



Estudios sobre los transportadores de nitrato en organismos modelo 20 años después de la primera clonación de un transportador celular

Studies about nitrate transporters in model organisms 20 years after the first cloning of a cellular transporter

Romen Palenzuela Rodríguez

Grado en Biología

Septiembre de 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 20 <u>15</u> / <u>2016</u>	ENTRADA Fecha: Núm:
--	----------------------------------

Datos Personales


Nº DNI o pasaporte: <u>43379696N</u>	Nombre y Apellidos: <u>Raiven Palomares Rodríguez</u>
Teléfono: <u>029 65 3145</u>	Dirección de correo electrónico: <u>raiven.palomares@ull.es</u>

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Estudio sobre los transportadores de nitrato/nitrito en organismos modelo 20 años después de la primera clonación de un transportador celular.
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. <u>JOSE M. SILVERIA / ANA LANCHA</u>	
Profesor/a del Departamento de <u>BIQUIMICA, MICROBIOL, BIOL CEC</u>	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: 	Fdo.: 

La Laguna, a 1 de Septiembre de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

Índice

Resumen	- 4 -
Abstract	- 4 -
Introducción	- 5 -
Asimilación de nitrato en eucariotas	- 7 -
Principales tipos de transportadores de nitrato	- 8 -
Alta y baja afinidad	- 8 -
Inducibles y constitutivos	- 8 -
Familias	- 8 -
NNP: características de secuencia proteica y estructurales	- 9 -
PTR/POT: Características de secuencia proteica y estructurales	- 11 -
FNT: Características de secuencia proteica y estructurales	- 15 -
Regulación transcripcional	- 15 -
Regulación postraducciona	- 16 -
Mecanismos reguladores de los transportadores de nitrato	- 17 -
Transportadores de nitrato en organismos modelo	- 18 -
Transportadores de nitrato en bacterias	- 18 -
Transporte de nitrato en algas	- 20 -
Transporte de nitrato en hongos y levaduras	- 22 -
Transportadores de nitrato en plantas	- 24 -
Conclusiones	- 25 -
Bibliografía	- 26 -

Resumen

Numerosos organismos son capaces de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno. El nitrógeno de nitrato tiene que pasar por una serie de estados de reducción (nitrito y amonio), llevados a cabo por ciertas enzimas para poder ser asimilado por las células. Un paso clave en este proceso es aquel llevado a cabo por los transportadores de nitrato en las membranas celulares. Éstos transportadores pertenecen a una superfamilia llamada MFS (Major Facilitator Superfamily) que a su vez abarca una serie de familias entre las cuales se encuentran aquellas relacionadas con el transporte de nitrato; también se hablará de la superfamilia FNT (Formate Nitrite Transporter). El objetivo de este trabajo es revisar la situación actual del conocimiento de estos transportadores. Haciendo hincapié en ciertas características como su regulación, estructura, secuencia, los genes y los transportadores implicados y su relación con otro tipo de moléculas.

Palabras clave: nitrato, nitrito, transportador.

Abstract

Many organisms are able to use nitrate as the sole nitrogen source. Said nitrate has to go through a series of states (nitrite and ammonium) carried out by special enzymes in order to be assimilated by the cells and thus form part of the organism's metabolism. A key step in this process is the one carried out by transporters nitrate in cell membranes. These transporters belong to a superfamily called MFS (Major Facilitator Superfamily) which in turn includes a number of families entering which are those related to the transport of nitrate; I will also talk about the FNT (Formate Nitrite Transporter) superfamily. The objective of this review is to review the knowledge that has been acquired about this type of transports in the last two decades. Emphasizing certain characteristics as its regulation, structure, sequence, genes involved and their relationship with other molecules.

Key words: nitrate, nitrite, transporter.

Estudios sobre los transportadores de nitrito:nitrato en organismos modelo 20 años después de la primera clonación de un transportador celular

Introducción

El nitrógeno es un elemento esencial para todos los organismos y aparece en numerosas moléculas biológicas, incluidas ADN, ARN y proteínas. A lo largo de su ciclo biogeoquímico pasa por diferentes estados de oxidación, de los cuales el más abundante es la forma gaseosa (dinitrógeno, N₂), a pesar de dicha abundancia en la atmósfera, no está disponible para los organismos, excepto para los diazotrofos, los cuales pueden utilizarla como fuente asimilable de nitrógeno. La mayoría de los organismos como plantas, algas, hongos filamentosos y algunas bacterias y levaduras son capaces de incorporar el nitrógeno a partir de los iones de nitrato, nitrito y amonio como fuentes de nitrógeno inorgánico, mediante mecanismos de reducción de dichos compuestos, [Fukuda et. Al, 2015], [Scharf et. Al, 2003], [Siverio, 2002]. En suelos bien aireados, la nitrificación es rápida, por lo que el nitrato es la principal fuente de nitrógeno, [Krapp et. al, 2014]. El nitrato no solo es una fuente de nitrógeno en las plantas sino que actúa en las plantas como una molécula señalizadora implicada en la morfogénesis de las raíces, el balance raíz:brote y las adaptaciones del metabolismo del carbono, así como en la gametogénesis del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, entre otras, [Galván & Fernández, 2001]. Mientras tanto, en organismos unicelulares también es utilizado para la síntesis de aminoácidos y la regulación de otras rutas metabólicas en su forma de amonio, [Yan et. al, 2013], además de funcionar como molécula señalizadora.

Las características químicas tanto del nitrito como del nitrato hacen necesaria la existencia de sistemas de transporte para transportar éstas moléculas al interior de las células, donde son utilizadas, [Siverio 2002]. El transporte de nitrato:nitrito es el paso clave en el control de la cantidad de nitrato incorporada por las células y subsecuente almacenamiento, reducción y exporte. Numerosos estudios moleculares, genéticos y bioquímicos han sido dirigidos al entendimiento de este paso, el cual es mucho más complejo

y estructurado de lo que se esperaba, [Galván & Fernández, 2001]. La vía de asimilación de nitrato está altamente conservada y consta de tres pasos secuenciales que van desde la entrada del anión al interior celular en contra de gradiente electroquímico y la posterior reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a amonio llevado por las reacciones consecutivas de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. Esta vía demanda de alta energía debido a que el nitrato se reduce a amonio, proceso mediado por la transferencia de 8 electrones. Este amonio será utilizado para la síntesis de aminoácidos mediante la acción de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, [Magasanik et. Al, 2002], mediante el ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetasa / glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa). En primer lugar, de amonio se incorpora como el grupo amida de la glutamina en una reacción que implica glutamato y ATP (catalizada por GS); entonces, el grupo amida se transfiere reductivamente a su forma α -oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato [Sanz-Luque, 2015]. El NAD(P)H, proveniente fundamentalmente de la vía de las pentosas fosfato, es el donador de electrones más frecuente en estas reacciones aunque en el caso de la nitrato reductasa de cianobacterias y la nitrito reductasa de plantas superiores, es la ferredoxina producida durante la fotosíntesis la encargada de aportar los electrones necesarios, [Cabrera, 2010]. En los organismos fotosintéticos el nitrito se reduce en el cloroplasto usando ferredoxina como agente reductor.

Además, se sabe que el nitrito resultante de la primera reducción del nitrato es un compuesto tóxico y mutagénico para las células (capacidad de diazotizar los grupos aminos de las bases nitrogenadas), por lo que las células recurren a complejos sistemas de regulación transcripcional y postraduccional con el fin de sincronizar la actividad de la vía a los requerimientos nutricionales de la célula y a la disponibilidad de nitrógeno generalmente los genes de la vía se inducen por nitrato y se reprimen por fuentes de nitrógeno altamente reducidas como el amonio o la glutamina), de esta forma el organismo evita someterse a toxicidad o mutaciones. Una de las estrategias más comunes utilizadas por organismos asimiladores de nitrato es agrupar en el genoma los genes que codifican la maquinaria necesaria para el uso de nitrato como fuente de nitrógeno; de esta forma es

posible coordinar eficientemente la expresión y regulación de todos los elementos [Cabrera, 2010]. Datos más recientes han demostrado al óxido nítrico (NO) como una molécula de señalización importante en la regulación transcripcional y postraduccional de la nitrato reductasa y el transporte de N inorgánico, [Sanz-Luque, 2015].

