

COMFUTURO MEMORIA FINAL 2018



ComFuturo
Ciencia, Juventud
y Talento

PROYECTO "SACCO2" *Sistemas Algaes para la Captación de CO2*

➤ ÍNDICE

1. Resumen de logros obtenidos.....	pág. 2
2. Detalle de resultados alcanzados en relación con cada uno de los objetivos e hitos propuestos.....	pág. 3
3. Objetivos e hitos no cubiertos. Justificación	pág. 13
4. Producción científica.....	pág. 13
→ Indicadores.....	pág. 13
5. Divulgación.....	pág. 14
→ Indicadores.....	pág. 14
6. Resultados susceptibles de explotación comercial.....	pág. 14
7. Anexos.....	pág. 16

Resumen de Logros obtenidos

Resumen, de 500 palabras máximo, explicando los resultados o logros obtenidos gracias al Proyecto ComFuturo. No se trata de describir aquí cuál es el objetivo del proyecto, sino de explicar qué consecuencias o avances han generado estas investigaciones que no se hubieran obtenido de no haberse abordado el proyecto. Este texto irá destinado tanto al público general como a las entidades que apoyan económicamente el Programa, debiendo usarse el **lenguaje más sencillo y divulgativo** posible y evitando, en la medida de lo posible, la terminología técnica. Deben quedar claramente descritos **el impacto, alcance y beneficios que los resultados obtenidos tienen sobre la sociedad**

El uso de combustibles fósiles desde la revolución industrial ha modificado el estado actual de la atmósfera, generando una acumulación de gases como el CO₂ y provocando inminentemente el llamado cambio climático. Hoy en día los organismos fotosintéticos y más concretamente los microorganismos, son los únicos captadores naturales de CO₂. Estos microorganismos suponen una serie de ventajas sobre las plantas como por ejemplo, la eficiencia en la captación de carbono con respecto a su tamaño, de ahí a que se consideren que los principales sumideros de CO₂ se encuentran en los océanos y grandes masas de agua que son su hábitat natural.

Recientemente, hemos descubierto que la regulación metabólica del carbono en microalgas viene orquestada por unas moléculas señalizadoras llamadas inositoles polifosfato (IP). Este hallazgo nos permite ver cómo estas moléculas actúan a modo de código que las células interpretan para modular su metabolismo. Además estas moléculas son responsables de la capacidad de almacenamiento de las células, concretamente en forma de lípidos que son ampliamente utilizados en la industria del biodiesel. La siguiente pregunta era si estas moléculas están también implicadas en la captación de CO₂ y cuál es su potencial importancia en la mitigación de CO₂. En el proyecto SACCO2 comenzamos por determinar qué microalgas podíamos considerar como grandes captadoras de CO₂ (principalmente género *Chlorella*) y la comparamos con nuestro organismo modelo llamado *Chlamydomonas reinhardtii*. Utilizamos además organismos mutantes que nos determinaron la relación entre capacidad fotosintética (fijación de CO₂) y la síntesis de inositoles polifosfato. Comparando distintos parámetros, concluimos que existe un denominador común entre todas las estirpes de microalgas en presencia de distintas concentraciones de CO₂ que es la acumulación de ácido fítico (IP6) algo especialmente reseñable en el caso de las grandes captadoras de CO₂. IP6 es el inositol polifosfato más abundantes en las células por lo que no es de extrañar que la modulación de sus niveles conlleve la regulación metabólica de este proceso. Además mediante el uso de mutantes podemos decir que la capacidad de almacenamiento de carbono en sumideros (almidón y lípidos) es competitiva y viene en gran parte determinada por los niveles de IP7 e IP8 que se adaptan también a los niveles de CO₂ en el medio. Más recientemente, hemos podido observar la importancia que los niveles de IPs tienen sobre la adaptación de los fotosistemas a las condiciones de estrés lumínico a nivel molecular y cómo determinan su correcto funcionamiento. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de estas moléculas en la regulación del flujo de carbono, algo que supone un gran impacto dentro del marco de la captación y utilización de CO₂. El uso de organismos fotosintéticos supone una solución sostenible a la acumulación de este gas invernadero en la atmósfera y el hecho de que tengamos la capacidad de mejorar esta captación y utilización del carbono es del todo beneficioso para la industria y la sociedad en un intento de frenar el problema del calentamiento global del planeta.

Detalle de resultados alcanzados en relación con cada uno de los objetivos e hitos propuestos

Detallar los resultados alcanzados en relación con cada uno de los objetivos e hitos propuestos en la memoria de solicitud al Programa

En este proyecto he estado desarrollando los siguientes puntos cuyos resultados detallaré a continuación.

- Escrutinio de cepas de microalgas verdes con alta captación de CO₂
- Valoración de la capacidad fotosintética de estas microalgas
- Definir la relación entre niveles de Inositoles Polifosfatos (IP) y captación de CO₂
- Establecimiento del mecanismo molecular por el que los IPs regulan la capacidad fotosintética.

Escrutinio de cepas de microalgas verdes con alta captación de CO₂

- **Valoración del crecimiento de distintas cepas del género *Chlorella***

Hemos seleccionado las estirpes *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella zofigiensis*, teniendo en cuenta que se han descrito como las estirpes que mayor capacidad de captación de CO₂ presentan (Hempel et al., 2012; Moreira and Pires, 2016). Todas tienen un crecimiento óptimo en medio Arnon (Arnon DI et al., 1974) que se suplementó con distintas concentraciones de CO₂ (máx. 5%) para valorar su crecimiento y su capacidad fotosintética. *Chlorella vulgaris* y *sorokiniana*, especialmente esta última, son las que mayor densidad celular alcanzan en menor tiempo y además su crecimiento es menos sensible a las concentraciones crecientes de CO₂ (Fig.1 A y B). Es interesante destacar que, por el contrario, *C. zofigiensis* es especialmente sensible a bajas concentraciones de CO₂ llegando prácticamente a detener su crecimiento en presencia únicamente de aire (Fig. 1 A). Esto nos hace pensar que no estamos ante un alga que sea capaz de captar CO₂ de forma eficiente en condiciones limitantes por lo que probablemente será descartada en estudios comparativos con estirpes recombinantes.

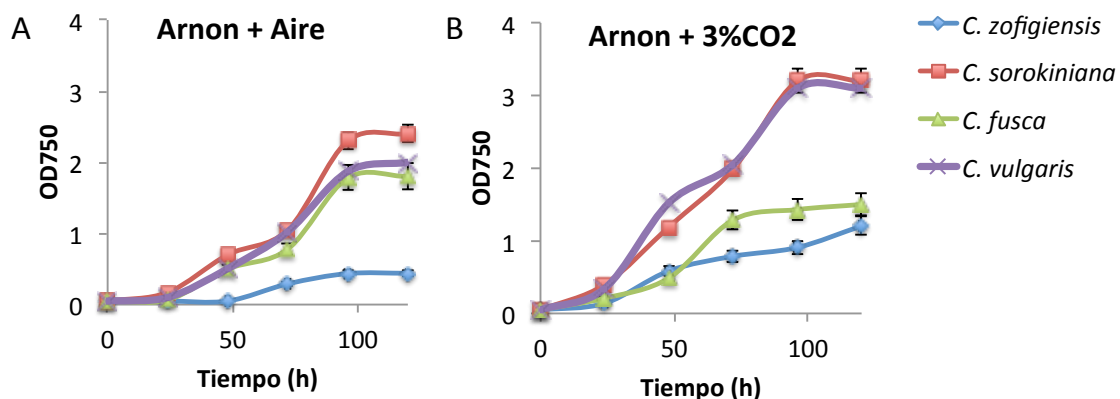


Fig. 1 : Curvas de crecimiento de las cuatro estirpes del género *Chlorella* estudiadas. A, Densidad Óptica (750nm) en presencia de aire únicamente. B, Densidad Óptica (750nm) en presencia de aire suplementado con 3% de CO₂ (esta concentración fue la óptima encontrada para el crecimiento de los cultivos).

