



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



MASTER UNIVERSITARIO  
**BIOTECNOLOGIA**  
TRABAJO FIN DE MASTER

**Tolerancia y sensibilidad a molibdeno en el  
microalga *Chlamydomonas reinhardtii***

David Roldán López

TUTOR(a) Y Director(a):  
Aurora Galván Cejudo

CODIRECTOR(A):  
Manuel Tejada Jiménez

Córdoba, 07/2020

## Índice general

Índice de Ilustraciones .....	3
Índice de tablas .....	3
Resumen.....	4
Abstract .....	5
1. Introducción .....	6
1.1 Biología del molibdeno.....	6
1.2 Biosíntesis del cofactor de molibdeno .....	6
1.2.1 Etapa 1. Circularización .....	8
1.2.2 Etapa 2. Síntesis de molibdopterina.....	8
1.2.3 Etapa 3. Adenilación.....	8
1.2.4 Etapa 4. Inserción del molibdeno.....	8
1.3 Homeostasis de molibdeno.....	9
1.3.1 Captación de molibdeno .....	9
1.3.2 Almacenamiento de molibdeno .....	13
1.3.3 Regulación de la homeostasis de molibdeno.....	14
1.4 Molibdoenzimas.....	16
1.4.1 Nitrato reductasa .....	16
1.4.2 Sulfito oxidasa .....	17
1.4.3 Xantina oxidasa .....	18
1.4.4 Aldehído oxidasa .....	18
1.4.5 componente reductor de la amidoxina.....	18
1.5 Deficiencia de molibdeno.....	19
1.6 Toxicidad de molibdeno .....	21
1.7 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como organismo modelo.....	21
2. Objetivo.....	24
3. Materiales y métodos .....	25
3.1 Estirpes de <i>Chlamydomonas</i> .....	25
3.2 Medios y condiciones de cultivo .....	26
3.2.1 Soluciones Stock.....	26
3.2.2 Medios de cultivo .....	27
3.2.3 Cultivos de <i>Chlamydomonas</i> .....	27
3.2.4 Determinación del número de células .....	28
3.2.5 Test de crecimiento .....	28
3.3 Análisis estadístico .....	29
3.4 Búsqueda bibliográfica.....	29

4.	Resultados .....	30
4.1	Medio sólido.....	30
4.2	Medio líquido .....	32
4.3	Curva de crecimiento .....	34
5.	Discusión .....	35
6.	Conclusiones.....	39
7.	Agradecimientos .....	39
8.	Bibliografía .....	39

## Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.	Esquema de la biosíntesis del cofactor de molibdeno. ....	7
Ilustración 2.	Organización de la maquinaria de homeostasis del Mo en la célula vegetal. ....	12
Ilustración 3.	Representación de la estructura del centro activo en las dos familias de molibdoenzimas en eucariotas. ....	16
Ilustración 4.	Esquema general de proteínas involucradas en la asimilación de nitrato y la biosíntesis del cofactor de molibdeno en <i>Chlamydomonas</i> . ....	17
Ilustración 5.	Dominios estructurales de las molibdoenzimas sulfito oxidasa, xantina oxidasa y componente reductor de la amidoxina. ....	19
Ilustración 6.	Tipos de deficiencia de cofactor de molibdeno según la etapa de biosíntesis se encuentra afectada. ....	20
Ilustración 7.	Anatomía de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	22
Ilustración 8.	Ciclos de vida de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	23
Ilustración 9.	Test de crecimiento en cultivo sólido de 21 estirpes de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	31
Ilustración 10.	Test de crecimiento en cultivo sólido de 12 estirpes de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	32
Ilustración 11.	Test de crecimiento en cultivo líquido de las estirpes 6145C, 704, 70.9 y 1gr de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	33
Ilustración 12.	Curvas de crecimiento en cultivo líquido de las estirpes 704 y 1gr de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	34

## Índice de tablas

Tabla 1.	Sistemas de transporte implicados en el transporte de molibdato en plantas. ....	11
Tabla 2.	Estirpes de <i>Chlamydomonas</i> usadas en este trabajo. ....	25

## Resumen

El molibdeno (Mo) es un micronutriente esencial que lleva a cabo su función biológica coordinado con una molécula de pterina formando el cofactor de Mo. Este cofactor está presente en el sitio activo de enzimas implicadas en funciones vitales tanto en procariotas como en eucariotas. Aunque la mayoría de los seres vivos necesitan Mo para vivir, la concentración intracelular de este metal tiene que estar bien controlada mediante mecanismos homeostáticos que implicarían estrategias para importación y exportación de este elemento, mecanismos de almacenamiento celular y elementos de regulación. En eucariotas solo se conocen algunos transportadores para la entrada de Mo. En el laboratorio donde se ha realizado este TFM se proponen identificar elementos de la homeostasis de Mo en eucariotas usando el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo, y mediante la estrategia de análisis transcriptómico (RNA-seq) buscando expresión diferencial en distintas condiciones de Mo. En este trabajo se ha realizado el primer paso de este objetivo, encontrando las condiciones óptimas para llevar a cabo dicho estudio transcriptómico. Mediante análisis de crecimiento hemos encontrado que tanto las estirpes 704 (silvestre) como la 1gr (deficiente en el transporte de Mo) presentan deficiencia por Mo cuando este metal no es añadido al medio y toxicidad por Mo cuando está presente a una concentración de 10 mM. Estudios posteriores de concentración intracelular de Mo podrían sugerir cuál de estas dos estirpes sería la más adecuada, permitiendo así la realización del análisis transcriptómico por RNA-seq. Conocer mejor cómo las células eucariotas controlan la concentración de Mo puede ayudar a optimizar procesos en los que este metal es fundamental como la asimilación y la fijación de nitrógeno, que reducirían de manera drástica el uso masivo de fertilizantes nitrogenados.

## Abstract

Molybdenum (Mo) is an essential micronutrient that carries out its biological function coordinated with a pterin molecule forming the Mo cofactor. This cofactor is present in the active site of enzymes involved in vital functions in both prokaryotes and eukaryotes. Although most living beings require Mo for living, the intracellular concentration of this metal must be well controlled by homeostatic mechanisms that involve strategies for importing and exporting this element, cellular storage mechanisms and regulation elements. In eukaryotes, only a few transporters are known for Mo supply. In the laboratory where this TFM has been carried out, we aim to identify elements of Mo homeostasis in eukaryotes using the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism, and by the strategy of transcriptomic analysis (RNA-seq) looking for differential gene expression in different conditions of Mo availability. In the present work, the first step of this objective has been made, finding the optimal conditions to carry out the transcriptomic study. By growth analysis we have found that both 704 (wild type) and 1gr (Mo transport deficient) strains are Mo deficient when this metal is not added to the medium and Mo toxicity when presents at a concentration of 10 mM. Further studies of intracellular Mo concentration may point out which of these two strains would be the most appropriate, thus allowing the performance of transcriptomic analysis by RNA-seq. A better understanding of how eukaryotic cells control Mo concentration may help to optimize processes in which Mo is fundamental such as nitrogen assimilation and fixation, which would drastically reduce the massive use of nitrogen fertilizers.

## 1. Introducción

### 1.1 Biología del molibdeno

El molibdeno (Mo) es un metal de transición esencial para la mayoría de los seres vivos, tanto en procariontas como en eucariotas. El Mo está presente en un gran número de metaloenzimas en bacterias, arqueas, hongos, algas, plantas y animales. Para llevar a cabo su actividad biológica, el Mo debe coordinarse con una molécula de pterina, formándose el grupo prostético conocido como cofactor de molibdeno (Moco), el cual se encuentra en el sitio activo de estas enzimas y participa en diversas reacciones redox debido a su versatilidad (Mendel and Kruse, 2012).

Las enzimas dependientes de Mo (molibdoenzimas) son esenciales para la vida, están presentes en los ciclos redox biogeoquímicos del nitrógeno, carbono y azufre. En eucariotas, las molibdoenzimas son la nitrato reductasa (asimilación de nitrato), sulfito oxidasa (detoxificación de sulfito), xantina oxidasa (metabolismo de purinas), aldehído oxidasa (biosíntesis de fitohormonas) o componente reductor de la amidoxima (síntesis del óxido nítrico) (Hille et al., 2011). El análisis de las molibdoenzimas cristalizadas demuestra que el cofactor de molibdeno se encuentra profundamente enterrado en lugar de situarse en la superficie de la enzima, encontrándose un canal que permite la entrada de los sustratos. Durante el tiempo de vida de estas enzimas, el cofactor no se libera (Fischer et al., 2005).

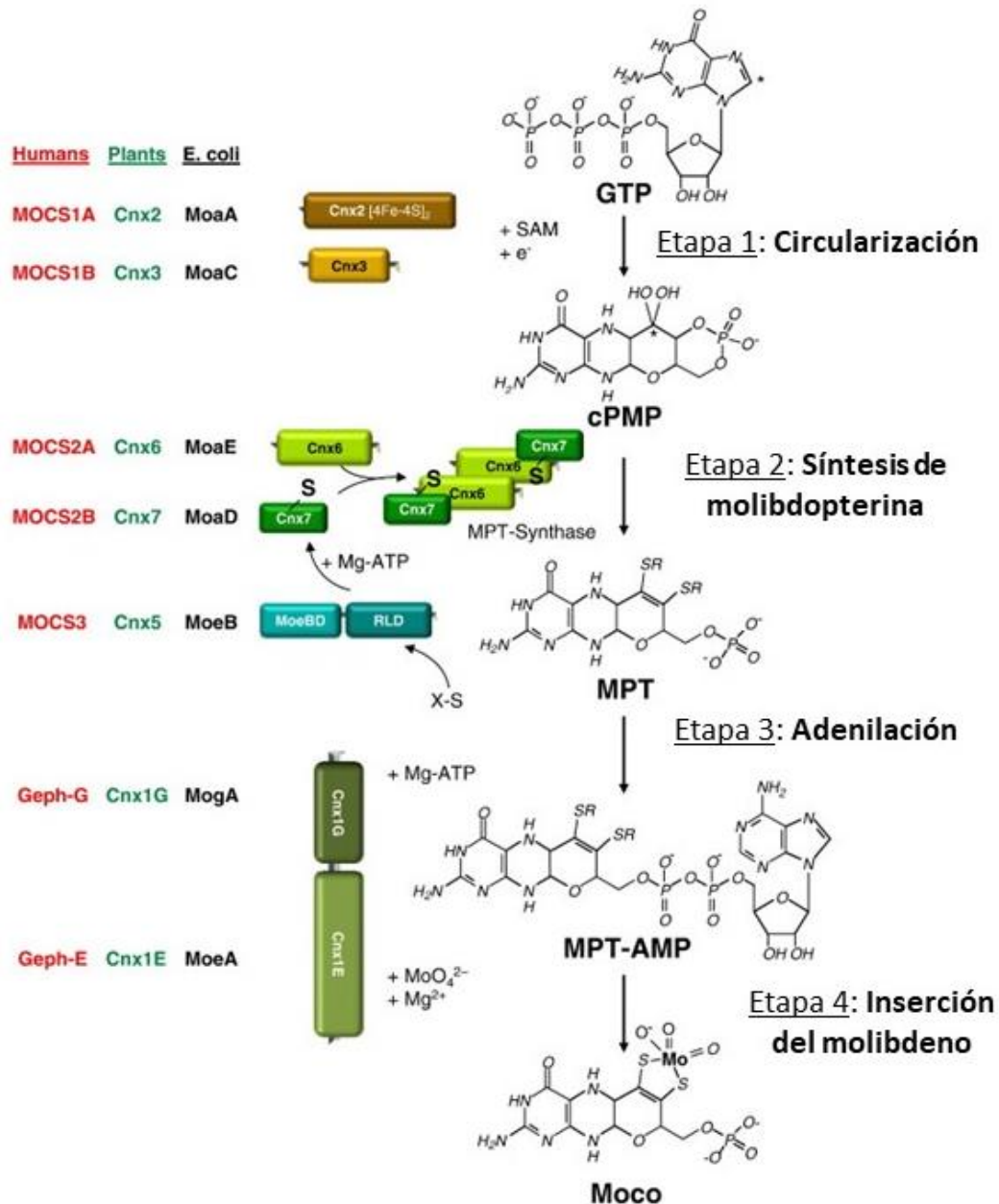
El Mo es muy abundante en los océanos en forma de anión molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ). En el suelo, el anión molibdato es la única forma de Mo disponible para bacterias, hongos y plantas. El Mo pertenece al grupo de los elementos traza, es un elemento esencial en pequeñas concentraciones. La captación de Mo en grandes cantidades desencadena síntomas de toxicidad, mientras que su ausencia puede ser letal para el organismo (Turnlund, 2002).

### 1.2 Biosíntesis del cofactor de molibdeno

La biosíntesis del cofactor de molibdeno es un proceso bien conservado en todos los organismos y se basa en la acción de seis proteínas en una secuencia de cuatro etapas principales, con el requerimiento de hierro, ATP y cobre (Mendel and Kruse, 2012). El resultado es una pterina tricíclica que recibe el nombre de molibdopterina, la forma biológicamente activa del Mo.

La biosíntesis del cofactor de molibdeno se puede dividir en cuatro etapas principales de acuerdo con los intermediarios biosintéticos formados: piranopterina monofosfato cíclica (cPMP), molibdopterina (MTP), molibdopterina adenilada (MTP-AMP) y cofactor de

molibdeno. Se han identificado un total de seis productos génicos en plantas (Mendel, 2011), hongos y humanos (Stallmeyer et al., 1999) que están presentes en este proceso de biosíntesis. Junto con la estructura conservada del cofactor de molibdeno, estos hallazgos proporcionan una base para proponer una vía biosintética evolutiva de múltiples pasos (Ilustración 1).



*Ilustración 1. Esquema de la biosíntesis del cofactor de molibdeno. La ruta biosintética puede dividirse en cuatro etapas: circularización, síntesis de molibdopterina, adenilación, inserción del molibdeno. Los nombres de las proteínas involucradas aparecen en verde para plantas, rojo para humanos y negro para E. coli (Modificada de Mendel and Kruse, 2012).*

### 1.2.1 Etapa 1. Circularización

La etapa inicial de la biosíntesis de cofactor de molibdeno comienza con la conversión de GTP en cPMP. El cPMP es el primer intermediario detectable de la ruta y es el más estable, tiene una vida media de varias horas a bajo pH (Wuebbens and Rajagopalan, 1993). La conversión de GTP a cPMP es catalizada por dos proteínas. Una de ellas (MoaA en bacterias, Cnx2 en plantas, MOCS1A en humanos) es un miembro de la superfamilia de enzimas dependientes de radical S-adenosilmetionina (SAM) (Hänzelmann et al., 2004). Los miembros de esta familia de proteínas catalizan la formación de radicales mediante la escisión reductora de SAM que implica un grupo [4Fe – 4S] (Sofia et al., 2001). Las dos proteínas involucradas en esta primera etapa, Cnx2 y Cnx3 (en plantas), se localizan en la matriz mitocondrial. Mientras que el resto de las etapas se llevan a cabo en el citosol. La salida de cPMP de la mitocondria al citosol es mediada por un transportador de la familia ABC que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria, la proteína transportadora ATM3 (Teschner et al., 2010).

