde inóculos muy diluidos. Por ello, los inóculos fueron cultivados, centrifugados y resuspendidos en sus correspondientes medios (TAP para control, TAP -N para ausencia de nitrógeno), a una OD₇₅₀ de aproximadamente 0,22. Los datos obtenidos indican un cierto retraso en el crecimiento de *vip1-1* en medio de cultivo sin nitrógeno aunque no muy significativo (**Fig.5**). En los medios de cultivo control (TAP), *vip1-1* inicialmente mostró un crecimiento más lento probablemente por una fase de latencia del cultivo más larga que la del silvestre, aunque a lo largo de la cinética del experimento logra igualar el número de células de la estirpe WT (**Fig.5**). En el caso de las condiciones de estrés tanto *vip1-1* como el WT muestran un retardo en el crecimiento muy acusado. Además, es especialmente evidente en el caso de *vip1-1* que solamente dobla su concentración después de 48h de exposición al estrés nutricional.

Curva de crecimiento de WT y *vip1-1* en hambre de nitrógeno

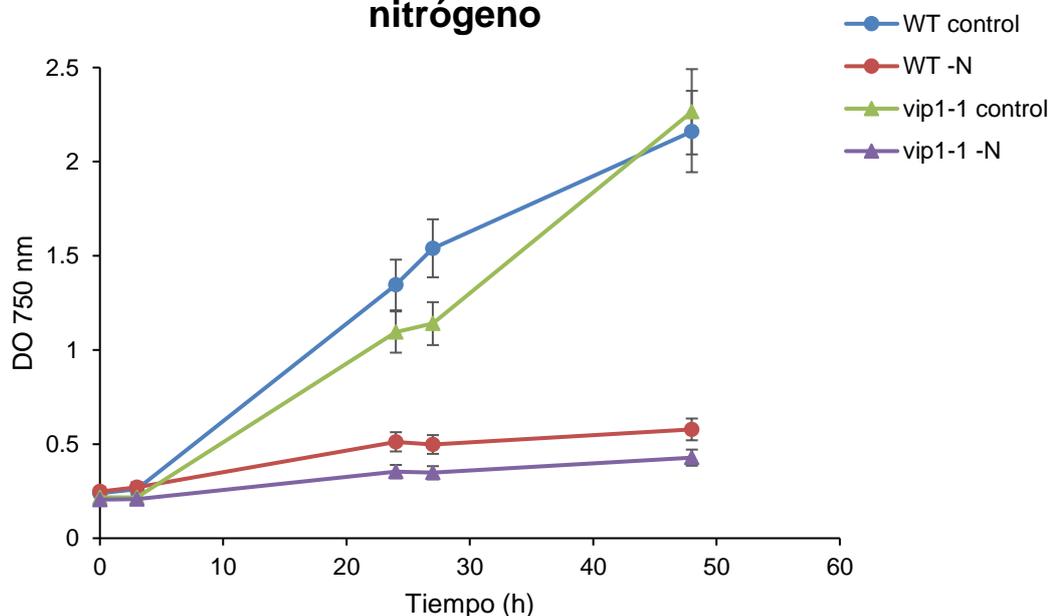


Figura 5. Curva de crecimiento del WT y del mutante *vip1-1* en medio de cultivo con y sin nitrógeno. El WT se representa con (●) en medio control y (●) en medio sin nitrógeno. *vip1-1* se representa con (▲) en medio control y (▲) en medio sin nitrógeno.

5.3 Acumulación de carotenoides en *vip1-1*

Teniendo en cuenta el fenotipo de crecimiento que encontramos en condiciones de carencia de N en *vip1-1* y de que previamente habíamos encontrado una acumulación de lípidos en este mutante en las mismas condiciones¹, procedimos a evaluar el perfil de los carotenoides en nuestro mutante *vip1-1* en comparación con WT. Se ha descrito que en microalgas las mismas condiciones de estrés que determinan la presencia de cuerpos lipídicos inducen la síntesis de carotenoides⁶¹, por lo que es probable que las rutas que regulan estos procesos sean las mismas. En este sentido, pretendimos ver si la carotenogénesis está alterada en nuestro mutante, dado que presenta acumulación exacerbada de TAGs, para poder establecer un nuevo mecanismo regulador de esta ruta biosintética que estuviera mediado por los inosítoles polifosfato.

En primer lugar, se realizó un experimento en luz estándar ($50 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$), empleando como condición un tratamiento con norflurazón (NF) durante 24 h. El norflurazón es un inhibidor de la fitoeno desaturasa (PDS), enzima que actúa sobre el fitoeno en una de las primeras etapas de la ruta de carotenogénesis. De esta forma, al limitar la entrada de carbono en la ruta pretendimos identificar posibles diferencias en la reordenación de los carotenoides ya sintetizados entre el WT y *vip1-1*. De forma significativa, variaron las mismas especies químicas para ambas variantes de *C. reinhardtii*: violaxantina, anteraxantina, zeaxantina y α -caroteno (**Fig.6a**).