En la mayoría de las plantas solo una proporción del nitrato transportado es asimilado en las raíces, el resto es transportado hacia las partes aéreas de la planta a través de xilema para su asilimación en los brotes. Un exceso del suministro del nitrato puede causar altas concentraciones de nitrato que pueden acumularse en la vacuola, otra parte puede ser perdida en la solución del suelo a través de la membrana plasmática. El almacenamiento vacuolar se puede utilizar para el mantenimiento de la concentración del pool nitrato citosólico, el cual se mantiene constante bajo un largo rango de concentraciones externas de nitrato. Por lo tanto, un elemento esencial en el proceso de asimilación de nitrato es el tráfico de dicho ión a través de las membranas [Forde, 2000].

Asimilación de nitrato en eucariotas

La asimilación de nitrato adquiere un cierto grado de complejidad en eucariotas fotosintéticos y engloba dos barreras membranales: la membrana plasmática (delimita la reducción citosólica del nitrato a nitrito) y la envoltura del cloroplasto (reducción del nitrito a amonio, [Galván & Fernández, 2001]. [Fig. 6]. El proceso implica dos transportes y dos reducciones para producir amonio en el cloroplasto, el principal lugar de incorporación de amonio en los esqueletos de carbono, y se lleva a cabo por el ciclo de glutamina sintetasa / glutamato sintasa. Los pasos de transporte consisten en la entrada de nitrato en la célula y nitrito en el cloroplasto. La primera etapa de reducción de nitrato a nitrito se produce en el citosol y es catalizada por la enzima NR, y la segunda etapa de reducción de nitrito a amonio se lleva a cabo en el cloroplasto es catalizada por NiR, [Fernandez & Galván 2008].

El almacenamiento vacuolar se puede utilizar para el mantenimiento de la concentración del pool nitrato citosólico, el cual se mantiene constante bajo

un largo rango de concentraciones externas de nitrato. Por lo tanto, un elemento esencial en el proceso de asimilación de nitrato es el tráfico de dicho ión a través de las membranas, [Forde, 2000].

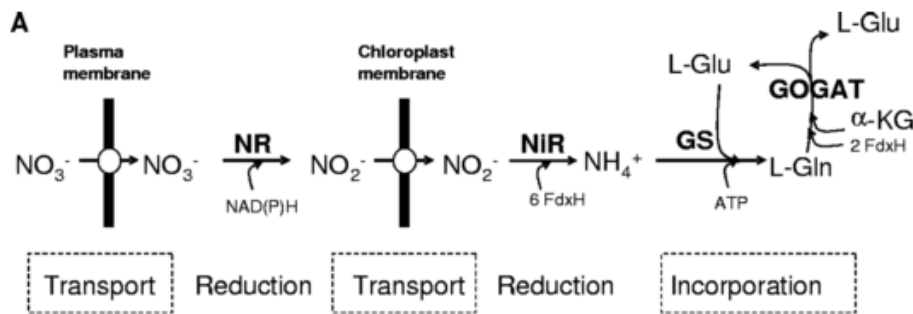


Fig. 6: Asimilación de nitrato en eucariotas fotosintéticas, la cual requiere de dos transportes y dos reducciones para producir amonio en el cloroplasto, donde es incorporado; DdxH, ferredoxina reducida, [Fernandez & Galvan, 2008].

Principales tipos de transportadores de nitrato

Alta y baja afinidad

Cinéticamente, se han definido dos grupos de transportadores de nitrato: uno con alta afinidad (HATS), cuya K_m se encuentra en el rango μM de nitrato, presentes en levaduras, hongos filamentosos, algas y plantas; y otro grupo de baja afinidad (LATS), presentes en levaduras y algas, [Siverio, 2002].

Inducibles y constitutivos

Algunos de los sistemas de transporte de nitrato son expresados constitutivamente, mientras que otros son inducidos por el nitrato y sometidos a un bucle de retroalimentación negativo por los productos de la asimilación del nitrato, [Forde, 2000]. Entonces, a la hora de nombrar dichos transportadores, hablamos de iHATS o iLATS para los transportadores inducibles (“inducible”), así como cHATS o cLATS para aquellos que se expresan constitutivamente (“constitutive”) en la célula. Los transportadores inducibles son expresados en las células en función de cambios del medio, como puede ser la concentración de nitrógeno o la forma en la que éste se encuentra en dicho medio.

Familias

El análisis y comparación de las secuencias de los distintos transportadores de nitrato aislados hasta el momento ha permitido agruparlos en tres familias génicas claramente diferenciadas. Por un lado, la familia NNP (Nitrate Nitrite Porter), y por otro, los PTR o POT (H^+ /oligopéptido), ambos son expresados por múltiples genes que son regulados de forma diferente y con propiedades cinéticas distintas, [Forde, 2000]. Ambas pertenecen al conjunto de transportadores agrupados en la MFS, un grupo bastante heterogéneo en el que se incluyen transportadores de diferentes tipos de sustratos. A nivel estructural son muy similares, con doce dominios transmembranales y extremos amino y carboxilo terminales citosólicos. Otra característica interesante es la existencia de un dominio central citosólico de tamaño variable entre los dominios transmembranales 6 y 7, [Cabrera, 2010]. Si bien, algunos estudios no consideran a la familia PTR miembro de la MFS dada la insuficiente homología en su secuencia, sin embargo, exhiben características muy similares, como la longitud de su secuencia, las 12 hélices predichas en su estructura conformacional y el lugar de sus extremos N-terminal y C-terminal, [Okamoto et. al, 2003]. Además aparece un tercer grupo, llamado FNT, del que hablaremos más adelante.

NNP: características de secuencia proteica y estructurales

La familia de NNP (Nitrate Nitrite Porter) son miembros de la MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y catalizan tanto el transporte de nitrato como la de nitrito tanto en eucariotas como procariotas. Aparentan tener un gran tamaño (entre 395 y 547 residuos), [Pao et. al, 1998]. Se trata de la familia de transportadores de nitrato más prevalentemente conservada en arqueas, bacterias, hongos, levaduras, algas y plantas, [Fukuda, 2015].

Todos los miembros de la familia NNP contienen dos tramos de residuos bastante conservados llamados secuencias NS (“nitrate signature”), se trata de un rasgo único de ésta familia pues dichas secuencias no son encontradas en otros miembros de la MFS, [Zheng, et. al, 2013]. Estas NS presentan regiones ricas en glicina en las TM5 y TM11; además, residuos de glicina bastante conservados aparecen en las TM4, TM7, TM8 y TM10. Las secuencias ricas en glicina, constituyen un núcleo interno de las TM,

rodeando al lugar de unión al sustrato. Las ya nombradas glicinas podrían permitir un mejor grado de flexibilidad conformacional, [Yan, 2013].

Los transportadores bacterianos de la familia NNP juegan un papel importante en la absorción de nitrato como aceptor terminal de electrones para la respiración anaerobia y la extrusión de nitrito citotóxico producida por la respiración anaeróbica. En *Escherichia coli* (bacteria modelo), hay dos transportadores de la familia NNP, NarK y NarU, siendo el primero bastante expresado durante el crecimiento anaeróbico en presencia de nitrato (además de jugar un papel fundamental en el transporte del nitrato), mientras el que segundo cumple importantes funciones durante el déficit de nutrientes o el crecimiento lento. Tanto NarK como NarU comparten el 75% de la secuencia de aminoácidos, lo que sugiere que poseen mecanismos de transporte similares, [Fukuda, 2015].