### 1.2.2 Etapa 2. Síntesis de molibdopterina

La segunda etapa de la biosíntesis de cofactor de molibdeno consiste en la introducción de un grupo ditioleno en el cPMP para la formación de MPT. Esta reacción es llevada a cabo por la MPT sintasa, un heterotetrámero compuesto por dos subunidades pequeñas (Cnx7 en plantas) y dos subunidades grandes (Cnx6 en plantas), que cataliza la conversión de cPMP a MPT. Las subunidades pequeñas tienen unidos grupos sulfuro en el extremo C-terminal. La formación de MPT no es una reacción catalítica, por lo que la MPT sintasa tiene que regenerarse. Esta resulfuración es catalizada por la enzima MPT-sintasa sulfurasa (Cnx5 en plantas) (Ilustración 1) (Matthies et al., 2005; Wuebbens and Rajagopalan, 2003).

### 1.2.3 Etapa 3. Adenilación

Una vez formado el MPT, el Mo debe ser coordinado con el grupo ditioleno para ser fisiológicamente activo. La inserción de Mo en el MPT no es espontánea, sino que está catalizada por la Mo insertasa. En bacterias, la inserción es llevada a cabo por dos proteínas que se expresan de forma separada, mientras que en la gran mayoría de organismos se lleva a cabo por dos proteínas que están fusionadas, formando una proteína de dos dominios (Cnx1 en plantas). La inserción está compuesta por dos etapas diferentes, la primera de ellas es la adenilación del MPT para la formación de MTP-AMP (llevada a cabo por el dominio Cnx1G). Esta etapa es dependiente de  $Mg^{+2}$  y ATP (Llamas et al., 2004).

### 1.2.4 Etapa 4. Inserción del molibdeno

Tras la formación de MTP-AMP, se transfiere del dominio Cnx1G al dominio Cnx1E (en nomenclatura de plantas). Cnx1E cataliza la inserción del Mo en el grupo ditioleno de MPT



para formar el cofactor de molibdeno fisiológicamente activo. Esta etapa final depende de la unión cooperativa de MPT-AMP y Mo a Cnx1E, la cual cataliza la hidrólisis de MPT-AMP dependiente de  $Mg^{+2}$  y la inserción de Mo en la MPT (Llamas et al., 2006). En plantas, se ha identificado el complejo Cnx1G MPT-AMP con cobre como grupo ligando unido al grupo ditiolato. Esto demuestra que la inserción del Mo se lleva a cabo en una reacción de intercambio de metal que tiene al Cu como grupo saliente. Además, la unión del Cu también protege al MPT ditiolato de la oxidación. La mutación de los genes involucrados en la biosíntesis del cofactor conlleva una pérdida pleiotrópica de todos los procesos celulares dependientes de molibdoenzimas.

El cofactor de molibdeno es uno de los dos cofactores presentes en la naturaleza que contienen Mo. El otro cofactor que tiene Mo es denominado como cofactor de hierro-molibdeno (FeMoco). Este cofactor se encuentra, exclusivamente, en la nitrogenasa bacteriana y tiene una biosíntesis y estructura diferente al cofactor presente en las demás molibdoenzimas (Rubio and Ludden, 2008).

### 1.3 Homeostasis de molibdeno

Los organismos vivos son sistemas abiertos que se encuentran en un continuo intercambio con el medio. La homeostasis de micronutrientes, como el molibdeno, hace referencia a la habilidad de la célula para regular su concentración intracelular en rangos compatibles con su función fisiológica y evitando efectos tóxicos. La homeostasis de los micronutrientes es un proceso complejo que implica: (1) estrategias para la obtención del exterior celular, (2) compartimentalización en diferentes orgánulos o unión a otras moléculas para su almacenamiento, (3) mecanismos de exporte al exterior celular para evitar toxicidad o para su transporte a diferentes tejidos y (4) mecanismos de regulación que proporcionen una conexión entre los cambios ambientales y las respuestas celulares a dichos cambios (Tejada-Jiménez et al., 2009). La correcta homeostasis de molibdeno es necesaria para (1) hacer frente a las variaciones en la disponibilidad de molibdato en los suelos causadas por cambios ambientales y (2) garantizar un suministro adecuado de molibdato para satisfacer las necesidades celulares de Mo (Tejada-Jiménez et al., 2013).

#### 1.3.1 Captación de molibdeno

El molibdeno está presente en los suelos en una concentración de 1-5 mg/kg y puede encontrarse en distintos estados de oxidación entre 0 y 6 (He et al., 2005). El molibdato es la forma predominante en solución a pH superior a 4,2 y es la única forma en la que los seres

vivos puede adquirir molibdeno encontrada hasta la fecha. Su disponibilidad varía con el pH y la humedad. El aumento de pH y de humedad aumenta la solubilidad/disponibilidad del molibdato (Lindsay, 1979). Es crucial la existencia de transportadores específicos de molibdato debido a su baja disponibilidad y su importancia biológica.

En bacterias, el molibdato es transportado al interior celular mediante un sistema de transporte de alta afinidad de la familia ABC. Este sistema está compuesto por tres proteínas: una proteína periplasmática de unión a Mo (ModA), una proteína integral de membrana de tipo canal (ModB) y una proteína ATPasa (ModC). Estas tres proteínas son codificadas por los genes *modA*, *modB* y *modC*, respectivamente. Además, se ha demostrado que ModA, ModB y ModC están conservadas en diferentes familias bacterianas (Grunden and Shanmugam, 1997). Las proteínas de la familia ABC están ampliamente distribuidas en bacterias y participan en el transporte de una gran variedad de sustratos (Davidson and Chen, 2004).

En eucariotas, los transportadores de Mo se han identificado recientemente. Debido a la relación existente entre el transporte de molibdato, sulfato y fosfato en células vegetales, inicialmente se pensó que la entrada de Mo en la célula se llevaba a cabo totalmente mediante una vía inespecífica usando los transportadores de sulfato o fosfato (Stout and Meagher, 1948). Las primeras indicaciones sobre la existencia de transportadores específicos de molibdato en las células eucariotas fueron descubiertas en *Chlamydomonas reinhardtii* sugiriendo la existencia de, al menos, dos transportadores específicos de molibdato con diferentes propiedades cinéticas: uno con alta afinidad, pero baja capacidad y otro con baja afinidad, pero alta capacidad (Llamas et al., 2000). Estos datos fisiológicos fueron confirmados con la identificación de la familia de transportadores de molibdato de alta afinidad MOT1 (MOLybdate Transporter type 1) (Tejada-Jiménez et al., 2007). Miembros de esta familia se caracterizaron de forma paralela en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Arabidopsis thaliana* (Baxter et al., 2008; Gasber et al., 2011; Tejada-Jiménez et al., 2007, 2011; Tomatsu et al., 2007). Actualmente, se ha demostrado la existencia de proteínas de la familia MOT1 en plantas superiores, algas, hongos y bacterias, relacionadas con el transporte y acumulación de molibdato (Tejada-Jiménez et al., 2007).

Usando *Chlamydomonas reinhardtii* como modelo se ha demostrado que las proteínas de la familia MOT1 son lo suficientemente diferente de la familia SULTR de transportadores de sulfato en plantas como para ser considerada una familia independiente. Las principales diferencias son: (1) la ausencia de los dominios STAS (Sulphate Transporter and Anti-Sigma antagonist) en la familia de proteínas MOT1. Estos dominios están presentes en la familia

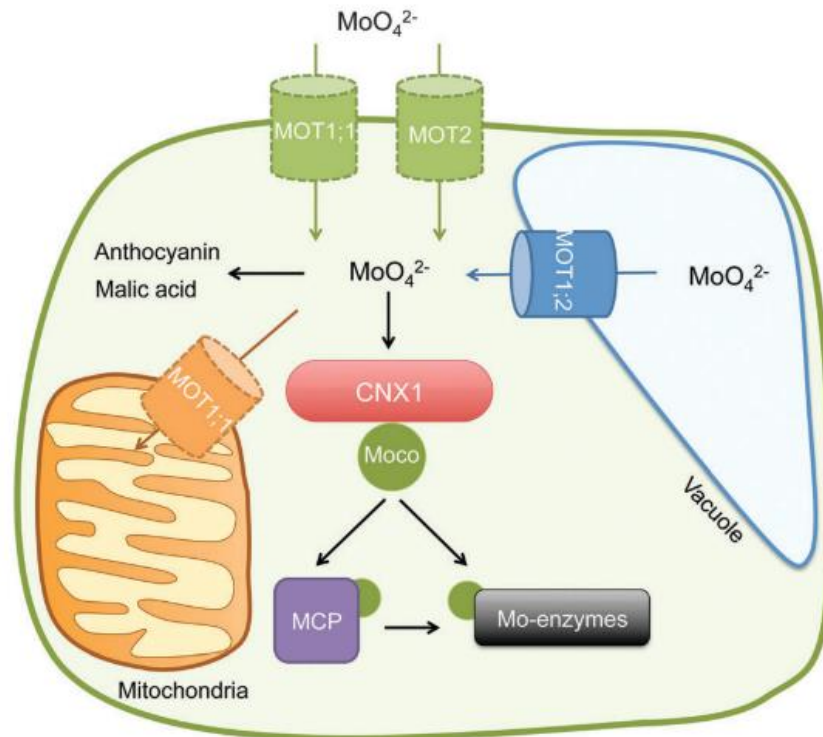
SULTR y son esenciales para la actividad transportadora de sulfato (Shibagaki and Grossman, 2004, 2006). (2) La presencia de dos dominios conservados en todas las proteínas de la familia MOT1, pero no en la familia SULTR. Además, se ha demostrado que el transporte de molibdato mediado por el transportador de familia MOT1 en *Chlamydomonas* (CrMOT1) presenta una muy alta afinidad por su sustrato (molibdato), con una  $K_m$  de 7 nM (Tejada-Jiménez et al., 2007) (Tabla 1).

*Tabla 1. Sistemas de transporte implicados en el transporte de molibdato en plantas (modificada de Tejada-Jiménez et al., 2013).*

Transportador	Anión específico	$K_m$	Otros sustratos	Organismo
<b>MOT1;1</b>	$\text{MoO}_4^{2-}$	7-20 nM	$\text{WO}_4^{2-}$	<i>C. reinhardtii</i> <i>A. thaliana</i>
<b>MOT1;2</b>	$\text{MoO}_4^{2-}$		$\text{WO}_4^{2-}$	<i>A. thaliana</i>
<b>MOT2</b>	$\text{MoO}_4^{2-}$	550 nM	$\text{WO}_4^{2-}$	<i>C. reinhardtii</i>
<b>SHST1</b>	$\text{SO}_4^{2-}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{MoO}_4^{2-}$	<i>S. hamata</i>

En *Arabidopsis* se han identificado dos miembros de la familia MOT1 (AtMOT1;1 y AtMOT1;2). El transportador AtMOT1;1 es un transportador específico de molibdato de alta especificidad y afinidad, con una  $K_m$  de 20 nM, además es insensible a una alta concentración de sulfato en el medio (Tejada-Jiménez et al., 2013; Tomatsu et al., 2007). Tiene unas características muy similares a CrMOT1, pero difiere en su regulación (que veremos más adelante). En cuanto a su localización, se han encontrado dos localizaciones subcelulares para AtMOT1;1: la membrana plasmática y la membrana de la mitocondria (Baxter et al., 2008; Gasber et al., 2011; Tomatsu et al., 2007).

La localización en la membrana plasmática podría deberse a un artefacto al fusionar el transportador con la proteína GFP, pero parece una localización fisiológica involucrada en la toma eficiente de Mo del suelo. Su presencia en la mitocondria podría estar relacionada con el mantenimiento de la homeostasis. El transportador AtMOT1;2 se identificó por su similitud en la secuencia con AtMOT1;1 (72%) (Gasber et al., 2011). Las plantas que carecen de AtMOT1;2 funcional presentan un perfil de acumulación de Mo alterado. Además, este transportador muestra una localización vacuolar, por lo que puede jugar un papel importante en la compartimentalización del Mo en plantas, aunque su papel fisiológico aún no está confirmado (Ilustración 2).



*Ilustración 2. Organización de la maquinaria de homeostasis del Mo en la célula vegetal (Tejada-Jiménez et al., 2013).*

Transportadores de la familia MOT1 se han identificado también en plantas leguminosas, donde el molibdeno tiene especial importancia. En sus nódulos se realiza la fijación del nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) debido a la simbiosis que establecen con bacterias fijadoras del nitrógeno (rizobios). La nitrogenasa presente en las bacterias y la nitrato reductasa presente en las leguminosas son molibdoenzimas que necesitan del cofactor de Mo para su función catalítica. En general, las leguminosas presentan en su genoma un mayor número de transportadores MOT1 con respecto a otras dicotiledóneas, esto sucede por la alta demanda de Mo (Duan et al., 2017; Gil-Díez et al., 2019; Tejada-Jiménez et al., 2017). Se ha identificado un transportador de alta afinidad en la leguminosa *Lotus japonicus* (LjMOT1) con una  $K_m$  de 182 nM. Se ha demostrado que este transportador está involucrado en la captación de Mo del medio, pero no en su transporte hasta los nódulos, debido a que la pérdida de este transportador no afecta a la capacidad de fijación del nitrógeno de la planta (Duan et al., 2017). En otros estudios, se han identificado 5 miembros de la familia MOT1 en la leguminosa *Medicago truncatula*. Dentro de esta familia se encuentra el transportador MtMOT1.1, que es el más similar al LjMOT1, y los transportadores MtMOT1.4 y MtMOT1.5, que se expresan en toda la planta. Por otra parte, se encuentra el transportador MtMOT1.3, que es específico de células de los nódulos, está presente en la membrana plasmática y es responsable principal de la captación del Mo en dicha estructura. En este caso, la pérdida del transportador sí conlleva

una pérdida de la actividad nitrogenasa (Tejada-Jiménez et al., 2017). Otro transportador presente es el MtMOT1.2 que se expresa exclusivamente en las células endodérmicas de las raíces y los nódulos. Está presente tanto en la membrana plasmática como en el sistema de endomembranas intracelular, lo que indica que es el responsable de la introducción de Mo al citosol desde el exterior celular o desde compartimentos intracelulares (Gil-Díez et al., 2019).

Se ha identificado y caracterizado una segunda familia de transportadores de molibdato en *Chlamydomonas reinhardtii*, que carece de relación con la familia MOT1, la familia MOT2 (Tejada-Jiménez et al., 2011). Se ha demostrado mediante estudios con ARN antisentido que la captación de Mo depende de CrMOT2 únicamente en ausencia de actividad CrMOT1. El transportador de Mo CrMOT2 también es un transportador de alta afinidad, pero su  $K_m$  (550 nM) es mayor que la mostrada por CrMOT1 (Tejada-Jiménez et al., 2011). Además, difiere en la regulación respecto a CrMOT1 (que se discute más adelante).

En plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, algas y animales están presentes proteínas que guardan similitud con CrMOT2. Además, la expresión heteróloga de MOT2 humano (HsMOT2) en *S. cerevisiae* permite la captación de Mo del medio externo, lo que sugiere que HsMOT2 puede actuar como transportador de molibdato en humanos (Tejada-Jiménez et al., 2011).

Se han encontrado otros transportadores en plantas que están relacionados con el transporte de molibdato. Por ejemplo, el transportador de alta afinidad de sulfato SHST1 puede transportar molibdato con baja afinidad en *Stylosanthes hamata* (Fitzpatrick et al., 2008).

### 1.3.2 Almacenamiento de molibdeno

La concentración de algunos nutrientes, como los metales de transición, tiene que ser estrechamente controlada para evitar reacciones no deseadas en la célula debido a un exceso, o la inactivación de enzimas debido a una deficiencia. La presencia de metales (como el hierro, el cobre o el Mo) puede producir efectos citotóxicos mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, debido a sus propiedades químicas. El almacenamiento de metales por compartimentalización o por unión a pequeñas proteínas en el interior celular permite regular su concentración, asegurando así su disponibilidad y previniendo de un estado de toxicidad (Blaby-Haas and Merchant, 2012).