Valoración de la capacidad fotosintética de estas microalgas

- **Valores Fv/Fm en distintas concentraciones de CO₂**

Utilizamos varios parámetros para evaluar la capacidad fotosintética de estas estirpes en las distintas condiciones de CO₂. El primero de ellos fue Fv/Fm que es el parámetro que mide la capacidad fotosintética máxima (paso de oscuridad a luz). Por un lado, encontramos que no existen grandes diferencias, al menos en lo que valores se refiere entre estirpes como *C. fusca*,

C. sorokiniana y *C. vulgaris* que mantienen un valor de alrededor de 0,7 incluso en las condiciones más limitantes de CO₂ (Tabla I). Sin embargo, *C. zofigiensis* y *Chlamydomonas reinhardtii* presentan valores algo más bajos, lo que probablemente se corresponde con una captación de CO₂ menos eficiente. Este parámetro también se encuentra reducido en estirpes como *npq1* y *npq2* que son mutantes de *Chlamydomonas* donde se ha descrito su reducida capacidad fotosintética al presentar un quenching no fotoquímico (NPQ) aberrante con respecto al silvestre (Tabla I). En términos generales, esto quiere decir que no son capaces de disipar el exceso de energía de forma eficiente, de manera que causa un estrés celular que afecta negativamente al funcionamiento de los fotosistemas. Cabe destacar también que no observamos que Fv/Fm se adapte a distintas condiciones de CO₂ en los organismos silvestres. Sin embargo, en organismos con NPQ aberrantes (*npq1* y *npq2*) Fv/Fm aumenta a concentraciones crecientes de CO₂. Esto refleja la capacidad limitada de captar de CO₂ que tienen estos mutantes.

Tabla I: Medida de la eficiencia fotosintética (valores Fv/Fm) en distintas microalgas en concentraciones crecientes de CO₂ suplementado. Algas del género *Chlorella*: *C. fusca*, *C. sorokiniana* y *C. vulgaris*. También se realizaron controles con el silvestre de *Chlamydomonas reinhardtii* (WT *C. reinhardtii*) y mutantes afectados en la regulación de la fotosíntesis (*npq1* y 2) y un mutante con niveles IP7 e IP8 altamente reducidos (*vip1-1*). Estas medidas fueron obtenidas por triplicado utilizando el DUAL-PAM100 de Waltz.

	Fv/Fm							
CO ₂	<i>C fusca</i>	<i>C sorokiniana</i>	<i>C zofigiensis</i>	<i>C vulgaris</i>	WT <i>C reinhardtii</i>	<i>npq1</i>	<i>npq2</i>	<i>vip1-1</i>
0%	0,72	0,69	0,63	0,71	0,62	0,46	0,38	0,65
1%	0,73	0,75	0,59	0,71	0,69	0,5	0,4	0,63
3%	0,73	0,75	0,61	0,73	0,67	0,52	0,53	0,62
5%	0,74	0,76	0,53	0,71	0,69	0,57	0,57	0,64

- **Tasa de transferencia de electrones (ETR) en las algas estudiadas**

La conversión de la energía de la luz en energía química durante la fotosíntesis requiere de la transferencia de electrones entre distintos componentes de la cadena fotosintética desde la fotólisis del agua hasta dar lugar a la generación de energía y poder reductor. Mediante el aparato DUAL-PAM 100 se puede determinar la oxidación/reducción de los componentes de esta cadena, concretamente la plastoquinona, y emitir unos valores que se corresponden con la capacidad de transferencia de electrones que tienen los fotosistemas en cada momento. En nuestro caso particular, utilizamos curvas de luz para ver el punto de saturación de la transferencia (Fig. 2). Este punto varía en las distintas estirpes. En el caso de la estirpe silvestre *Chlamydomonas reinhardtii* o del mutante *vip1-1* (mutante deficiente en IP7 e IP8) la saturación se alcanza en valores de aproximadamente 500 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ (Fig. 2 A y D). Además *vip1-1* presenta los valores más altos de ETR algo que nos hace pensar que podría haber una correlación positiva entre la deficiencia de IP7 e IP8 y la transferencia de electrones de la cadena fotosintética pero necesitamos comprobar esta hipótesis con otros experimentos de medida de captación directa. En condiciones de alta concentración de CO₂, los mutantes *npq*, especialmente el mutante *npq2*, presenta un ETR muy reducido (se satura a una intensidad de aproximadamente 250 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) en comparación con el silvestre (Fig. 2 B y C). Algo que confirma su fenotipo y que nos indica que esta estirpe puede servirnos como control en las medidas de IPs para ver la relación entre la disipación de energía y los niveles de IPs. En cuanto a las estirpes del género *Chlorella* todas presentan una saturación del ETR en un valor más bajo de luz que *Chlamydomonas* (aproximadamente 250 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) aunque los valores máximos obtenidos no se diferencian mucho (Fig. 2 E, F G y H). Pensamos que esto debe ser efecto de una adaptación a la luz diferente en los distintos géneros que se refleja en una saturación más baja. Vemos además como *C. zofigiensis* y *fusca* son las que presentan valores menores de ETR lo que se corresponde también con su crecimiento más lento.

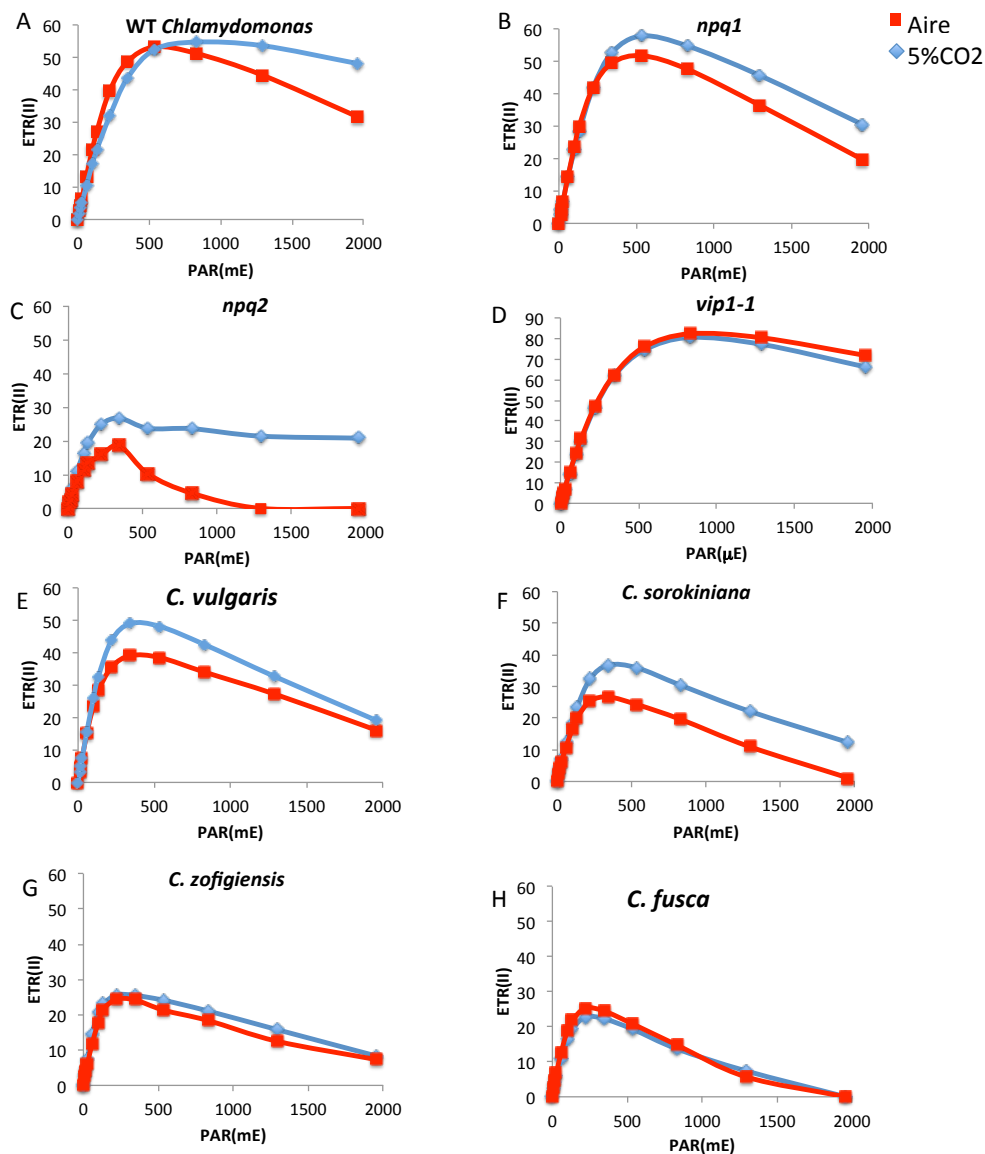


Fig. 2 : Valoración ETR (capacidad de transferencia de electrones del fotosistema) en todas las microalgas utilizadas en alto (5%) y bajo (aire) contenido de CO₂ utilizando curvas de luz.