El gen YNT1 codifica el transportador de nitrato/nitrito Ynt1 en la levadura *Hansenula polymorpha*, se trata de un transportador de alta afinidad tanto para el nitrato como para el nitrito, [Siverio, 2002]. Y está regulado postranscripcionalmente en respuesta a la calidad de las fuentes de nitrógeno. En algas y levaduras, el nitrato actúa como inductor una vez entra en la célula, y entonces, los niveles de nitrato intracelular juegan un papel clave en la regulación de los genes encargados de la asimilación de nitrato. La salida de nitrato y nitrito desde la célula podría jugar un papel importante en la absorción de nitrato/nitrito así como en el mantenimiento de nitrito por debajo de los niveles tóxicos, [Cabrera et. al, 2014].

NRT2 es la nomenclatura aceptada para los genes de la familia NNP en algas y plantas superiores, con un prefijo o sufijo de dos letras indicando la especie de origen, [Forde, 2000]. Siendo los organismos modelo *Arabidopsis thaliana* en plantas y *Chlamydomonas sp.* en algas.

La estructura típica de la proteína NRT2 consiste en 12 hélices transmembrana en dos juegos de seis formando un dominio N-terminal y un dominio C-terminal unidos por un lazo hidrofílico entre las hélices 6 y 7. Este dominio central es largo, de más de 90 residuos. La identidad de secuencia entre las proteínas NRT2 va desde 30% al 90%, pero la mayor conservación se encuentra en el medio de la proteína, donde son identificados los patrones NNP y MFS, [Higuera et al, 2016]. Las proteínas

NRT2 comparten la secuencia D/N-R-X-G-R-R/K entre los dominios transmembrana 2 y 3, además de I-X₂-R-X₃-G-X₃-G en el dominio transmembrana 4 y después de éste. La secuencia consenso [FYK]-X₃-[ILQRK]-X-[GA]-X-[VASK]-X-[GASN]-[LIVFQ]-X_{1,2}-G-X-G-[NIM]-X-G-[GTA] en el quinto dominio transmembrana ha sido propuesto como la firma (“signature”) para la familia NNP. Una porción de dicha secuencia, A-G-W/L-G-N-M-G, presente en secuencias de CRN (*A. nidulans*), NRT2 (*Chlamydomonas* and *Hordeum vulgare*) y NarK (*E.coli*), así como ausentes en otros miembros de MFS, ha sido sugerido como la secuencia de reconocimiento del sustrato, [Galván & Fernández, 2001]. Mientras que los transportadores de *Aspergillus* NRTA y NRTB, el de *Hansenula* YNT, y los de *E. coli* NarK y NarU no requieren un segundo componente para su correcta funcionalidad; la mayor parte de the los transportadores NRT2 de las plantas y algunos de *Chlamydomonas* requiere una segunda proteína NAR2, [Higuera, 2016], una proteína monomérica sostenida en la membrana plasmática por medio de un simple dominio transmembrana, [Krapp et al, 2014], [Sanz-Luque, 2015], cabe destacar la alta especificidad que existe entre NAR2 y NRT2, [Tsay et. al, 2007]. De hecho, en *Arabidopsis* se propone el sistema NRT2/NAR2 (de dos componentes) como un complejo tetramérico formado por dos subunidades de cada uno de los dos polipéptidos, [Higuera et. al, 2016]. Al parecer, NAR2 está bastante bien conservada en las algas verdes *Chlamydomonas* y *Volvox*, pero muestran una baja conservación con respecto a las demás clorofitas, [Sanz-Luque et. al, 2015].

Todos los NRT2 estudiados parecen ser transportadores de alta afinidad; si bien en plantas sí actúan como transportadores de nitrato de alta afinidad, así como en hongos y levaduras, además de en *Chlamydomonas* (NRT2.1/NAR2), constituye un transportador biespecífico que muestra alta afinidad no sólo para el nitrato sino también para el nitrito, [Tsay et. al, 2007], [Higuera et al, 2016].

PTR/POT: Características de secuencia proteica y estructurales

La familia de transportadores PTR (*Peptide Transporter*) o POT comprende simportes dependientes de protones, miembros de la MFS (*Major Facilitator Superfamily*), que catalizan el transporte de pequeños péptidos (oligopéptidos) a través de la membrana celular con la ayuda del gradiente electroquímico de protones de ésta, [Newstead, 2015]. Aparecen tanto en eucariotas como procariotas y a los encargados del transporte de nitrato se les denomina NRT1, en esta familia se incluye exclusivamente a transportadores de plantas como AtNRT1.1 y BrNRT1.2. Se ha propuesto que la familia NRT1 incluye a los LANTs y la familia NRT2 (perteneciente a NNP) a los HANTs, aunque esta generalización se encuentra con excepciones como las de AtNRT1.1, que tiene propiedades de HATS y LATS y CrNRT2.3 de *C. reinhardtii*, que se trata de un LATS, [Cabrera, 2010]. Los transportadores NRT1 no muestran conservación significativa con miembros de la familia NRT2, [Galván & Fernández, 2001].

Aunque la familia POT tiene similitud de secuencia con varios miembros de la MFS, el pequeño número de individuos y la corta longitud de los segmentos con similitudes remarcables indica que se trata de familias distintas, [Galván & Fernández, 2001].

En relación a su estructura génica, encontramos lo que llamamos dos secuencias consenso que actúan como la firma de las proteínas de la familia PTR, las cuales son:

PTR1: [GA]-[GAS]-[LIVMFYWA]-[LIVM]-[GAS]-D-X-[LIV-MFYWT]-[LIVMFYW]-G-X₃-[TAV]-[IV]-X₃-[GSTAV]-X-[LIV-MF]-X₃-[GA] entre la TM2 y la TM3.

PTR2: [FYT]-X₂-[LMFY]-[FYV]-[LIVMFYWA]-X-[IVG]-N-[LIVMAG]-G-[GSA]-[LIMF]-[FYT]-X₂-[LMFY]-[FYV]-[LIVMFYWA]-X-[IVG]-N-[LIVMAG]-G-[GSA]-[LIMF] en el interior de la TM5.

Cabe destacar que dichas secuencias se encuentran bastante bien conservadas en las proteínas NRT1, [Okamoto et. al, 2003].

En las plantas, un grupo de proteínas de membrana que pertenecientes a la familia nitrate transporter1/peptide transporter (NRT1/PTR), y más tarde denominada familia NPF (NRT1 PTR Family), muestran secuencia homóloga con las proteínas que aparecen de forma en todos los reinos de vida (bacterias, hongos, animales), [Higuera et. al, 2016]. Por lo que ahora

la familia PTR ha sido denominada familia NRT1/PTR o NPF, [**Sanz-Luque, 2015**]. En estos organismos, se han utilizado muchos nombres para definir la familia de éstas proteínas: transportador de oligopeptidos acoplado a protones (POT), transporte peptídico (PepT/PTR) o transportador de soluto (SLC15). El primer miembro descubierto de ésta familia es conocido como AtNRT1.1 o CHL1, identificado en *Arabidopsis thaliana*, y se trataba de un transportador de nitrato, aunque más tarde se demostró que los miembros de la familia NRT1/PTR podían actuar como transportadores dipeptídicos. Tras bastantes estudios también se llegó a la conclusión de que muchos miembros de ésta familia podían transportar un mayor rango de moléculas como Auxina, ABA y glucosinolatos e incluso dos sustratos difetentes (nitrato/IAA; nitrato/ABA; nitrato/glucosinolatos; péptidos/aminoácidos), [**Léran et. al. 2014**].