En procariontes se conocen dos sistemas implicados en el almacenamiento de Mo. El primero está formado por la familia de proteínas, que está presente tanto en arqueas como en bacterias, y que contienen dos dominios Mop de unión de Mo (Wagner et al., 2000). El segundo sistema de almacenamiento de Mo es el de la proteína MoSto (Mo Storage protein) descrita en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*. Dicha proteína forma un

hexámero capaz de unir hasta 100 átomos de Mo mediante dominios POM (polinuclear oxyanion) existentes en la proteína (Poppe et al., 2014). En eucariotas no se han encontrado proteínas del tipo molbindin o MoSto. La única proteína relacionada con el almacenamiento de Mo en eucariotas se ha descrito en *C. reinhardtii* donde la proteína portadora del cofactor de molibdeno (MCP) es capaz de unir Mo en forma de cofactor de molibdeno (Ataya et al., 2003; Fischer et al., 2006). La MCP es una proteína de 64 KDa formada por cuatro subunidades de 16,5 KDa que se disponen formando un homotetrámero. Esta proteína se une al cofactor con gran afinidad previniendo su oxidación. La protección del cofactor es necesaria en un ambiente oxidante para mantener la disponibilidad de cofactor activo. Además, la MCP se encarga de transferir este cofactor directamente a las molibdoenzimas que lo necesitan para ser activas (Ataya et al., 2003; Witte et al., 1998). La existencia de la MCP permite crear un sumidero del cofactor activo.

No existen datos sobre una proteína homóloga a MCP en plantas superiores, aunque en *Arabidopsis* existe una familia de 9 proteínas clasificadas como lisina descarboxilasa que presentan una similitud estructural con la MCP de *Chlamydomonas reinhardtii*, por lo que reciben el nombre de proteínas de unión a cofactor de molibdeno (MBP). No obstante, solo 4 de estas proteínas pueden unir cofactor de molibdeno con una alta afinidad, lo que sugiere que la familia de proteínas MBP tienen otra función (Kruse et al., 2010).

Además, se ha encontrado que el transportador AtMOT1;2 tiene una localización vacuolar, por lo que puede jugar un papel importante en la compartimentalización del Mo, aunque su relación con la acumulación de Mo todavía no se ha confirmado (Gasber et al., 2011).

Por último, se han encontrado evidencias de que existe una relación directa entre los niveles de antocianinas o ácido málico y la acumulación de molibdato en *Brassica sp.* y *Medicago sativa L.* Esto sugiere que estos compuestos podrían estar relacionados con el almacenamiento de Mo en plantas (Hale et al., 2001; Steinke et al., 2008).

### 1.3.3 Regulación de la homeostasis de molibdeno

Tanto la entrada del Mo como su uso, almacenamiento y eliminación tienen que estar bien regulados para asegurar su disponibilidad metabólica. Esto incluye elementos de detección de la concentración intra- y/o extracelular, así como mecanismos que coordinen la expresión de los diferentes elementos de la homeostasis en respuesta a las necesidades celulares o a los cambios en el entorno (Tejada-Jiménez et al., 2009).

Actualmente, solo se conocen los sistemas de regulación de la homeostasis de Mo en bacterias, concretamente la regulación de transporte de Mo hacia el interior celular. Dicha

regulación es llevada a cabo por la proteína ModE, que actúa como represor del transportador ModABC dependiendo de la concentración de molibdato (Grunden et al., 1996). En presencia de molibdato intracelular, la proteína ModE dimeriza formando un complejo que se une a la región promotora del operón *ModABC* impidiendo la unión de la ARN-polimerasa. Cuando se produce una bajada de la concentración intracelular de Mo, ModE pierde su forma dimérica y se separa del promotor permitiendo así la expresión de los genes necesarios para el transporte de molibdato. De esta forma, el transportador ModABC es regulado transcripcionalmente por la concentración intracelular de molibdato.

En eucariotas se han realizado estudios para analizar la regulación de los transportadores de entrada, lo que indica que existen sistemas de regulación de la concentración celular de Mo. Pero todavía se desconocen los mecanismos implicados en esta regulación.

CrMOT1 se regula de una manera muy diferente a lo descrito en bacterias para el transportador ModABC. La expresión y la actividad de CrMOT1 son reguladas por la presencia de nitrato y es insensible a la disponibilidad de Mo, de manera que tanto la transcripción como la actividad de transporte mediada por CrMOT1 se activan en presencia de nitrato (Tejada-Jiménez et al., 2007). Este punto de regulación juega un papel importante en la aporte de Mo cuando la célula necesita asimilar nitrato como fuente de nitrógeno, debido a que, en estas condiciones aumenta la necesidad celular de Mo para asegurar una correcta actividad de la nitrato reductasa (NR), que es una molibdoenzima. De este modo, se puede entender a CrMOT1 como un punto de coordinación entre la síntesis de cofactor de molibdeno y la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*.

En *Arabidopsis*, la regulación de AtMOT1;1 es diferente a la regulación que presenta CrMOT1. AtMOT1;1 sí presenta una regulación transcripcional que responde a la disponibilidad de molibdato. La expresión de AtMOT1;1 disminuye en raíces y tallos de plantas que crecen en condiciones limitantes de Mo (Tomatsu et al., 2007). Este transportador es esencial para la captación de molibdeno del suelo y no parece estar conectado con la asimilación de nitrato, como sí ocurría en *Chlamydomonas reinhardtii*.

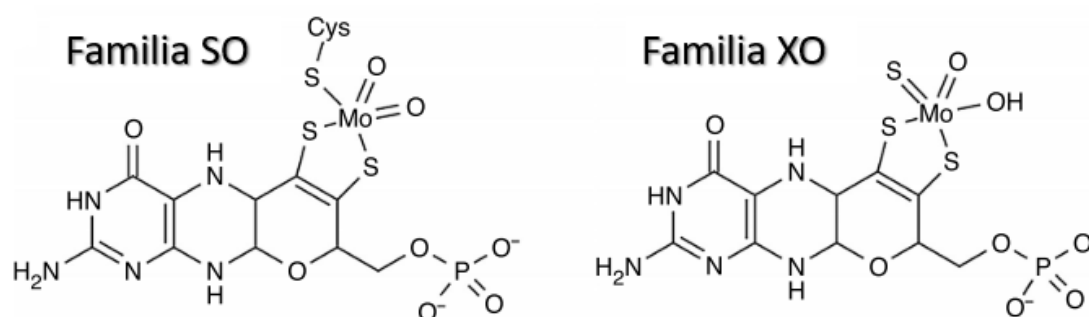
Por otra parte, el transportador CrMOT2 de *Chlamydomonas reinhardtii* presenta una regulación diferente dependiente de la disponibilidad de Mo, diferente a lo que ocurre con CrMOT1, pero manera similar a AtMOT1;1 y al ya conocido sistema de transporte de Mo bacteriano (Tejada-Jiménez et al., 2011, 2013). Esto sugiere que CrMOT1 y CrMOT2 juegan un papel diferente a nivel celular, mientras que CrMOT1 está conectado con la actividad de la NR, CrMOT2 parece ser esencial en condiciones de deficiencia de Mo.

## 1.4 Molibdoenzimas

Existen más de 50 enzimas en bacterias cuya actividad depende directamente de la presencia de cofactor de molibdeno en su centro activo (Schwarz et al., 2009); sin embargo, en eucariotas solo se han encontrado cinco molibdoenzimas, que son la nitrato reductasa (NR), sulfito oxidasa (SO), xantina oxidasa (XOR), aldehído oxidasa (AO) y componente reductor de la amidoxima (mARC). En animales, todas estas enzimas están presentes menos la NR, que es de gran importancia en plantas o microalgas (Schwarz, 2016).

Las SO y XOR están involucradas en reacciones catabólicas en el metabolismo de cisteínas y purinas (Hille et al., 2014). La AO y mARC son enzimas que se relacionan con el metabolismo de fármacos (Garattini and Terao, 2013; Havemeyer et al., 2011).

Basado en la estructura del sitio activo, se establecen dos familias de molibdoenzimas en eucariotas: tipo SO (tienen una cisteína conservada que forma el tercer enlace ecuatorial de azufre como cofactor de molibdeno) y el tipo XO (tercer azufre ecuatorial como ligando sulfido terminal) (Hille, 1996). Mientras que la AO pertenece a la familia de la XO, todavía no está claro si mARC pertenece a la familia de SO (debido a una conservación del residuo de cisteína) o si representa una nueva familia de molibdoenzimas (Ilustración 3).



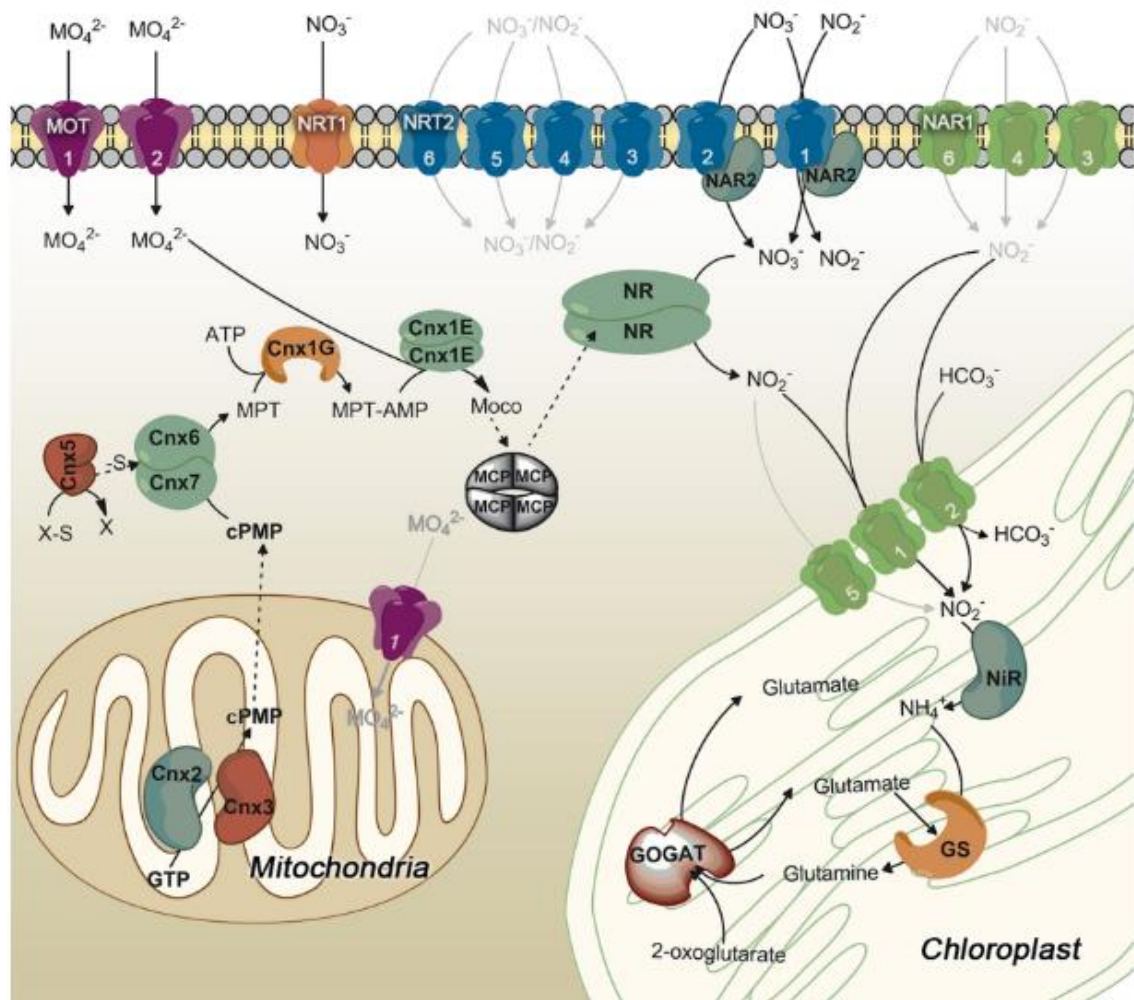
*Ilustración 3. Representación de la estructura del centro activo en las dos familias de molibdoenzimas en eucariotas (Modificada de Schwarz, 2016).*

### 1.4.1 Nitrato reductasa

La nitrato reductasa (NR) es una molibdoenzima clave en el proceso de asimilación de nitrato en plantas y microalgas (Ilustración 4). La NR es una enzima citosólica que cataliza la reacción de reducción del nitrato a nitrito con el gasto de NAD(P)H, como primer paso de la asimilación de nitrato. En eucariotas, esta enzima es un homodímero donde cada subunidad tiene un peso de 100-120 kDa y contiene tres grupos prostéticos: FAD, hemo  $b_{557}$  y el cofactor de molibdeno (Zhou and Kleinhofs, 1996). La NR en *Chlamydomonas* está codificada por un único gen (NIA1).



La NR es un punto de encuentro entre el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del Mo (Sanz-Luque et al., 2015).



*Ilustración 4. Esquema general de proteínas involucradas en la asimilación de nitrato y la biosíntesis del cofactor de molibdeno en Chlamydomonas (Sanz-Luque et al., 2015).*

A parte de la reducción del nitrato, la NR tiene otras dos actividades. La primera es NAD(P)H deshidrogenasa o diaforasa, catalizando la transferencia de electrones de nucleótidos de piridina a aceptores artificiales de electrones como el diclorofenol, indofenol o citocromo c (función independiente de cofactor de molibdeno). La segunda es la transferencia de electrones desde donadores artificiales de electrones como flavinas o azul de bromofenol al nitrato (función dependiente de cofactor de molibdeno) (Caboche and Rouzé, 1990; Solomonson et al., 1986).

#### 1.4.2 Sulfito oxidasa

La enzima SO cataliza la oxidación de dos electrones del sulfito a sulfato. El sulfito oxidado deriva del catabolismo de la cisteína, por lo tanto, la SO representa la etapa final en la degradación de cisteínas (Hille, 1996). Esta enzima es un homodímero formado por dos

monómeros que tienen un dominio de hemo tipo citocromo b5 N-terminal, un dominio de cofactor de molibdeno catalítico y un dominio de dimerización C-terminal. La SO se localiza en el espacio intermembrana de la mitocondria donde los electrones obtenidos de la oxidación del sulfito pasan directamente al aceptor de electrones citocromo c. Esta enzima necesita del cofactor de molibdeno para su buen plegamiento y función (Klein and Schwarz, 2012).

