



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Producción de
Óxidos de Nitrógeno Gaseosos
en *Thermus thermophilus*



Tesis Doctoral
Carlos Bricio Garberí
Madrid 2012

Memoria presentada por Carlos Bricio Garberí para optar al título de Doctor en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. José Berenguer Carlos, en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid, Septiembre 2012

ABREVIATURAS

β -gal	β -galactosidasa
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
Amp ^r	Resistente a Ampicilina
Anox	Anaerobiosis sin óxidos de nitrógeno
cDNA	DNA complementario
cols.	Colaboradores
cNOR th	Óxido nítrico reductasa de tipo <i>c</i> de <i>Thermus thermophilus</i>
DDM	n-dodecil- β -D-maltósido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
DNasal	Desoxirribonucleasa I
D.O. ₅₅₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm
D.O. ₄₂₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 420 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>hph5</i>	Gen de resistencia termoestable a Higromicina B
Hth	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>
Hyg ^r	Resistente a Higromicina B
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
JL18	<i>Thermus thermophilus</i> JL18
Kan ^r	Resistente a Kanamicina
<i>kat</i>	Gen de resistencia termoestable a Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani

Mo-bisMGD	Cofactor de molibdo bis-molibdopterin guanina dinucleótido
mRNA	RNA mensajero
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAP	Nitrato reductasa periplásmica
NAR	Nitrato reductasa de membrana
NCE	Elemento conjugativo de respiración de nitrato
NDH	NADH deshidrogenasa
NIR	Nitrito reductasa
NOR	Óxido nítrico reductasa
NOS	Óxido nitroso reductasa
ONPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pden	<i>Paracoccus denitrificans</i>
Psau	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PRQ25	<i>Thermus thermophilus</i> PRQ25
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNasaA	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR con transcripción reversa (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SG0	<i>Thermus thermophilus</i> SG0.5JP17-16
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS

SNP	Nitroprusiato sódico
Tat	Sistema de transporte de dos argininas (Twin arginine transport system)
TB	Medio rico de cultivo para <i>Thermus</i> (<i>Thermus Broth</i>)
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
Tsco	<i>Thermus scotoductus</i>



ÍNDICE

CONTENIDO

1. ABSTRACT_____Página 29

2. INTRODUCCIÓN_____Página 33

2.1. La desnitrificación

2.1.1. Enzimas implicadas en la desnitrificación

2.1.1.1. *Nitrato reductasa*

2.1.1.2. *Nitrito reductasa*

2.1.1.3. *Óxido nítrico reductasa*

2.1.1.4. *Óxido nitroso reductasa*

2.2. El género *Thermus*

2.3. *Thermus thermophilus*

2.3.1. Cadena respiratoria aerobia

2.3.2. La desnitrificación en *T. thermophilus*

2.3.2.1. *La respiración de nitrato*

3. OBJETIVOS_____Página 55

4. MATERIALES Y MÉTODOS _____ **Página 59**

4.1. Materiales

4.1.1. Estirpes empleadas

4.1.2. Oligonucleótidos empleados

4.1.3. Plásmidos utilizados

4.1.4. Material químico y bioquímico

4.1.5. Anticuerpos

4.2. Métodos microbiológicos

4.2.1. Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

4.2.2. Crecimientos de *T. thermophilus* en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis

4.2.3. Transformación bacteriana

4.2.4. Conjugación entre estirpes de *T. thermophilus*

4.2.5. Generación de mutantes en *Thermus*

4.2.6. Aislamiento de envolturas celulares y solubilización de membranas totales de *T. thermophilus*

4.3. Manipulación de ácidos nucleicos

4.3.1. Preparación del DNA

4.3.2. Amplificación de DNA

4.3.3. Clonación de DNA

4.3.4. Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

4.3.5. Extracción de RNA y retrotranscripción

4.4. Manipulación de proteínas

4.4.1. Preparación de extractos de electroforesis.

4.4.2. Electroforesis de proteínas

4.4.3. Inmunodetección de proteínas (Western-Blot)

4.4.4. Medición de concentración de proteínas

4.4.5. Purificación de proteínas de membrana con extensión de histidinas

4.5. Ensayos químicos y enzimáticos

4.5.1. Detección de producción y consumo de nitrito

4.5.2. Ensayos β -galactosidasa en *T. thermophilus*

4.5.3. Ensayo de actividad óxido nítrico reductasa

4.5.4. Medición de óxidos de nitrógeno gaseosos

4.6. Análisis bioinformático

5. RESULTADOS _____ **Página 87**

5.1. Los genes de desnitrificación en distintas estirpes de *Thermus thermophilus*

5.1.1. Las proteínas Nor de *T. thermophilus* PRQ25

5.1.2. Conservación de los genes *nor* en otros *T. thermophilus*

5.1.3. NorCBH se expresan como un operón

5.1.4. Integridad del complejo donador de electrones Nrc en diferentes estirpes de *T. thermophilus*

5.2. Transferencia horizontal de la maquinaria desnitrificante por conjugación

5.2.1. Secuenciación del derivado conjugativo C-15

5.3. Identificación del producto final de la desnitrificación

5.3.1. ¿Existe una óxido nitroso reductasa en PRQ25?

5.3.2. Óxido nitroso como producto final de la desnitrificación en *T. thermophilus* PRQ25

5.4. Análisis funcional de los genes *nor*

5.4.1. Aislamientos de mutantes *nor*

5.4.2. Análisis funcional de los mutantes *nor*

5.4.3. NorB es requerida para la síntesis de NorC

5.4.4. Acumulación de NO en los mutantes *nor*

5.4.5. Inducibilidad del promotor *Pnor* en los mutantes *nor*

5.5. Aislamiento, purificación y caracterización de la óxido nítrico reductasa de *T. thermophilus*

5.5.1. La actividad óxido nítrico reductasa está asociada a la membrana

5.5.2. NorH interacciona con NorC

5.5.3. Sobreexpresión de NOR

5.5.4. Expresión y purificación de NOR a partir del plásmido pMKcNOR

5.6. Desnitrificación en la cepa *T. thermophilus* B

6. DISCUSIÓN _____ Página 121

6.1. Desnitrificación parcial frente a completa

6.2. La óxido nítrico reductasa cNOR de *T. thermophilus*

6.2.1. Una subunidad adicional para la cNOR de *T. thermophilus*

6.3. Adquisición de genes de desnitrificación mediante conjugación

6.4. Otras actividades Nor en *T. thermophilus*: la cepa B

7. CONCLUSIONS _____Página 133

8. BIBLIOGRAFÍA _____Página 137

ANEXO I. SECUENCIAS DE DNA Y ALINEAMIENTOS _____Página 155

ANEXO II. PUBLICACIONES _____Página 163

TABLAS

- **Tabla 1.** Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo. **Página 59**
- **Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en el trabajo. **Página 61**
- **Tabla 3.** Plásmidos de otras investigaciones empleados en este trabajo. **Página 65**
- **Tabla 4.** Plásmidos construidos en esta Tesis. **Página 66**
- **Tabla 5.** Composición y utilidad de los tampones y soluciones empleados. **Página 67**
- **Tabla 6.** Antisueros utilizados en esta Tesis. **Página 69**
- **Tabla 7.** Características de NorC, NorB y NorH de *T. thermophilus* PRQ25. También se muestra el porcentaje de identidad con otras óxido nítrico reductasas presentes en diferentes organismos. **Página 89**
- **Tabla 8.** Desnitrificación en distintas estirpes de *T. thermophilus*. Caracterización de la capacidad (positiva +, o negativa -) de producción de gas en cultivos anaerobios de distintas estirpes de *T. thermophilus* en presencia de 40 mM nitrato a 70°C crecidos durante 48 horas. Se muestran también los resultados de amplificación por PCR positiva (+), o negativa (-) de los genes del operón *nor* utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. **Página 91**

FIGURAS

- **Figura 1.** Esquema del ciclo de óxido-reducción del nitrógeno. **Página 33**
- **Figura 2.** Representación gráfica de la desnitrificación en bacterias. Durante el proceso se produce la reducción secuencial de los óxidos de nitrógeno desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso (N_2) catalizado por cuatro reductasas: la nitrato reductasa (NAR) que reduce nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), la nitrito reductasa (NIR) que cataliza la reducción de nitrito a óxido nítrico (NO), la óxido nítrico reductasa (NOR) que reduce el NO hasta óxido nitroso (N_2O) y la óxido nitroso reductasa (NOS) que cataliza la reducción del óxido nitroso a N_2 . **Página 36**
- **Figura 3.** Nitrato reductasas respiratorias. **A)** Nitrato reductasa de membrana de *Escherichia coli* (PDB 1SIW). Las subunidades NarG, NarH y NarI se muestran en verde, morado y naranja, respectivamente. Se indica la localización del cofactor de Mo-bisMGD, de los cinco centros ferrosulfurados y de los dos grupos hemo *b*. **B)** Nitrato reductasa periplásmica NAP de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 1OGY). La subunidad NapA (amarillo) contiene un centro [4Fe-4S] y dos cofactores de Mo-bisMGD. La subunidad NapB (gris) es un citocromo *c* bihemo. **Página 38**
- **Figura 4.** Nitrito reductasas. **A)** Nitrito reductasa de tipo *cd1* de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1NIR). Esta enzima es un homodímero en el que cada subunidad (naranja y amarillo) contiene un grupo hemo *c* y un grupo hemo *d1*. **B)** Nitrito reductasa de cobre (CuNir) de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 1ZV2). La CuNir es un homotrímero (subunidades en distinto tono de azul) que contiene dos átomos de Cu por monómero (en magenta) coordinados por residuos de cisteína, histidina y metionina. **Página 40**
- **Figura 5.** Óxido nítrico reductasas. **A)** Óxido nítrico reductasa de tipo cNOR de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3O0R). La subunidad NorC (azul) tiene un dominio globular de localización periplásmica que contiene un hemo *c*. NorB (amarillo) es una proteína con doce hélices transmembrana que contiene dos grupos hemo, *b* y *b*₃ y una molécula de hierro sin grupo hemo. **B)** Óxido nítrico reductasa de tipo qNOR de *Geobacillus stearothermophilus* (PDB 3AYF). La enzima es un monómero que presenta dos grupos hemo, *b*, y *b*₃ y un residuo de zinc. **Página 42**