- **Capacidad de disipar energía mediante el mecanismo fotoprotector “quenching no fotoquímico” (valores NPQ)**

Todos los organismos fotosintéticos (plantas y microorganismos) se pueden encontrar sometidos a un exceso de intensidad lumínica de manera que la capacidad fotosintética tiende a saturarse. Este exceso de energía de excitación por parte de la luz aumenta la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan pigmentos, lípidos e incluso proteínas de la membrana tilacoidal, haciendo menos efectiva la fotosíntesis en el organismo disminuyendo por tanto su capacidad de captar CO₂. Por ello, los organismos fotosintéticos han desarrollado un mecanismo fotoprotector llamado “quenching no fotoquímico” (NPQ) que permite disipar el exceso de energía en forma de calor. Básicamente, este proceso se basa en un cambio conformacional del fotosistema estimulado por la combinación de un gradiente de protones transmembrana, la subunidad S del fotosistema II (PSII) y la conversión de violaxantina en zeaxantina (activación del ciclo de las xantofilas). La formación de zeaxantina y el intermediario anteraxantina disipa la energía fotónica en calor preservando la integridad del PSII. En nuestro caso observamos la evolución del NPQ en ciclos de luz y oscuridad en las distintas microalgas (Fig. 3). Vemos que en general hay pequeñas diferencias en cuanto a la

concentración de CO₂. Se aprecia además que existe una tendencia general a tener NPQ más alto en condiciones de limitación de CO₂ probablemente porque no se necesita tanta energía para su captación ya que se encuentra en condiciones limitantes. Además, en *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* se mantiene NPQ activo incluso en cultivos que se encuentran en fase de oscuridad lo cual puede ser un reflejo de la capacidad de fotoprotección que tienen estas estirpes (Fig. 3 A, E y F). Cabe destacar también el caso de *Chlorella fusca* y *Chlorella zofigiensis* que tienen una respuesta NPQ muy alta en limitación de CO₂ en la fase lumínica y que después se relaja en oscuridad a unos niveles parecidos a las otras estirpes del género (Fig. 3, G y H). Estos resultados podrían indicar que estas estirpes no son tan eficientes como el resto ya que pierden bastante energía, que no son capaces de utilizar para fijar CO₂, cuando éste es limitante. Los mutantes *npq1* (deficiente en zeaxantina), *npq2* (deficiente en violaxantina) y *vip1-1* (deficiente en IP7 e IP8) presentan un NPQ reducido (Fig. 3 B, C y D). Esto es algo que es esperable en los mutantes *npq* pero desconocido para *vip1-1* que en todos los casos sus niveles de NPQ fueron indetectables. Esto podría indicar un fallo en la disipación de energía que estaría también relacionando los IPs con la capacidad de captación de CO₂ en el alga y que es importante valorar.

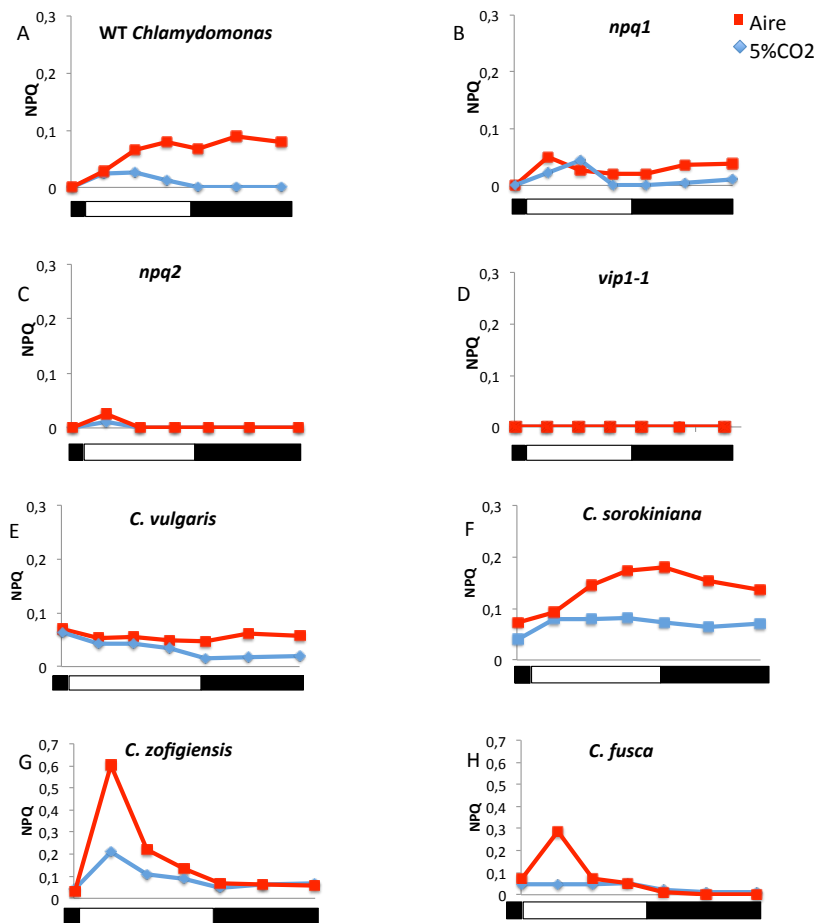


Fig. 3: Evolución NPQ en todas las microalgas utilizadas en alto (5%) y bajo (aire) contenido de CO₂ utilizando ciclos de luz y oscuridad

Monitorización de la capacidad fotosintética de estirpes con niveles de IP aberrantes

- Capacidad fotosintética monitorizada con IMAGING-PAM

Para poder visualizar el comportamiento de la fotosíntesis en organismos verdes se ha desarrollado un equipo capaz de acoplar la medida del PAM a una cámara que capta *in vivo* la

fluorescencia emitida por las células, de tal manera que se puede monitorizar en imágenes los cambios de eficiencia fotosintética a tiempo real en organismos vivos. Utilizando esta técnica quise visualizar cuál era el comportamiento en el mutante *vip1-1* ante el estrés lumínico, ya que hemos visto que según los valores del DUAL-PAM 100 este mutante es incapaz de disipar energía mediante calor (NPQ). Estas curvas nos dan información de la capacidad de adaptación a la luz del organismo y de cómo es capaz de enfrentarse a una situación de estrés lumínico. Realizamos dos tipos de experimentos, uno donde adaptamos los cultivos a dos tipos de luces, luz cámara ($100\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) y alta luz ($800\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) durante 24h y por otro lado utilizamos una cinética de luz alta para ver como responden los cultivos (tiempos cortos).