La mayoría de genes NRT1 de algas y plantas codifican para transportadores de nitrato de baja afinidad, [**Tsay, 2007**].

La ya nombrada subfamilia perteneciente a las plantas, ejemplificada como NRT1.1 (CHL1), el transportador mejor investigado perteneciente a este grupo, permea para ligandos nitrogenados. CHL1 de *Arabidopsis thaliana* (AtNRT1.1 o AtNPF2.6) representa una proteína paradigmática, de hecho es considerado un transceptor tanto con funciones de sensor como de transportador, [**Sanz-Luque, 2015**]. Sin embargo, la idea de encontrar la estructura de la proteínas pertenecientes a la familia POT ha sido bastante perseguida. Con la excepción del transportador de nitrato en *Arabidopsis thaliana* (NRT1.1), la estructuras de POT han sido obtenidas de numerosos homólogos bacterianos-. Éste transportador ha evolucionado para reconocer y transportar otros tipos de ligandos nitrogenados como lo son el nitrato, la auxina (importante hormona de las plantas) y glucosinolatos (compuestos que defienden a la en las plantas está disponible y detallada y exhibe dos afinidades por el nitrato. Cambia de un estado de alta afinidad a otro de baja afinidad para el nitrato en función de las condiciones de nitrato y de la fosforilación/defosforilación de la Treonina 101. En condiciones de bajas concentraciones de nitrato, AtNRT1.1 es fosforilada por una proteína kinasa CIPK23 y actúa como un transporte de alta afinidad; en condiciones de altas concentraciones de nitrato es desfosforilado y es un transportador de baja

afinidad. Además, está involucrado en el transporte de auxina además del de nitrato. Curiosamente, la estructura cristalina de NRT1.1 reveló una conformación dimérica, [Yan, 2015], [Okamoto et. al, 2015], [Liu & Tsay, 2003], [Sanz-Luque, 2015], [Gojon et. al, 2011]. En las plantas, flujo de salida de nitrato puede incluso superar el consumo de nitrato en diversas situaciones de estrés. Un transportador de la excreción de nitrato, NAXT1, perteneciente a la familia NRT1 / PTR se ha encontrado en la membrana plasmática de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, aunque su papel aun no se conoce del todo. Por otra parte, se ha informado de que la *Arabidopsis* NRT1.1 (CHL1) es un transportador bidireccional implicado en la traslocación de nitrato de raíz-brote, [Cabrera et al, 2014].

Se ha propuesto que los miembros de la familia NPF sean nombrados de acuerdo con esta nomenclatura NPFX.Y, siendo X quien denote el nombre de la subfamilia e Y el miembro de la especie, a continuación se describen brevemente los miembros de las subfamilias desde NPF1 a NPF8: NPF1; NPF2, contiene transportadores de glicosinolatos, además de transportadores encargados del flujo de nitrato tanto hacia el interior como hacia el exterior de la membrana plasmática; NPF3, relacionada con la absorción de nitrito por parte del cloroplasto para evitar su toxicidad en el citosol; NPF4, familia formada principalmente por transportadores de ABA, además, contiene el segundo transportador de nitrato caracterizado en plantas, AtNPF4.6 (NRT1.2/AIT1); NPF5; NPF6, que incluye al transportador NRT1.1, ya conocido por ser el primero en identificarse en plantas, ahora denominado AtNPF6.3, el cual tiene la capacidad de transportar auxina además de nitrato y nitrito; NPF7, transporte de nitrato y dipéptidos; NPF8, contiene transportadores dipeptídicos y son capaces de transportar histidina; [Léran et. al. 2014].

Se predice que las proteínas NRT1 que tienen 12 dominios transmembrana, con un bucle largo que contiene muchos residuos cargados que separan los primeros seis dominios transmembrana de los segundos seis, además de los extremos cortos N- y C- terminales. Curiosamente, esta estructura secundaria se asemeja a la predicha para CRNA de *A. nidulans* y YNT1 de *Hansenula polymorpha*, y se diferencia de las proteínas NRT2 de algas y

plantas, que contienen un dominio hidrófilo C- terminal, [Galván & Fernández, 2001].

FNT: Características de secuencia proteica y estructurales

Miembros de la familia FNT (“formate-nitrite transporter”) han sido encontrados en bacterias, arqueas, hongos, algas y protozoos parásitos [Cabrera et. al, 2014]. Están incluidas en la super familia MIP (“Major Intrinsic protein”) [Yan, 2015]. Los FNTs son proteínas transmembrana de seis hélices que pueden formar una estructura similar a una acuaporina pentamérica y se comportan más como un canal que un transportador. Las funciones para los diferentes NAR1 / FNT se pueden resumir como: (1) en *E. coli*, NirC está involucrada tanto en la absorción de nitrito y como en su exportación; (2) en *Aspergillus nidulans*, NitA media el transporte específico de alta afinidad de nitrito y también tiene un papel en el exporte de nitrito; (3) en *Hansenula*, NAR1 media el flujo de salida de nitrato y nitrito; (4) en *Chlamydomonas reinhardtii* en existen seis NAR1 y sus funciones sólo se han estudiado para NAR1.1 y NAR1.2., [Higuera et al, 2016].

NAR1 es la abreviación de “Nitrate Assimilation-Related component 1”, [Sanz-Luque et. al, 2015]. NAR1.1 es un transportador de nitrito plastídico y, junto con otras proteínas clave para asimilación de nitrato, se regula en función de la disponibilidad de nitrato y bajo el control del gen regulador NIT2. NAR1.2, también llamado LCIA, es un transportador plastídico con especificidad tanto para el nitrito y el bicarbonato, y se sobreexpresa en condiciones de bajo CO₂, [Higuera et al, 2016], lo que hace que forme parte de un mecanismo de concentración de CO₂ o CMM (CO₂-concentration mechanism). El CCM es esencial para acumular CO₂ cerca de RUBISCO y crear una fotosíntesis eficiente en microalgas acuáticas, como es el caso de *Chlamydomonas*, [Sanz-Luque et. al, 2015].

Regulación transcripcional

La regulación transcripcional es el mecanismo regulador que controla los niveles de las enzimas implicadas en el metabolismo de nitrato, aunque

otros mecanismos también pueden ser operativos. Éste se lleva a cabo a nivel de la transcripción en función de los metabolitos relacionados con el nitrato (éste incluido) tanto intracelular como extracelularmente.

Regulación postraducciona

Los mecanismos de regulación y control de la movilización de los transportadores de la membrana son múltiples, implicando en numerosas ocasiones modificaciones postraduccionales de estas proteínas.

En algunos casos se recurre a la glicosilación de las proteínas, para otros transportadores se sugiere que su fosforilación es uno de los mecanismos de control de los niveles de endocitosis y localización de la proteína. En el caso de Ynt1 la fosforilación en las serinas 244 y 246 dependiente de la quinasa Npr1, es necesaria para la llegada a membrana de este transportador. En otros casos la fosforilación es un paso previo y necesario para la ubiquitinación y posterior endocitosis del transportador, [Cabrera, 2010].