- **Figura 6.** Óxido nitroso reductasa de *Pseudomonas stutzeri* (PDB 3SBQ). Se trata de un homodímero en el que cada subunidad (morado y azul) contiene dos centros de multicobre: Cu_A y Cu_Z. **Página 43**
- **Figura 7.** Elemento NCE de *T. thermophilus* NAR1. **A)** Localización y sentido de transcripción de los operones implicados en la reducción de nitrato (*narCGHJIKT*), oxidación de NADH (*nrcDEFN*) y regulación (*dnrST* y *drpAB*). Se indica también el transportador de hierro truncado (*feo**), así como la localización de una transposasa de tipo IS4 en el extremo 3' del agrupamiento. **B** y **C)** Estructura proteica de la cadena transportadora Nrc (**B**) y de la nitrato reductasa Nar de *T. thermophilus* NAR1 (**C**). **Página 48**
- **Figura 8.** Crecimiento de la estirpe *T. thermophilus* PRQ25. Se muestra la curva de crecimiento anaerobio a 70°C en presencia de 40 mM de nitrato (NO₃⁻) y 5 mM de nitrito (NO₂⁻) de la estirpe PRQ25, así como la acumulación de gas en campana Durham. La estirpe aerobia HB27 se utilizó como control negativo. **Página 87**
- **Figura 9.** Esquema de los agrupamientos génicos NCE y *nor-nir* en el megaplásmido de PRQ25. También se representan en color verde los genes homólogos a los del megaplásmido de HB27 y HB8. **Página 88**
- **Figura 10.** Predicción topológica de las proteínas NorC (**A**), NorB (**B**) y NorH (**C**) a partir de sus secuencias. Las gráficas representan la localización de los aminoácido de cada una de las proteínas según un valor de puntuación asignado por el programa de predicción topológica TMPred (Swiss Intitute of Bioinformatics). Los aminoácidos con valores de puntuación superiores a 500 representan una región transmembrana predicha por el programa. Cada gráfica muestra 2 predicciones: la predicción recomendada (línea negra) y otra menos probable (línea gris). **Página 90**
- **Figura 11.** Transcripción de los genes *norC*, *norB* y *norH*. **A)** Estructura del agrupamiento *nor*. El lazo indica el posible terminador transcripcional. Las flechas indican la localización de los oligonucleótidos empleados en el ensayo de RT-PCR. **B)** Amplificación por PCR sobre cDNA de un cultivo de la cepa PRQ25 crecida a 60°C aeróbicamente (-) o inducido en anaerobiosis con nitrato 20 mM durante 4 horas a la misma temperatura (+). Como control positivo se amplificó *groES*. **Página 92**

- **Figura 12.** Integridad de NrC en las cepas desnitrificantes. PCR para detectar el gen *nrcE* en las diferentes estirpes de *T. thermophilus* utilizando los oligonucleótidos H45 y H46' como cebadores. **Página 93**
- **Figura 13.** Caracterización de las cepas transconjugantes C-5 y C-15. **A)** Detección de producción y consumo de nitrito de los transconjugantes C-5 y C-15 a partir de 40 mM de nitrato y 5 mM de nitrito después de incubarlos a 70°C durante 2 días. HB27 y HB27_{gdh} (estirpe receptora) se utilizaron como controles negativos. **B)** Amplificación de los genes *narC* (782 pb), *nirS* (1620 pb) y *norB* (1431 pb) en las estirpes transconjugantes C-5 y C-15. El tamaño del producto de PCR de *nirS* (1731 pb) corresponde a amplificar *nirS* desde una región anterior (a 121 pb del origen del gen) utilizando el oligonucleótido 3c (Tabla 2). **C)** Western-Blot para detectar NarG, NirS y NorC en C-5 y C-15 inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C. Se utilizaron como controles HB27 y PRQ25. **D)** Comparación del patrón de bandas de proteínas de membrana de las estirpes donadora (PRQ25) y receptora (HB27_{gdh}) con las estirpes transconjugantes (C-5 y C-15). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales de la capa S de cada cepa. Como control se utilizó la cepa HB27. **Página 95**
- **Figura 14.** Análisis de la secuencia de C-15. **A)** Distribución de tamaños de los contigs. **B)** Número relativo de copias de cada contig, calculado a partir del número de lecturas en función de su longitud y la cobertura media del genoma. **Página 96**
- **Figura 15.** Producción de N₂O por la cepa PRQ25. Comparación de las concentraciones de óxido nitroso producido por la cepa PRQ25 a partir de la cantidad de nitrato indicada después de 2 días de incubación a 70°C en condiciones de anaerobiosis. También se indica la presencia (+) o ausencia (-) de nitrito después del periodo de incubación. La cepa aerobia se utilizó como control negativo. **Página 97**
- **Figura 16.** La acumulación de N₂O en cepas desnitrificantes de *T. thermophilus*. Producción de óxido nitroso en cultivos anaerobios de diferentes estirpes de *T. thermophilus* crecidas durante 5 días a 70°C en presencia de 10 mM de nitrato. **Página 98**

- **Figura 17.** Alineamiento de McoP de *Pyrobaculum aerophilum* con TTC1370 de *T. thermophilus* HB27 y Lacasa de PRQ25. **Página 99**

- **Figura 18.** Mutantes de inserción en la lacasa. **A)** Esquema de la construcción de mutantes de inserción del gen TTC1370 (lacasa), por recombinación homóloga, utilizando el plásmido no replicativo pK18 con un fragmento interno del gen de 538 pb, clonado a *Xba*I, *Eco*RI. **B)** Comparación de las concentraciones relativas de óxido nitroso producido a partir de 10 mM de nitrato después de 5 días de incubación anaerobia a 70°C de los mutantes de inserción en el gen TTC1370 (HB27d [lac] y HB27 [lac]) con sus estirpes parentales. **Página 100**

- **Figura 19.** Comparación de las concentraciones en ppm de ¹⁵N en forma de óxido nitroso y di-nitrógeno en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 5 mM de nitrato de las cepas desnitrificantes PRQ25 y HB27d después de una incubación de 5 días a 70°C. Como control se utilizó una muestra de aire sin cultivo. **Página 101**

- **Figura 21.** Comparación de la producción de óxido nitroso entre los mutantes de inserción del gen *cytba3* y sus estirpes parentales después de 24 horas de incubación a 60°C. **Página 102**

- **Figura 20.** Producción de óxido nitroso en cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de las estirpes transconjugantes C-5 y C-15 al cabo de 24 horas a 70°C . Se utilizó como control negativo las cepa aerobia HB27 y como control positivo la estirpe PRQ25. **Página 102**

- **Figura 22.** Mutantes del operón *nor*. **A)** Esquema de la construcción de los mutantes en el operón *nor*; las cruces rojas (X) marcan la delección de los genes que se encontraban en esa posición; la flecha gris indica el origen de transcripción del operón *Pnor*; la flecha azul indica el promotor *PslpA* utilizado para expresar el gen de la resistencia a kanamicina y el lazo marca el posible terminador transcripcional. **B)** Productos de PCRs de comprobación de las mutaciones de delección y sustitución de los genes del operón *nor*. Se utilizaron oligonucleótidos que hibridaban de una región anterior de entre 500 y 800 pb (oligonucleótidos badM-Fw, 2b-dir, 3b-dir) y una región posterior entre 500 y 800 pb (oligonucleótidos 1c-rev, 2c-rev, 3c-rev) (Tabla 2) del gen que se quería comprobar la mutación. **Página 103**

- **Figura 23.** Crecimientos anaerobios de los mutantes *nor*. **A)** Cinética de crecimiento anaerobio con 10mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de los mutantes del operón *nor*. Se midió la turbidez de los cultivos a una D.O.₅₅₀. Como controles se utilizaron las cepas HB27d y HB27. **B)** Cinética de producción de óxido nitroso a partir de 10 mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de las cepas mutantes del operón *nor*. Como controles se utilizaron las estirpes HB27d y HB27. **Página 104**
- **Figura 24.** Detección de NorC en los mutantes *nor* **A)** Western-Blot para detectar la expresión de NorC en células totales de las diferentes cepas de *T. thernophilus*, tras ser inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C. **B)** Esquema del mutante limpio $\Delta norB$. La cruz roja (X) marca la delección del gen de resistencia a kanamicina y las flechas azules indican los oligonucleótidos utilizados para la PCR de comprobación del mutante. **C)** Producto de PCR de comprobación del mutante de delección $\Delta norB$ utilizando como control positivo DNA de la cepa HB27d. **D)** Western-Blot para detectar la expresión de NorC en células totales de los mutantes $\Delta norB::kat$ y $\Delta norB$ tras ser inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C, utilizando como control positivo la estirpe PRQ25. **Página 105**
- **Figura 25.** Acumulación de NO en los mutantes *nor*. Detección de óxido nítrico en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de los mutantes del operón *nor*, junto con las cepas HB27, HB27d y PRQ25, después de 5 días de incubación a 70°C. La tabla representa la presencia (+) o ausencia (-) de nitrito en el medio de los cultivos anaerobios de las mismas cepas después del período de incubación. **Página 106**
- **Figura 26.** Expresión del promotor *Pnor* en los mutantes *nor*. Actividad β -galactosidasa de los mutantes del operón *nor*, inducida en diferentes condiciones utilizando el plásmido pMH *Pnor*- β gal (Tabla 3). Como control negativo se utilizó la cepa HB27 sin plásmido. La actividad β -galactosidasa viene representada como variación de D.O.₄₂₀ (Δ D.O.₄₂₀) relativizada con la turbidez de cada cultivo. **Página 107**
- **Figura 27.** Producción de N₂O *in vitro*. Producción de óxido nitroso después de 24 horas, a partir de 100 μ M de NO, utilizando extractos de membranas de las estirpes indicadas inducidas durante 16 horas con nitrato. Se utilizó como donador de electrones ascorbato 5 mM y 0,5 mM de TMP para transferir los electrones directamente hasta NOR. **Página 108**