Atendiendo a las diferencias entre el fenotipo WT y el mutante *vip1-1*, es interesante comentar que no existen diferencias significativas en luz estándar entre los controles del WT y *vip1-1* en ningún carotenoide. Sin embargo, cuando tratamos a las células con NF, sí se manifiestan diferencias significativas entre el silvestre y el mutante. La violaxantina y el β -caroteno se acumulan menos en *vip1-1* que en WT bajo efecto de NF. En cambio, la zeaxantina se acumula en mayor medida en el mutante. Esto indica

un incremento de la activación del ciclo de las xantofilas en *vip1-1*, donde los carotenoides violaxantina y β -caroteno son convertidos en zeaxantina.

Tras comprobar que el mutante *vip1-1* tiene tendencia a acumular más zeaxantina que WT decidimos comprobar la acumulación de carotenoides en WT y *vip1-1* en condiciones de alta luz ($1000 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$). La alta irradiancia es un estímulo que activa el ciclo de las xantofilas aumentando la proporción de zeaxantina, debido a sus propiedades fotoprotectoras³². De todos los carotenoides cuantificados en estas condiciones, *vip1-1* demostró acumular menos violaxantina y más zeaxantina que el WT de forma significativa (**Fig.6b**), mostrando de nuevo una activación más fuerte del ciclo de las xantofilas.

Un parámetro empleado a menudo para medir el estado del ciclo de las xantofilas es el estado de de-epoxidación, expresado como $\frac{\text{anteraxantina} + \text{zeaxantina}}{\text{anteraxantina} + \text{zeaxantina} + \text{violaxantina}}$. El estado de de-epoxidación de la estirpe silvestre y de *vip1-1* fue calculado en cada situación, y se recoge en la Tabla II. En todos los casos *vip1-1* mostró un mayor estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas.

Tabla II. Estado de de-epoxidación de WT y *vip1-1*, en condiciones control, bajo estrés por norflurazón (NF) y en alta luz (HL).

Estado de de-epoxidación	Control	NF	HL
WT	0.2448	0.4955	0.6874
<i>vip1-1</i>	0.3194	0.7183	0.7878