Uno de los mecanismos moleculares de control de la localización de los transportadores de nutrientes mejor caracterizado es la ubiquitinación, [Navarro et. al. 2006]. Este sistema de marcaje de proteínas se basa en la unión covalente de un polipéptido de 76 aminoácidos, la ubiquitina, a residuos de lisina de la proteína diana [284]. Se trata de un proceso secuencial en el que intervienen varias enzimas. Inicialmente, la ubiquitina libre es activada por una enzima E1 (enzima activadora) formándose un intermediario con un enlace tio-éster de alta energía, E1~S~Ub. A continuación, una enzima E2 (conjugadora de Ub) toma la Ub activada y forma con ella otro enlace tio-éster de alta energía, E2~S~Ub. Estas enzimas E2, posteriormente, interaccionan con una enzima E3 (ligasa de ubiquitina) que directa o indirectamente permiten la unión de la ubiquitina al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana a través de su extremo carboxilo formándose un enlace isopeptídico. Estas enzimas pueden actuar sobre una proteína previamente ubiquitinada añadiendo nuevas ubiquitinas al residuo de ubiquitina ya presente, lo que daría lugar a cadenas de ubiquitina. Este mecanismo de poliubiquitinación no se conoce en profundidad, sugiriéndose la participación de una nueva familia de enzimas

denominadas E4. La modificación por ubiquitina es un proceso reversible, gracias a la participación de unas hidrolasas de ubiquitina (DUB) que rompen el enlace isopeptídico y liberan las moléculas de ubiquitina. Este mecanismo dinámico es necesario para mantener unos niveles adecuados de ubiquitina libre, [Cabrerá, 2010].

Mecanismos reguladores de los transportadores de nitrato

Los transportadores MFS pueden ser uniportes que transportan un solo sustrato, simportes que transportan el sustrato junto con un ión acoplado, o antiportes que transportan dos moléculas diferentes al mismo tiempo y en direcciones opuestas, [Quistgaard et. al. 2015], Fig. 2.

El mecanismo de transporte sugiere que el transporte del soluto requiere un soporte (transportador) que transporta el sustrato en un lado de la bicapa lipídica, atraviesa la membrana, y la libera en el otro lado. El mecanismo de acceso alternado, en cambio, prevé que para completar un ciclo de transporte, el transportador debe cambiar entre al menos dos conformaciones, una conformación orientada hacia el exterior y una hacia el interior, con el fin de permitir el acceso alternado al sitio de unión de sustrato a partir de cada lado de la membrana. Sin embargo recientes estudios estructurales han ofrecido soporte al mecanismo “carrier”, en estos transportadores, un dominio (ya sea el dominio de oligomerización o la subunidad de transporte) proporciona la estructura necesaria para soportar el movimiento del lugar de unión al sustrato a lo

largo de la membrana vía rotación de cuerpo rígido (*rigid-body rotation*) del dominio de unión al sustrato, modo que el acceso alterno al periplasma y al citoplasma se consigue mediante dicha rotación del dominio N-terminal en relación con el dominio C-terminal. Este modelo, conocido como interruptor oscilante (*rocker-switch model*) puede ser considerado como una forma específica del acceso alternante. Así, el acceso alternante representa un mecanismo general que puede ser aplicado a todos los transportadores

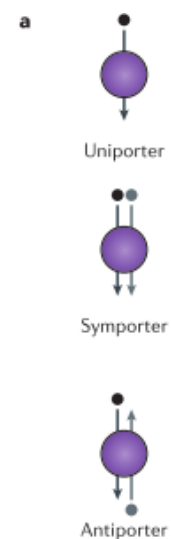


Fig.2: tipos de transporte en función de los sustratos y su dirección, [Quistgaard et. al. 2015]

conocidos. Este mecanismo general predice tres conformaciones esenciales [Fig. 4]: abierto al exterior, ocluido y abierto al interior, [Yan, 2015], [Yan, 2013].

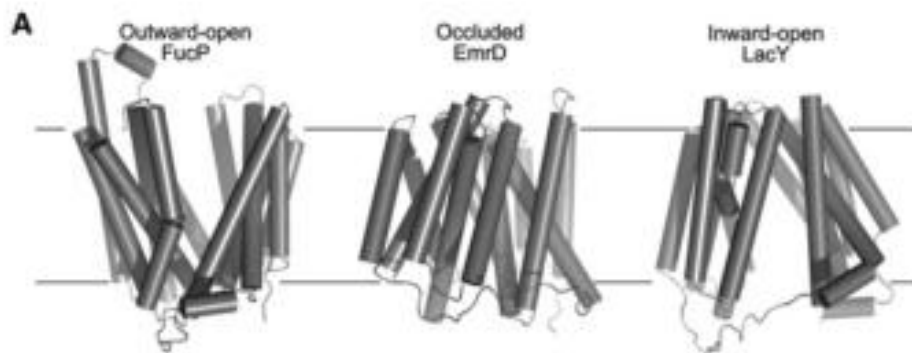


Fig. 4: Tres estados conformacionales de las proteínas pertenecientes a MFS, pudiendo ser aplicado a los transportadores de nitrato estudiados en este trabajo, [Yan et. al, 2013].

Transportadores de nitrato en organismos modelo

Transportadores de nitrato en bacterias

Durante el crecimiento anaerobio, las bacterias reducen el nitrato a nitrito y luego el nitrito a amoníaco. En presencia de concentraciones milimolares de nitrato, la síntesis de las nitrato y nitrito reductasas periplásmicas, Nap y Nrf, se reprime sustancialmente, pero se induce una ruta citoplásmica asociada a la membrana. Esto requiere que el complejo de conservación de energía NarGHI nitrato reductasa, que se regula coordinadamente durante el crecimiento anaerobio en presencia de nitrato con una nitrito reductasa disipadora de energía dependiente de NAFH, NirBD, que reduce el nitrito en el citoplasma al amoníaco. Mientras que el sitio activo para la reducción de nitrato se encuentra en el citoplasma, el nitrato debe ser primero transportado a través de la membrana citoplasmática en contra del gradiente electroquímico para que NarG pueda funcionar, [Jia et. al, 2009]. El proceso de transporte de nitrato se lleva a cabo mediante dos proteínas transportadoras de nitrito:nitrato, las cuales han sido identificadas en la bacteria *E. coli*, y no se trata más que de NarK y NarU, [Zheng et. al, 2013]. Ambas pertenecen a la familia de transportadores NNP, [Yan, 2015]. (Cabe destacar la proteína NirC, la cual, a pesar de no ser un miembro de las

NNP, actúa como un canal de H⁺/nitrito, catalizando la absorción de nitrito, mas aun no está demasiado claro si también facilita la salida de éste de la célula), [Jia et al, 2009].

La estructura tanto de NarK como de NarU es similar a la de los transportadores agrupados en la MFS y contienen dos hélices transmembrana o TM (“transmembrane helice”) con dos pseudo ejes de simetría, siendo los TM 1-6 y 7-12 los dominios N-terminal y C-terminal, respectivamente. Cada dominio contiene un par de repeticiones invertidas, las TM 1-3 y 4-6 en el dominio N-terminal y las TM 7-9 y 10-12 en el dominio C-terminal. Las repeticiones invertidas dentro de cada dominio están relacionadas por un doble eje veces perpendicular a la membrana normal. La superficie tanto de NarU como de NarK embebida en la membrana es hidrófoba, con el límite citoplásmico demarcado por un potencial electrostático positivo. Se sugiere que pueden transportar sustratos vía “alternating-access mechanism”, en el cual el transportador adopta tres conformaciones ya mostradas en la [Fig. 4], [Fukuda 2015], [Yan, 2013].

Las proteínas NarK parecen tanto catalizar el intercambio de nitrito como de nitrato, aparentemente actuando como un simporte mediante protones, [Zheng et. al, 2013]. Sin embargo, recientes estudios han asociado a NarK como un antiportador, [Yan, 2015], [Fukuda et. al, 2015]. La primera descripción del transportador NarK lo asociaba con la respiración celular, mientras que la última lo ha asociado no solo con dicha respiración sino también tanto con la asimilación como exporte neto de nitrito:nitrato al y desde el material celular. Las dos secuencias NS, las cuales aparecen en todos los NNP, de NarK son: secuencia NS1 formada por los residuos 164 - 175 (GGALGLNGGLGN) localizados en la TM5; secuencia NS2 formada por los residuos 408-420 (GFISAIGAIGGFF) localizados en la TM11 [Fig. 1]. Ambas secuencias se encuentran en el centro de la proteína, revestiendo parte de la ruta de transporte del sustrato, además, son ricas en glicina, que asegura una fuerte fijación a las hélices circundantes, [Zheng et. al, 2013].