#### 1.4.3 Xantina oxidasa

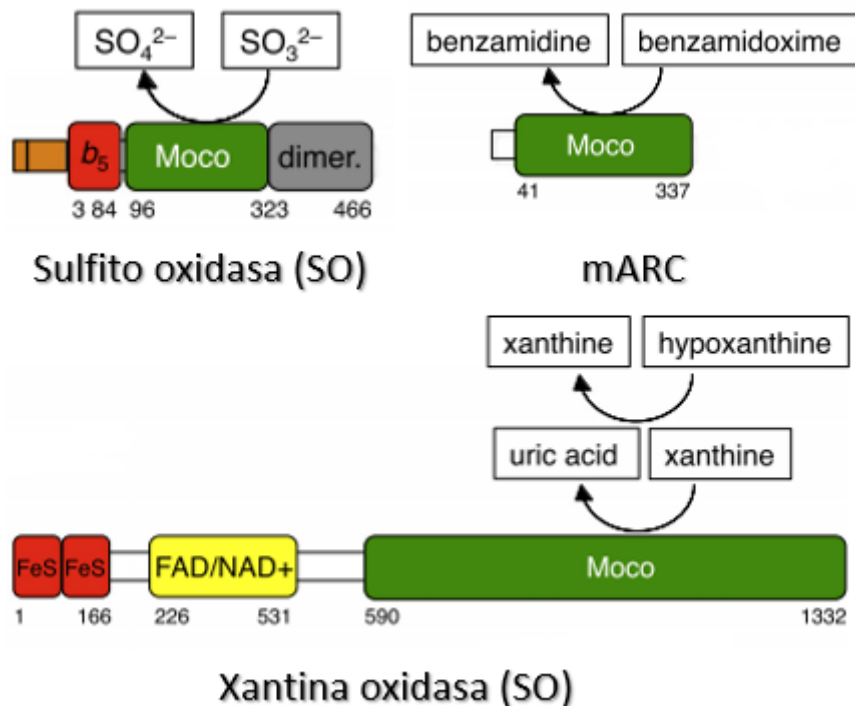
La enzima XOR cataliza las dos últimas etapas en el catabolismo de purinas, la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Esta enzima forma un homodímero con un dominio N-terminal de unión a dos clústeres de [2Fe-2S], un dominio central FAD y un dominio C-terminal de unión a cofactor de molibdeno que media la dimerización (Ilustración 5). La XOR se sintetiza como una deshidrogenasa y transfiere los electrones desde el sustrato hasta el NAD<sup>+</sup>, no obstante, las modificaciones postraduccionales convierten una enzima reversible (oxidación de cisteínas) o irreversible (proteolítica) en una oxidasa (XO) (Cao et al., 2014). En contraste con la xantina deshidrogenasa, la oxidasa produce aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (Kelley et al., 2010).

#### 1.4.4 Aldehído oxidasa

La enzima AO es muy similar estructuralmente a la XOR (Coelho et al., 2012). Esta enzima cataliza la oxidación de aldehídos en ácidos carboxílicos produciendo aniones superóxido y peróxido de hidrógeno como la XO (Hille et al., 2014). En contraste a la XO, existe una menor especificidad de sustratos y se incluyen heterociclos, purinas, pteridinas, es por esto que la AO juega un papel importante en el metabolismo de fármacos (Garattini and Terao, 2013).

#### 1.4.5 componente reductor de la amidoxina

La enzima mARC presenta dos isoformas: mARC1 y mARC2, que están presentes en el metabolismo de compuestos N-hidroxilados comúnmente utilizados como profármacos (Plitzko et al., 2013). La mARC es una enzima monomérica que se encuentra insertada en la membrana externa de la mitocondria orientada hacia el citosol para interactuar con el citocromo b5 y la enzima NADH/citocromo b5 reductasa, construyendo una cadena de transferencia de electrones hacia el centro de Mo (Havemeyer et al., 2011; Klein et al., 2012). Esta enzima juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis del NO. Recientemente, se ha encontrado que mARC2 juega un papel en la lipogénesis (Neve et al., 2015).



*Ilustración 5. Dominios estructurales de las molibdoenzimas sulfito oxidasa, xantina oxidasa y componente reductor de la amidoxina (Modificada de Schwarz, 2016).*

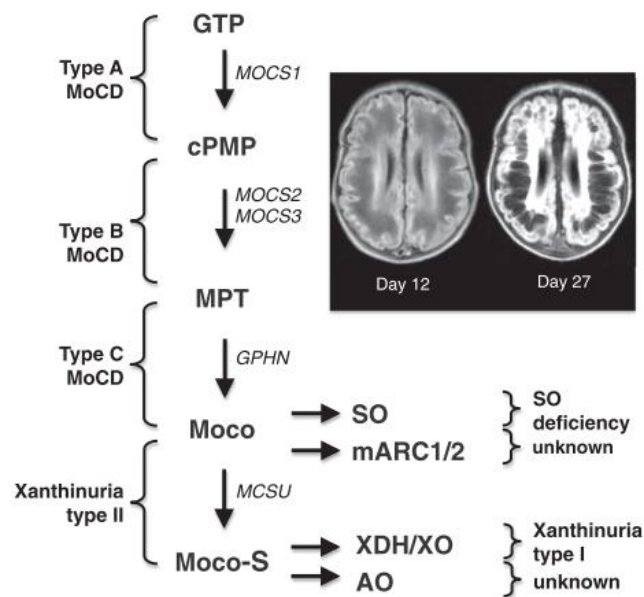
### 1.5 Deficiencia de molibdeno

El Mo es esencial para la correcta función de diversas enzimas. La deficiencia de Mo y, por lo tanto, la deficiencia de la biosíntesis del cofactor de molibdeno da como resultado una pérdida pleiotrópica de la actividad de todas las molibdoenzimas.

En plantas, la deficiencia de Mo ha sido estudiada en diferentes especies donde los fenotipos varían en severidad y apariencia. En general, se presentan defectos en los tejidos foliares más jóvenes que pierden su desarrollo normal, aparecen plantas anormalmente pequeñas, clorosis en las hojas y necrosis en los meristemas. Además, da lugar a flores con un desarrollo alterado en las anteras y los estambres, junto con una pobre producción de polen, lo que en los cultivos se traduce en un fuerte impacto en la producción agraria. A nivel celular, los cloroplastos cerca de las lesiones se vuelven bulbosos y se agrandan mostrando protuberancias esféricas unidas por membranas de cloroplasto y tonoplasto. Los síntomas que aparecen por la deficiencia de Mo son debidos mayoritariamente a la incapacidad para asimilar nitrato y para sintetizar la hormona vegetal ácido abscísico. Además, en plantas leguminosas el Mo tiene un papel crítico en la fijación simbiótica de nitrógeno, que depende de una llegada adecuada de este metal al nódulo donde dicho proceso tiene lugar (Kaiser et al., 2005).

En humanos, la deficiencia de cofactor de molibdeno (MoCD) es una enfermedad genética rara que causa la pérdida de la actividad de todas las enzimas dependientes de Mo. Esta deficiencia causa una degeneración progresiva del sistema nervioso central, los pacientes presentan dificultades de alimentación en el periodo neonatal, convulsiones, llanto agudo y características dismórficas de la cabeza. Esta patología puede provocar la muerte a las pocas semanas de nacer, los pocos pacientes que sobreviven al periodo neonatal no muestran el desarrollo neuronal necesario, por lo que no pueden realizar movimientos coordinados, no se comunican con el medio y necesitan alimentación asistida llegando a morir a los pocos años de vida (Bayram et al., 2013; Mechler et al., 2015).

La mayoría de los síntomas presentes en la MoCD se reflejan en la deficiencia aislada de la enzima SO, lo que provoca la acumulación de sulfito. Esto sugiere que la SO es la molibdoenzima más importante y que la acumulación de sulfito es la primera causa de la neurodegeneración. La acumulación de sulfito es acompañada con cambios en otros metabolitos que contienen azufre como tiosulfatos o homocisteínas (Belaidi et al., 2012; Relinque et al., 2015).



*Ilustración 6. Tipos de deficiencia de cofactor de molibdeno según la etapa de biosíntesis se encuentra afectada (Modificada de Schwarz, 2016).*

La MoCD es causada por mutaciones en alguna de las etapas de la ruta biosintética del cofactor de molibdeno. Incluso antes de la identificación de los genes involucrados en dicha biosíntesis, se establecieron dos tipos de pacientes: tipo A y tipo B. En el tipo B (mutaciones en los genes MOCS2 o MOCS3) se produce el precursor del cofactor cPMP, mientras que esto no ocurre en el tipo A (mutación en MOCS1). Posteriormente, se han encontrado que las

mutaciones presentes en el gen *GPHN* también pueden producir MoCD (Schwarz, 2016) (Ilustración 6).

### 1.6 Toxicidad de molibdeno

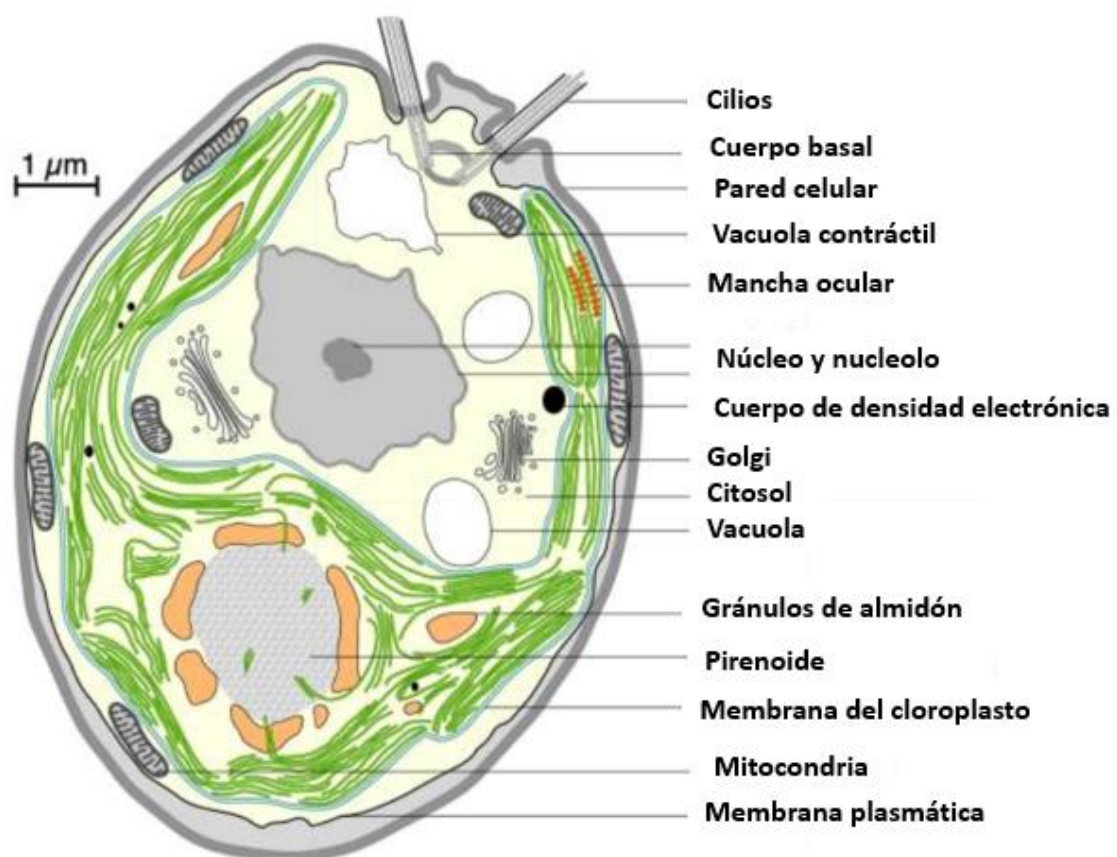
Una vez dentro de la célula los metales de transición (como es el molibdeno) pueden tener efectos tóxicos en solución acuosa, ya que pueden catalizar la producción de radicales libres, en reacciones tipo Fenton, o también pueden competir por el sitio de unión de otros metales en la correspondiente enzima inactivándola (Valko et al., 2005). Existen diversos mecanismos celulares para controlar la concentración de metal libre en el citosol. Uno de ellos es la eliminación del metal del citosol mediante transportadores específicos llevándolo a orgánulos de almacenamiento, como la vacuola (Tejada-Jiménez et al., 2009). De estos transportadores, solo se conoce que el transportador AtMOT1;2 presente en plantas está localización en la vacuola y podría estar involucrado en sacar Mo de dicho orgánulo (Gasber et al., 2011). Otra estrategia para controlar la concentración intracelular de Mo y evitar su toxicidad es la presencia de transportadores implicados en la salida del Mo desde el citosol hacia el medio extracelular. Estos mismos transportadores son esenciales para el transporte de larga distancia en organismos pluricelulares. No obstante, actualmente se desconocen los transportadores implicados en la salida del Mo, ya que todos los transportadores de la familia MOT1 o MOT2 parecen mediar el transporte de molibdato hacia el citosol (bien desde el medio extracelular, o bien desde algún orgánulo). También existe la posibilidad del uso de proteínas, tipo metalotioneínas o metalochaperonas, que unen el metal para entregarlo a la proteína que lo va a usar o al transportador específico que participa en sacarlo fuera de la célula o en almacenarlo en el orgánulo correspondiente (Valko et al., 2005). Se conocen las familias de proteínas MCP en *Chlamydomonas* y BMP en *Arabidopsis* que se unen cofactor de molibdeno para su protección, pero no unen molibdato ni ninguna otra forma de Mo.

### 1.7 *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo

La especie *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde unicelular. Este organismo eucariota fotosintético se utiliza como organismo de referencia para el estudio de diferentes procesos biológicos de plantas como la fotosíntesis o la asimilación de nutrientes inorgánicos, y también algunos procesos específicos de animales como la biología de los flagelos. En los últimos años, se ha utilizado para investigaciones de ciclo celular debido a que es un sistema fotosintético cuyo ciclo celular se puede sincronizar con ciclos de luz-oscuridad, de biogénesis

de cloroplastos y fotosíntesis debido a su capacidad fotosintética, de rodopsinas y optogenética debido a que posee un gran número de fotorreceptores, incluyendo 12 rodopsinas de unión al retinal o, incluso, se ha propuesto para el estudio de la fototaxis mediada por cilios (Salomé and Merchant, 2019).

En cuanto a la morfología de *Chlamydomonas reinhardtii* (Ilustración 7), tiene una forma ovalada y mide entre 5-10  $\mu\text{m}$ . La célula está rodeada por una pared celular rica en glicoproteínas y carbohidratos. Además, presenta un par de cilios de misma longitud en uno de los polos celulares. Estos cilios son similares a los presentes en las células animales, su axonema presenta una simetría de 9+2 basada en 9 microtúbulos que rodean el par central. Cercana a ese mismo polo, la célula acumula vacuolas de diferentes tamaños, llamadas vacuolas contráctiles. Estas estructuras son dinámicas, las vacuolas pequeñas pueden fusionarse para formar una de gran tamaño que se fusiona con la membrana plasmática para liberar contenido al exterior celular, por este motivo, controlan la tonicidad intracelular regulando la salida de agua (Xu et al., 2016).