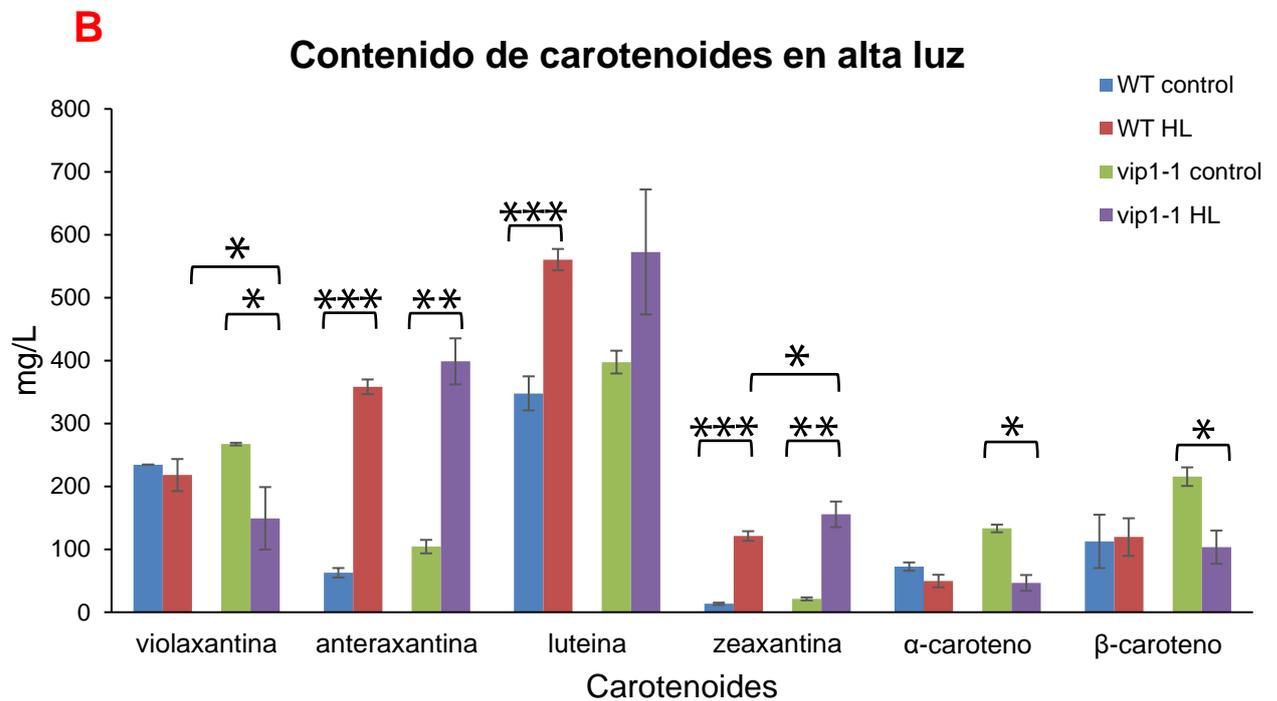
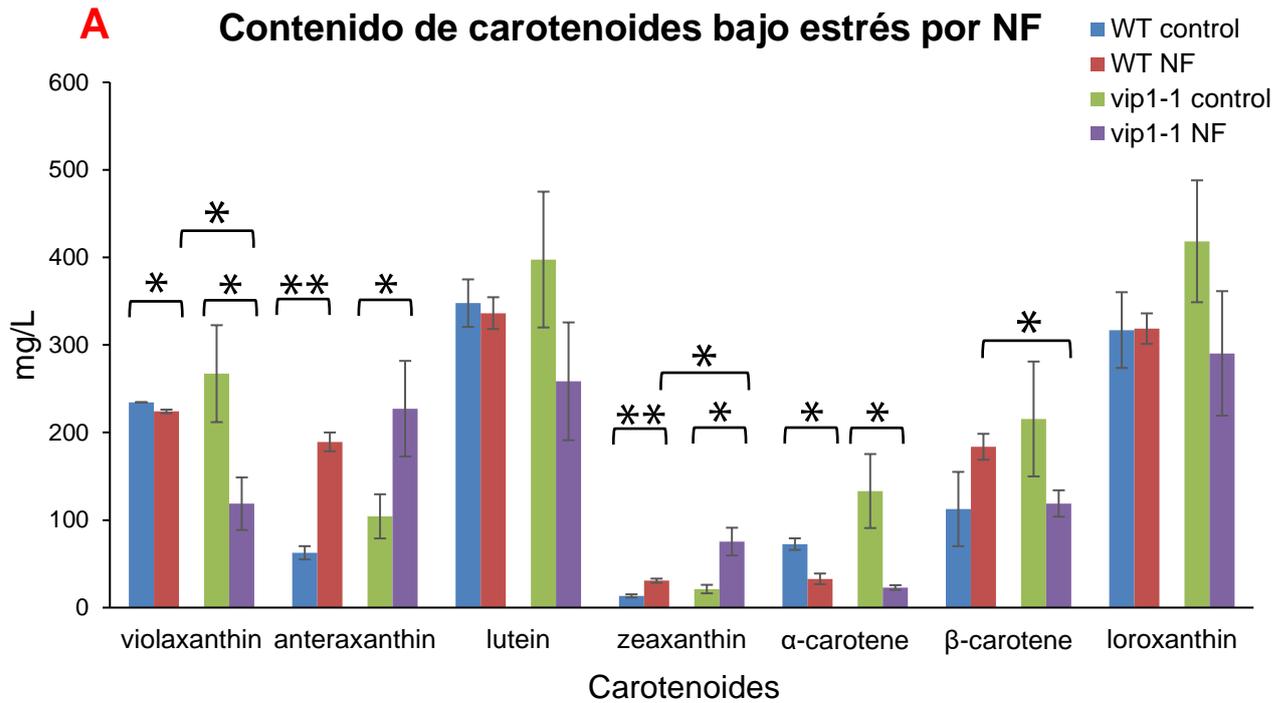


Figura 6. Acumulación de carotenoides en WT y *vip1-1*, en presencia de NF o alta luz. Se representa el WT control (■), y en el tratamiento con NF o alta luz (■); *vip1-1* en control (■), y en el tratamiento correspondiente con (■). Los valores obtenidos están normalizados por gramo de peso seco para cada réplica. Las diferencias significativas se marcan con 1, 2 o 3 asteriscos (p-valor inferior a 0,05, 0,01 o 0,001 respectivamente). **A)** Niveles de carotenoides en WT y *vip1-1*, en

condiciones control (TAP) y en presencia del inhibidor norflurazón (TAP + NF). **B)** Niveles de carotenoides en WT y *vip1-1* en luz control y alta luz.

5.4 La inhibición de la biosíntesis de carotenoides incrementa más la autofagia en *vip1-1* que en WT

Los carotenoides son compuestos de gran importancia para la estabilidad y la fotoprotección del cloroplasto en *C. reinhardtii*. De hecho, problemas en la biosíntesis de carotenoides provocan un aumento en el proceso de reciclaje celular llamado autofagia²⁷. Por este motivo, llevamos a cabo una medida de actividad autofágica empleando como marcador la proteína ATG8 en un inmunoblot, cuyos resultados se muestran en la **Fig.7**. ATG8 es una proteína que se procesa por la cistein-proteasa llamada ATG4 que libera uno de sus extremos para que se produzca la conjugación de ATG8 (lipidación). Esto ocurre cuando el proceso se activa y el autofagosoma comienza a formarse en el citosol⁶². La aparición de las formas lipidadas de ATG8 son el indicativo de que este proceso se está activando en las células y de que por tanto debe existir un estrés que esté inactivando a la quinasa TOR, principal regulador de este proceso.