NarU fue estudiado por [Yan, 2013] mediante un ensayo de flujo detenido a base de liposomas; aparentemente, los liposomas a los que se le acopló NarU permitieron el flujo de agua hacia el interior, lo que sugiere que NarU no es un antiporte de nitrato:nitrito, pues en ese caso no habría sido capaz de

reducir la presión osmótica a lo largo de la membrana del liposómica. Por lo tanto, es poco probable que Naru sea un transportador de H^+ acoplados.

Zheng et al.

Page 9

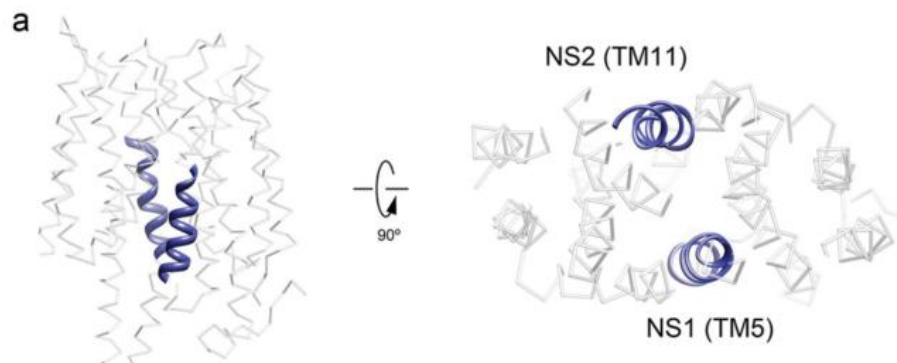


Fig. 1: Las dos secuencias NS altamente conservadas en TM5 y TM11 (hélices azules) en el centro de Nark forman la ruta del transporte de nitrato:nitrito, [Zheng et. al, 2013].

Transporte de nitrato en algas

El principal género utilizado para los estudios acerca del metabolismo del nitrógeno es el alga verde *Chlamydomonas*, además, también es utilizado para analizar procesos biológicos fundamentales como la fotosíntesis, la biología del cloroplasto, la genética mitocondrial y el carbono y la deficiencia de nutrientes, entre otros.

Éste organismo haploide y unicelular carece de la complejidad estructural presente en plantas, por lo que tiene una interesante flexibilidad para adaptarse a las condiciones ambientales extremas. Entre las ventajas de utilizar *Chlamydomonas* en estudios moleculares se incluye su fácil manejo microbiológico, su genética haploide, y la transformación de sus tres genomas, la secuencia de su genoma revela la evolución de las funciones clave de animales y plantas, [Fernández y Galván, 2008]. La [Fig. 6] muestra la organización de las enzimas/proteínas implicadas en la asimilación de nitrato.

De hecho, hay tres familias diferentes de proteínas, NRT1 (también llamada NPF, un miembro), NRT2 (seis miembros) y NAR1 (seis miembros), relacionadas con el transporte del nitrito:nitrato en *Chlamydomonas*, [Sanz-Luque, 2015], [Fernandez & Galvan, 2008].

Los genes relacionados con la asimilación de nitrato o NAR (Nitrate Assimilation Related), [Fernandez & Galván, 2008], se han encontrado en dos clusters de genes: un cluster de 45 kb que contiene, entre los genes

estructurales para la reducción de nitrato (Nia1) y nitrito (Nii1), los genes Nrt2 para el transporte de nitrato; segundo cluster de aproximadamente 10-15 kb que contiene un tercer gen Nrt2 y un gen regulado por el nitrato, que codifica para una oxidasa mitocondrial alternativa. El agrupamiento de los genes relacionados con la asimilación de nitrato ya ha sido observado en otros organismos como *A. nidulans*, *H. polymorpha* y *Arabidopsis thaliana*, lo que puede representar una estrategia para hacer de la regulación de la asimilación de nitrato una ruta más eficiente, [Galván & Fernández, 2001]. Los genes NRT2 codifican para transportadores de nitrato:nitrito de alta afinidad (HANNiT) y han sido clonados en mohos, hongos, algas, levaduras, bacterias y, en muchas especies de plantas, aparecen como una familia multigénica. La gran mayoría de las proteínas NRT2 requieren un segundo componente NAR2, [Fernandez & Galvan, 2008]. A pesar de haber seis miembros de la familia NRT2 en *Chlamydomonas*, solo dos de ellas requieren a NAR2 para su funcionalidad, [Sanz-Luque, 2015]. El requerimiento de NAR2 para el funcionamiento de los transportadores de nitrato de alta afinidad (HANT) ya ha sido corroborado, no solo en *Chlamydomonas*, [Zhou et. al, 2000], sino también en otros sistemas como por ejemplo los de mohos y plantas. Los genes pertenecientes a la familia NAR1 aparecen en prácticamente todos los organismos eucariotas y procariotas, a excepción de las plantas; en *Chlamydomonas* son los claramente regulados por el carbono y el nitrógeno. Estudios funcionales han otorgado evidencias de que NAR1.1 es un transportador específico de nitrito del cloroplasto, mostrando que se trata de un proceso regulado (mejora la eficiencia en el uso de nitrato para el crecimiento celular bajo ciclos de luz/oscuridad y entornos con bajas concentraciones de CO₂). Un segundo miembro de ésta familia, NAR1.2, parece ser un transportador biespecífico para el nitrato y el bicarbonato, [Fernandez & Galvan, 2008].

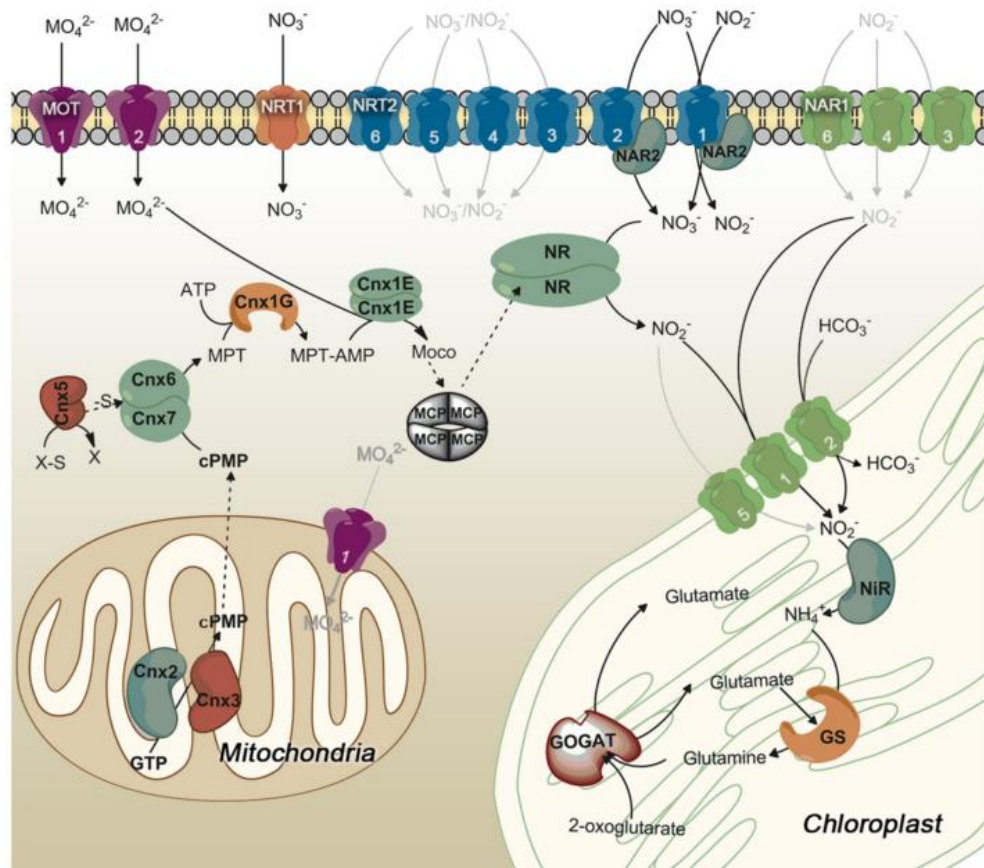


Fig 5: Esquema general de las proteínas implicadas en la asimilación de nitrato y la biosíntesis de cofactor molibdeno en *Chlamydomonas*. Los pasos simbolizados con líneas grises no se han demostrado empíricamente. Las proteínas hipotéticas que median estos pasos están representadas en su localización más probable. Se utilizan colores diferentes para cada familia de transportadores. Los números en los transportadores identifican cada miembro de la familia.