- **Figura 28.** Generación del mutante *norH-his*. **A)** Esquema de la construcción del mutante HB27d *norH-his*, por recombinación homóloga, utilizando el plásmido no replicativo pK18*norH-his* con el gen *norH* fusionado a una extensión de 6 histidinas en el extremo 3' de su secuencia. El triángulo azul representa la extensión de secuencia codificante de 6 histidinas fusionada a *norH*. **B)** Actividad del mutante *norH-his*. Producción de óxido nitroso a partir de 10 mM de nitrato del mutante HB27d *norH-his* después de 24 horas de incubación a 70°C. Se utilizaron como controles las cepas HB27, HB27d y Δ *norH*. **Página 109**
- **Figura 29.** Purificación de NOR a partir membranas de HB27d *norH-his*. **A)** Extracto de proteínas de membrana totales y eluidas de la columna de níquel. El carril M corresponde al marcador de tamaños indicados a la izquierda en KDa. **B)** Western blot para detectar NorC en los extractos de proteínas. 1- extracto total de membrana solubilizado con DDM, 2- eluido con 250 mM de imidazol y 3- eluido con 500 mM de imidazo. **Página 109**
- **Figura 30.** Complementación del mutante Δ *norC*. **A)** Comprobación de la complementación de Δ *norC* con el plásmido pMKcNOR mediante amplificación de gen *norC*, y por Western blot para detectar NorC en las estirpes mutantes complementadas. 1 y 2 corresponden a dos clones de Δ *norC* complementados con el plásmido pMKcNOR. En ambos casos se utilizó el mutante Δ *norC* como control negativo. **B)** Producción relativa de óxido nitroso a partir de 10 mM de nitrato del mutante Δ *norC* /pMKcNOR, al cabo de 5 días a 70°C. Las cepas HB27d y Δ *norC* se utilizaron como controles. **Página 110**
- **Figura 31.** Purificación de NOR a partir membranas de HB27 pMKcNOR. **A)** Extracto de proteínas de membrana eluidas de la columna de níquel (carriles 1 y 2 cargando 10 y 15 μ l de muestra respectivamente) y tras diálisis y pasar la muestra por una columna de cobalto (carriles 3 y 4 cargando 10 y 15 μ l de muestra respectivamente). El carril M corresponde al marcador de tamaños indicados a la izquierda en KDa. **B)** Western-Blot para detectar NorC en los extractos de proteínas eluidos con ambas columnas. **Página 111**

- **Figura 32.** NOR de *T. thermophilus*. **A)** Espectro de absorción de NOR purificada reducida con ditionito. Recuadrado se ha ampliado el detalle de los picos del espectro correspondientes a los grupos hemo *c* y hemo *b*. **B)** Medición amperométrica del consumo de óxido nítrico. Las flechas negras marcan la adición de óxido nítrico (NO) a la mezcla de reacción; la flecha roja indica la adición de la óxido nítrico reductasa purificada (NOR) a la mezcla de reacción, que incluía ascorbato 10 mM y TMPD 0,5 mM para transferir los electrones directamente hasta el centro de reacción de NOR. **Página 112**
- **Figura 34.** Desnitrificación en *T. thermophilus* B. **A)** Crecimiento en anaerobiosis con 10 mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de las estirpes de *T. thermophilus* HB27, PRQ25, HB27d y B. Se midió la turbidez de los cultivos a una D.O.₅₅₀. Las barras de error corresponden al error típico. **B)** Producción de óxido nítrico a partir de 10 mM de nitrato a 70°C de las cepas de *T. thermophilus* HB27, B, PRQ25 y HB27d durante 24 horas. Las barras de error corresponden al error típico. **Página 113**
- **Figura 33.** Expresión de las proteínas de la desnitrificación en *T. thermophilus* B. Western-Blot para detectar la expresión de las proteínas NarG, NirS, NorC, DnrT, DrpA y DrpB en las estirpes HB27, HB27d y B, después de ser inducidas con 20 mM de nitrato durante 16 horas a 70°C. **Página 113**
- **Figura 35.** Detección de óxidos de nitrógeno en la cepa *T. thermophilus* B. **A)** Presencia de nitrito en los cultivos anaerobios de las cepas HB27, PRQ25, HB27d y B a partir de 10 mM de nitrato después de 24 horas y 5 días de incubación a 70°C. **B)** Detección de óxido nítrico en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de la estirpe B después de 5 días de incubación a 70°C. Una solución de óxido nítrico 100 μM y una muestra del espacio de cabeza saturado de NO de la cepa $\Delta norC$ fueron usadas como controles. **Página 114**
- **Figura 36.** Análisis de la secuencia de *T. thermophilus* B. **A)** Distribución de tamaños de los contigs. **B)** Número relativo de copias de cada contig, calculado a partir del número de lecturas en función de su longitud y la cobertura media del genoma. **Página 114**

• **Figura 37.** Comparación de los agrupamientos génicos de la maquinaria desnitrificante de *T. thermophilus* B, NAR1, PRQ25 y *T. scotoductus* SA.01. Los genes que presentan un asterisco (*) se encuentran mutados o incompletos. **Página 115**

• **Figura 38.** Predicción topológica de las proteínas CoxA (**A**), CoxB (**B**) a partir de sus secuencias. Las gráficas representan la localización de los aminoácidos de cada una de las proteínas según un valor de puntuación asignado por el programa de predicción topológica Tmpred (Swiss Institute of Bioinformatics). Los aminoácidos con valores de puntuación superiores a 500 representan una región transmembrana predicha por el programa. Cada gráfica muestra 2 predicciones: la predicción recomendada (línea negra) y otra menos probable (línea gris) **Página 116**

ABSTRACT

1. ABSTRACT

The denitrification is an energy coupled prokaryotic process that consists in the sequential reduction of the nitrogen oxides (nitrate, nitrite, nitric oxide and nitrous oxide) to produce N_2 as final product. Although N_2 is described as the major final product, partial denitrification is very common in ground and wastewater bacteria, leading to the production of high levels of nitrous oxide, one of the gases with higher greenhouse effects.

Several strains of the ancient bacterium *Thermus thermophilus* are able to carry out one or more of the denitrification steps under anaerobic conditions. Reduction of nitrate is encoded by an apparently conjugative element (NCE), which, depending on the isolate, contains the genes for a tetrameric nitrate reductase, one or two nitrate/nitrite transporters, a NADH dehydrogenase and sensory systems that signals the cell to switch between aerobic and anaerobic metabolism. Reduction of nitrite to nitric oxide was studied in a previous work, whereas this thesis has been dedicated to study the last steps of the denitrification pathway in this bacterium.

Nitric oxide reduction is genetically linked to nitrite reduction, being encoded by a cluster of 9 genes (*nor-nir*) located upstream of NCE, in what constitutes a denitrification supercluster. In the first chapter, we describe a three-genes operon that encodes homologues to the two subunits of the cytochrome c dependent nitric oxide reductases (NorC-NorB), and a small additional gene, *norH*, with homologues found only among Aquificales, and in other members of the *Thermus* phylum. In the second chapter, we show how the complete denitrification supercluster is transferable in a single step with high frequency by conjugation-like process, because of its linkage to a plastic and likely mobilizable megaplasmid. As part of this chapter, the sequence of one of the denitrificant transconjugant is analyzed, and hypotheses regarding denitrification mobility are concomitantly raised. In the third chapter we demonstrate that the final product of nitrate reduction by the denitrification supercluster is actually nitrous oxide, and not di-nitrogen as speculated. Chapters four and five are dedicated to the functional and biochemical analysis of the nitric oxide reductase. Major conclusion of these chapters is that the Nitric oxide reductase of *T. thermophilus* contains a third subunit (NorH) absent in the counterparts from modern Proteobacteria. This subunit affects the stability and *in vivo* efficiency of the enzyme. A final chapter is dedicated to study the denitrification in a *T. thermophilus* strain (B) that has no homologues to the NOR studied in this Thesis. A complete sequence of this strain is provided, and hypotheses are raised on the nature of the enzyme that actually reduces NO in this strain.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La desnitrificación

El del nitrógeno es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes de la biosfera, ya que éste es un nutriente esencial para la síntesis de los dos polímeros más importantes para la vida: los ácidos nucleicos y las proteínas. A pesar de ser el quinto elemento más abundante en la naturaleza, la accesibilidad biológica del nitrógeno es relativamente baja, ya que en su mayor parte se encuentra en forma de nitrógeno gas (N_2) (80% de la atmósfera), o fijado en compuestos orgánicos de difícil metabolización, como las quitinas, y por lo tanto, no utilizable por plantas y animales.

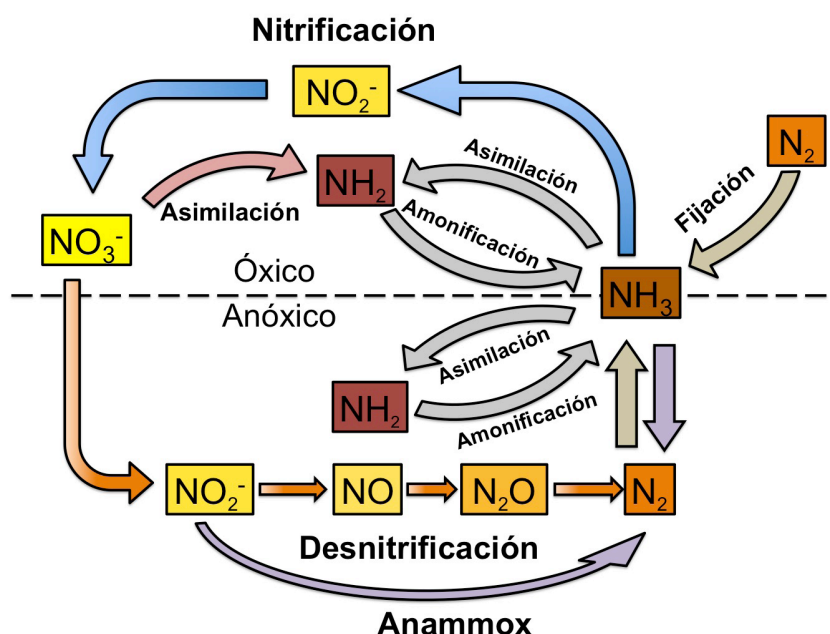


Figura 1. Esquema del ciclo de óxido-reducción del nitrógeno.