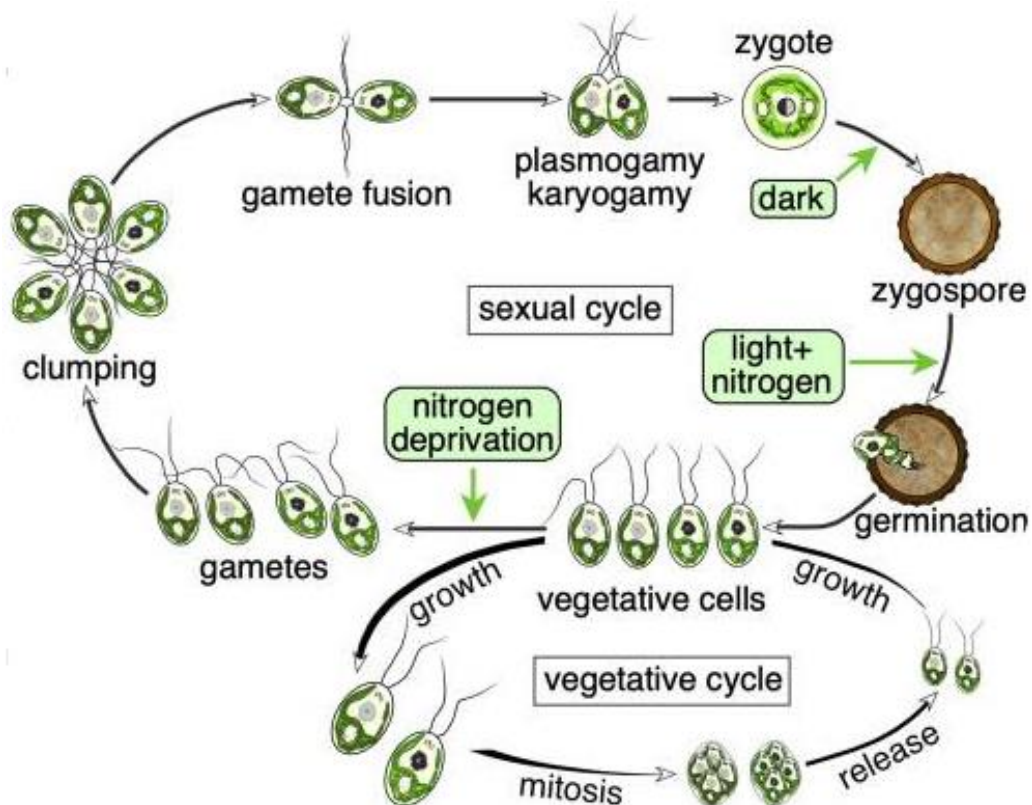


*Ilustración 7. Anatomía de Chlamydomonas reinhardtii (modificada de Salomé and Merchant, 2019)*

En su citoplasma se encuentra un único cloroplasto de gran tamaño que ocupa más de la mitad del volumen celular. Esta célula presenta gránulos de almidón entre las membranas de los

tilacoides y alrededor de una estructura esférica ubicada en el polo opuesto a los cilios, conocidas como pirenoide. Esta estructura presente en el interior del cloroplasto es el sitio de fijación del CO<sub>2</sub>, un proceso facilitado por las altas concentraciones locales de las enzimas involucradas, como la Rubisco (Freeman Rosenzweig et al., 2017). Finalmente, la mancha ocular es un dominio especializado de las membranas del cloroplasto que contienen gránulos de carotenoides. La mancha ocular refleja la luz sobre fotorreceptores del tipo ChR ubicados en la membrana plasmática para controlar el movimiento flagelar mediado por la luz (Salomé and Merchant, 2019).

Es un organismo haploide que tiene ciclo de vida sexual y vegetativo (Ilustración 8). Cuando los recursos no son limitados, *Chlamydomonas* se multiplica de forma asexual por división mitótica. Cada célula hija lleva la misma información genética nuclear, mitocondrial y cloroplástica. En condiciones adversas por escasez de nutrientes, las células se diferencian a gametos *mt+* o *mt-* y se reproduce de forma sexual (Salomé and Merchant, 2019). La presencia del ciclo sexual permite realizar cruces genéticos y análisis de tétradas, así como la obtención de diploides. Por este motivo, se utiliza para estudios de dominancia y complementación.



*Ilustración 8. Ciclos de vida de Chlamydomonas reinhardtii* (Salomé and Merchant, 2019)

El genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* está secuenciado y es relativamente pequeño (~10<sup>8</sup> pb). Debido a su uso tan extendido en investigación, se han establecido métodos sencillos para

la generación y aislamiento de mutantes (Yamano et al., 2013). Además, se han encontrado diversos marcadores seleccionables y técnicas de transformación eficientes a nivel de genes nucleares, cloroplásticos y mitocondriales.

Este microorganismo tiene un tiempo de generación corto (6-12 horas) con facilidad para el crecimiento en medios y ambientes controlados, manteniendo una homogeneidad en los cultivos. El crecimiento más rápido que en modelos clásicos de plantas ha llevado a potenciar su uso en investigación en biotecnología vegetal.

Para el metabolismo eucariota del Mo, *Chlamydomonas reinhardtii* ya ha sido utilizado permitiendo la identificación de componentes para su captación (Tejada-Jiménez et al., 2007), la obtención de mutantes en la biosíntesis del cofactor del molibdeno (Llamas et al., 2007), así como la caracterización funcional y estructural de las proteínas que utilizan este cofactor o que transfieren a las enzimas que lo necesitan (Fischer et al., 2006).

## 2. Objetivo

A pesar del papel crítico del Mo en procesos biológicos fundamentales en eucariotas, hasta la fecha, sólo se han identificado transportadores para la toma de Mo. No se conocen los componentes homeostáticos encargados del almacenamiento de Mo, transportadores encargados de la exportación de Mo, ni los reguladores encargados de coordinar la expresión de los componentes homeostáticos con la situación fisiológica de disponibilidad de Mo. El objetivo de este trabajo es realizar los primeros pasos para la identificación de los componentes implicados en la homeostasis de Mo en eucariotas. Para ello partimos de la hipótesis de que en eucariotas existen mecanismos para regular la concentración celular de Mo y que, al igual que ocurre con otros micronutrientes, y que la expresión de los genes necesarios para que se lleve a cabo debe responder a variaciones de dicha concentración.

En el grupo de investigación donde se ha realizado este TFM se va a abordar la identificación y caracterización de componentes del sistema de homeostasis de Mo en eucariotas mediante expresión diferencial a través de una estrategia de transcriptómica basada en la secuenciación de ARN (RNA-Seq) y usando como modelo el alga *Chlamydomonas reinhardtii* crecida en condiciones de deficiencia y toxicidad por Mo vs. condiciones suficientes de este metal.

Por lo tanto, el objetivo general se puede dividir en objetivos específicos:

- 1) Determinar las condiciones adecuadas para conseguir una expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis de Mo. Para ello se cultivan diferentes estirpes de



dicho microalga en presencia de diferentes concentraciones de molibdato y diferentes fuentes de nitrógeno, con el fin de conseguir las condiciones de deficiencia y toxicidad de Mo más adecuadas para llevar a cabo el análisis transcriptómico.

- 2) Identificar genes posiblemente implicados en la homeostasis de este metal mediante la generación de mutantes que muestren alteración en la toxicidad o deficiencia de Mo.

Debido a la crisis sanitaria solo se ha podido abordar experimentalmente el primer objetivo.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Estirpes de *Chlamydomonas*

Las estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizadas en este trabajo están recogidas en la Tabla 2.

*Tabla 2. Estirpes de Chlamydomonas usadas en este trabajo.*

Estirpe	Genotipo	Gen mutado	Referencia
6145C	mt- WT	-	(Fernández and Matagne, 1986)
704	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS	-	(Loppes et al., 1999)
7.96	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII CNX2-	CNX2 (biosíntesis de cofactor de Mo)	(González-Ballester et al., 2005a)
11.40	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII CNX3-	CNX3 (biosíntesis de cofactor de Mo)	(González-Ballester et al., 2005a)
204.81	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII CNX5-	CNX5 (biosíntesis de cofactor de Mo)	(González-Ballester et al., 2005a)
1.78	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII CNX1G-	CNX1G (biosíntesis de cofactor de Mo)	(González-Ballester et al., 2005a)
70.9	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII CNX1E-	CNX1E (biosíntesis de cofactor de Mo)	(González-Ballester et al., 2005a)
70.9 + CNXE SB	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII RBCS2:CNX1E	-	(Llamas et al., 2007)
70.9 + CNXE KB	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII RBCS2:CNX1E	-	(Llamas et al., 2007)
89.87	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII NIT2-	NIT2 (regulador de la ruta de asimilación de nitrato)	(Camargo et al., 2007)
104 +	mt <sup>+</sup> Nit4-	CNX1E (biosíntesis	(Fernández and

		de cofactor de Mo)	Matagne, 1986)
104 -	Mt- Nit4-	CNX1E (biosíntesis de cofactor de Mo)	(Fernández and Matagne, 1986)
102 +	mt+ Nit5- Nit6-	CNX1E (biosíntesis de cofactor de Mo)	(Fernández and Matagne, 1986)
102 -	mt- Nit5- Nit6-	CNX1E (biosíntesis de cofactor de Mo)	(Fernández and Matagne, 1986)
102 + CNX1E 0	mt+ Nit5- Nit6- Rbc:AphVIII Rbc:CNX1E	-	(Tejada-Jiménez et al., 2013)
102 + CNX1E 00	mt+ Nit5- Nit6- Rbc:AphVIII Rbc:CNX1E	-	(Tejada-Jiménez et al., 2013)
21 gr	mt+ Nit5-	Nit5 (transporte de Mo)	(Sosa et al., 1978)
1 gr	mt+ Nit5- Rbc:AphVIII Rbc:MoT1i	MOT1 silenciado por RNAi	(Tejada-Jiménez et al., 2007)
2 gr	mt+ Nit5- Rbc:AphVIII Rbc:MoT1i	MOT1 silenciado por RNAi	(Tejada-Jiménez et al., 2007)
C <sub>2</sub> i	mt+ cw15 arg7+ Nia1:ArS Rbc:AphVIII Rbc:MoT1i	MOT2 silenciado por RNAi	(Tejada-Jiménez et al., 2011)
Mcp	mt+ cw15 ARG7 + NIA1:ARS RBCS2:Aph VII MCP1	MCP1 (almacenamiento de cofactor de Mo)	(Fernández and Matagne, 1986)

## 3.2 Medios y condiciones de cultivo

### 3.2.1 Soluciones Stock

Los medios utilizados para el cultivo de *Chlamydomonas* se prepararon a partir de las siguientes soluciones concentradas (Harris, 2009):

- Solución Tris 1 M: 121 g/l.
- Solución A: 5 g/l CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 10 g/l MgSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, 40 g/l NH<sub>4</sub>Cl.
- Solución A-N: 5 g/l CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 10 g/l MgSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (Igual que la solución A, pero sin NH<sub>4</sub>Cl).
- Solución B: 115 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 46 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Solución de oligoelementos: 50 g de EDTA (ácido libre) se disolvieron en 250 ml de agua. A continuación, se calentaron 550 ml de agua a 100 °C y se añadieron por el siguiente orden: 11,4 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 22 g/l ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 5,1 g/l MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O; 5 g/l FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 1,6 g/l CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 1,6 g/l CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O; 0,214 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O. Tras mezclar ambas soluciones, se dejó enfriar a 80 - 90 °C y se ajustó a pH a 6,8 con KOH al

20 % procurando que la temperatura no bajase de 70 °C. Se enrasó el volumen hasta 1 l, manteniéndose en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 días antes de su uso.

- Solución Hutner: Igual que la solución de oligoelementos, pero sin Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.
- Solución molibdato: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 M.
- H<sub>2</sub>O Mili-Q para completar el volumen.

### 3.2.2 Medios de cultivo

**Medio TAP (Tris-Acetate-Phosphate):** medio con acetato como fuente de carbono orgánico.

*Medio líquido:* 10 ml/l de solución Tris 2 M, 10 ml/l de solución A, 1 ml/l de solución B, 1 ml/l de solución de oligoelementos, 0,95 ml/l de ácido acético glacial.

**Medio TAP -Mo:** medio TAP modificado sin molibdato usando solución de oligoelementos sin Mo (solución Hutner).

*Medio líquido:* 10 ml/l de solución Tris 2 M, 10 ml/l de solución A, 1 ml/l de solución B, 5 ml/l Hutner, 0,95 ml/l de ácido acético glacial.

**Medio TAP -Mo -N:** medio TAP modificado sin molibdato ni fuente de nitrógeno.

*Medio líquido:* 10 ml/l de solución Tris 2 M, 10 ml/l de solución A-N, 1 ml/l de solución B, 5 ml/l Hutner, 0,95 ml/l de ácido acético glacial.

**Fuentes de nitrógeno:** Para la preparación de medios con una fuente de nitrógeno diferente al amonio 8 mM (NH<sub>4</sub>Cl), se utilizó el medio TAP -Mo -N suplementado con nitrato 4 mM (KNO<sub>3</sub>) o nitrato + urea 4 mM (KNO<sub>3</sub> + CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O).

**Condiciones de molibdato:** Los medios TAP -Mo con diferentes fuentes de nitrógeno (amonio, nitrato o nitrato + urea) fueron suplementados con molibdato en distintas concentraciones: Mo 0 (no se añade), Mo 1 (0,88 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), Mo 10 (10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), Mo 25 (25 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), Mo 50 (50 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) y Mo 100 (100 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>).

*Medios sólidos:* se añadió bactoagar (16 g/l) a las mezclas previamente disueltas. Los medios sólidos, tras ser esterilizados, se enfriaron en un baño termostatzado a 50 °C y posteriormente se vertieron en placas de *Petri*.

### 3.2.3 Cultivos de *Chlamydomonas*

La conservación de las estirpes de *Chlamydomonas* se llevó a cabo en medios sólidos TAP en placas de *Petri* estériles. Para mantener las estirpes se realizaron pases cada 2-3 meses, evitando así, la muerte celular. Los cultivos con los inóculos frescos (provenientes de los

cultivos sólidos de conservación) se cultivaron durante 2-3 días en una cámara termostatazada a 25°C con agitación e iluminación continua de 15-20 W/m<sup>2</sup> proporcionada por tubos led de luz blanca. Los recipientes utilizados para los cultivos fueron matraces Erlenmeyer de 50 ml.

#### 3.2.4 Determinación del número de células

Se utilizó el contador automático de células “microcellcounter F-500” de Sysmex. Las células se diluyeron en solución salina isotónica de Sysmex (10 ml de solución salina cada 25-200 µl de cultivo).

#### 3.2.5 Test de crecimiento

##### 3.2.5.1 Preinóculos

Las células de Chlamydomonas provenientes de los cultivos sólidos de mantenimiento se inocularon en medio TAP -Mo en tubos Falcon de 25 ml. El número de preinóculos realizados dependió del número de estirpes en estudio en cada experimento. Estos cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 2-3 días hasta alcanzar la densidad celular adecuada para proceder al conteo de células y llevar a cabo los siguientes inóculos.

##### 3.2.5.2 Inóculos

De los preinóculos de Chlamydomonas que llegaron a la densidad celular adecuada se tomaron alícuotas para determinar el número de células. Posteriormente, se realizó un inóculo de 20.000 o 40.000 células para tener cultivos que partieran del mismo número de células. Estos cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 5-6 días hasta llegar a fase exponencial de crecimiento.

##### 3.2.5.3 Test de crecimiento

Se tomaron alícuotas de los cultivos de Chlamydomonas para determinar el número de células. A continuación, se recogieron las células por centrifugación (5000 x g durante 1-2 minutos a temperatura ambiente) y se resuspendieron en medio TAP -Mo -N ajustando a  $2 \cdot 10^6$  células/ml. Esta suspensión de células se utilizó para realizar los tests de crecimiento en medios de cultivo sólidos y líquidos en cada una de las condiciones (medio sólido y líquido, fuentes de nitrógeno y concentración de molibdato):

- Medio sólido: se tomaron 5 µl de suspensión de células (10.000 células) que se sembraron en forma de gota en las placas de diferentes condiciones. Los cultivos en medio sólido se mantuvieron en la cámara de cultivo con luz constante durante 3-6 días. Finalmente, se escanearon las placas para comparar el crecimiento de forma cualitativa entre las diferentes condiciones y seleccionar las estirpes que iban a ser estudiadas en medio líquido.

- Medio líquido: se tomaron 25 µl de suspensión de células (50.000 células) que se sembraron en medios de cultivo líquido para cada condición en estudio. Se mantuvieron los cultivos en la cámara de cultivo y se midió la cantidad de células a día 3, día 4 y día 7 del test de crecimiento.

Para obtener la curva de crecimiento se usaron 250.000 células de las estirpes de interés para sembrar en medios de cultivo líquido y medir la cantidad de células cada 24 horas durante 4 días.