Teniendo en cuenta que en condiciones de inhibición de la biosíntesis de carotenoides se había determinado previamente una activación de la autofagia²⁷; en este punto realizamos la siguiente aproximación para poder establecer si los inositoles polifosfato están implicados en la regulación de este proceso. Para ello, monitorizamos por inmunoblot la proteína ATG8 en muestras de WT y *vip1-1* tratadas con hambre de N y con el inhibidor NF. Los resultados indicaron que la autofagia medida en el WT es mayor que en *vip1-1* en condiciones de hambre de N, pero el mutante *vip1-1* mostró mayores niveles que el silvestre cuando la biosíntesis de carotenoides fue inhibida mediante NF. Esta desregulación en la activación de la autofagia es indicativo de una posible regulación mediada por las moléculas inositoles, que puede o no estar relacionada con la actividad TOR y que será uno de los siguientes pasos a investigar.

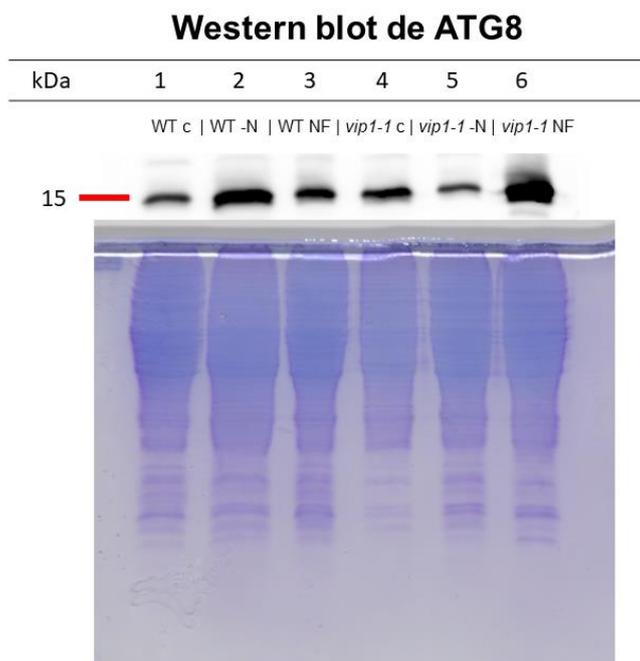


Figura 7. Western blot de la proteína ATG8 para WT y *vip1-1* en condiciones control, hambre de N (TAP -N) y en presencia de norflurazón (NF) durante 24 h. Se muestran bajo las bandas la carga de proteína de cada carril, empleando la tinción de azul de Coomassie. Las muestras son: 1) WT control 2) WT en hambre de N 3) WT tras 24 h bajo efecto de NF 4) *vip1-1* control 5) *vip1-1* en hambre de N 6) *vip1-1* tras 24 h bajo efecto de NF. El NF se empleó a una concentración de 20 μ M.

5.5 Perfil metabólico de *vip1-1* en alta luz.

En vistas a las diferencias comentadas con respecto a los carotenoides y al efecto del NF en la autofagia, decidimos realizar un estudio metabólico general de *vip1-1* en condiciones de baja y alta luz, con la intención de encontrar pistas sobre la alteración metabólica que sufre el mutante en alta luz y su posible conexión con el metabolismo del carbono. Como resultado, detectamos distintas áreas del metabolismo celular afectadas en *vip1-1*.

En primer lugar observamos una desregulación del α -cetoglutarato y del oxaloacetato, ambos intermediarios del ciclo de Krebs (**Fig.8a**). Para ambas moléculas, el irradiar con alta luz provocó comportamientos opuestos en las variantes, puesto que en el silvestre los niveles de oxaloacetato y α -cetoglutarato descendieron mientras que en *vip1-1* sus niveles se vieron aumentados. El ciclo de Krebs dota de disponibilidad de

energía a la célula, en forma de NADH y ATP. En consonancia con la alteración del ciclo de Krebs, los niveles de las adenosinas fosforiladas (AMP, ADP y ATP) también experimentaron una desregulación, en especial con los niveles de AMP en baja luz y con los niveles de ADP en alta luz (**Fig.8a**).

En el metabolismo de la célula, es esencial que los azúcares se conjuguen con grupos fosfato o grupos adenosil difosfato para entrar a formar parte de las rutas biosintéticas. Al centrar la atención en estas moléculas también observamos ciertas diferencias. En el caso de la glucosa, el mutante *vip1-1* acumuló más UDP-glucosa y menos ADP-glucosa que el silvestre cuando fueron expuestos a condiciones de alta luz. Por el contrario, se vieron incrementados en el mutante azúcares fosforilados como la sacarosa-6P (alta luz) o la ribosa-5P (baja luz) (**Fig.8b**).

Otra ruta metabólica que también se vio afectada es la ruta de las pentosas fosfato. En condiciones de alta luz, *vip1-1* aumenta el flujo de carbono hacia esta ruta, puesto que el "pool" de azúcares interconvertibles ribulosa-5P y xilulosa-5P es mayor en el mutante que en el silvestre (**Fig.8b**). Sin embargo, la medida de NADPH acumulado para esa misma condición fue notablemente menor para *vip1-1*. Este perfil metabólico nos sugiere una desregulación a distintos niveles del metabolismo, y no sólo a la acumulación de lípidos previamente descrita¹.