La bioquímica del ciclo del nitrógeno depende de reacciones de reducción-oxidación (redox) que son llevadas a cabo en gran parte por los microorganismos (Falkowski, 1997), bien en procesos asimilativos para la formación de estructuras y metabolitos celulares, o bien en vías de respiración en procesos también denominados desasimilativos (Figura 1). Entre éstos últimos, la desnitrificación es sin duda el más relevante, y fue originalmente descrita como el fenómeno de pérdida de nitrógeno fijado en una comunidad microbiana fermentadora. El término se conservó cuando Kluver introdujo el concepto en el campo de la bioenergética celular como un tipo de respiración anaerobia bacteriana (Kluver y Donker, 1926). El proceso de desnitrificación ha sido

estudiado en profundidad como un modelo de trabajo en bioquímica inorgánica, ya que la vía está repleta de cofactores metálicos, algunos de ellos únicos.

Durante la desnitrificación, los óxidos de nitrógeno sirven como aceptores de electrones finales durante un proceso de respiración que conlleva la generación de un gradiente electroquímico a través de una membrana (Bothe y cols., 2006; Martínez-Espinosa y cols., 2011). Mayoritariamente es llevado a cabo por procariotas, con algunas excepciones entre hongos, y ocurre principalmente entre microorganismos anaerobios facultativos. Éstos lo emplean únicamente en unas condiciones ambientales definidas por la escasez de oxígeno y la disponibilidad del óxido de nitrógeno apropiado para sustituirlo como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria.

La desnitrificación fue descrita por primera vez en *Corynebacterium nephridii* (Hart y cols., 1965; Renner y Becker, 1970) y posteriormente en *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas fluorescens* y un gran número de otros organismos (Greenberg y Becker, 1977; Zumft y Kronek, 2006). Su distribución dentro del árbol filogenético no sigue un patrón definido e incluye desde alfa y beta Proteobacterias hasta arqueas halófilas e hipertermófilas pertenecientes a las ramas más cortas del árbol filogenético (Zumft, 1997), lo que hace pensar que juega un papel evolutivo importante (Cabello y cols., 2004; Philippot, 2002).

A pesar de que el proceso suele definirse con N_2 como producto final, la desnitrificación es frecuentemente parcial, constituyendo una fuente importante de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). Así, organismos aislados del suelo, fangos o aguas residuales terminan el proceso de desnitrificación con la producción de N_2O (desnitrificación parcial), contribuyendo al aumento de los niveles de este gas en la atmósfera. Un ejemplo de desnitrificación incompleta se ha observado en un manantial termal de Great Basin en Estados Unidos, donde se han detectado unos altos niveles de óxido nitroso producido durante la desnitrificación llevada a cabo por bacterias del género *Thermus* spp. (Hedlund y cols., 2011). El proceso de desnitrificación parcial o incompleta se conoce desde hace ya varias décadas (Greenberg y Becker, 1977; Kaspar, 1982) y apoya la teoría de que la desnitrificación tiene un origen ancestral, que al diversificarse a lo largo del tiempo, en algunos casos se habría perdido de manera completa o incompleta (Betlach, 1982; Bothe y cols., 2000). También existen pruebas experimentales a nivel de laboratorio que confirman la posibilidad de transferencia horizontal de parte de la maquinaria desnitrificante (Ramírez-Arcos y cols., 1998a), lo

que defiende la interpretación evolutiva de su herencia y justifica la especificidad de cepa observada (Philippot, 2002)

El óxido nitroso es uno de los gases que más contribuyen al calentamiento global (Schlesinger, 2009). Presenta un tiempo de vida atmosférico de 114 años (Forster y cols., 2007) en comparación a los 30 que tiene el dióxido de carbono, y se ha identificado como el causante principal de la destrucción de la capa de ozono. Recientes estudios han mostrado cómo los niveles de N_2O en la atmósfera han aumentado (Machida y cols., 1995) a causa de actividades industriales como la producción de nylon (Thiemens y Trogler, 1991), el uso de fertilizantes y la combustión de óxidos de nitrógeno, alterando los procesos biogeoquímicos de los ecosistemas naturales, su dinámica trófica y su biodiversidad. Estudios en lagos de Noruega y Suecia han mostrado cómo cambios en la estequiometría de nitrógeno:fósforo, causados por el aumento de nitrógeno atmosférico de origen antropocéntrico, alteran la limitación ecológica de nutrientes del fitoplancton, provocando una reducción en su biodiversidad y un desequilibrio con la población de zooplancton, lo que puede desembocar en una disminución de la producción en estratos tróficos más altos (Elser y cols., 2009).

El estudio de las enzimas implicadas en la desnitrificación es muy interesante ya que proporciona una información muy importante para entender el funcionamiento y la estructura de las enzimas de mamíferos que interaccionan con el NO a modo de señal en numerosos procesos (Koshland, 1992), y nos dan información acerca de la posible evolución de la cadena respiratoria, debido a la semejanza entre las reductasas que utilizan NO y N_2O en la desnitrificación y las oxidasas terminales de la cadena respiratoria aerobia (Richardson, 2000).

2.1.1. Enzimas implicadas en la desnitrificación

El proceso de la desnitrificación está catalizado por cuatro enzimas oxidoreductasas que actúan de forma secuencial en un mismo microorganismo reduciendo los óxidos de nitrógeno desde nitrato (NO_3^-) hasta N_2 : la nitrato reductasa (NAR), la nitrito reductasa (NIR), la óxido nítrico reductasa (NOR) y la óxido nitroso reductasa (NOS) (Figura 2). Durante la desnitrificación en un organismo modelo como *Pseudomonas aeruginosa*, la nitrato reductasa NAR, que está localizada en la membrana interna de la bacteria, reduce el nitrato hasta nitrito (NO_2^-). A continuación el nitrito es transportado hasta el espacio periplásmico donde es reducido por la nitrito reductasa periplásmica soluble

NIR, produciendo óxido nítrico (NO), que a su vez es reducido hasta óxido nitroso (N_2O) por la correspondiente NO reductasa NOR asociada a la membrana. Finalmente, el óxido nitroso se utiliza como último aceptor de electrones de la vía de la desnitrificación produciendo N_2 como producto final, en una reacción catalizada por la óxido nitroso reductasa NOS periplásmica. A lo largo del proceso, se produce la separación de protones a través de la membrana mediante la segregación de las reacciones de oxidación de las de reducción de las quinonas, sin que hasta el momento haya sido detectado bombeo activo de protones por ninguna de las dos enzimas de membrana implicadas (NAR y NOS).

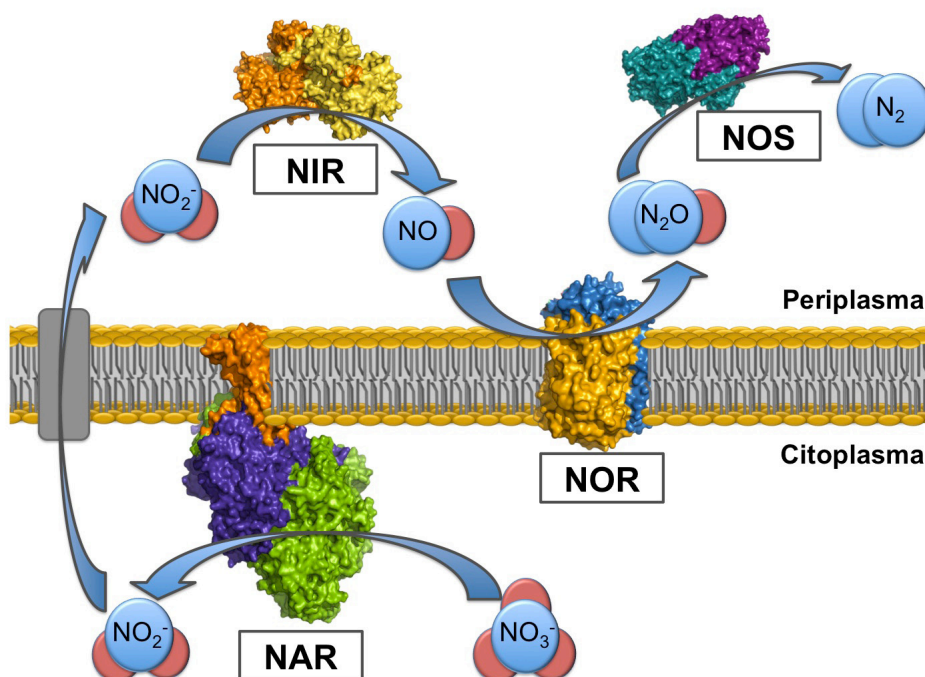


Figura 2. Representación gráfica de la desnitrificación en bacterias. Durante el proceso se produce la reducción secuencial de los óxidos de nitrógeno desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso (N_2) catalizado por cuatro reductasas: la nitrato reductasa (NAR) que reduce nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), la nitrito reductasa (NIR) que cataliza la reducción de nitrito a óxido nítrico (NO), la óxido nítrico reductasa (NOR) que reduce el NO hasta óxido nitroso (N_2O) y la óxido nitroso reductasa (NOS) que cataliza la reducción del óxido nitroso a N_2 .