### 3.3 Análisis estadístico

Los tests de crecimiento llevados a cabo en este trabajo se han realizado por duplicado. El test de crecimiento en medio sólido se analizó de forma cualitativa, por lo que no se pudo llevar a cabo análisis estadístico, pero se realizó dos veces para confirmar los resultados obtenidos. Por otra parte, el test de crecimiento en medio líquido se analizó de forma cuantitativa mediante el número de células por mililitro. En este último caso se representa la media de las dos repeticiones biológicas (n = 2) y la desviación estándar.

### 3.4 Búsqueda bibliográfica

Debido al problema sanitario al que nos hemos enfrentado durante el desarrollo de este trabajo, se estableció una tipología mixta, es decir, se ha llevado a cabo un trabajo de revisión que integra los datos experimentales que se obtuvieron hasta el establecimiento del estado de alerta. Para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica en la que se basa la parte de revisión se usó principalmente la base de datos PubMed (National Center for Biotechnology Information). La búsqueda de bibliografía se ha realizado en inglés y con el uso de palabras clave como “Molybdenum homeostasis”, “Chlamydomonas reinhardtii”, “Molybdenum transporter” o “Molybdenum cofactor”. Se ha filtrado por tipo de publicación y fecha, dando prioridad a las revisiones sobre el tema a tratar, por su visión general y recogida de resultados. Otro factor que se ha tenido en cuenta es el año de publicación de los artículos utilizados, intentando que en el caso de las revisiones fueran lo más recientes posible. Las distintas revisiones usadas han servido de base para identificar y consultar las publicaciones originales más relevantes en cuanto al metabolismo y homeostasis de Mo en eucariotas. Asimismo, mediante búsqueda directa con las palabras clave mencionadas anteriormente se han identificado las publicaciones reciente relacionadas con el tema de este TFM y que todavía no se están recogidas en revisiones bibliográficas publicadas.

Con el uso de la bibliografía analizada se estructuró la introducción bibliográfica de este trabajo.

## 4. Resultados

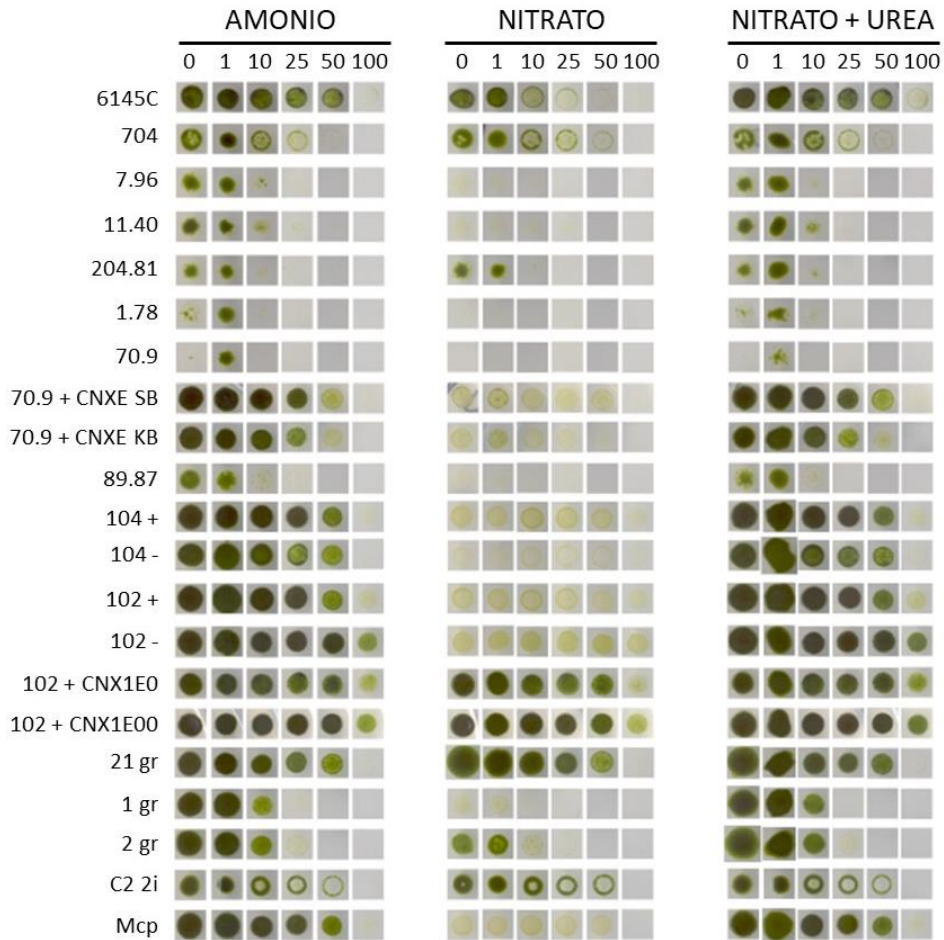
Con el objetivo de determinar las condiciones más adecuadas de deficiencia y toxicidad de Mo, se llevaron a cabo test de crecimiento en medio sólido y en medio líquido. Puesto que se quiere realizar un estudio transcriptómico mediante RNA-seq, las condiciones de toxicidad y deficiencia buscadas serían aquellas que permitan el crecimiento celular, pero en las que dicho crecimiento se vea afectado respecto a condiciones normales.

### 4.1 Medio sólido

Inicialmente, se llevó a cabo un test de crecimiento en medio sólido para analizar de forma cualitativa la sensibilidad a Mo de las 21 estirpes que componen la colección de partida (Tabla 2). Dichas estirpes se eligieron por poseer diferentes defectos en el metabolismo del Mo, además se escogieron dos estirpes silvestres diferentes. Asimismo, se utilizaron tres fuentes de nitrógeno diferentes:

- Amonio: Condición control, crecen todas las estirpes en estudio.
- Nitrato: Condición en la que se induce la expresión de la enzima nitrato reductasa, que es una molibdoenzima, por lo que la demanda de Mo es mayor.
- Nitrato + urea: Condición para aquellas estirpes mutantes que no crecen en medios que tienen nitrato como fuente de nitrógeno. El nitrato induce la expresión de la nitrato reductasa y la demanda de Mo, mientras que la urea sirve de fuente de nitrógeno ante la imposibilidad de utilizar el nitrato.

En este test se partió de 10.000 células/gota y se escanearon los cultivos al tercer día de crecimiento.

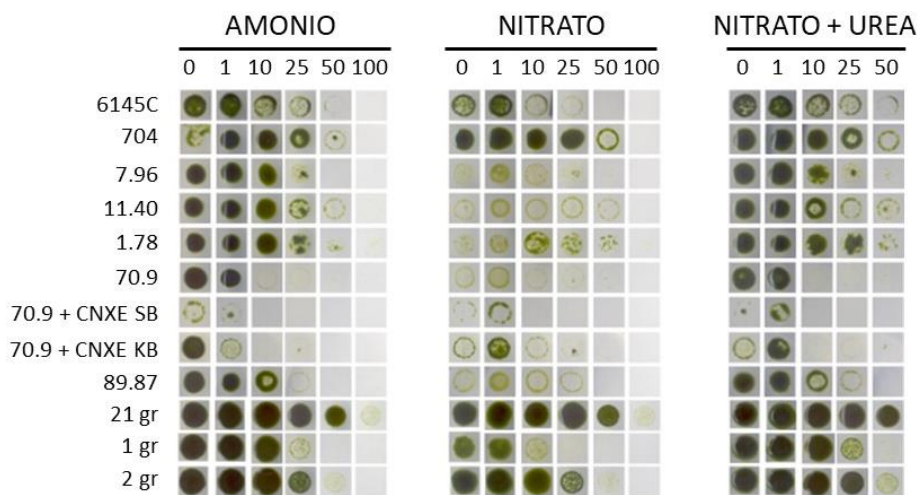


**Ilustración 9.** Test de crecimiento en cultivo sólido de 21 estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii* en medios TAP con diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones de Mo. Condiciones de nitrógeno: Amonio, 8 mM NH<sub>4</sub>Cl; Nitrato, 4 mM KNO<sub>3</sub>; Nitrato + Urea, 4 mM KNO<sub>3</sub> + CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O. Condiciones de Mo: 0, sin Mo añadido; 1, 0,88 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 10, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 25, 25 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50, 50 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 100, 100 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

En base a los resultados obtenidos en el primer test (Ilustración 9), se procedió a seleccionar aquellas estirpes que mostraban de forma más clara el efecto de la toxicidad o deficiencia con el objetivo de realizar un segundo test en medio sólido. En todos los casos las diferentes concentraciones de Mo se compararon con Mo 1 (0,88 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), siendo ésta la concentración estándar de Mo para el crecimiento de *Chlamydomonas*. Se puede apreciar como la estirpe 704 muestra un peor crecimiento en la condición de Mo 0, independientemente de la fuente de nitrógeno, lo que la convierte en candidata para el estudio de la deficiencia. Así mismo, encontramos que la estirpe 70.9 también muestra un mal crecimiento en la condición de Mo 0, en amonio y en nitrato + urea. Otros ejemplos de deficiencia son la estirpe 1.78 en amonio y nitrato + urea, o la estirpe 89.87 en nitrato + urea. Del mismo modo, se puede apreciar también el efecto de toxicidad con el aumento de la

concentración de Mo en muchas de las estirpes, por ejemplo, en 6145C, 704, 11.40, 21gr, 1gr o 2gr.

Una vez seleccionadas aquellas estirpes que mejor representaban el efecto de la deficiencia y/o la toxicidad de Mo, se llevó a cabo un segundo test en medio sólido (Ilustración 10) para confirmar los resultados y seleccionar las estirpes más representativas para realizar test de crecimiento en medio líquido. En este caso, también se partió de una cantidad inicial de 10.000 células/gota, pero se escanearon los cultivos al cuarto día de crecimiento.



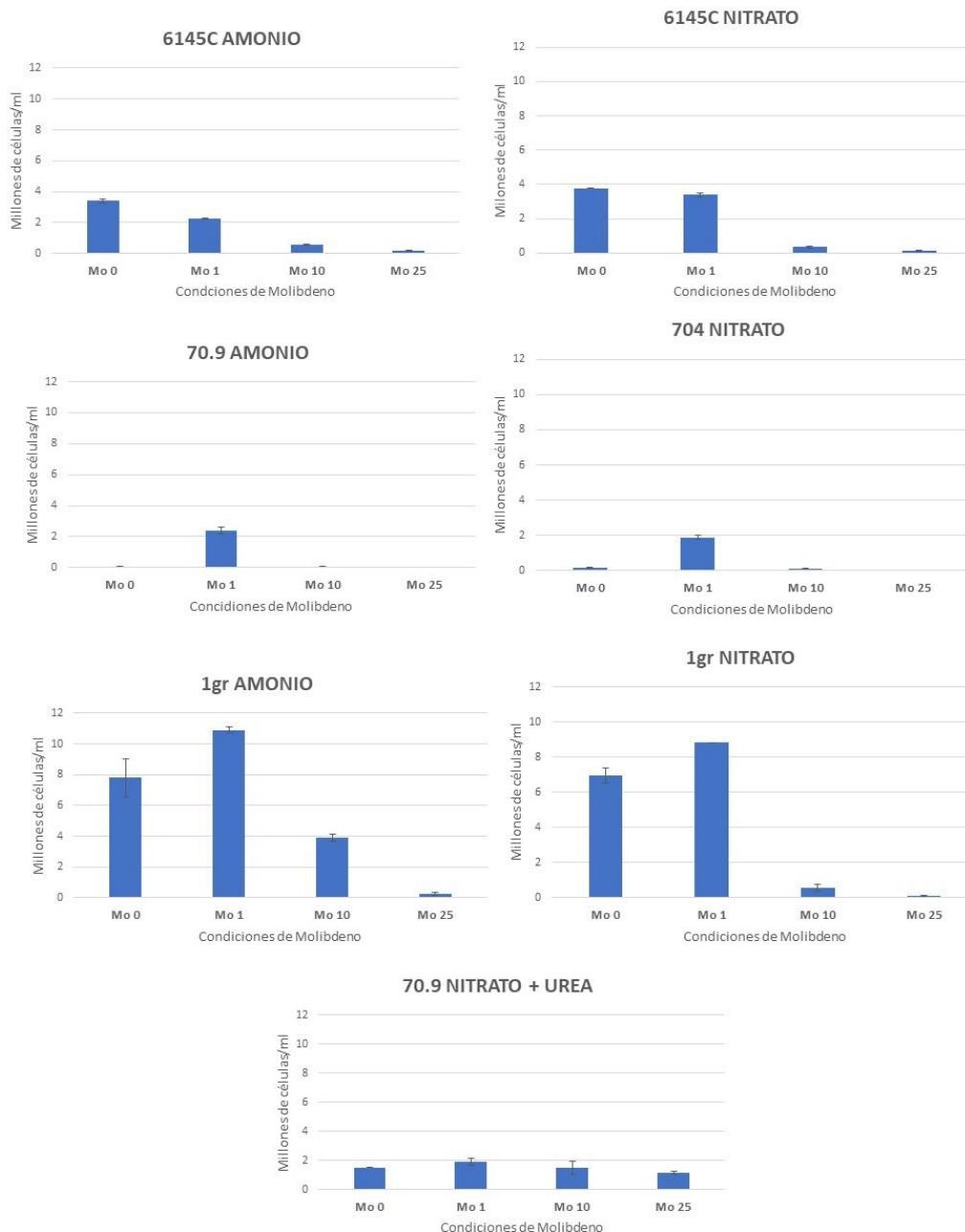
*Ilustración 10. Test de crecimiento en cultivo sólido de 12 estirpes de Chlamydomonas reinhardtii en medios TAP con diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones de Mo. Condiciones de nitrógeno: Amonio, 8 mM NH<sub>4</sub>Cl; Nitrato, 4 mM KNO<sub>3</sub>; Nitrato + Urea, 4 mM KNO<sub>3</sub> + CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O. Condiciones de Mo: 0, sin Mo añadido; 1, 0,88 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 10, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 25, 25 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50, 50 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 100, 100 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.*

En este segundo test en medio sólido, se confirmaron aquellas estirpes que mejor representaban el efecto de la deficiencia y toxicidad de Mo. Las estirpes 6145C, 704, 70.9, 70.9 KB y 1gr se seleccionaron como posibles candidatas para realizar el análisis transcriptómico. A continuación, con el objetivo de realizar una comparación cuantitativa, se sometieron dichas estirpes a un test de crecimiento en medio líquido.

#### 4.2 Medio líquido

Para realizar el test de crecimiento en medio líquido, se utilizaron las estirpes 6145C, 704, 70.9 y 1gr. En este caso, la cantidad de células de partida fue de 50.000 células y se midió la cantidad de células al cuarto día desde la inoculación, con el objetivo de realizar una comparación cuantitativa (Ilustración 11).