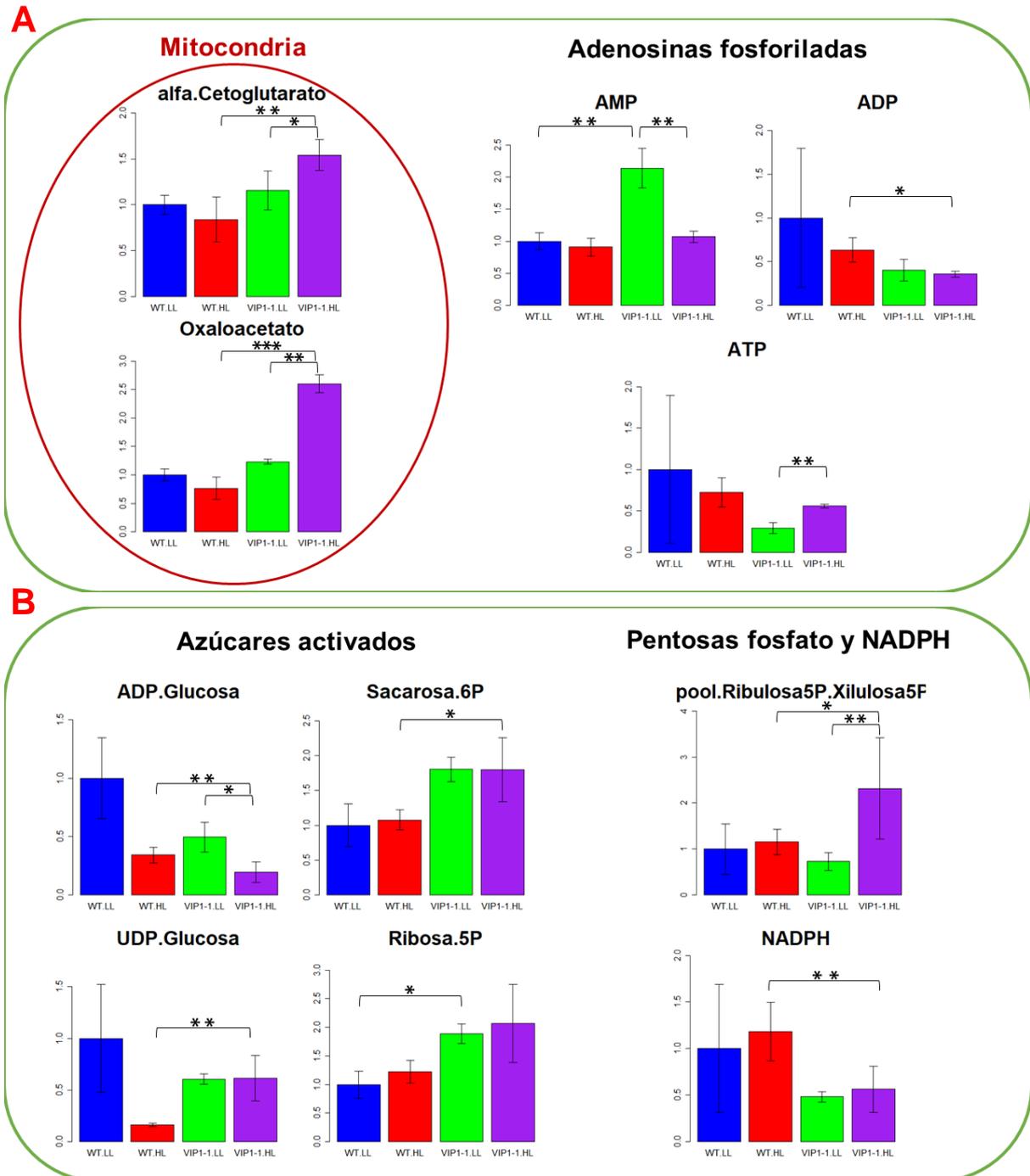


Figura 8. Representación de la extracción de metabolitos en alta luz. Las muestras representadas son: WT en baja luz (■ WT.LL); WT en alta luz (■ WT.HL); *vip1-1* en baja luz (■ VIP1-1.LL) y *vip1-1* en alta luz (■ VIP1-1.HL). **A)** Metabolitos relacionados con la mitocondria (izquierda) y con el nucleósido adenosina (derecha) **B)** Metabolitos relacionados con la activación de azúcares (izquierda) y con el ciclo de las pentosas fosfato (derecha).

6. DISCUSIÓN

Los carotenoides son compuestos esenciales presentes en todos los organismos fotosintéticos con numerosos beneficios para la salud humana²⁸. Por tanto, la investigación acerca de la regulación de su biosíntesis y sus funciones en la célula son de especial interés, tanto en investigación básica como en el sector biotecnológico. En este estudio, hemos empleado el mutante *vip1-1* en el que se han descrito previamente alteraciones en su metabolismo del carbono, con una sobreacumulación de lípidos¹. Esta desregulación es producto de niveles alterados de las moléculas inositoles polifosfato (InsP), cuyas funciones en la célula no están completamente elucidadas aún. De esta forma, procedimos a analizar si esta desregulación del metabolismo se extiende también a la biosíntesis de carotenoides.