Los primeros genes relacionados con la desnitrificación fueron identificados en *P. aeruginosa*, al ser diferenciados de aquellos implicados en la reducción asimilativa de nitrato (Sias y cols., 1980). En la mayoría de los organismos, los genes de la desnitrificación aparecen agrupados entre ellos y con otros codificantes de proteínas implicadas en la maduración y el ensamblado de los complejos enzimáticos, en la síntesis de grupos prostéticos y en la regulación y señalización del proceso. Varios ejemplos de esto es la proximidad física de los genes de la NOS (*nos*), la NOR (*nor*) y la NIR (*nir*) en *Pseudomonas stutzeri*, o entre el operón *narGHJI*, que codifica

la NAR, y los operones para la NOR *nosRZDLYX* en *Brucella suis* y para la NIR, *nirFGHJ*, en *Ralstonia metallidurans* (Philippot, 2002). Sin embargo, los genes que codifican enzimas implicadas en la donación de electrones no suelen formar parte de los agrupamientos génicos de la desnitrificación. Un ejemplo es el citocromo C₅₅₀ de *Paracoccus denitrificans*, que se encuentra codificado en el genoma (*cycA*) cerca de la subunidad I de COX (Van Spanning y cols., 1990).

En el caso de la respiración de nitrato y óxido nitroso, éstas son reacciones que pueden operar de manera independiente a la respiración de nitrito en muchas bacterias. Sin embargo, las reducciones de nitrito y de óxido nítrico no presentan ese nivel de independencia entre ellas, ya que ambas reacciones están controladas a nivel transcripcional y de actividad enzimática para asegurar que la reacción secuencial de nitrito hasta óxido nitroso ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) forma una unidad funcional (Zumft, 1993). Ésto se observa en *P. stutzeri* cuando al delecionar los genes *norCB*. Esta mutación afecta a la reducción de nitrito, disminuyendo la actividad de la nitrito reductasa de tipo *cd1* y rebajando su nivel de expresión (Braun y Zumft, 1991) para así reducir los niveles de NO e impedir su toxicidad.

Por otro lado, la comparación de la localización de los genes de la desnitrificación en el genoma de diversos organismos parece sugerir que estos genes se encuentran organizados en islas metabólicas de respiración anaerobia, que son transferibles horizontalmente entre diferentes organismos procariontes (Ramírez-Arcos y cols., 1998a; Vollack y cols., 1998).

2.1.1.1. Nitrato reductasa

Se han descrito al menos cuatro clases de nitrato reductasa (Berks y cols., 1995a): dos enzimas asimilativas de procariontes y eucariotas, la nitrato reductasa bacteriana de membrana (NAR) y la periplásmica (NAP). Todas las nitrato reductasas procariontes pertenecen a la familia de las dimetil sulfóxido (DMSO) reductasas, que presentan molibdeno en forma de molibdopterin-guanín dinucleótido (MGD) como cofactor en su centro activo (Kroneck y Abt, 2002). De entre las nitrato reductasas, sólo NAR y NAP están implicadas en la desnitrificación (Figura 3).

Las nitrato reductasas periplásmicas son heterodímeros formados por una subunidad grande NapA que contiene un cofactor MGD y un centro [4Fe-4S], y un citocromo *c* que forma la subunidad NapB (Reyes y cols., 1998). Los genes codificantes de las dos subunidades de la nitrato reductasa periplásmica NapA y NapB fueron identificadas en el megaplásmido de *Alcaligenes eutrophus* (Siddiqui y cols., 1993). Una agrupamiento mayor fue localizado en *Paracoccus denitrificans* (Berks y cols., 1995b) y se han encontrado homólogos en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en ninguno de los dos casos relacionados con los genes *nar*.

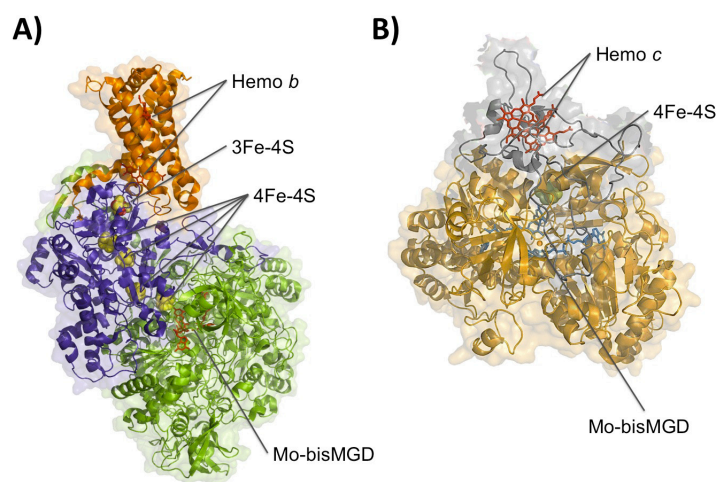


Figura 3. Nitrato reductasas respiratorias. **A)** Nitrato reductasa de membrana de *Escherichia coli* (PDB 1SIW). Las subunidades NarG, NarH y NarI se muestran en verde, morado y naranja, respectivamente. Se indica la localización del cofactor de Mo-bisMGD, de los cinco centros ferrosulfurados y de los dos grupos hemo *b*. **B)** Nitrato reductasa periplásmica NAP de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 1OGY). La subunidad NapA (amarillo) contiene un centro [4Fe-4S] y dos cofactores de Mo-bisMGD. La subunidad NapB (gris) es un citocromo *c* bihemo.

Las NAR están generalmente constituidas por tres subunidades: NarG (subunidad catalítica), NarH (proteína sulfoferrica, transportadora de electrones) y NarI (citocromo con dos grupos hemo *b*). Los primeros genes estructurales de la nitrato reductasa de membrana (*narGHJI*) secuenciados fueron los de *Escherichia coli* (Blasco y cols., 1989) y *Bacillus subtilis* (Cruz Ramos y cols., 1995; Hoffmann y cols., 1995). NarJ es una chaperona ausente en la estructura de la nitrato reductasa, pero necesaria para la maduración de la enzima. El complejo NarGH está localizado en el citoplasma, pero se mantiene anclado a la membrana plasmática por medio de la subunidad NarI. Ésta oxida el conjunto de quinonas y envía los electrones a través de NarH hasta NarG, donde se produce la reducción del nitrato (Blasco y cols., 1989; Jormakka y cols., 2004).

Existen ciertas arqueas halófilas o hipertermófilas que presentan una nitrato reductasa homóloga a NAR, pero cuyo centro catalítico se encuentra orientado hacia el periplasma. Ésto se deduce de la existencia de un péptido señal de la vía Tat en el extremo N-terminal de NarG junto con los ensayos de actividad efectuados en los diferentes compartimentos celulares (Cabello y cols., 2004). Por tanto, tales arqueas no necesitan utilizar energía para bombear nitrito al exterior celular.

2.1.1.2. Nitrito reductasa

La reducción de nitrito a óxido nítrico es un paso clave en el proceso desasimilativo de la desnitrificación. En las bacterias desnitrificantes han sido descritas dos tipos de nitrito reductasas no relacionadas evolutivamente entre sí, que se diferencian tanto en secuencia como en el metal prostético: la nitrito reductasa de tipo citocromo *cd1* (NirS) y la nitrito reductasa de cobre (NirK). Las dos son generalmente excluyentes, aunque ambas están presentes indistintamente en cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. La mayoría de las cepas desnitrificantes estudiadas contienen la nitrito reductasa con el grupo hemo, pero la nitrito reductasa de cobre está presente en un mayor número de géneros (Coyne y cols., 1989).

El gen *nirS* codifica una nitrito reductasa de tipo *cd1* y fue aislado por primera vez de *Pseudomonas aeruginosa* (Silvestrini y cols., 1989). Se trata de una enzima homodimérica en la que cada monómero está organizado en un dominio hélice- α que une covalentemente al grupo hemo *c* y actúa como intermediario en la transferencia de electrones desde la cadena respiratoria hasta el grupo hemo *d1* unido mediante interacciones no covalentes al dominio lámina- β , donde se produce la reducción del nitrito. Actualmente se encuentran publicadas las estructuras tridimensionales de las enzimas de *P. panthotrophus* (Fülöp y cols., 1993; Fülöp y cols., 1995; Gordon y cols., 2003) y de *P. aeruginosa* (Nurizzo y cols., 1997) (Figura 4.A).

El gen *nirK* fue identificado en *Pseudomonas* sp. G179 (Nishiyama y cols., 1993) y en *P. aureofaciens* (Glockner y cols., 1993) y codifica una nitrito reductasa de cobre. Esta enzima es un homotrímero de localización periplásmica, en el que cada monómero posee dos centros de cobre: uno encargado del transporte de electrones y otro asociado al centro activo de la enzima (Ye y cols., 1993). Su estructura tridimensional fue obtenida de la enzima de *Rhodobacter sphaeroides* (Jacobson y cols., 2005) (Figura 4.B).

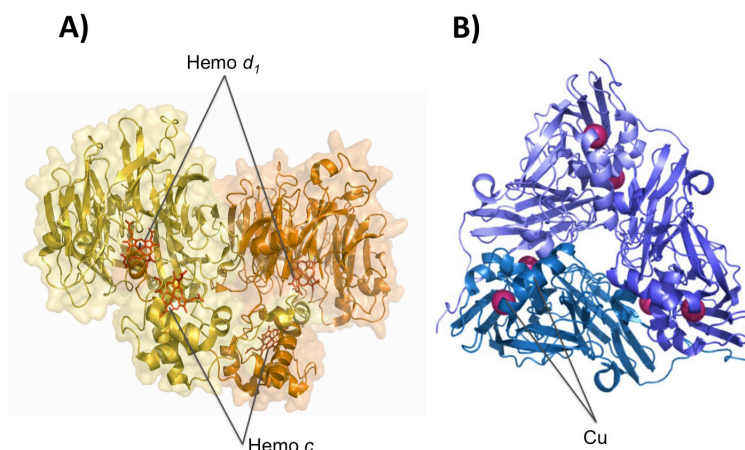


Figura 4. Nitrito reductasas. **A)** Nitrito reductasa de tipo *cd1* de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1NIR). Esta enzima es un homodímero en el que cada subunidad (naranja y amarillo) contiene un grupo hemo *c* y un grupo hemo *d1*. **B)** Nitrito reductasa de cobre (CuNir) de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 1ZV2). La CuNir es un homotrímero (subunidades en distinto tono de azul) que contiene dos átomos de Cu por monómero (en magenta) coordinados por residuos de cisteína, histidina y metionina.