Transporte de nitrato en hongos y levaduras

En *Saccharomyces cerevisiae* aparecen los transportadores de sulfito Ssu1 y Ssu2, pertenecientes a la familia de transportadores TDT (“tellurite resistance/dicarboxyle”), el cual al parecer es capaz también de transportar metabolitos derivados del NO, como lo es el nitrato, fuera de la célula, así como Nar1 exporta tanto nitrato como nitrito, perteneciente a la familia FNT (“formate-nitrite transporter”), [Cabrera et. al, 2014].

La regulación del transportador Ynt1 en *H. polymorpha* se lleva a cabo mediante la internalización y degradación vacuolar, disparada por la presencia de fuentes de nitrógeno intracelulares, modula la cantidad de Ynt1 en la membrana plasmática y, por consiguiente, la absorción de nitrato. Este mecanismo permite a la célula regular el transporte de nitrato de acuerdo

con la disponibilidad de la molécula según en qué estado esté. La internalización vacuolar se lleva a cabo mediante la ubiquitinación, la cual no se trata más que de un mecanismo de señalización para la endocitosis de proteínas membranales y su subsecuente degradación en la vacuola. La regulación hacia abajo (“down-regulation”) de Ynt1 disminuye la absorción de nitrato y, a largo plazo, la cantidad de nitrato intracelular reduciría la inducción de genes de asimilación de nitrato. Dicho mecanismo también puede regular el transporte de nitrato en otros organismos asimiladores de nitrato. El dominio central de HATS en hongos es muy similar en longitud y composición a la de Ynt1. Aunque la aparición de la endocitosis en hongos filamentosos ha sido algo controvertida, la evidencia actual apoya una vía endocítica que implica proteínas de membrana, [Navarro et. al, 2006].

Cabe destacar que los genes reguladores de la asimilación de nitrato han sido caracterizados con bastante éxito en hongos filamentosos y levaduras y se han descubierto los genes NIRA, NIT4, and YNA1 de *A. nidulans*, *Neurospora crassa*, y *H. polymorpha*, respectivamente, [Fernandez & Galvan, 2008].

La levadura *Hansenula polymorpha*, al igual que otros organismos, ha evolucionado agrupando el clusters [Fig. 5] todos los genes que controlan la asimilación de nitrato, de ésta forma, encontramos los genes YNT1 (codifica para el transportador de nitrato Ynt1), YNR1 (codifica para la enzima nitrato reductasa,) e YNI1 (codifica para la enzima nitrito reductasa), además de los genes YNA1 e YNA2, que codifican para los factores transcripcionales $Zn(II)_2Cys_6$ denominados Yna1 e Yna2. Se ha concluido que la expresión de estos genes es inducida por nitrato y sometido a represión catabólica de nitrógeno, [Siverio, 2002]. Ésta regulación génica resulta parecida a la de los hongos filamentosos, [Marzluf, 1997]. En éste caso los activadores resultan ser NIT4 de *N. crassa* y NirA de *A. nidulans*, que también pertenecen a la familia de factores transcripcionales $Zn(II)_2Cys_6$, sin embargo no reconocen la secuencia promotora usual en los genes objetivo (CGG X_n CCG), sino que en el caso de NIT4, enlaza con lugares que contengan la secuencia octamérica simétrica TCCGCGGA, [Fu et. al, 1995], así como NirA enlaza con cuatro regiones que contienen la secuencia consenso CTCCCGHGG en la región intergénica de los genes

niaD y niiA, que codifican para las nitrato reductasas de los hongos filamentosos, [Strauss et. al, 1995].

Tanto NirA como NIT4 de *A. nidulans* y *N. crassa* (respectivamente), demuestran una alta similitud con los factores YNA1 y YNA2 de *Hansenula polymorpha*, con una secuencia típica Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₅₋₁₆-Cys-X₂-Cys-X₆₋₈Cys. La similitud de las proteínas Yna1p y Yna2p con NirA y NIT4 sugiere un papel de los genes YNA1 y YNA2 en la activación transcripcional de los genes inducidos por nitrato en *H. polymorpha*.



Fig. 5: Cluster de genes que codifican para el transportador Ynt1, las nitrato y nitrito reductasas, así como sus factores transcripcionales en la levadura *H. polymorpha*, [Siverio, 2002].

Transportadores de nitrato en plantas

El nitrato es la fuente preferida de nitrógeno para las plantas y al menos 16 proteínas transportadoras de nitrato:nitrito han identificadas, [Zheng et. al, 2013]. El transporte hacia las células de la raíz desde la solución del suelo envuelven numerosos transportes específicos de membrana de las familias NRT1 y NRT2, que muestran alta y/o baja afinidad por el sustrato, haciendo eficiente al sistema de absorción entero en un amplio rango de concentraciones de NITRATO, [Gojon et. al, 2011]. En las plantas de la función de las proteínas NarK está probablemente relacionada únicamente a la asimilación neta de nitrógeno, [Zheng et. al, 2013].

Estudios fisiológicos han establecido que las plantas adquieren NITRATO del suelo a través de la combinación de la actividad de al menos tres sistemas distintos, de los cuales dos poseen una alta afinidad al sustrato mientras que la afinidad del último es baja. Uno de los sistemas de alta afinidad es fuertemente inducido por el suministro externo de nitrato y es conocido como iHATS, mientras que el segundo (cHATS) es expresado constitutivamente en las células. El sistema de baja afinidad es conocido como LATS y parece ser importante a bajas concentraciones de nitrato y

resulta ser un transporte activo dependiente del gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática, [Forde, 2000].

Además de su rol como nutriente, el nitrato parece ser también una molécula señalizadora en las plantas, la cual controla muchos aspectos en el metabolismo y desarrollo de la planta, [Gojon et. al, 2011].

Los transportadores de nitrato en plantas son numerosos (pertenecientes a las familias NRT1 y NRT2) y la gran mayoría aparecen en otros organismos, como algas verdes, bacterias, hongos, etc. O al menos lo hacen sus homólogos. Los cuales ya han sido explicados en otros apartados. Además, en plantas, el nitrato y sus transportadores parecen guardar una estrecha relación con las hormonas de las mismas.

CHL1 (CHLORATE1/NRT1.1/NPF6.3) parece ser, además de un transportador con afinidad dual por el nitrato, un transportador de auxina controlado por el mismo, [Krouk & Abi, 2016].

La provisión de nitrato ha demostrado promover la biosíntesis y transporte de Citoquininas (CK) en muchas especies de plantas, [Rayahu et. al, 2005], la producción de etileno, [Tian et. al, 2009], y la síntesis, transporte y liberación del ácido abscísico (ABA) y sus formas conjugadas, [Krouk & Abi, 2016].