Nuestros estudios respaldan que la alteración de los niveles de InsP en *vip1-1* tiene como consecuencia una sobreactivación del ciclo de las xantofilas, que se traduce en una mayor acumulación de zeaxantina, a la que anteriormente se han asociado funciones fotoprotectoras⁶³. Esto propone que, o bien los InsP participan directamente en la regulación de los carotenoides o bien la activación del ciclo de las xantofilas es un mecanismo compensatorio de otro estrés que tiene lugar en *vip1-1*. Previa observaciones acerca del mutante muestran que el fosfoproteoma del fotosistema II de *vip1-1* se encuentra modificado⁵⁸, y se ha descrito que estas fosforilaciones controlan los mecanismos de reparación del fotosistema en otros organismos fotosintéticos⁶⁴. Por tanto, es probable que nuestros resultados se deban a un peor funcionamiento del aparato fotosintético, y la activación del ciclo de las xantofilas sea un mecanismo de compensación contra estrés oxidativo. Con anterioridad se habían relacionado defectos en la biosíntesis de carotenoides con un aumento de la autofagia, proceso de reciclaje de componentes celulares dañados²⁷. En principio, este aumento de la autofagia se asoció con que defectos en esta biosíntesis provocan un mayor estrés oxidativo. En nuestro caso, hemos observado que al inhibir la biosíntesis de carotenoides, *vip1-1* mostró mayor incremento de la autofagia que el WT. Los carotenoides poseen importantes funciones estructurales en el fotosistema II²², por lo que la mayor actividad autofágica de *vip1-1* sugiere que el fotosistema II es más vulnerable a limitaciones en la disponibilidad de carotenoides ante una

desregulación de los InsP. Por ello, es posible que el funcionamiento aberrante del aparato fotosintético en *vip1-1* se deba a problemas estructurales, y el estrés oxidativo derivado de estos problemas se acentúen al inhibir la biosíntesis de carotenoides.

Tras esto, decidimos realizar un estudio metabólico para intentar descubrir otras rutas afectadas. Nuestros resultados apuntan a una conexión con intermediarios del ciclo de Krebs, como son el α -cetoglutarato y el oxaloacetato. Para el caso de éste último, es posible que su acumulación en *vip1-1* en condiciones de alta luz también esté relacionada con su función de exportación de poder reductor en el cloroplasto. El oxaloacetato en el cloroplasto es reducido a malato, y es en forma de malato como es exportado al exterior del orgánulo⁶⁵. Previamente se ha descrito que *vip1-1* presenta regulación aberrante del flujo cíclico de electrones⁵⁸, un mecanismo activado en alta luz que, a diferencia del flujo en Z, no produce poder reductor. Además, los niveles de NADPH en *vip1-1* resultaron ser inferiores a los del silvestre. Por tanto, una menor acumulación de poder reductor en el cloroplasto de *vip1-1* también podría estar contribuyendo a estos elevados niveles de oxaloacetato.

Por otro lado, también detectamos menores niveles de ADP-glucosa en el mutante en alta luz. La biosíntesis del almidón requiere una activación de la glucosa, mediante su conversión a ADP-glucosa⁶⁵. Esto, junto con observaciones previas sobre la acumulación de triacilgliceroles en *vip1-1*¹, respalda el papel de los InsP como mediadores acerca del flujo de carbono hacia sus distintas formas de reserva. Además, la ruta de las pentosas fosfato se mostró alterada en *vip1-1* en alta luz, reflejado en una acumulación de sus intermediarios xilulosa-5P y ribulosa-5P. La ruta de las pentosas fosfato es capaz de operar consumiendo ATP para generar ribosa-5P o produciendo NADPH con liberación de CO₂⁶⁵. Puesto que los niveles de NADPH acumulado en *vip1-1* en condiciones de alta luz fueron menores, nuestros datos apoyan que esta ruta se encuentra funcionando principalmente en su modalidad no oxidativa cuando *vip1-1* es irradiado con elevada intensidad lumínica.

7. CONCLUSIONES

Los inositoles polifosfato están implicados en la regulación del ciclo de las xantofilas. Basándonos en la bibliografía disponible, proponemos que la falta de inositoles pirofosfato provoca un estrés, y la activación del ciclo de las xantofilas es consecuencia de ello.