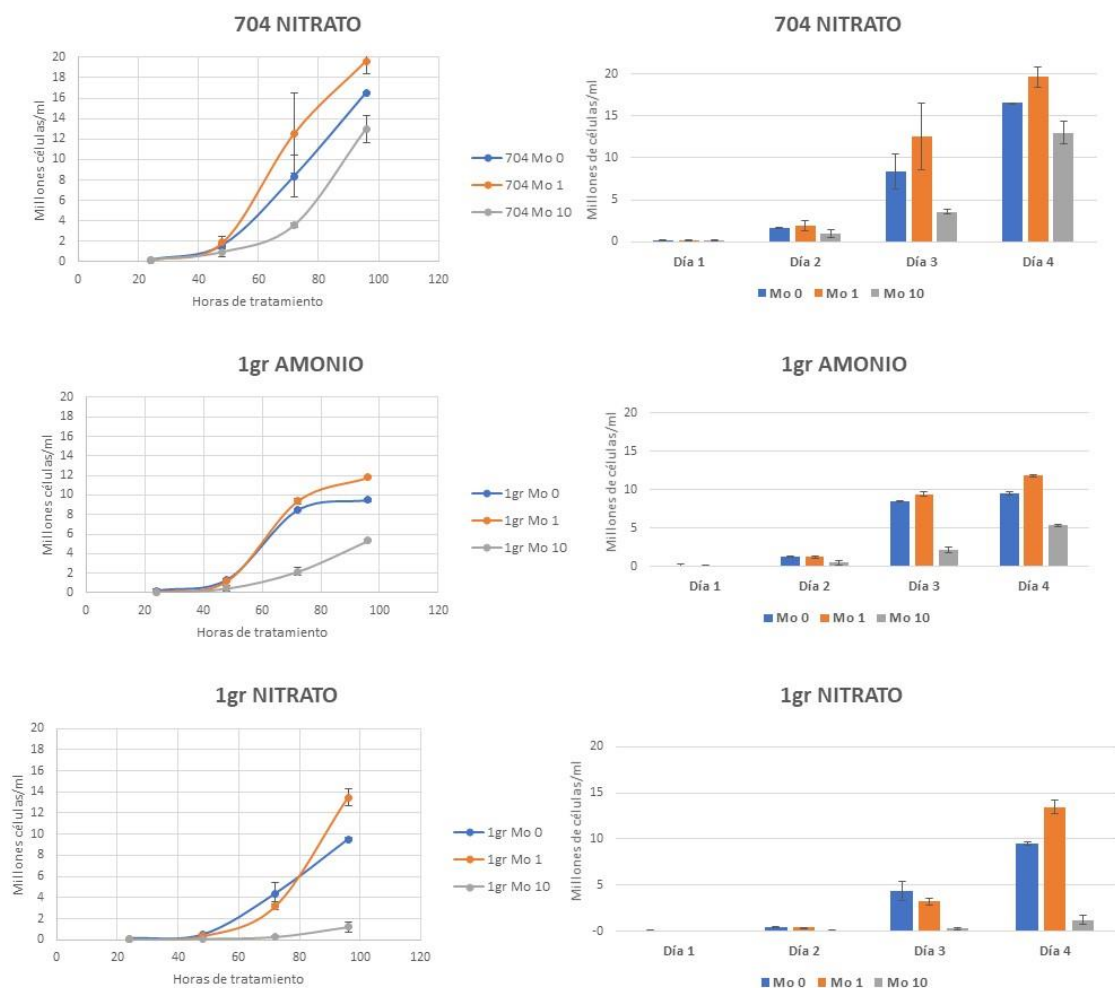
**Ilustración 11.** Test de crecimiento en cultivo líquido de las estirpes 6145C, 704, 70.9 y 1gr de *Chlamydomonas reinhardtii* en medios TAP con diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones de Mo. Condiciones de nitrógeno: Amonio, 8 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; Nitrato, 4 mM  $\text{KNO}_3$ ; Nitrato + Urea, 4 mM  $\text{KNO}_3$  +  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ . Condiciones de Mo: 0, sin Mo; 1, 0,88  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ; 10, 10 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ; 25, 25 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ . Los datos representados son los obtenidos en el conteo celular como millones de células/ml de cultivo al cuarto día de crecimiento. Los valores se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media ( $n=2$  cultivos/condición).

En este test de crecimiento en medio líquido se puede apreciar que la estirpe 1gr presenta un buen crecimiento en condiciones normales de Mo, mientras que este crecimiento ha disminuido en condiciones de toxicidad y deficiencia de Mo, tanto en amonio como en nitrato. Además, la estirpe 704 en nitrato también muestra el efecto de la deficiencia y toxicidad de

Mo en su crecimiento. Por este motivo, las estirpes 1gr y 704 se seleccionaron para realizar una curva de crecimiento que pudiera confirmar este patrón de comportamiento.

### 4.3 Curva de crecimiento

Para terminar de demostrar el efecto de la deficiencia y toxicidad del Mo sobre el crecimiento de las estirpes seleccionadas como candidatas para realizar el análisis transcriptómico (1gr y 704) se llevó a cabo una curva de crecimiento (Ilustración 12). En este caso, se partió de una cantidad inicial de 250.000 células y se midió la cantidad de células diariamente.



**Ilustración 12.** Curvas de crecimiento en cultivo líquido de las estirpes 704 y 1gr de *Chlamydomonas reinhardtii* en medios TAP con diferentes fuentes de nitrógeno y concentraciones de Mo. Condiciones de nitrógeno: Amonio, 8 mM NH<sub>4</sub>Cl; Nitrato, 4 mM KNO<sub>3</sub>. Condiciones de Mo: 0, sin Mo añadido; 1, 0,88 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 10, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. Los datos representados son los obtenidos en el conteo celular como millones de células/ml de cultivo diariamente desde la inoculación. Los valores se representan como la media ± la desviación estándar de la media (n= 2 cultivos/condición).

En las curvas de crecimiento se puede apreciar que el efecto de la toxicidad o deficiencia de Mo en los dos primeros días es mínimo, los cultivos muestran un crecimiento similar. Sin embargo, en tiempos más largos hay un mayor crecimiento en estándar de Mo (Mo 1) que en condiciones de Mo no añadido (Mo 0) o exceso de Mo (Mo 10). Una situación de toxicidad de Mo, debido a un aumento en su concentración, tiene un efecto mayor que una situación de deficiencia de Mo por un descenso en la misma. En general, los cultivos sometidos a una mayor concentración de Mo crecen menos que los cultivos que están sometidos a un déficit. Estos resultados, sugieren que tanto la estirpe 704 (creciendo con nitrato como fuente de nitrógeno) como la estirpe 1gr (creciendo con nitrato o amonio) muestran deficiencia de crecimiento tanto por bajo Mo como por exceso (toxicidad), y por tanto podrían ser buenas candidatas para un análisis transcriptómico en el que se busquen genes diferencialmente expresados en deficiencia o toxicidad por Mo.

## 5. Discusión

El Molibdeno es un micronutriente esencial debido a su papel biológico en forma de cofactor de Mo presente en las molibdoenzimas (Mendel and Kruse, 2012). En eucariotas, se han identificado enzimas dependientes de Mo, entre las que se encuentran la nitrato reductasa, sulfito oxidasa, xantina oxidasa, aldehído oxidasa y el componente reductor de la amidoxina (Hille et al., 2011). Como ocurre con otros micro- (y macro-) nutrientes, la concentración de Mo debe estar regulada para asegurar la disponibilidad metabólica de este metal y evitar al mismo tiempo los efectos tóxicos. El mantenimiento de la homeostasis está compuesta por mecanismos de captación hacia el interior celular, de compartimentalización intracelular, de exportación hacia el exterior y de regulación para responder a los cambios ambientales (Tejada-Jiménez et al., 2009). Actualmente, en eucariotas solo se conocen mecanismos de captación de Mo, por ejemplo, el transportador AtMOT1;1 en *Arabidopsis* (Tomatsu et al., 2007) o el LjMOT1 en la leguminosa *Lotus japonicus* (Duan et al., 2017). Los primeros transportadores eucariotas de este tipo: MOT1 (Tejada-Jiménez et al., 2007) y MOT2 (Tejada-Jiménez et al., 2011) se identificaron usando *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo. No obstante, no se conocen otros componentes homeostáticos relacionados con la exportación de Mo, su almacenamiento ni elementos reguladores de la expresión génica.

En el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFM se proponen como objetivo la identificación y caracterización de componentes del sistema de homeostasis de Mo en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante la realización de un análisis transcriptómico RNA-Seq,

mediante comparación de la expresión génica en condiciones de toxicidad y deficiencia de Mo frente a condiciones suficientes de este metal. En este trabajo se ha realizado el primer paso de dicho objetivo, la determinación de las condiciones y la estirpe de *Chlamydomonas* adecuadas para conseguir la expresión diferencial. Para ello, se han llevado a cabo cultivos en diferentes concentraciones de Mo y fuentes de nitrógeno. La estirpe y condiciones adecuadas sería aquella estirpe que muestre: (1) deficiencia en el crecimiento usando medios en los que no se añade Mo y (2) deficiencia de crecimiento (pero no ausencia de éste) con concentraciones altas de Mo, teniendo en cuenta que la concentración estándar de Mo en los medios comúnmente usados para su crecimiento es de alrededor de 1  $\mu$ M.

Se ha analizado el crecimiento de 21 estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii*, todas ellas con deficiencias relacionadas con el metabolismo del molibdeno, además de dos estirpes silvestres con diferentes fondos genéticos (6145c y 704). Estas estirpes se han cultivado en medios con distintas cantidades de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  como fuente de Mo y en presencia de distintas fuentes de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser determinante en la disponibilidad de Mo y su efecto celular debido a la relación directa que hay entre los metabolismos de Mo y N (Tejada-Jiménez et al., 2007). En presencia de nitrato sería esperable una mayor necesidad y uso de Mo ya que el crecimiento en estas condiciones depende directamente de la actividad de la enzima nitrato reductasa que es una Mo-enzima, mientras que en amonio la necesidad celular de Mo podría ser menor. Además, por esta relación se ha visto que el nitrato es capaz de activar algunos genes del metabolismo del Mo como CNX2 y el transportador MOT1 (Llamas et al., 2007; Wang et al., 2003). Algunas de las estirpe que se han usado en el análisis no son capaces de usar nitrato como fuente de nitrógeno, ya que al no poder sintetizar cofactor de Mo carecen de actividad nitrato reductasa. Por tanto, para reproducir las condiciones de presencia de nitrato en estas estirpes, se incluyó una condición en la que la fuente de nitrógeno era urea en presencia de nitrato.

De todas ellas, las estirpes 704 y 1gr son las que mostraron un perfil de crecimiento relacionado con la cantidad de Mo disponible, tanto en deficiencia como en toxicidad. En ambos casos la concentración de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  necesaria para obtener toxicidad por Mo fue 10 mM. A concentraciones mayores de 10 mM el crecimiento fue demasiado bajo por lo que podría ser un problema para obtener biomasa con la que realizar los estudios de RNA-seq. Conseguir una condición de deficiencia de Mo en *Chlamydomonas* es complicado, puesto que la mayoría de las estirpes siguen creciendo en medios sin adición de Mo, usando el Mo contaminante en los medios de cultivo. Estudios previos en *Arabidopsis* se ha mostró que el efecto de deficiencia únicamente se consigue cuando se combina la no adición de Mo con una

estirpe mutante del transportador AtMOT1 (Ide et al., 2011). En este estudio, tanto el mutante de silenciamiento de MOT1 mediante RNAi (1gr) como la estirpe silvestre 704 mostraron fenotipo de deficiencia por bajo Mo en el medio. Esto podría apuntar a un transporte disminuido o menos eficiente de la estirpe 704 comparado con otras estirpes silvestre como la 6145c. Es interesante resaltar que la estirpe 1gr, que tiene silenciado el transportador MOT1 y por tanto muestra un transporte deficiente de Mo (Tejada-Jiménez et al., 2007), mostró una toxicidad similar a estirpes con expresión normal de MOT1. Sería esperable que una células con menor eficiencia en el transporte de Mo mostraran una mayor resistencia a altas concentraciones exteriores de este mal, sin embargo, esto no ocurre en la estirpe 1gr. Este fenómeno podría apuntar a dos hipotéticos escenarios, uno sería que el transportador MOT1 (además de mediar el transporte de  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) puede tener algún papel activando los mecanismos protección contra la toxicidad de Mo, bien sean los transportadores para sacar el Mo de la célula o los sistemas de almacenamiento celular de Mo. Otra opción sería que, a largo plazo, transportadores aún no identificados de Mo puedan llevar a cabo el papel de MOT1 minimizando así el efecto de su silenciamiento.

Aunque por cuestiones sanitarias no se ha podido llevar a cabo toda la programación experimental que incluía este TFG, los siguientes pasos a dar incluían el análisis del contenido intracelular de Mo en las estirpes y condiciones elegidas mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-Masas). Dicho análisis permitiría relacionar directamente el fenotipo observado en las estirpes 704 y 1gr con el aumento o disminución de la cantidad de Mo intracelular. Seleccionando de esta manera la estirpe que presente dicha relación fenotipo-contenido intracelular de Mo. Finalmente, se obtendría ARN de las estirpe elegida en las condiciones experimentales seleccionadas previamente (ausencia de Mo, Mo estándar y Mo 10 mM). Dicho ARN se usaría para realizar un análisis transcriptómico tipo RNA-seq, que sería encargado a la unidad de genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (Cabimer).

Como estrategia complementaria, en el grupo de investigación donde se ha realizado este TFM, se proponen generar mutantes de *Chlamydomonas* afectados en genes relacionados con la homeostasis de Mo. Para ello, la estirpe 704 se transformaría con un fragmento de ADN que confiere resistencia al antibiótico paromomicina, que se usaría como marcador seleccionable. Dicho fragmento se insertaría al azar en el genoma de *Chlamydomonas*. Posteriormente, los mutantes afectados en la homeostasis de Mo se seleccionarían por tener alterado el perfil de deficiencia/toxicidad por Mo. La inserción de los mutantes obtenidos se identificaría mediante RESDA-PCR (González-Ballester et al., 2005b). Una estrategia similar ya ha sido usada

anteriormente en *Chlamydomonas* (González-Ballester et al., 2005a). Los genes identificados por esta estrategia pueden compararse con los obtenidos mediante el estudio transcriptómico. En este TFM se planificó también llevar a cabo el inicio de esta estrategia. Para ello se amplificaría por PCR el fragmento de ADN correspondiente al gen *AphVIII* que confiere resistencia a paromomicina. Este fragmento se usaría para transformar la estirpe 704 de *Chlamydomonas* y se obtendrían los primeros mutantes resistentes a paromomicina. Se analizaría el crecimiento de estos mutantes en medios de cultivo sin Mo añadido y con 10 y 25 mM de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , y se compararía con el crecimiento en condiciones estándar de Mo y con el crecimiento de la estirpe parental (704) en esas mismas condiciones. Se seleccionarían como mutantes interesantes aquellos que presenten un patrón de deficiencia/toxicidad de Mo diferente a la estirpe parental. Por ejemplo, aquellos que presenten menos crecimiento en condiciones sin Mo añadido, o aquellos que resistan más concentración de Mo exterior. Una vez que se obtengan unos 1.000 mutantes, se cuantificarían los mutantes con fenotipo interesante respecto al total y, a éstos, se les analizaría el lugar de la inserción para encontrar el posible gen afectado que pudiera estar relacionado con la homeostasis de Mo. Con esta estrategia se puede complementar la estrategia transcriptómica confirmando los genes que se obtengan en una y otra, o bien obteniendo mutantes diferentes cuyos genes no tengan una clara regulación por la disponibilidad de Mo.

Un mejor conocimiento de la homeostasis del Mo llevaría a comprender el uso eficiente de este micronutriente esencial. Por una parte, el Mo es fundamental para la asimilación vegetal del nitrógeno, tanto por asimilación de nitrato, con la nitrato reductasa, como por fijación simbiótica de nitrógeno con la nitrogenasa bacteriana (Gil-Díez et al., 2019). Una optimización de dicho proceso en cultivos reduciría la necesidad del uso extensivo de fertilizantes nitrogenados de síntesis, disminuyendo sus efectos negativos sobre el medioambiente y la salud humana. Además, la alteración en la homeostasis se relaciona con la deficiencia del cofactor de Mo en humanos (MoCD), lo que conlleva una neurodegeneración progresiva que termina con la muerte de los pacientes afectados (Bayram et al., 2013; Mechler et al., 2015). Conocer la homeostasis de Mo en humanos sería una herramienta valiosa para el estudio y tratamiento de la enfermedad.