2.1.1.3. Óxido nítrico reductasa

Las óxido nítrico reductasas forman parte de la súper-familia de proteínas oxidasas de hemo-cobre, como las citocromo oxidasas. Estas enzimas catalizan la reducción de oxígeno hasta H_2O utilizando protones, provenientes exclusivamente de la membrana interna de la mitocondria o de la bacteria, y bombean protones a través de ella participando en la generación de un gradiente electroquímico (Brzezinski y Adelroth, 2006; Mills y Ferguson-Miller, 2003; Wikström, 2004). La particularidad de NOR frente al resto de enzimas de esta súper-familia radica en la incapacidad de bombear protones durante su actividad, así como en no ser, aparentemente, capaces de generar gradiente por asimetría redox (Hendriks y cols., 2002; Reimann y cols., 2007).

Todos los miembros de las oxidasas de hemo-cobre tienen en su subunidad catalítica doce hélices transmembrana y seis histidinas conservadas, cuya función probable es coordinar los cofactores de la enzima.

Han sido descritos tres tipos diferentes de óxido nítrico reductasa en bacterias: cNOR, qNOR y qCuNOR. Mientras que el centro activo es altamente homólogo en los tres casos por presentar un centro catalítico binuclear con un grupo hemo b_3 y un metal sin grupo hemo, se diferencian en los donadores de electrones que reconocen y en el número y tipo de centros de transferencia de electrones (Tavares y cols., 2006). La cNOR está formada por dos subunidades (NorC y NorB) y acepta electrones de un citocromo *c* soluble o una cupredoxina (Hino y cols., 2010; Thorndycroft y cols., 2007). La qNOR sólo presenta una subunidad, pero con homología a las dos de cNOR, aunque carece de hemo *c* (Matsumoto y cols., 2012), y oxida directamente el quinol. Finalmente, la qCuNOR vuelve a presentar dos subunidades y puede aceptar electrones tanto del (mena)quinol como del citocromo c_{551} ya que en vez de un grupo hemo *c* en la subunidad pequeña, presenta un centro Cu_A (Tavares y cols., 2006).

La cNOR es probablemente la variante mejor estudiada. Los genes *norCB* fueron aislados originalmente de *P. stutzeri* (Braun y Zumft, 1991) y mostraron estar estrechamente ligados con *nirS* (Jüngst y cols., 1991) Otros ejemplos de organismos que presentan cNOR son *P. denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* (Jüngst y cols., 1991) o *P. aeruginosa* que utiliza la cNOR para la detoxificación de óxido nítrico producido por las NO sintetasas del anfitrión durante la infección (Kakishima y cols., 2007).

Las óxido nítrico reductasas de tipo cNOR son purificadas como heterodímeros en forma de complejos de citocromos *bc* situados en la membrana citoplasmática de la bacteria (Watmough y cols., 1999; Zumft, 2005). El complejo está formado por la subunidad NorC, que contiene un grupo hemo *c* y transfiere los electrones hasta la subunidad catalítica NorB, que contiene tres cofactores: hemo *b*, hemo b_3 , y una molécula de Fe_B sin grupo hemo. Los dos últimos cofactores forman un centro bi-metálico cuya capacidad de reducir NO radica en la presencia de Fe_B en vez del ión de cobre (Cu_B) de otras oxidasas de hemo-cobre (Blomberg y cols., 2006a, b) .

Recientemente se han cristalizado la cNOR de *P. aeruginosa* (Hino y cols., 2010) y la qNOR de *Geobacillus stearothermophilus* (Matsumoto y cols., 2012), permitiendo obtener información sobre sus estructuras, comprender mejor el posible mecanismo molecular de la reducción de NO y las implicaciones evolutivas de estas dos enzimas.

En cNOR, NorB consiste en doce hélices transmembrana y NorC presenta un dominio α -hélice unido a un dominio hidrofílico, típico de citocromos *c*, orientado hacia el periplasma. Por otro lado qNOR contiene catorce hélices transmembrana y un dominio hidrofílico en el extremo C-terminal de la proteína, localizado en el espacio extracelular. Ambas enzimas presentan una alta homología estructural a pesar de la poca similitud en sus secuencias, aunque la diferencia más señalada se encuentra en el metal sin grupo hemo presente en cada enzima, ya que la molécula Fe_B de cNOR cambia por una de Zn en qNOR provocando cierta disimilitud en los centros binucleares de las enzimas (Figura 5).

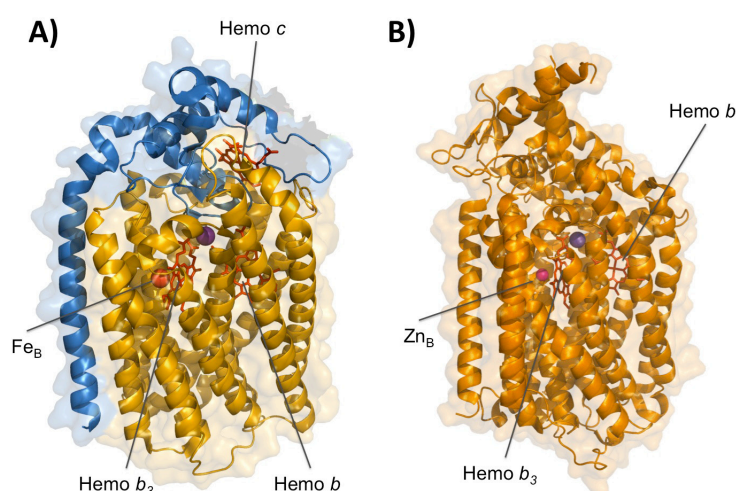


Figura 5. Óxido nítrico reductasas. **A)** Óxido nítrico reductasa de tipo cNOR de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3O0R). La subunidad NorC (azul) tiene un dominio globular de localización periplásmica que contiene un hemo *c*. NorB (amarillo) es una proteína con doce hélices transmembrana que contiene dos grupos hemo, *b* y *b*₃ y una molécula de hierro sin grupo hemo. **B)** Óxido nítrico reductasa de tipo qNOR de *Geobacillus stearothermophilus* (PDB 3AYF). La enzima es un monómero que presenta dos grupos hemo, *b*, y *b*₃ y un residuo de zinc.

Un estudio comparativo de la estructura de las dos NOR cristalizadas (Shiro, 2012) propone a las óxido nítrico reductasas como ancestros de las actuales oxidasas de hemo-cobre, que durante la evolución pasaron de realizar una respiración anaerobia a una aerobia, adquiriendo la capacidad de bombear protones y generar un gradiente electroquímico.

2.1.1.4. Óxido nitroso reductasa

El último paso de la desnitrificación consiste en la reducción de N_2O a N_2 gaseoso. Esta reacción está catalizada por la óxido nitroso reductasa (NOS), que es una metaloenzima de centros multi-cobre.

La óxido nitroso reductasa está codificada por el gen *nosZ* y es una enzima homodímera, periplásmica y soluble, que contiene cobre como grupo prostético, salvo en el caso de *Wolinella succinogenes*, que contiene un grupo hemo *c* (Simon y cols., 2004). NOS está compuesta por dos subunidades con centro binucleares de cobre (Cu_A y Cu_Z con propiedades espectroscópicas distintas, similares a los observados en la citocromo *c* oxidasa. El centro Cu_A de una de las subunidades se encarga de transferir los electrones desde un donador externo, como el citocromo c_{552} , hasta el centro Cu_Z de la otra subunidad. La cristalización de NOS en *P. nautica* y en *P. stutzeri* (Brown y cols., 2000; Pomowski y cols., 2010) ha permitido comprender mejor su estructura y determinar el modo en el que la enzima se une al sustrato, así como su mecanismo de reacción (Figura 6).

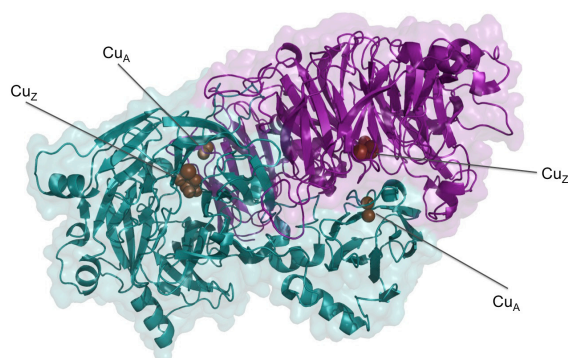


Figura 6. Óxido nitroso reductasa de *Pseudomonas stutzeri* (PDB 3SBQ). Se trata de un homodímero en el que cada subunidad (morado y azul) contiene dos centros de multicobre: Cu_A y Cu_Z .

En los últimos años se ha publicado la capacidad de reducir N_2O por una oxidasa de centros multi-cobre (McoP) de la arquea *Pyrobaculum aerophilum* (Fernandes y cols., 2010). Las oxidasas de multi-cobre son una amplia familia de enzimas distribuidas en toda la naturaleza, que acoplan la oxidación de metales con la reducción de oxígeno hasta H_2O y son fundamentales para la fisiología de los organismos aerobios. *Pyrobaculum aerophilum* es un hipertermófilo con una alta versatilidad metabólica capaz de desnitrificar reduciendo el nitrato hasta N_2 , a pesar de que ningún homólogo a *nosZ* había sido identificado en su genoma, por lo que esta enzima podría jugar tal papel *in vivo*.