Durante el primer experimento observamos que mientras el silvestre es capaz de realizar fotosíntesis en condiciones de alta luz (50% aproximadamente) de forma muy parecida al cultivo en luz estándar, el mutante *vip1-1* es incapaz de adaptarse a la luz alta algo que se refleja en su Fv/Fm que se aproxima al 0% (Fig. 4). Esto nos hace suponer que la capacidad de adaptación de las células fotosintéticas al estrés lumínico está relacionado con los niveles de IPs o más concretamente con los niveles de IP7 e IP8.

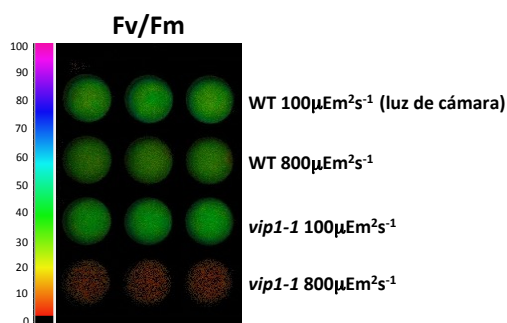


Fig. 4: Imagen IMAGING PAM parámetro Fv/Fm. Los valores de la izquierda representan la correlación de los colores de la imagen con el porcentaje de actividad fotosintética.

Cuando realizamos las curvas de alta luz, observamos que el WT no sufría cambios sustanciales en la capacidad fotosintética global Y(II) posiblemente debido a que tiene NPQ activo sobre todo al comienzo de la cinética. Poco a poco este NPQ se va reduciendo a medida que pasa el tiempo en alta luz pero no llega a ser del todo 0%. Por el contrario *vip1-1* no presenta NPQ ni siquiera al comienzo del experimento y esto se relaciona con una bajada progresiva de la Y(II) que se reduce a la mitad. Estos experimentos nos dicen que los IPs son necesarios para la adaptación al estrés lumínico y que de ellos además depende la eficiencia fotosintética de los organismos (Fig.5). Esto implica que hemos encontrado unas moléculas reguladoras del proceso de captación de CO₂ en organismos fotosintéticos que no se habían descrito hasta ahora.

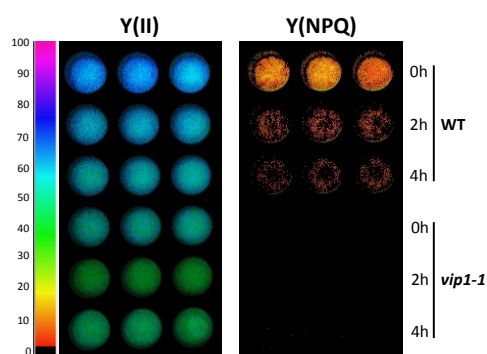


Fig. 5: Imagen IMAGING PAM parámetros Y(II) y Y(NPQ) registrados en a lo largo de una cinética. Los valores de la izquierda representan la correlación de los colores de la imagen con el porcentaje de actividad fotosintética.

- **Implicación de la carencia de IP7 y 8 en los niveles de carotenoides**

En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía (como antena auxiliar), o protegiendo el centro de reacción contra la autooxidación (Grossman et al., 2004; Cazonelli and Pogson, 2010; Erikson et al, 2015). Esto es especialmente relevante en condiciones de estrés lumínico donde es común que se formen ciertas especies reactivas de oxígeno (tripletes de clorofila o oxígeno singlete). Debido al fenotipo que encontramos en el mutante *vip1-1* decidimos que era interesante medir los niveles de estos compuestos para arrojar luz a los resultados obtenidos en IMAGING-PAM. Utilizando un sistema de cromatografía líquida (HPLC) conseguimos separar y cuantificar los niveles de varios pigmentos neoxantina, violaxantina, luteína, anteraxantina y B-caroteno (Fig. 6 A). Además de las correspondientes clorofila A y B (Fig.6 B).

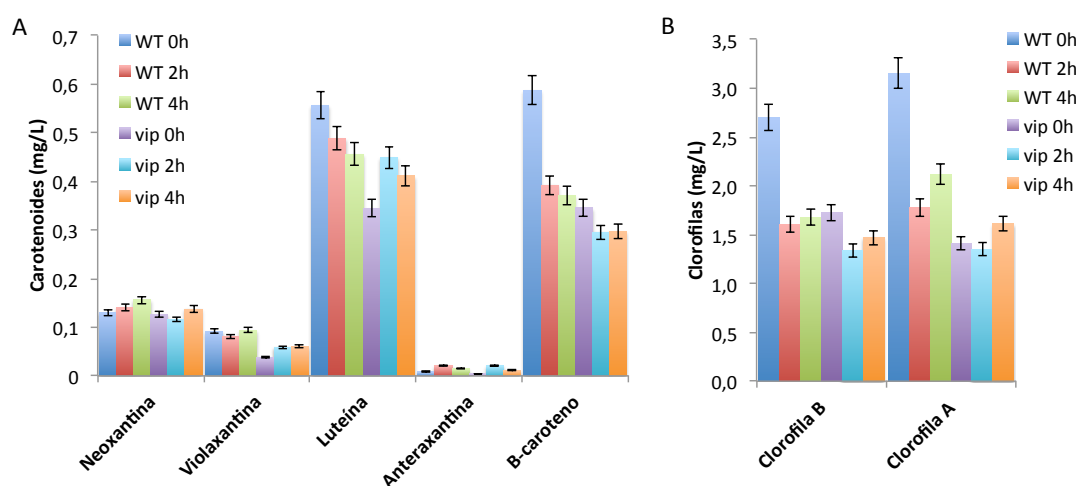


Fig. 6: Contenido en distintos carotenoides (A) y contenido en clorofila (B) de los cultivos durante la cinética de luz alta. Estos resultados provienen de una normalización de muestras mediante densidad óptica a 750nm (mismo contenido celular). Las muestras fueron analizadas mediante HPLC (Cordero et al., 2010).

Observamos varias diferencia entre el WT y el mutante *vip1-1*. Los carotenoides mayoritarios luteína y B-caroteno se encuentran reducidos entre 40 -50%(Fig 6 A). También la violaxantina presenta una reducción muy fuerte (55%) en el mutante (Fig. 6 A). Además las dos clorofilas se encuentran reducidas en un 30% clorofila B y un 60% la clorofila A (Fig. 6B). Estos resultados son bastante sorprendentes y nos hacen pensar que está reducción está influyendo directamente en la incapacidad del mutante de activar el NPQ ante situaciones de estrés lumínico o de limitación de CO₂. Cabe destacar que no hemos detectado zeaxantina en ninguna de las muestras analizadas por lo que es difícil relacionar esta reducción de NPQ en *vip1-1* con una activación del ciclo de xantofilas, a pesar de que observamos una ligera subida del intermediario anteraxantina en el mutante.

- **Inmunoblot de proteínas del cloroplasto bajo estrés lumínico**

Con estos experimentos queríamos ver qué diferencia existe a nivel molecular en la respuesta a estrés lumínico entre el WT y *vip1-1*. Para monitorizar la respuesta nos servimos de varios

anticuerpos que detectan componentes estructurales de los fotosistemas como son proteína 5 del complejo captador de la luz (LhcB5), Ferredoxina (Fd), proteínas A y C del fotosistema II (PsbC y PsbA), subunidad grande de la RuBisCO (RbcL) y citocromo B6 (cytB6). Realizamos la inmunodetección con muestras recogidas a lo largo de una cinética en luz alta (Fig.7).