## 6. Conclusiones

- 1) El papel que juega el Mo en la fijación del nitrógeno en plantas y en el desarrollo de enfermedades en humanos ha desencadenado un aumento de publicaciones sobre la homeostasis del Mo en los últimos años.
- 2) Según la búsqueda bibliográfica realizada, no se conocen los mecanismos eucariotas de homeostasis de Mo relacionados con el almacenamiento, exporte y regulación.
- 3) Las estirpes 704 y 1gr de *Chlamydomonas reinhardtii* presentan crecimiento deficiente cuando no se añade Mo al medio de crecimiento, lo que sugiere que estas estirpes están en deficiencia de dicho metal en esas condiciones.
- 4) Las estirpes 704 y 1gr de *Chlamydomonas reinhardtii* presentan crecimiento deficiente en presencia de 10 mM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, lo que sugiere que estas estirpes están bajo condiciones de toxicidad por dicho metal.
- 5) El análisis del contenido intracelular de Mo en las estirpes 704 y 1gr en condiciones de no Mo añadido, Mo estándar y Mo 10 mM mediante ICP-MS podría indicar qué estirpe sería la más idónea para el estudio transcriptómico.
- 6) Como punto de autoevaluación, la realización de este trabajo ha ampliado mis conocimientos sobre la regulación de la concentración intracelular de micronutrientes y me ha proporcionado una visión general sobre el potencial de la biotecnología vegetal.

## 7. Agradecimientos

Agradecimientos a la Fundación Torres Gutiérrez por la ayuda recibida para la realización de este TFM en la convocatoria 2019/20, y a mis tutores por su apoyo y dedicación.

## 8. Bibliografía

- Ataya, F.S., Witte, C.P., Galván, A., Igeño, M.I., and Fernández, E. (2003). Mcp1 encodes the molybdenum cofactor carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii* and participates in protection, binding, and storage functions of the cofactor. *J. Biol. Chem.* 278, 10885–10890.
- Baxter, I., Muthukumar, B., Hyeong, C.P., Buchner, P., Lahner, B., Danku, J., Zhao, K., Lee, J., Hawkesford, M.J., Guerinot, M. Lou, et al. (2008). Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genet.* 4.
- Bayram, E., Topcu, Y., Karakaya, P., Yis, U., Cakmakci, H., Ichida, K., and Kurul, S.H. (2013). Molybdenum

- cofactor deficiency: Review of 12 cases (MoCD and review). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *17*, 1–6.
- Belaidi, A.A., Arjune, S., Santamaria-Araujo, J.A., Sass, J.O., and Schwarz, G. (2012). Molybdenum cofactor deficiency: A new HPLC method for fast quantification of s-sulfocysteine in urine and serum. In *JIMD Reports*, (Springer), pp. 35–43.
- Blaby-Haas, C.E., and Merchant, S.S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1823*, 1531–1552.
- Caboche, M., and Rouzé, P. (1990). Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* *6*, 187–192.
- Camargo, A., Llamas, Á., Schnell, R.A., Higuera, J.J., González-Ballester, D., Lefebvre, P.A., Fernández, E., and Galván, A. (2007). Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* *19*, 3491–3503.
- Cao, H., Hall, J., and Hille, R. (2014). Substrate orientation and specificity in xanthine oxidase: Crystal structures of the enzyme in complex with indole-3-acetaldehyde and guanine. *Biochemistry* *53*, 533–541.
- Coelho, C., Mahro, M., Trincão, J., Carvalho, A.T.P., Ramos, M.J., Terao, M., Garattini, E., Leimkühler, S., and Romão, M.J. (2012). The first mammalian aldehyde oxidase crystal structure: Insights into substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *287*, 40690–40702.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004). ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 241–268.
- Duan, G., Hakoyama, T., Kamiya, T., Miwa, H., Lombardo, F., Sato, S., Tabata, S., Chen, Z., Watanabe, T., Shinano, T., et al. (2017). LjMOT1, a high-affinity molybdate transporter from *Lotus japonicus*, is essential for molybdate uptake, but not for the delivery to nodules. *Plant J.* *90*, 1108–1119.
- Fernández, E., and Matagne, R.F. (1986). In vivo complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* *10*, 397–403.
- Fischer, K., Barbier, G.G., Hecht, H.J., Mendel, R.R., Campbell, W.H., and Schwarz, G. (2005). Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: Crystal structures of the nitrate reductase active site. *Plant Cell* *17*, 1167–1179.
- Fischer, K., Llamas, A., Tejada-Jimenez, M., Schrader, N., Kuper, J., Ataya, F.S., Galvan, A., Mendel, R.R., Fernandez, E., and Schwarz, G. (2006). Function and structure of the molybdenum cofactor carrier protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* *281*, 30186–30194.
- Fitzpatrick, K.L., Tyerman, S.D., and Kaiser, B.N. (2008). Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Lett.* *582*, 1508–1513.



- Freeman Rosenzweig, E.S., Xu, B., Kuhn Cuellar, L., Martinez-Sanchez, A., Schaffer, M., Strauss, M., Cartwright, H.N., Ronceray, P., Plitzko, J.M., Förster, F., et al. (2017). The Eukaryotic CO<sub>2</sub>-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization. *Cell* *171*, 148-162.e19.
- Garattini, E., and Terao, M. (2013). Aldehyde oxidase and its importance in novel drug discovery: Present and future challenges. *Expert Opin. Drug Discov.* *8*, 641–654.
- Gasber, A., Klaumann, S., Trentmann, O., Trampczynska, A., Clemens, S., Schneider, S., Sauer, N., Feifer, I., Bittner, F., Mendel, R.R., et al. (2011). Identification of an Arabidopsis solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biol.* *13*, 710–718.
- Gil-Díez, P., Tejada-Jiménez, M., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K.S., Imperial, J., and González-Guerrero, M. (2019). MtMOT1.2 is responsible for molybdate supply to *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ.* *42*, 310–320.
- González-Ballester, D., De Montaigu, A., Higuera, J.J., Galván, A., and Fernández, E. (2005a). Functional genomics of the regulation of the nitrate assimilation pathway in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* *137*, 522–533.
- González-Ballester, D., De Montaigu, A., Galván, A., and Fernández, E. (2005b). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal. Biochem.* *340*, 330–335.
- Grunden, A.M., and Shanmugam, K.T. (1997). Molybdate transport and regulation in bacteria. *Arch. Microbiol.* *168*, 345–354.
- Grunden, A.M., Ray, R.M., Rosentel, J.K., Healy, F.G., and Shanmugam, K.T. (1996). Repression of the *Escherichia coli* modABCD (molybdate transport) operon by ModE. *J. Bacteriol.* *178*, 735–744.
- Hale, K.L., McGrath, S.P., Lombi, E., Stack, S.M., Terry, N., Pickering, I.J., George, G.N., and Pilon-Smits, E.A.H. (2001). Molybdenum sequestration in Brassica species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol.* *126*, 1391–1402.
- Hänzelmann, P., Hernández, H.L., Menzel, C., García-Serres, R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., Mendel, R.R., and Schindelin, H. (2004). Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 34721–34732.
- Harris, E.H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook*. Second edition. Acad. Press.
- Havemeyer, A., Lang, J., and Clement, B. (2011). The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: Current state of research. *Drug Metab. Rev.* *43*, 524–539.
- He, Z.L., Yang, X.E., and Stoffella, P.J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* *19*, 125–140.

- Hille, R. (1996). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* *96*, 2757–2816.
- Hille, R., Nishino, T., and Bittner, F. (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord. Chem. Rev.* *255*, 1179–1205.
- Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* *114*, 3963–4038.
- Ide, Y., Kusano, M., Oikawa, A., Fukushima, A., Tomatsu, H., Saito, K., Hirai, M.Y., and Fujiwara, T. (2011). Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/ sulphur metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *62*, 1483–1497.
- Kaiser, B.N., Gridley, K.L., Brady, J.N., Phillips, T., and Tyerman, S.D. (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann. Bot.* *96*, 745–754.
- Kelley, E.E., Khoo, N.K.H., Hundley, N.J., Malik, U.Z., Freeman, B.A., and Tarpey, M.M. (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 493–498.
- Klein, J.M., and Schwarz, G. (2012). Cofactor-dependent maturation of mammalian sulfite oxidase links two mitochondrial import pathways. *J. Cell Sci.* *125*, 4876–4855.
- Klein, J.M., Busch, J.D., Pottings, C., Baker, M.J., Langers, T., and Schwarz, G. (2012). The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* *287*, 42795–42803.
- Kruse, T., Gehl, C., Geisler, M., Lehrke, M., Ringel, P., Hallier, S., Hänsch, R., and Mendel, R.R. (2010). Identification and biochemical characterization of molybdenum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *285*, 6623–6635.
- Lindsay, W.L. (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. Centen. Profr. Color. State Univ. Fort Collins 3.
- Llamas, A., Kalakoutskii, K.L., and Fernández, E. (2000). Molybdenum cofactor amounts in *Chlamydomonas reinhardtii* depend on the Nit5 gene function related to molybdate transport. *Plant, Cell Environ.* *23*, 1247–1255.
- Llamas, A., Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2004). Synthesis of adenylated molybdopterin: An essential step for molybdenum insertion. *J. Biol. Chem.* *279*, 55241–55246.
- Llamas, A., Otte, T., Multhaupt, G., Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2006). The mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin: A novel route toward metal cofactor assembly. *J. Biol. Chem.* *281*, 18343–18350.
- Llamas, Á., Tejada-Jimenez, M., González-Ballester, D., Higuera, J.J., Schwarz, G., Galván, A., and Fernández, E. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* CNX1E reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* mutants. *Eukaryot. Cell* *6*, 1063–1067.

- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M.C.P., and Matagne, R.F. (1999). Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter. *Plant Mol. Biol.* *41*, 701–711.
- Matthies, A., Nimtz, M., and Leimkühler, S. (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: Identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry. *Biochemistry* *44*, 7912–7920.
- Mechler, K., Mountford, W.K., Hoffmann, G.F., and Ries, M. (2015). Ultra-orphan diseases: A quantitative analysis of the natural history of molybdenum cofactor deficiency. *Genet. Med.* *17*, 965–970.
- Mendel, R.R. (2011). Cell biology of molybdenum in plants. *Plant Cell Rep.* *30*, 1787–1797.
- Mendel, R.R., and Kruse, T. (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1823*, 1568–1579.
- Neve, E.P.A., Köfeler, H., Hendriks, D.F.G., Nordling, Å., Gogvadze, V., Mkrtchian, S., Näslund, E., and Ingelman-Sundberg, M. (2015). Expression and function of mARC: Roles in lipogenesis and metabolic activation of ximelagatran. *PLoS One* *10*, e0138487.
- Plitzko, B., Ott, G., Reichmann, D., Henderson, C.J., Roland Wolf, C., Mendel, R., Bittner, F., Clement, B., and Havemeyer, A. (2013). The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in N-reductive metabolism in human cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 20228–20237.
- Poppe, J., Warkentin, E., Demmer, U., Kowalewski, B., Dierks, T., Schneider, K., and Ermler, U. (2014). Structural diversity of polyoxomolybdate clusters along the three-fold axis of the molybdenum storage protein. *J. Inorg. Biochem.* *138*, 122–128.
- Relinque, B., Bardallo, L., Granero, M., Jiménez, P.J., and Luna, S. (2015). Isolated sulfite oxidase deficiency. *J. Neonatal. Perinatal. Med.* *8*, 53–55.
- Rubio, L.M., and Ludden, P.W. (2008). Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 93–111.
- Salomé, P.A., and Merchant, S.S. (2019). A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* *31*, 1682–1707.
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* *6*.
- Schwarz, G. (2016). Molybdenum cofactor and human disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *31*, 179–187.

- Schwarz, G., Mendel, R.R., and Ribbe, M.W. (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460, 839–847.
- Shibagaki, N., and Grossman, A.R. (2004). Probing the function of STAS domains of the Arabidopsis sulfate transporters. *J. Biol. Chem.* 279, 30791–30799.
- Shibagaki, N., and Grossman, A.R. (2006). The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 22964–22973.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., and E.Miller, N. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 29, 1097–1106.
- Solomonson, L.P., Barber, M.J., and Robbins, A.P. (1986). Functional domains of assimilatory NADH:nitrate reductase from *Chlorella*. *J. Biol. Chem.* 261, 11290–11294.
- Sosa, F.M., Ortega, T., and Barea, J.L. (1978). Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* affected in their nitrate assimilation capability. *Plant Sci. Lett.* 11, 51–58.
- Stallmeyer, B., Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L., and Mendel, R.R. (1999). Human molybdopterin synthase gene: Identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 698–705.
- Steinke, D.R., Majak, W., Sorensen, T.S., and Parvez, M. (2008). Chelation of molybdenum in *Medicago sativa* (Alfalfa) grown on reclaimed mine tailings. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5437–5442.
- Stout, P.R., and Meagher, W.R. (1948). Studies of the molybdenum nutrition of plants with radioactive molybdenum. *Science* (80- ). 108, 471–473.
- Tejada-Jiménez, M., Llamas, Á., Sanz-Luque, E., Galván, A., and Fernández, E. (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20126–20130.
- Tejada-Jiménez, M., Galván, A., Fernández, E., and Llamas, Á. (2009). Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 358–363.
- Tejada-Jiménez, M., Galván, A., and Fernández, E. (2011). Algae and humans share a molybdate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6420–6425.
- Tejada-Jiménez, M., Chamizo-Ampudia, A., Galván, A., Fernández, E., and Llamas, Á. (2013). Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics* 5, 1191–1203.
- Tejada-Jiménez, M., Gil-Díez, P., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K.S., Imperial, J., and González-Guerrero, M. (2017). *Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under

- molybdenum deficiency. *New Phytol.* *216*, 1223–1235.
- Teschner, J., Lachmann, N., Schulze, J., Geisler, M., Selbach, K., Santamaria-Araujo, J., Balk, J., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2010). A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell* *22*, 468–480.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N., and Fujiwara, T. (2007). An Arabidopsis thaliana high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 18807–18812.
- Turnlund, J.R. (2002). Molybdenum metabolism and requirements in humans. *Met. Ions Biol. Syst. Molybdenum Tungsten Their Roles Biol. Process.* *39*, 727–739.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* *12*, 1161–1208.
- Wagner, U.G., Stupperich, E., and Kratky, C. (2000). Structure of the molybdate/tungstate binding protein Mop from *Sporomusa ovata*. *Structure* *8*, 1127–1136.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., and Crawford, N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* *132*, 556–567.
- Witte, C.P., Igeño, M.I., Mendel, R., Schwarz, G., and Fernández, E. (1998). The *Chlamydomonas reinhardtii* MoCo carrier protein is multimeric and stabilizes molybdopterin cofactor in a molybdate charged form. *FEBS Lett.* *431*, 205–209.
- Wuebbens, M.M., and Rajagopalan, K. V. (1993). Structural characterization of a molybdopterin precursor. *J. Biol. Chem.* *268*, 13493–13498.
- Wuebbens, M.M., and Rajagopalan, K. V. (2003). Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *278*, 14523–14532.
- Xu, F., Wu, X., Jiang, L.H., Zhao, H., and Pan, J. (2016). An organelle K<sup>+</sup> channel is required for osmoregulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* *129*, 3008–3014.
- Yamano, T., Iguchi, H., and Fukuzawa, H. (2013). Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* *115*, 691–694.
- Zhou, J., and Kleinjohs, A. (1996). Molecular evolution of nitrate reductase genes. *J. Mol. Evol.* *42*, 432–442.