

Capítulo 3

Biología molecular de la asimilación de nitrato en algas

Fernández Reyes E¹, Galván Cejudo A, Llamas Azúa A, Camargo García A, Tejada Jiménez M, Higuera Sobrino JJ, Sanz Luque E, Esquinas Tarifa E, Macías Gómez MI

Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Edif. Severo Ochoa (C6), Planta baja –E, 14071 Córdoba; Tel: 957218591; Fax: 957218592; Web: <<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/english/gei.htm>>; ¹CE: <bb1feree@uco.es>

RESUMEN

El alga verde eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii* es un organismo modelo para el estudio de la biología molecular de la asimilación de nitrato. Este sistema biológico presenta excelentes cualidades para estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y moleculares. Estas investigaciones han permitido los siguientes logros: i) generación de una colección de mutantes; ii) identificación y caracterización de genes para el transporte de amonio; iii) caracterización de genes del transporte biespecífico de bicarbonato/nitrato; iv) clonación y caracterización del gen que codifica la proteína portadora de cofactor de molibdeno (MCP), determinación de la estructura cristalina de la misma y de sus residuos funcionales en la unión del cofactor; v) utilización de una nueva estrategia para identificar mutantes del cofactor de molibdeno; y vi) identificación de un nuevo LTR-retrotransposón de la familia *gypsy*.

Palabras clave: nitrógeno, amonio, proteínas, metabolismo, fotosíntesis, citosol, núcleo, cloroplasto, mitocondria plantas.

Introducción

El nitrato es la fuente principal de nitrógeno para el crecimiento de las plantas de cosecha y los organismos fotosintéticos de los mares. Su asimilación ocurre mediante una ruta aparentemente sencilla, con dos pasos de transporte a través de membranas y dos pasos de reducción enzimática, para ser transformado finalmente en amonio que se incorpora en esqueletos carbonados (Márquez et al, 2004).

El objetivo último de nuestro tema de investigación es el conocimiento en profundidad del proceso a nivel molecular para así poder comprender y en su caso manipular el uso eficiente del nitrógeno por los vegetales. Hemos desvelado una complejidad antes no sospechada en cuanto a los sistemas de transporte y los mecanismos de regulación en el que participan al menos cuatro compartimentos celulares: citosol, núcleo, cloroplasto y mitocondria (Galván et al, 2006).

Nuestro grupo viene estudiando este proceso utilizando estrategias de genómica funcional en el alga verde eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii* como modelo de plantas. El uso de este sistema biológico radica en sus excelentes cualidades para estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y moleculares, la existencia de aproximaciones moleculares bien establecidas (León-Bañares et al, 2004; Galván et al, 2006), y la reciente secuenciación de su genoma (más información en <<http://www.chlamy.org>>).

Resultados y discusión

Los logros principales de nuestro grupo se relacionan con el desarrollo de nuevas estrategias moleculares, la caracterización de varias familias génicas para

transportadores específicos, y la identificación de nuevos genes para la regulación de la adquisición de nitrógeno, y en los últimos años han sido:

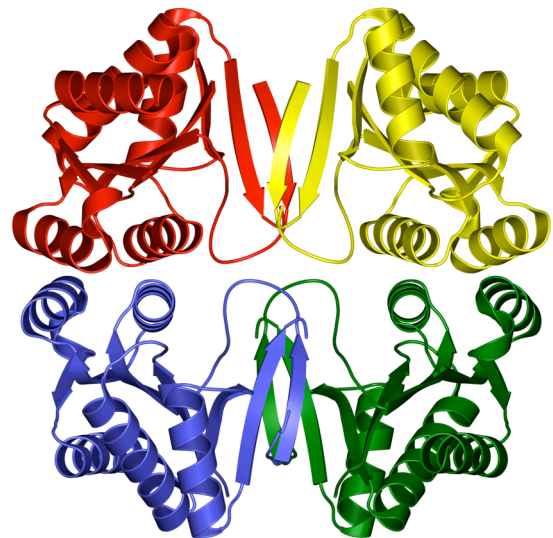


Figura 1.- Estructura cristalina de la proteína portadora de cofactor de molibdeno (MCP) de *Chlamydomonas* (Fisher et al, 2006).