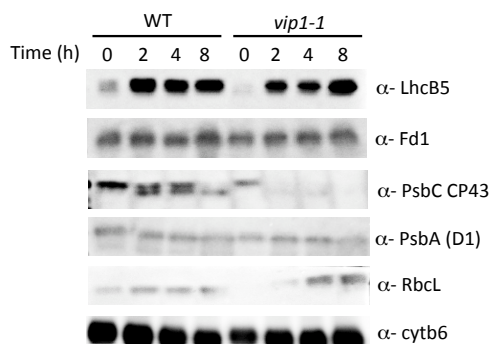


Fig. 7: Inmunoblot de distintas proteínas implicadas en la fotosíntesis en cinéticas de luz alta ($800\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

En general, no vemos grandes diferencias en la mayoría de las proteínas. Sin embargo, los niveles de proteína PsbC y RbcL presentan un patrón diferente entre el WT y el mutante. Concretamente, PsbC ó CP43 forma parte del complejo antena junto con CP47. Este complejo antena se une a la clorofila A y al B-caroteno para transferir energía de excitación a los centros de reacción. *Vip1-1* reduce los niveles de PsbC muy rápidamente ante el estrés lumínico. Esto unido a unos niveles más bajos de clorofila A y B-caroteno (60% y 33% respectivamente) genera una reducción importante de la capacidad fotosintética con respecto al control. Por lo tanto, podemos concluir que PsbC es una posible diana de estas moléculas a través de la cuál los IPs controlarían la transmisión de la energía hacia los centros de reacción, en definitiva controlan el acceso de la energía necesaria para realizar la fotosíntesis. Por el contrario, RbcL parece acumularse a lo largo de la cinética en luz alta. Esto podría ser una respuesta a la limitada transferencia de energía que está sufriendo el mutante que responde con una acumulación de RbcL para tener un mayor aporte de CO_2 al ciclo de Calvin podría ser un intento de realizar una fijación de CO_2 más eficiente en estas condiciones donde la transmisión de energía está limitada en los centros de reacción. Estos resultados indican que hay una regulación a nivel molecular que depende de los niveles de IP7 e IP8 y que podría estar determinada en dos pasos uno en la fase de captación de energía y otra la fijación metabólica de CO_2 .

Definir la relación entre niveles de Inositoles Polifosfatos (IP) y captación de CO_2

- **Niveles de inositoles polifosfato de orden alto (high order IPs)**

Los inositoles polifosfato, aunque son poco abundantes en las células, están presentes en todos los organismos eucariotas donde regulan diversos procesos de señalización celular (Raboy, 2003; Barker et al., 2009; Gillaspay, 2011; Wilson et al., 2013; Williams et al., 2015). Los inositoles polifosfato de alto orden (los más fosforilados) dan lugar también a una variedad de moléculas pirofosforiladas llamadas IP7 e IP8 de las que hablaremos en el siguiente apartado. Usando la técnica LC-MS/MS desarrollada en Couso et al., 2016 se han podido determinar los niveles de estas moléculas en los cultivos de nuestras microalgas y compararlos en distintas condiciones de CO_2 adaptando el protocolo de medida establecido para *Chlamydomonas* (Fig. 8). Así, hemos visto que existe una correlación entre la capacidad fotosintética y los niveles de IP3 e IP6. Los resultados obtenidos sugieren que hay una tendencia a acumular IP6 en algas con una capacidad fotosintética óptima como *Chlamydomonas* (WT y *vip1-1*) o *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* (Fig. 8 A ,D, G y H). Sin embargo, en *Chlorella fusca* y *zofigiensis* (Fig. 8 E y F), que no poseen valores óptimos para la captación de CO_2 , existe una tendencia

clara a acumular IP3, algo que también se observa de manera significativa en el mutante *npq2* (Fig. 8 C). Estos resultados indican que es el ratio IP3/IP6 el que puede estar regulando este proceso. También se observa que existe un aumento de otras especies como IP4 pero no parece que exista un patrón establecido para este IP según los datos obtenidos hasta ahora.

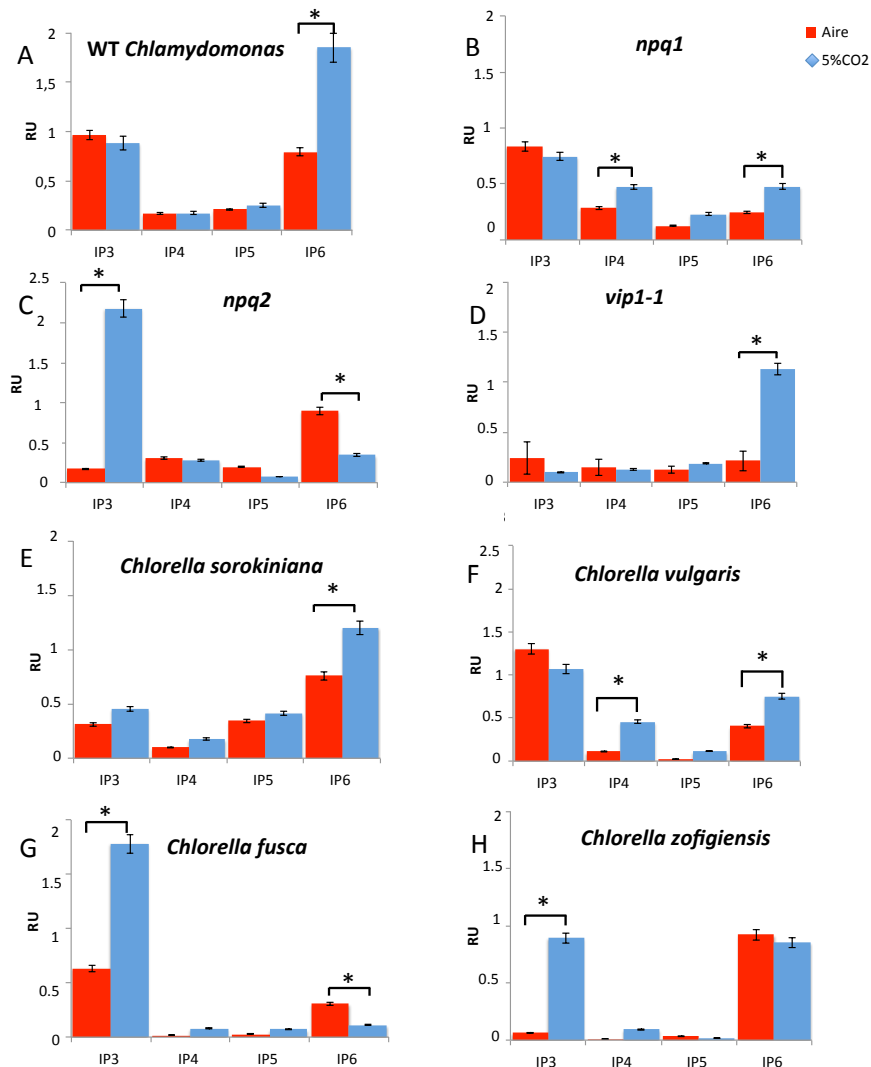


Fig. 8 : Niveles IP3, IP4, IP5 e IP6 en todas las microalgas utilizadas en alto (5%) y bajo (aire) contenido de CO₂ en el medio.

- Niveles de inositoles polifosfato pirofosforilados (IP7 e IP8)**

Dentro de los inositoles polifosfato de alto orden se encuentran las formas pirofosforiladas derivadas principalmente del IP6, llamadas IP7 e IP8. Son los IP más minoritarios aunque no los menos importantes ya que juegan un papel fundamental en el metabolismo y almacenaje del carbono en células vegetales (Couso et al., 2016). En el caso de las muestras de *Chlorella*, los valores de estos metabolitos están en el límite de detección de nuestro equipo por lo que por el momento, sólo se ha podido determinar sus niveles en estirpes de *Chlamydomonas* (Fig. 9). En estas estirpes vemos que los mutantes *npq* tienen reducidos los niveles de IP7 e IP8 (Fig. 9 C y D), siendo este último prácticamente indetectable en algunas muestras (Fig. 9 B, C y D). Estos resultados parecen indicar que en estas estirpes mutantes con fotosíntesis alterada, los niveles de IP7 e IP8 están disminuidos con respecto al control, sugiriendo que podría existir una relación entre los niveles de estas moléculas y la captación de CO₂. Como era esperable, el

mutante *vip1-1* también tiene reducido el nivel de estos metabolitos (Fig. 9 B) debido a la falta de la quinasa VIP1 que genera IP7 e IP8 (Couso et al., 2016).