Conclusiones

A pesar de la gran cantidad de estudios acerca de los transportadores de nitrato que se han realizando a lo largo de los años, nos encontramos aún muy lejos de llegar a un entendimiento completo de estos. Si bien sus mecanismos no nos resultan demasiado complejos, los transportadores de nitrato actúan sinérgicamente con una inmensa batería de genes y moléculas, las cuales pueden cambiar entre diferentes organismos, lo que hace que podamos únicamente hacernos una pequeña idea de cómo éstos funcionan. A pesar de ello se han encontrado evidencias de que a parte de su principal función (el transporte de nitrato y metabolitos relacionados) pueden realizar muchas otras funciones secundarias, tanto de transporte como de regulación, estos descubrimientos son sumamente alentadores y, junto con los conocimientos adquiridos acerca de sus secuencias proteicas,

conformaciones tridimensionales y otras características, nos encontramos a un paso más cerca de llegar a entender estos complejos pero interesantes transportadores.

Bibliografía

B

Bloom, A. J., Burger, M., Kimball, B. A., y Pinter Jr., P. J. 2014. *Nature Climate Change*. 4: 477-480.

C

Cabrera, E. 2010. Caracterización de los transportadores de nitrato y de potasio en la levadura *Hansenula polymorpha*. Ciencias y Tecnologías. Universidad de La Laguna. España.

Cabrera, E., González-Montelongo, R., Giraldez, T. Álvarez de la Rosa, D., y Siverio, J. M. 2014. Molecular components of nitrate and nitrite efflux in yeast. *Eukaryotic cell*. 13: 267-278.

F

Fernández, E., y Galván, A. 2008. Nitrate Assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryotic cell*. 7: 555-559.

Forde, B. G. 2008. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *ELSEVIER*. 1465: 219-235.

Fu, Y.H., Feng, B., Evans, S., y Marzluf, G.A. 1995. Sequence-specific DNA binding by NIT4, the pathway-specific regulatory protein that mediates nitrate induction in *Neurospora*. *Molecular Microbiology*. 15: 935-942. FIJATE REVISTAS EN CURSIVA

Fukuda, N., Takeda, H., Kato, H. E., Doki, S., Ito, K., Maturana, A. D., Ishitani, R., y Nureki, O. 2012. Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nature Communications*. 1-12.

G

Galván, A., y Fernández, E. 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 225-233.

Galván, A., Quesada, A., y Fernández, E. 1995. Nitrate and Nitrite Are Transported by Different Specific Transport Systems and by a Bispecific Transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 2088-2092.

Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., y Laugier, E. 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62: 2299-2308.

H

Higuera, J. J., Calatrava, V., González, Z., Mariscal, V., Siverio, J. M., Fernández, E., y Galván A. 2016. NRT2.4 and NRT2.5 Are Two Half-Size Transporters from the *Chlamydomonas* NRT2 Family. *Agronomy*. 6: 1-20.

J

Jia, W., Tovell, N., Clegg, S., Trimmer, M, y Cole, J. 2009. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *The Biochemical Journal*. 417: 297-304.

K

Kershko, A., y Ciechanover, A. 1998. The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*. 67: 425-79.

Krapp, A. 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. *ELSEVIER*. 25: 115-122. REVISTA???

Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., y Daniel-Vedele, F. 2014. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. 65: 789-798.

Krouk, G., and Abi, C. 2016. Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Molecular Biology*.

L

Léran, S., Varala, K., Boyer, J. C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniele-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernández, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J. M., Halkier, B. A., Harris, J. M., Hedrich, R., Limami, A. M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y. F., Zhang, M., Coruzzi, G., y Lacombe, B. 2014. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends in Plant Science*. 19: 5-9.

Liu, K. H., y Tsay, Y. F. 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal*. 22: 1005-1013.

M

Magasanik, B., y Kaiser, C. A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *ELSEVIER*. 290: 1-18.

Marluf, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 17-32.

Martín, Y., González, V. Y., Cabrera, E., Rodríguez, C., y Siverio, J. M. 2011. Npr1 Ser/Thr Protein Kinase Links Nitrogen Source Quality and Carbon Availability with the Yeast Nitrate Transporter (Ynt1) Levels. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 27225-27235.

Martín, Y., Navarro, F. J., y Sivero, J. M. 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter CHL1 in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Plant Mol Biology*.

Montanini, B., Viscomi, A. R., Bolchi, A., Manrtín, Y., Siverio, J.M., Balestrini, R., Bonfante, P., and Ottonello, S. 2006. Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochemistry Journal*. 394: 125-134.

N

Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y., y Siverio, J. M. 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 13268-13274.

Navarro, F. J., Martín, Y., y Siverio, J. M. 2008. Phosphorylation of the Yeast Nitrate Transporter Ynt1 Is Essential for Delivery to the Plasma Membrane during Nitrogen Limitation. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 31208-31217.

Newstead, S. 2015. Molecular insights into proton coupled peptide transport in the PTR family of oligopeptide transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1850: 488-499.

O

Okamoto, M., Vidmar, J. J., y Glass, A. D. M. 2003. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology*. 44: 304-317.

P

Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier Jr., M. H. 1998. Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 1-34.

Pérez, M. D., González, C., Ávila, J., Brito, N., y Siverio, J. M. 1997. The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochemistry Journal*. 321: 397-403.

Q

Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., and Nordlund, P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature Publishing Group*. 17: 1-10.

R

Rahayu, Y. S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Römheld, V., von Wirén, N., and Bangerth, F. 2005. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻ induced stimulation of leaf growth. *Journal of Experimental Botany*. 56:1143-1152.

Rice, C. W., y Tiedje, J. M. 1989. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *ELSEVIER*. 21: 597-602.

Rodríguez, C., Tejera, P., Medina, B., Guillén, R., Domínguez, A., Ramos, J., y Siverio, J. M. 2010. Ure2 Is Involved in Nitrogen Catabolite Repression and Salt Tolerance via Ca²⁺ Homeostasis and Calcineurin Activation in the Yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 37551-37560.

S

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galván, A., and Fernández, E. 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*.

Scharff, A. M., Egsgaard, H., Hansen, P. E., and Rosendahl, L. 2003. Exploring Symbiotic Nitrogen Fixation and Assimilation in Pea Root Nodules by in Vivo ¹⁵N Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Society*. 131: 367-378.

Silvestrini, L., Rossi, B., Gallmetzer, A., Mathieu, M., Scazzocchio, C., Berardi, E., y Strauss, J. 2015. Interaction of Yna1 and Yna2 Is required for nuclear accumulation and transcriptional activation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. *PLoS ONE*. 10: 1-25.

Siverio, J. M. 2002. Assimilation of nitrate by yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 277-284.

Strauss, J., Muro-Pastor, M. I., y Scazzocchio, C. 1998. The regulator of nitrate assimilation in ascomycetes is a dimer which binds a nonrepeated, asymmetrical sequence. *Molecular and Cellular Biology*. 18: 1339-1348.

T

Tian, Q. Y., Sun, P., and Zhang, W. H. 2009. Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytology*. 184:918-931.

Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H., y Hsu, P. K. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*. 581: 2290-2300.

Y

Yan, N. 2015. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*. 44: 257-283.

Yan, H., Huang, W., Yan, C., Gong, X., Jiang, S., Zhao, Y., Wang, J., y Shi, Y. 2013. Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Reports*. 3: 716-723.

Z

Zheng, H., Wisedchaisri, G., y Gonen, T.2013. Crystal Structure of a Nitrate/Nitrite Exchanger. *Nature*. 497: 1-11.

Zhou, J. J., Fernández, E., Galván, A., y Miller, A. J. 2000. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters*. 466: 225-227.