2.2. El género *Thermus*

El género *Thermus* fue descrito por Brock y Freeze (Brock y Freeze, 1969) y está constituido por bacterias moderadamente termófilas, quimiorganotrofas, de forma bacilar, inmóviles, que tiñen Gram negativo y no esporuladoras. Tienen una temperatura óptima de crecimiento de entre 60 y 75° C, aunque muchas cepas pueden crecer a temperaturas superiores a 75° C. Ocasionalmente, pueden aparecer estructuras morfológicas inusuales, denominadas cuerpos multicelulares, que consisten en varias células que comparten una misma envoltura externa, englobando así un único espacio periplásmico (Becker y Starzyk, 1984; Brock y Edwards, 1970).

No requieren vitaminas para su crecimiento, aunque necesitan algunos oligoelementos como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} . Utilizan carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbono y energía y sintetizan proteínas que resisten tanto altas temperaturas como altas concentraciones de urea, detergentes y la presencia de disolventes orgánicos. Su capacidad de crecimiento rápido, su extraordinariamente eficiente sistema de competencia natural (Koyama y cols., 1986) y la existencia de herramientas genéticas (Blas-Galindo y cols., 2007; de Grado y cols., 1998; Moreno y cols., 2003), han favorecido el uso de algunas cepas de *T. thermophilus* como modelos de estudio de laboratorio (Cava y cols., 2009).

Actualmente, el género *Thermus* incluye cientos de cepas termófilas aisladas de diferentes ambientes alrededor del mundo. Desde un punto de vista evolutivo, el género *Thermus* está estrechamente relacionado al género *Deinococcus*, dentro del Filum *Deinococcales* (Garrity y Holt, 2001; Rainey y cols., 1997; Weisburg y cols., 1989). Éste constituye uno de los linajes más antiguos del árbol filogenético bacteriano basándose en las secuencias de RNA 16S (Hartmann y Erdmann, 1989) y recientemente también en un conjunto de proteínas altamente conservadas (Wu y cols., 2009). Esto apoya la hipótesis de que las vías metabólicas que aparecen en este género precedieron a las homólogas de bacterias mesófilas “modernas”.

A nivel filogenético, tradicionalmente se ha descrito el género *Thermus* como aerobio estricto, aunque en los últimos años se ha observado la existencia de cepas con capacidad para crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación parcial o completa (Cava y cols., 2008a).

2.3. *Thermus thermophilus*

La especie *T. thermophilus* fue aislada en Japón y descrita inicialmente como *Flavobacterium thermophilum* (Oshima y Imahori, 1971). El primero en denominarla como *T. thermophilus* fue Oshima (Oshima y Imahori, 1974), pero este nombre no se incluyó en la Lista Aprobada de Nombres Bacterianos (Skerman y cols., 1980) debido a su parecido fenotípico con *T. aquaticus*. No fue hasta 1995, cuando el grupo de Williams propuso la recuperación del nombre de *T. thermophilus* para la especie (Williams y cols., 1995).

T. thermophilus es la única especie halotolerante de este género, siendo capaz de crecer en medios ricos con entre un 3 y un 6% (p/v) de NaCl. Esto se debe a su capacidad de producir solutos compatibles como la trehalosa o el manosilglicerato (Alarico y cols., 2005, 2007; Empadinhas y cols., 2003; Nunes y cols., 1995; Silva y cols., 2003)

El genoma de *T. thermophilus* tiene un tamaño de entre 2,12 y 2,31 Mpb y presenta un elevado contenido en G+C (60-66%) (da Costa y cols., 2001). Está constituido por un cromosoma de aproximadamente 1,8 Mpb y uno o dos megaplásmidos de diferentes tamaños. Actualmente, se encuentran accesibles en la base de datos la secuencia de los genomas completos de cuatro estirpes distintas: HB27 (Henne y cols., 2004), HB8 (Oshima y Imahori, 1974), JL-18 y SG0.5JP17-16 (añadidos a la base de datos por DOE Joint Genome Institute).

T. thermophilus es una especie que incluye cepas aerobias estrictas, como HB27, y aerobias facultativas capaces de utilizar óxidos de nitrógeno como aceptores finales de electrones para producir nitrito, como NAR1 (Ramírez-Arcos y cols., 1998b). En esta cepa, el nitrito producido no es subsiguientemente reducido como ocurre en todos los sistemas de respiración de nitrato conocidos, sino que se acumula en el medio, lo que la convierte en un modelo ideal para el estudio de la respiración de nitrato. A partir de estos estudios, se han descrito más cepas con capacidades facultativas de crecimiento en anaerobiosis, entre las que se conocen estirpes capaces de crecer con otros aceptores de electrones inorgánicos como hierro (Kieft y cols., 1999) y arseniato (Gihring y cols., 2001), y otras con capacidad de llevar a cabo un proceso de desnitrificación aparentemente completo (Cava y cols., 2008a).

2.3.1. Cadena respiratoria aerobia

En la estirpe HB27 la cadena respiratoria aerobia comienza con una NADH-deshidrogenasa de tipo I (Nqo1-14) formada por catorce subunidades homólogas a las trece de *E. coli* (NuoA-N) (Sazanov y Hinchliffe, 2006). Esta enzima es la principal fuente de electrones de la cadena de transporte, aunque existen otras enzimas que pueden llevar a cabo esta función, como el complejo II o la succinato deshidrogenasa (Kolaj-Robin y cols., 2011), la formiato deshidrogenasa (Henne y cols., 2004) o la polisulfuro reductasa (Jormakka y cols., 2008).

Los electrones son transferidos posteriormente a las quinonas de la membrana, cuyo papel en la cadena de transporte es fundamental. En *T. thermophilus* destaca la menaquinona 8 como principal quinona de la membrana (Fee y cols., 1986).

A continuación, los electrones son transferidos desde las quinonas hasta el complejo bc_1 , que consiste en un complejo menaquinol:citocromo *c* oxidorreductasa similar al complejo III de otros organismos (Mooser y cols., 2005, 2006), pero aparentemente dotado de una subunidad adicional.

En la cadena de transporte de electrones, el citocromo principal involucrado en la transferencia de electrones hasta las oxidasas terminales es el citocromo periplásmico c_{552} (Hon-Nami y Oshima, 1977; Soulimane y cols., 1997). Sin embargo en *T. thermophilus* existen varios citocromos *c* homólogos al c_{552} codificados en su genoma que podrían estar implicados en rutas de transporte de electrones a las oxidasas terminales (Henne y cols., 2004).

En la estirpe aerobia HB27 se han descrito los genes de dos citocromo oxidasas alternativas (Henne y cols., 2004) cuya expresión depende de la concentración parcial de oxígeno: la citocromo oxidasa de baja afinidad de oxígeno c_1aa_3 y la citocromo oxidasa de alta afinidad ba_3 . La citocromo oxidasa c_1aa_3 está formada por dos subunidades y es análoga a la citocromo oxidasa aa_3 mitocondrial, pero con un grupo hemo *c* covalentemente unido a la subunidad II (Hellwig y cols., 2002; Mather y cols., 1993). Por otro lado, en condiciones en las que la concentración de oxígeno es baja, se activa la expresión de la citocromo ba_3 de alta afinidad por oxígeno. Esta enzima está formada también por dos subunidades con dos grupos hemo (hemo *b* y hemo a_3)

junto con dos iones Cu (Keightley y cols., 1995; Soulimane y cols., 2000; Zimmermann y cols., 1988). Estudios *in vitro* en anaerobiosis han demostrado que esta citocromo oxidasa de alta afinidad es capaz de reducir NO hasta N₂O, lo que sugiere otra vez una filogenia común entre la respiración aerobia y la desnitrificación bacteriana (Giuffrè y cols., 1999).

2.3.2. La desnitrificación en *T. thermophilus*

Existen diferentes cepas de *T. thermophilus* capaces de llevar a cabo un proceso de desnitrificación parcial, como la estirpe NAR1, o aparentemente completo como PRQ25 (Cava y cols., 2008a). La cepa NAR1, originalmente anotada como HB8 (Cava y cols., 2007), ha sido ampliamente estudiada como una estirpe desnitrificante parcial, capaz de llevar a cabo el primer paso de la desnitrificación (Cava y cols., 2004; Ramírez-Arcos y cols., 1998b; Zafra y cols., 2005). Por otro lado, la secuenciación del genoma de la cepa desnitrificante tipo PRQ25 y la consiguiente localización de los posibles genes implicados en la desnitrificación (Alvarez y cols., 2011; Bricio y cols., 2011) ha permitido aumentar el conocimiento a cerca de este proceso en *T. thermophilus*.

2.3.2.1. *La respiración de nitrato*

La habilidad de NAR1 para respirar nitrato está codificada en un fragmento de DNA de alrededor de 30 kpb que puede ser transferido por conjugación a una cepa aerobia como HB27, de un modo muy parecido a lo que sucede con las cepas *Hfr* de *E. coli*. Una vez transferido, se integra en el exconjugante por recombinación y le confiere la capacidad de crecer anaeróbicamente (Ramírez-Arcos y cols., 1998a).

Este elemento conjugativo de respiración de nitrato (NCE) codifica los operones *nar*, *nrc*, *dnr* y *drp* (Figura 7). El operón *nar* codifica una nitrato reductasa de membrana (Nar), que contiene un citocromo *c* periplásmico como cuarta subunidad, además de homólogos de las subunidades NarG, NarH y NarI encontradas en las NAR de otras bacterias (Zafra y cols., 2005). El operón *nrc* codifica para una nueva clase de NADH deshidrogenada (NDH) compuesta por cuatro subunidades, contrastando con las catorce o dieciséis subunidades que forman las NDH de tipo I o la NDH II monomérica descritas en casi todas las bacterias (Cava y cols., 2004). La comparación filogenética de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de Nar y Nrc coinciden con

la filogenia del género basada en el RNA 16S, lo que sugiere un origen antiguo para ambas enzimas (Cava y cols., 2004; Philippot, 2002).