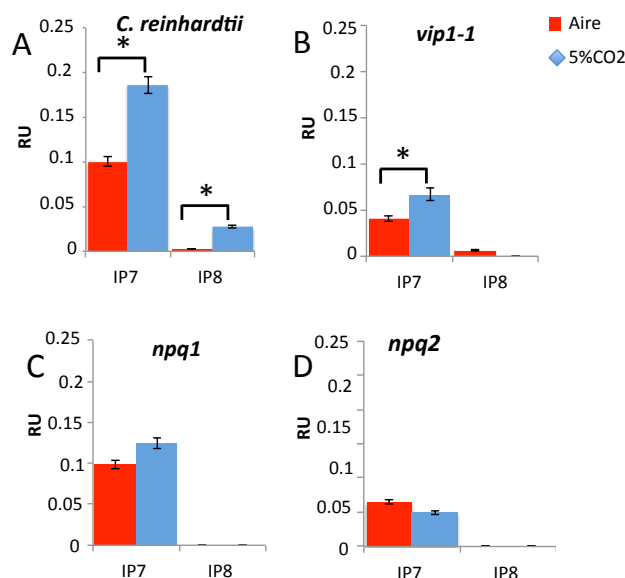


Fig. 9 : Niveles IP7 e IP8 en *Chlamydomonas reinhardtii* y mutantes *npq2* y *vip1-1* en alto (5%) y bajo (aire) contenido de CO₂ en el medio.

Conclusiones finales

Durante el desarrollo de este proyecto se ha analizado el crecimiento de distintas microalgas y comparado su capacidad fotosintética. Los resultados obtenidos indican que no todas las microalgas del género *Chlorella* pueden ser consideradas buenas captadoras de CO₂ ya que su capacidad de adaptación a ambientes limitantes reduce su capacidad fotosintética. Es el caso de *Chlorella fusca* o *Chlorella zofingiensis*. Sin embargo, si que vemos que existe una buena adaptación por parte de *Chlorella vulgaris* y *sorokiniana* además de alcanzar la mayor densidad óptica en el cultivo. En relación a los niveles de IP, se ha obtenido un resultado muy interesante que permite entender como se modula el metabolismo ante distintas condiciones de CO₂ y cómo responden las distintas estirpes en función de su eficiencia en la captación de CO₂. Todo parece indicar que el ratio IP3/IP6 podría tener un papel regulador que no ha sido descrito hasta el momento. Algas con un ratio más bajo (IP6 alto) presentan una mejor adaptación al CO₂ y con un ratio alto (IP3 alto) presentan peores parámetros fotosintéticos y de crecimiento. Teniendo en cuenta estas primeras conclusiones podemos avanzar que como pasos a seguir sería interesante generar estirpes de *Chlamydomonas* (hasta la fecha la única alga verde unicelular que podemos modificar genéticamente de forma estable) que fueran especialmente ricas en IP6, para lo cual se podrían sobreexpresar los genes de las quinasa responsables de la formación de este IP.

IP7 e IP8 son igualmente importantes en proceso de regulación de la fotosíntesis ya que vemos por un lado una reducción de estas moléculas en mutantes *npq* y al contrario mutantes con niveles IP7 e IP8 reducidos son deficientes en su capacidad de fotosíntesis. Utilizando estos mutantes, hemos monitorizado también un espectro amplio de proteínas pertenecientes al aparato fotosintético que nos muestran como interaccionan con los IPs dependiendo de las condiciones fotosintéticas. Más concretamente hemos encontrado dos posibles dianas en las PsbC y RbcL. Estas dianas nos confirman la implicación directa de los IPs en el correcto funcionamiento de los fotosistemas y en la fijación de CO₂ por tanto resalta su importancia como reguladores en la captación de CO₂.

Con este proyecto hemos conseguido entender más a fondo la regulación metabólica de la

captación de CO₂ en organismos fotosintéticos. En concreto sabemos qué moléculas están implicadas y cuáles son sus dianas dentro del aparato fotosintético. Esto es de un valor científico importante ya que a pesar de que conocemos el mecanismo de funcionamiento de la fotosíntesis, tenemos muy poca información sobre qué controla este proceso y cómo se decide modular la captación de CO₂ ante condiciones de estrés lumínico o limitación de CO₂.

Objetivos e hitos no cubiertos. Justificación

Explicar posibles objetivos e hitos previstos en la propuesta de proyecto que no hayan sido cubiertos, y justificar las causas

El proyecto SACCO2 se planteó desde una visión sólida de las posibles aplicaciones en la captura de CO₂ de las microalgas. Teniendo en cuenta los datos preliminares era fácil predecir que las moléculas inositoles polifosfato están relacionados con la captación de CO₂ por lo que sabíamos de antemano que el resultado principal no iba a variar sustancialmente. En general, la dirección del proyecto ha seguido los objetivos propuestos para el período de ejecución, pero además se han incluido experimentos que sirven para validar los resultados obtenidos. Los tres puntos siguientes resumen el trabajo adicional que se ha llevado a cabo:

- He utilizado cepas mutantes del alga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (*npq1* y *npq2*). Estas cepas presentan un NPQ reducido que es un fuerte componente de la capacidad fotosintética y por tanto una capacidad limitada de captar CO₂.
- He incluido también el mutante *vip1-1* (Couso et al., 2016) que presenta un perfil de IPs aberrante. Este mutante nos sirve de control para establecer la posible relación entre la captación de CO₂ y qué moléculas en concreto son las que están relacionadas con este proceso.
- Para evaluar bien el crecimiento de las distintas cepas en cultivos estancos, se ha aumentando la irradiancia con la que crecen los cultivos para obtener unas curvas de crecimiento que reflejen un aumento de biomasa mayor.
- He podido detectar por imagen de fluorescencia las diferencias en la captación de CO₂ en distintos mutantes usando la novedosa técnica IMAGING-PAM.
- He podido identificar dianas moleculares de estas moléculas en el aparato fotosintético de *C. reinhardtii*. Cabe destacar que este resultado es de alto impacto científico.

Sin embargo, la generación de estirpes con mayor capacidad de captación CO₂ y su evaluación posterior no ha llegado a completarse debido fundamentalmente a la reducción del tiempo de proyecto por incompatibilidades con el programa MSCA-IF de la Unión Europea del que soy beneficiaria.

Referencias

1. Arnon DI et al., 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim Biophys Acta*. 357: 231–245.
2. Barker CJ et al., 2009. Inositol pyrophosphates: structure, enzymology and function. *Cell. Mol. Life Sci*. 66: 3851–3871.
3. Cazzonelli CI, Pogson BJ, 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*. 15(5):266-74
4. Cordero B, Obraztsova I, Martin L, Couso I, Vargas MA, Rodriguez H, 2010. Isolation

- and characterization of lycopene b-cyclase gene from the astaxanthin producing green alga *Chlorella zofigiensis*. J. Phycol. 46, 1229–1238.
5. Couso I et al., 2016. Synergism between Inositol Polyphosphates and TOR Kinase Signaling in Nutrient Sensing, Growth Control, and Lipid Metabolism in *Chlamydomonas*. The Plant Cell. 28: 2026–2042.
 6. Erickson E, Wakao S, Niyogi KK., 2015. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J. 82(3):449-65
 7. Gillaspie GE, 2011. The cellular language of myo-inositol signaling. New Phytol. 192: 823–839.
 8. Grossman AR, Lohr M, Im CS., 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. Annu Rev Genet. 38:119-73
 9. Hempel N et al., 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. J. Appl. Phycol. 24:1407–1418.
 10. Moreira D and Pires JCM, 2016. Atmospheric CO₂ capture by algae: Negative carbon dioxide emission path. Bioresour. Technol. 215:371-379.
 11. Pugkaew W et al., 2017. Role of autophagy in triacylglycerol biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by chemical inducer and inhibitors. J. Appl. Phycol. DOI 10.1007/s10811-017-1166-7
 12. Raboy V (2003). myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry 64: 1033–1043.
 13. Wilson MSC et al., (2013). Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. Biochem. J. 452: 369–379.
 14. Williams SP et al., (2015). Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants. Front. Plant Sci. 6: 67.