1. Generación de una colección ordenada de mutantes insercionales y la identificación de las regiones adyacentes al gen marcador, seleccionando para mutantes afectados en genes de señalización positiva y negativa (González-Ballester et al, 2005b,c).

2. Identificación y caracterización de ocho genes para el transporte de amonio en *Chlamydomonas*. El gen *Nit2* también está implicado en la regulación de *Amt1.1* (González-Ballester et al, 2005a).

3. Caracterización de los seis genes *Nar1* de

Chlamydomonas: *NAR1.2*, corresponde a un transportador biespecífico de bicarbonato/nitrito, participando *NAR1.1* en el uso eficiente de nitrato (Mariscal et al, 2004, 2006).

4. Clonación y caracterización en *Chlamydomonas* del gen que codifica la primera proteína identificada para la transferencia y unión del cofactor de molibdeno. Determinación de la estructura cristalina de la proteína (Fig. 1), así como de sus residuos funcionales en la unión del cofactor (Ataya et al, 2003; Fischer et al, 2006).

5. Utilización de una nueva estrategia para identificar mutantes del cofactor de molibdeno (Navarro et al, 2005).

6. Identificación de un nuevo LTR-retrotransposón de la familia *gypsy* y con características inusuales en *Chlamydomonas* (Pérez-Alegre et al, 2005).

Agradecimientos

Financiado por Grupo PAI CVI-128 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Spain).

Referencias

Ataya FS, Witte CP, Galván A, Igeno MI, Fernandez 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.

Fischer K, Llamas A, Tejada-Jimenez M, Schrader N, Kuper J, Ataya FS, Galvan A, Mendel RR, Fernandez E, Schwarz G (2006): Function and structure of the molybdenum cofactor carrier protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*. 281: 30186-30194.

Galván A, Mariscal V, González-Ballester D, Fernández E (2006): The green alga *Chlamydomonas* as a tool to study the nitrate assimilation pathway in plants. En:

Varshney RK, Koeber RMD (eds): *Model Plants and Crop Improvement*. CRC Press (Boca Raton), pp 125-158.

González-Ballester D, Camargo A, Fernández E (2005a): Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: the nitrate-specific regulatory gene *Nit2* is involved in *Amt1;1* expression. *Plant Mol Biol* 56: 863-878.

González-Ballester D, de Montaigu A, Galván A, Fernández E (2005b): Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem* 340: 330-335.

González-Ballester D, de Montaigu A, Higuera JJ, Galván A, Fernández E (2005c): Functional genomics of the regulation of the nitrate assimilation pathway in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 137: 522-533.

León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E (2004): Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol* 22: 45-52.

Mariscal V, Moulin P, Orsel M, Miller AJ, Fernandez E, Galvan A (2006): Differential regulation of the *Chlamydomonas Nar1* gene family by carbon and nitrogen. *Protist* 157: 421-433.

Mariscal V, Rexach J, Fernández E, Galván A (2004): The plastidic nitrite transporter *NAR1;1* improves nitrate use efficiency for growth in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ* 27: 1321-1328.

Márquez A, Galván A, Fernández E (2004): Absorción y reducción de nitrato. En: Monza J, Márquez A (eds): *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Almuzara (Córdoba), pp 39-63.

Navarro MT, Mariscal V, Macías M, Fernández E, Galván A (2005): *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing nitrate reductase under control of the *cabII-1* promoter: isolation of chlorate resistant mutants and identification of new loci for nitrate assimilation. *Photosynth Res* 83: 151-161.

Pérez-Alegre M, Dubus A, Fernández E (2005): *REM1*, a new type of long terminal repeat retrotransposon in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cel Biol* 25: 10628-10639.