- La deficiencia de inositoles pirofosfato provoca mayor actividad autofágica al inhibir la biosíntesis de carotenoides, moléculas con función estructural en el aparato fotosintético. Por tanto, la ausencia de inositoles pirofosfato aumenta la vulnerabilidad de este aparato, probablemente debido a problemas estructurales que provocan estrés oxidativo en el cloroplasto.
- En estrés por alta luz, el ciclo de Krebs y la ruta de las pentosas fosfato se ven modificadas por la ausencia de los inositoles pirofosfato. En concreto, la ruta de las pentosas fosfato parece estar funcionando principalmente de forma no oxidativa. Estos resultados proponen una conexión moduladora de los inositoles polifosfato con la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Más investigación será necesaria para esclarecer si estas alteraciones son mecanismos de compensación contra estrés o son producto de una regulación ejercida por los inositoles pirofosfato desconocida hasta la fecha.

8. REFERENCIAS

1. Couso, I. *et al.* Synergism between inositol polyphosphates and TOR kinase signaling in nutrient sensing, growth control, and lipid metabolism in chlamydomonas. *Plant Cell* **28**, 2026–2042 (2016).
2. Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J. & Mayfield, S. P. Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. *Plant Journal* **82**, 523–531 (2015).
3. Cezare-Gomes, E. A. *et al.* Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology* vol. 188 602–634 (2019).
4. Freudenberg, R. A., Baier, T., Einhaus, A., Wobbe, L. & Kruse, O. High cell density cultivation enables efficient and sustainable recombinant polyamine production in the microalga Chlamydomonas reinhardtii. *Bioresource Technology* **323**, (2021).
5. Spreitzer, R. J. & Mets, L. J. Non-mendelian mutation affecting ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase structure and activity. *Nature* **285**, 114-115 (1980).
6. Cournac, L. *et al.* In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology* **129**, 1921–1928 (2002).
7. Minagawa, J. & Tokutsu, R. Dynamic regulation of photosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Journal* **82**, 413–428 (2015).

8. Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Matsuo, T., Yamasaki, T. & Minagawa, J. The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature Communications* **10**, (2019).
9. Purton, S. & Rochaix, J.-D. Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant using a genomic cosmid library. *Plant Molecular Biology* **24**, 376-388 (1994).
10. Neupert, J., Karcher, D. & Bock, R. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant Journal* **57**, 1140–1150 (2009).
11. Baier, T., Wichmann, J., Kruse, O. & Lauersen, K. J. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research* **46**, 6909–6919 (2018).
12. Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C. & Baulcombe, D. C. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **447**, 1126–1129 (2007).
13. Shin, S. E. *et al.* CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* **6**, (2016).
14. Bohne, F. & Linden, H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica* **1579**, 26-34 (2002).
15. Couso, I. *et al.* Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology* **47**, 223–232 (2012).
16. Tran, Q. G. *et al.* Enhancement of B-carotene production by regulating the autophagy-carotenoid biosynthesis seesaw in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology* **292**, (2019).
17. Merchant, S. S. *et al.* The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* **318** 245-250, (2007).
18. Zones, J. M., Blaby, I. K., Merchant, S. S. & Umen, J. G. High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals continuous cell and metabolic differentiation. *Plant Cell* **27**, (2015).
19. Boyle, N. R. *et al.* Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, (2012).
20. Salomé, P. A. & Merchant, S. S. Co-expression networks in *Chlamydomonas* reveal significant rhythmicity in batch cultures and empower gene function discovery. *Plant Cell* **33**, (2021).
21. Lohr, M. Carotenoids. In *The Chlamydomonas sourcebook* (2008).
22. Trebst, A. & Depka, B. Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* **400**, 359-362 (1997).
23. Pineau, B., Gérard-Hirne, C. & Selve, C. Carotenoid binding to photosystems I and II of *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown under weak light or exposed to intense light. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 73-85 (2001).
24. Fernández-Marín, B., Roach, T., Verhoeven, A. & García-Plazaola, J. I. Shedding light on the dark side of xanthophyll cycles. *New Phytologist* **230**, 1336–1344 (2021).
25. Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z. & Ughy, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* vol. 52 539–561 (2013).
26. Esteban, R., Moran, J. F., Becerril, J. M. & García-Plazaola, J. I. Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany* **119**, (2015).