Producción científica

Citar aquí los artículos científicos y/o capítulos de libro publicados, los trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales, etc. directamente relacionados con resultados del Proyecto ComFuturo. Se utilizará el formato de cita previsto en el CVN

Artículo

Couso I., Umen J.G., Crespo J.L. Crosstalks between C partitioning, NPQ and IPs in green algae (en preparación)

Congresos internacionales

- Couso I, Perez-Perez ME, Lemaire S, Umen J y Crespo JL. New tools to study autophagy flux in green algae. Second meeting of WG3 "Plant Autophagy: Improving Crop and Energy Production". Lugar: Madrid (España); Fecha: 23 y 24 Marzo 2017. Póster
- Couso I., Pérez-Pérez M.E., Dominguez M., Crespo J.L. Autophagic flux is needed for ribosomal protein turnover and lipid body formation under nutrient stress in *Chlamydomonas*. 1st Joint Meeting of the French-Portuguese-Spanish Biochemical and Molecular. Lugar: Barcelona, Spain Fecha: 23/10/2017-27/10/2017. Póster
- Pérez-Pérez M.E., Couso I., Crespo J.L. Autophagy is linked to the control of lipid homeostasis in *Chlamydomonas*. 2nd NEAR meeting. Lugar: Madrid, Spain Fecha: 15/11/2017-17/11/2017. Comunicación Oral

Participación en jornadas

Tecnologías CAC: Una oportunidad en la mitigación del cambio climático. Lugar: Sevilla. Fecha: 12 de Julio 2017. Organiza: Plataforma Tecnológica Española del CO₂.

--

Indicadores científicos

Indicar aquellos directamente relacionados con el Proyecto ComFuturo (anotar solo número)

- Artículos científicos: 1 (en preparación)
- Trabajos presentados en congresos internacionales: 2
- Presentaciones en reuniones científicas: 1

Divulgación

Indicar artículos, libros, webs, charlas, etc. de carácter divulgativo directamente relacionados con el Proyecto ComFuturo

Referencias obtenidas en los resultados relacionados con el proyecto:

<http://esciencenews.com/sources/newswise.scinews/2016/10/19/discovery.carbon.storage.signaling.mechanism.algae.offers.new.potential.sustainable.biofuel>
<http://phys.org/news/2016-10-algae-discovery-potential-sustainable-biofuels.html>
https://www.eurekalert.org/pub_releases/2016-10/ddps-ado101916.php
<http://www.biodieselmagazine.com/blog/article/2016/11/making-algae-better-oil-producers>
<http://www.biomassmagazine.com/articles/13853/new-discovery-offers-potential-for-algae-biofuelproduction>

Entrevistas relacionadas con el programa ComFuturo:

http://www.madrimasd.org/informacionidi/noticias/noticia.asp?id=67749&origen=notiweb&ia_suplemento=martes

Indicadores de divulgación

Anotar el número correspondiente para cada uno de los siguientes indicadores:

- Web propia del proyecto: <https://twitter.com/Sacco2Comfuturo>

Resultados susceptibles de explotación comercial

Describir si existen **resultados susceptibles de explotación comercial** y si se han iniciado por parte de los investigadores y de sus centros acciones en este sentido

Aunque tenemos resultados muy prometedores que indican una relación entre IPs y la captación del CO₂ en microalgas, es necesario generar estirpes con una mayor captura de CO₂ para poder comenzar con la explotación comercial de los mismos. Aunque no hemos tenido tiempo suficiente para aplicar el conocimiento que estamos generando, gran parte del objetivo principal se ha cubierto durante este tiempo en el que se ha desarrollado el proyecto SACCO2 y esto supone un avance sustancial a la hora de abordar la modificación genética de estos organismos. Nuestros resultados dejan la puerta abierta al estudio de la fotosíntesis y la

captación de CO₂ desde un punto de vista metabólico. De hecho, hemos demostrado que las moléculas IPs son ejes centrales en la regulación de la captación de CO₂. Este hallazgo podría estudiarse para ser objeto de una patente de invención y que eventualmente podría ser licenciada para su explotación comercial.

Plant Autophagy: Improving Crop and Energy Production

TRANSAUTOPHAGY COST-CA 15138
Second Meeting of Working Group 3



23th-24th March, 2017, Madrid, Spain

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

We hereby certify that

**Inmaculada
Couso Liañez**

Attended the scientific meeting

**Plant Autophagy:
Improving Crop and Energy Production,
Second Meeting of the Working Group 3 of
TRANSAUTOPHAGY (COST Action CA-15138)**

March 23-24, 2017, CIB-CSIC, Madrid, Spain

Pilar S. Testillano
Chair of the Organizing Committee



La Secretaría Técnica de la Plataforma Tecnológica Española del CO2

certifica que:

DÑA. INMACULADA COUSO

asistió a la jornada técnica

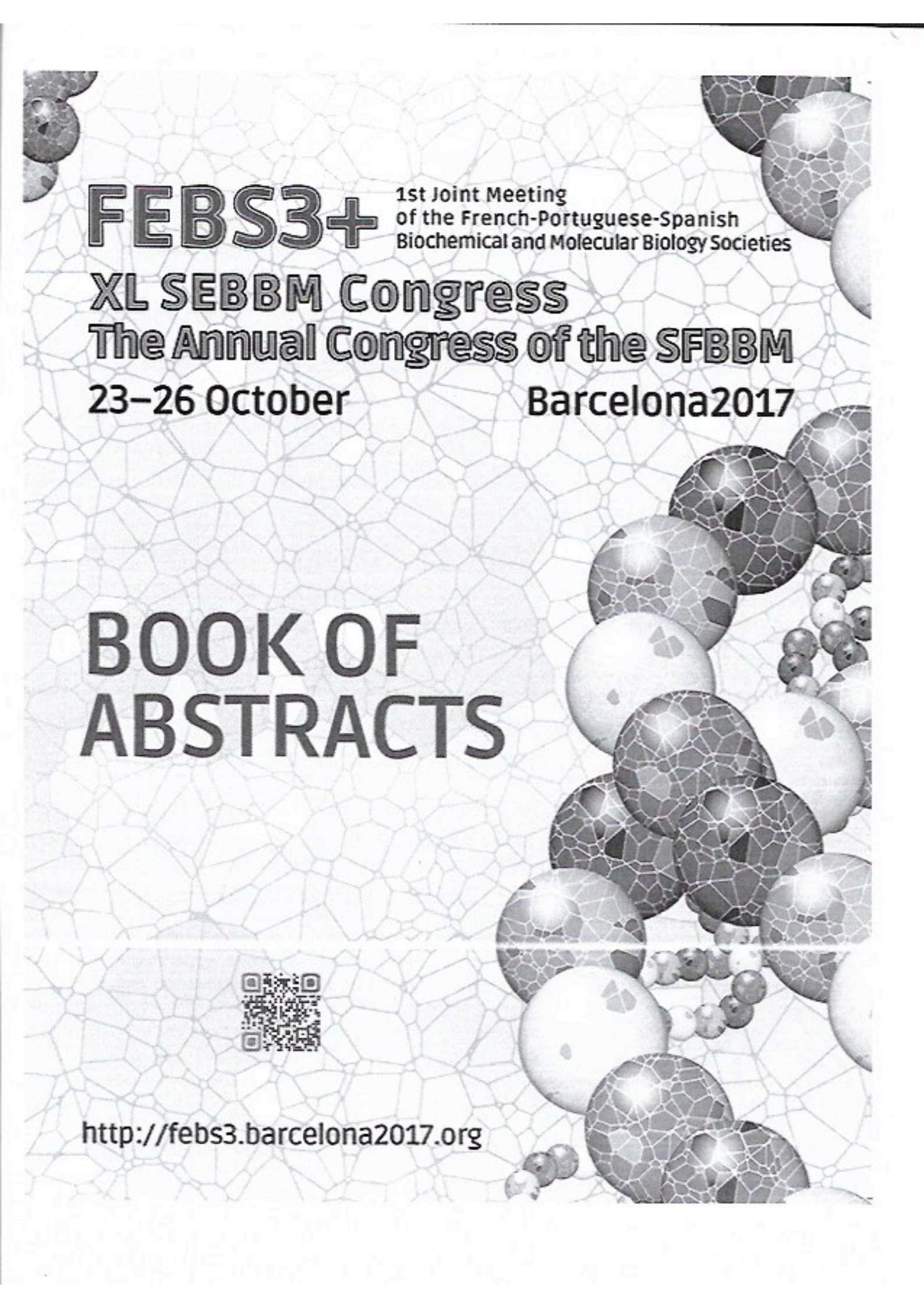
“Tecnologías CAC: una oportunidad en la mitigación del cambio climático”,

coorganizada por la Escuela Técnica Superior de Ingeniería

de la Universidad de Sevilla y la PTECO2,

que tuvo lugar en Sevilla, el día 12 de julio de 2017.


Rosa Alonso López
Secretaría Técnica



FEB3+

1st Joint Meeting
of the French-Portuguese-Spanish
Biochemical and Molecular Biology Societies

XL SEBBM Congress

The Annual Congress of the SFBBM

23–26 October

Barcelona2017

BOOK OF ABSTRACTS



<http://febs3.barcelona2017.org>

led to the oxidation and inactivation of ATG4. Thus, we propose that the fine tuning of ATG4 by the intracellular redox state may act as a regulatory hub for the redox control of autophagy [1]. Whether other ATG proteins are targeted by ROS remains unknown.

References

- [1] Ichimura et al. (2000) *Nature*, 408:488-492.
- [2] Pérez-Pérez et al. (2010) *Plant Physiol* 152(4):1874-1888.
- [3] Scherz Shouval et al. (2007) *EMBO J* 26(7):1749-1760.
- [4] Pérez-Pérez et al. (2014) *Autophagy* 10(11):1953-1964.
- [5] Pérez-Pérez et al. (2016) *Plant Physiology* 172:2219-2234.

P07.2

Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogem-induced immune response in tobacco

Claire Rosnoblet, Hervé Bégué, Cécile Blanchard, David Wendehenne
Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR 1347 Agroécologie, INRA, Université de Bourgogne, Agroparc Dijon, Pôle Mécanisme et Gestion des Interactions Plantes-Microorganismes - ERI CNRS, Dijon, FR

Cdc48, a molecular chaperone conserved in different kingdoms, is a member of the AAA1 family contributing to numerous processes in mammalian including proteins quality control and degradation, vesicular trafficking, autophagy and immunity. The functions of Cdc48 plant orthologues are less understood. We previously reported that Cdc48 is regulated by S-nitrosylation in tobacco cells undergoing an immune response triggered by cryptogem, an elicitor produced by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. Here, we investigated the function of NicCdc48 in cryptogem signaling and induced hypersensitive-like cell death. NicCdc48 was found to accumulate in elicited cells both at the protein and transcript levels. Interestingly, only a small proportion of the overall NicCdc48 population appeared to be S-nitrosylated. Using gel filtration in native conditions, we confirmed that NicCdc48 was present in its hexameric active form. An immunoprecipitation based strategy followed by mass spectrometry analysis led to the identification of about hundred NicCdc48 partners and underlined its contribution in cellular processes including targeting of ubiquitinated proteins for proteasome-dependent degradation, subcellular trafficking and redox regulation. Finally, the analysis of cryptogem induced-events in overexpressing NicCdc48 cells highlighted a correlation between NicCdc48 expression and hypersensitive cell death. Altogether, NicCdc48 is a component of cryptogem signaling and plant immunity.

P07.3

Autophagic flux is needed for ribosomal protein turnover and lipid body formation under nutrient stress in *Chlamydomonas*

Inmaculada Couso, María Esther Pérez Pérez, Mónica Domínguez-González, José L. Crespo
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), CSIC, Sevilla, ES

Autophagy is an intracellular catabolic process that allows cells to recycle unneeded or damaged material to maintain cellular homeostasis. This highly dynamic process is characterized by the formation of double-membrane vesicles called autophagosomes, which engulf and deliver the cargo to the vacuole. Flow of material to the vacuole through the entire pathway is known as autophagic flux and reflects the autophagic degradation activity. A number of assays have been developed to determine autophagic flux in yeasts, mammals and plants but it has not been examined in algae. Here we analyzed autophagic flux

in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. By monitoring specific autophagy markers such as ATG8 lipidation and using immunofluorescence and electron microscopy techniques, we show that concanamycin A, a vacuolar ATPase inhibitor, blocks autophagic flux in *Chlamydomonas*. Our results also revealed that inhibition of autophagic flux by concanamycin A prevented the degradation of ribosomal proteins RPS6 and RPL37 under nitrogen or phosphate deprivation. Moreover, we found that autophagic flux is needed for the synthesis of lipid bodies in nitrogen- or phosphate-starved cells. These results indicate that autophagy might play an important role in the recycling of ribosomal proteins and the regulation of lipid metabolism under nitrogen or phosphate limitation in *Chlamydomonas*.

P07.4

Lotus japonicus as a model for the identification of new genes involved in the response to abiotic stress and productivity in legume plants

Carmen Pérez Delgado, Margarita García-Calderón, Antonio Márquez Cabeza, Marco Betti
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, ES

Photorespiration, nitrogen metabolism and the biosynthesis of isoflavonoids are three metabolic pathways reported to be clearly involved in plant productivity and the response to abiotic stress. Previous transcriptomics works have shown a coordinate regulation of these pathways in the model legume *Lotus japonicus* [1-3]. A series of gene co-expression networks integrating all the transcriptomic data available has been built in this plant in order to identify possible regulatory genes that may be of interest [4]. Several transcription factors and other genes were identified that showed a high number of connections with many genes of the aforementioned routes. Specific LORE1 transposon mutants from *L. japonicus* affected in some of these genes have been identified. A preliminary characterization of these mutants indicates that the loss of function of certain genes may be associated with an increase in productivity and could be of extraordinary interest for further studies in legumes.

The funding received by FEDER, Ministerio de Economía y Competitividad (project AGL-2014-54413 R) is gratefully acknowledged.

References

- [1] Pérez-Delgado CM, García-Calderón M, Sánchez DH, Urdavari MK, Kopka J, Márquez AJ, Betti M. 2013. *Plant Physiol*. 162: 1834-1848.
- [2] Pérez-Delgado CM, García-Calderón M, Márquez AJ, Betti M. 2015. *PLoS ONE* 10(6):e0130438.
- [3] García-Calderón M et al. 2015. *Front. Plant Sci.* 6:760.
- [4] Pérez-Delgado CM, Moyano T, García-Calderón M, Canales J, Gutiérrez RA, Márquez AJ, Betti M. 2016. *J. Exp. Bot.* 67: 3095-3108.

P07.5

Decrease in Starch Synthase 4 (SS4) expression affects tuberization in *Solanum tuberosum*

Sandy Raynaud¹, Mónica Domínguez², Nicolas Szydlowski³, Regla Bustos⁴, Salomé Pral⁵, Ángel Mérida¹
¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-US, Sevilla, ES, ²Université Lille 1, CNRS, UMR 3290 - MSAP - Miniaturisation pour la Synthèse l'Analyse et la Protéomique, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, FR, ³Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, UNIA UPM, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, ES, ⁴Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, ES



NEAR
Network of Excellence for Autism Research

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

THIS IS TO CERTIFY THAT:

Dr. Inmaculada Couso Liañez

HAS PARTICIPATED IN THE :

SECOND NEAR MEETING

LA CRISTALERA, MIRAFLORES DE LA SIERRA
15-17 NOVEMBER, 2017

THE ORGANIZER

PATRICIA BOYA