27. Pérez-Pérez, M. E., Couso, I. & Crespo, J. L. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **8**, 376–388 (2012).
28. Gong, M. & Bassi, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances* **34** (2016).
29. Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J. & Chen, F. Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. *Marine Drugs* vol. 19 (2021).
30. Singh, D., Barrow, C. J., Mathur, A. S., Tuli, D. K. & Puri, M. Optimization of zeaxanthin and β -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **4**, (2015).
31. Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* vol. 74 (2020).
32. Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Havaux, M. & Bassi, R. Enhanced photoprotection by protein-bound vs free xanthophyll pools: A comparative analysis of chlorophyll b and xanthophyll biosynthesis mutants. *Molecular Plant* **3**, 576–593 (2010).
33. μ *et al.* Photophysics of the carotenoides associated with the xanthophyll cycle in the Photosynthesis. *Photosynthesis Research* **41**, 389-395 (1994)
34. Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan. Photoinhibition and Zeaxanthin Formation in Intact Leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* **84** (1987).
35. Berman, J. *et al.* Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews* vol. 14 727–743 (2015).
36. Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Morillas-España, A. & Ación-Fernández, F. G. Extremophile microalgae as feedstock for high-value carotenoids: A review. *International Journal of Food Science and Technology* vol. 56 4934–4941 (2021).
37. Liu, C. *et al.* Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology* vol. 337 (2021).
38. Cazzonelli, C. I. & Pogson, B. J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* vol. 15 (2010).
39. Zhou, X. *et al.* Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 3558–3563 (2015).
40. Rossel, J. B., Wilson, I. W. & Pogson, B. J. Global changes in gene expression in response to high light in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**, 1109–1120 (2002).
41. Rockholm, D. C. & Yamamoto, H. Y. Violaxanthin De-Epoxidase' Purification of a 43-Kilodalton Luminal Protein from Lettuce by Lipid-Affinity Precipitation with Monogalactosyldiacylglyceride. *Plant Physiol* vol. 110 (1996).
42. Vila, M., Couso, I. & León, R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry* **43**, (2008).
43. Couso, I., Cordero, B. F., Vargas, M. Á. & Rodríguez, H. Efficient heterologous transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* npq2 mutant with the zeaxanthin epoxidase gene isolated and characterized from *Chlorella zofingiensis*. *Marine Drugs* **10**, (2012).
44. Li, Z. *et al.* Evolution of an atypical de-epoxidase for photoprotection in the green lineage. *Nature Plants* **2**, (2016).
45. Stanley, L. & Yuan, Y. W. Transcriptional Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Plants: So Many Regulators, So Little Consensus. *Frontiers in Plant Science* vol. 10 (2019).
46. Werth, E. G. *et al.* Investigating the effect of target of rapamycin kinase inhibition on the *Chlamydomonas reinhardtii* phosphoproteome: from known homologs to new targets. *New Phytologist* **221**, 247–260 (2019).

47. Cridland, C. & Gillaspay, G. Inositol pyrophosphate pathways and mechanisms: What can we learn from plants? *Molecules* vol. 25 (2020).
48. Williams, S. P., Gillaspay, G. E. & Perera, I. Y. Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants. *Frontiers in Plant Science* vol. 6 (2015).
49. Vashishth, A., Ram, S. & Beniwal, V. Cereal phytases and their importance in improvement of micronutrients bioavailability. *3 Biotech* vol. 7 (2017).
50. Woll, K. A. & van Petegem, F. Calcium-release channels: Structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors. *Physiological Reviews* vol. 102 209–268 (2022).
51. Zhu, H., Bhattacharyya, B. J., Lin, H. & Gomez, C. M. Skeletal muscle IP3R1 receptors amplify physiological and pathological synaptic calcium signals. *Journal of Neuroscience* **31**, (2011).
52. Kelly, P. T., MacKinnon, R. L., Dietz, R. v., Maher, B. J. & Wang, J. Postsynaptic IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release modulates synaptic transmission in hippocampal neurons. *Molecular Brain Research* **135**, (2005).
53. Lee, Y.-S., Mulugu, S., York, J. D. & O'shea, E. K. *Regulation of a Cyclin-CDK-CDK Inhibitor Complex by Inositol Pyrophosphates*.
54. Lev, S. *et al.* Fungal inositol pyrophosphate IP7 is crucial for metabolic adaptation to the host environment and pathogenicity. *mBio* **6**, (2015).
55. Macbeth, M. R. *et al.* *Inositol Hexakisphosphate Is Bound in the ADAR2 Core and Required for RNA Editing*. <https://www.science.org> (2022).
56. Sheard, L. B. *et al.* Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, (2010).
57. Imamura, S. *et al.* TOR (target of rapamycin) is a key regulator of triacylglycerol accumulation in microalgae. *Plant Signaling and Behavior* **11**, (2016).
58. Couso, I. *et al.* Inositol polyphosphates and target of rapamycin kinase signalling govern photosystem II protein phosphorylation and photosynthetic function under light stress in *Chlamydomonas*. *New Phytologist* **232**, 2011–2025 (2021).
59. Sager, R. & Ramanis, Z. Genetic studies of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Symp Soc Exp Biol* **24**, (1970).
60. Harris, E. H. Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. in *The Chlamydomonas sourcebook* (2008).
61. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology* vol. 7 (2016).
62. Loewith, R. & Hall, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* vol. 189 (2011).
63. Bonente, G. *et al.* Analysis of LHCSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biology* **9**, (2011).
64. Koivuniemi, A., Aro, E. M. & Andersson, B. Degradation of the D1- and D2-Proteins of Photosystem II in Higher Plants Is Regulated by Reversible Phosphorylation. *Biochemistry* **34**, (1995).
65. Johnson, X. & Alric, J. Central carbon metabolism and electron transport in *chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic Cell* **12**, (2013).

Agradecimientos: A la Dra. Mercedes García y el Dr. Francisco J. Romero por acogerme en su laboratorio; a María Morales, Elena García y Christina Arvanitidou por su ayuda; y en especial, a la Dra. Inmaculada Couso por su paciencia y sus enseñanzas