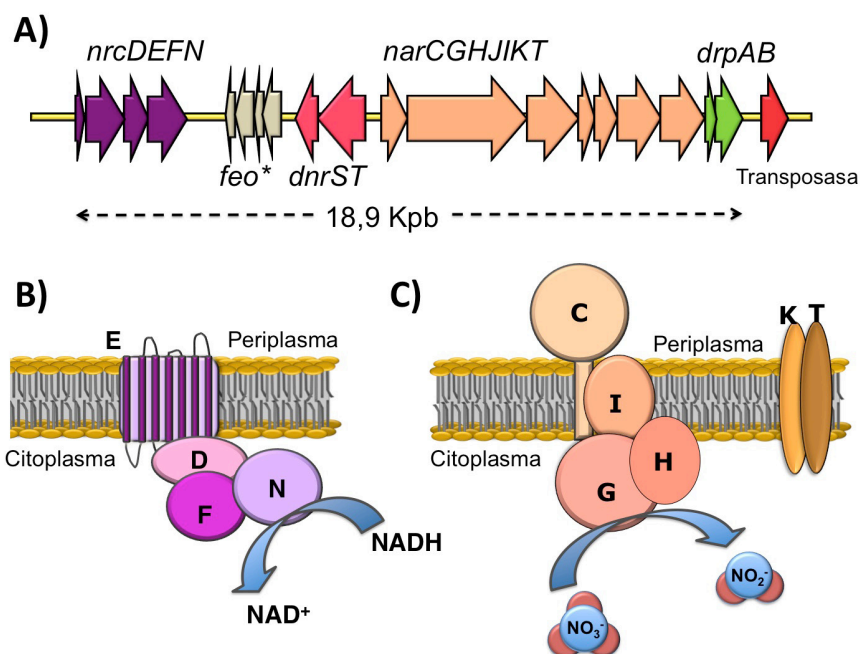


Figura 7. Elemento NCE de *T. thermophilus* NAR1. **A)** Localización y sentido de transcripción de los operones implicados en la reducción de nitrato (*narCGHJIKT*), oxidación de NADH (*nrcDEFN*) y regulación (*dnrST* y *drpAB*). Se indica también el transportador de hierro truncado (*feo**), así como la localización de una transposasa de tipo IS4 en el extremo 3' del agrupamiento. **B** y **C)** Estructura proteica de la cadena transportadora Nrc (**B**) y de la nitrato reductasa Nar de *T. thermophilus* NAR1 (**C**).

Cuando una cepa de *T. thermophilus*, que contiene el NCE, crece en un medio rico en nitrato, una bajada de los niveles de oxígeno, tanto por consumo debido al aumento de la población como por las condiciones ambientales, provoca la inducción simultánea de los operones *nar* y *nrc*, además de la represión en paralelo del operón *nqo*, que codifica la NDH deshidrogenasa aerobia de tipo I, y del complejo respiratorio III (Cava y Berenguer, 2006). De esta manera se reemplaza no sólo el aceptor final de electrones, sino toda la cadena respiratoria durante la transición a crecimiento anaerobio con nitrato, aunque la menaquinona 8 se mantiene como un factor común a ambos procesos respiratorios (Cava y cols., 2004). Un sistema de integración regulatorio coordina las dos señales requeridas para las inducciones de los operones *nar* y *nrc*. Puesto que ni el promotor *Pnar* ni el *Pnrc* funcionan en la cepa aeróbica HB27 pero sí en el derivado exconjugante facultativo, se dedujo que los factores reguladores implicados estaban codificados en el propio elemento conjugativo NCE (Cava y cols., 2007; Ramírez-Arcos y cols., 1998a). El análisis de la secuencia reveló la presencia

de dos ORFs en la cadena complementaria entre los operones *nrc* y *nar*, que codifican homólogos de reguladores de transcripción, a los que se denominó: DnrS y DnrT.

DnrT es una proteína de la familia CRP (Catabolite Represor Protein), requerida para la expresión de *nar*, *nrc* e incluso de su propio promotor, jugando un papel importantísimo como regulador central del sistema de respiración de nitrato. Sin embargo, su mecanismo de actuación varía de un promotor a otro: mientras que para la expresión desde *Pdnr* y *Pnar* se requiere también la actuación de DnrS, su sola presencia permite la transcripción desde *Pnrc*, independientemente de la presencia o ausencia de nitrato u oxígeno (Cava y cols., 2007). Esto permite suponer que se trata de un regulador insensible a estas señales, por lo que podría considerarse como un activador transcripcional funcionalmente constitutivo cuya actividad depende, básicamente, de la concentración alcanzada. Por el contrario, DnrS es una proteína con un dominio GAF, que se vuelve sensible a proteólisis en presencia de oxígeno, por lo que ha sido propuesta como su sensor en este sistema (Cava y cols., 2007).

Se han encontrado otros dos genes denominados DrpA y DrpB, los cuales, según resultados de nuestro grupo (Tesis Doctoral de Zahra Chahlafi, 2012), parecen involucrados en la regulación del sistema por nitrato.

La existencia de otras cepas de *T. thermophilus* con potencial para desnitrificar había sido descrita anteriormente (da Costa y cols., 2001; Manaia y da Costa, 1991) y confirmada en la tesis de Olga Zafra en nuestro laboratorio. De esta manera las estirpes de *T. thermophilus* han sido clasificadas según su capacidad de desnitrificación como: aerobias (HB27 y HB8), desnitrificantes parciales (NAR1) y desnitrificantes completas (PRQ25), según fuesen capaces de reducir nitrato y nitrito del medio produciendo gas o no (Cava y cols., 2008a).

Recientes estudios hechos sobre la secuencia del genoma completo de la estirpe desnitrificante *T. thermophilus* PRQ25, parcialmente incluidos en esta tesis, han mostrado la existencia de una agrupación de genes que codifican proteínas homólogas a NAR, NIR y NOR (Alvarez y cols., 2011; Bricio y cols., 2011). Este agrupamiento esta formado por un elemento NCE, similar al de la cepa NAR1 y el agrupamiento *nor-nir*, que se encuentra rodeado de genes que pertenecen a una región variable al comparar las secuencias de los megaplásmido pTT27 de HB8 y HB27, lo que nos indica su posible localización plasmídica dentro del genoma. El elemento NCE de

PRQ25 presenta ciertas diferencias con respecto al descrito para la estirpe NAR1, como la presencia de un único transportador de nitrito (NarO) en contraposición a los dos que se encontraban en NAR1 (NarK y NarT), o la reconstitución de un posible transportador de hierro en la cepa PRQ25 que se encuentra mutado en NAR1. Aunque una de las diferencias más llamativas es la delección prácticamente completa del gen *nrcE* en la cepa PRQ25 (Alvarez, 2012; Bricio y cols., 2011), lo que impediría el anclaje a la membrana de la NADH deshidrogenasa (Nrc) encargada de donar electrones a la nitrato reductasa en NAR1.

El resto de los genes de la desnitrificación se localizan a aproximadamente 7 Kpb aguas abajo del elemento NCE, en el agrupamiento *nor-nir*, donde se encuentra el operón *nirSJM* que codifica una proteína homóloga a una nitrito reductasa de tipo *cd₁* (NirS), cuyo estudio ha sido realizado en la Tesis Doctoral de Laura Álvarez en nuestro laboratorio, el operón *norRST* que codifica proteínas implicadas en la regulación transcripcional de los promotores desnitrificantes (Alvarez, 2012) y el promotor *norCBH* que han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Sin embargo, ningún homólogo a NOS fue localizado en la secuencia de la estirpe de *T. thermophilus* PRQ25, lo que ha planteado el estudio llevado a cabo en esta Tesis, acerca de la capacidad de *Thermus* de producir N₂ como producto final de la desnitrificación.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo fundamental en esta Tesis fue el estudio de los pasos finales del proceso de desnitrificación en *T. thermophilus*. Para su consecución, el trabajo de investigación ha sido estructurado en los siguientes sub-objetivos:

1. Determinar el producto final de la desnitrificación en una cepa modelo de *T. thermophilus*.
2. Estudiar la capacidad de transferir lateralmente los agrupamientos génicos implicados en la desnitrificación mediante conjugación, e identificar su localización en una cepa transconjugante mediante genómica.
3. Estudiar la respiración de óxido nítrico, caracterizando la enzima implicada en el proceso, así como sus condiciones de expresión.
4. Estudiar la desnitrificación en *T. thermophilus* B, una cepa carente de la óxido nítrico reductasa, pero capaz de generar óxido nítrico por otras vías.

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Estirpes empleadas

Las estirpes bacterianas utilizadas en esta Tesis están reflejadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1 relA1</i> .	(Hanahan, 1983)
<i>T. thermophilus</i> HB27	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. Koyama
<i>T. thermophilus</i> PRQ14	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ15	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ16	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ17	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ21	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ23	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ24	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)

<i>T. thermophilus</i> PRQ25	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ26	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ27	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ28	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ30	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> PRQ31	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> RQ-1	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Santos y cols., 1989; da Costa y cols., 1989)
<i>T. thermophilus</i> B	Estirpe silvestre.	Cedida por el Dr. da Costa (Manaia y da Costa, 1991)
<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>gdh</i>	HB27 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r	Estirpe de laboratorio (Alvarez y cols., 2011)
<i>T. thermophilus</i> C-5	HB27 <i>gdh::kat</i> conjugado con PRQ25. Desnitrificante parcial.	Estirpe de laboratorio (Alvarez y cols., 2011)
<i>T. thermophilus</i> C-15	HB27 <i>gdh::kat</i> conjugado con PRQ25. Desnitrificante.	Estirpe de laboratorio (Alvarez y cols., 2011)
<i>T. thermophilus</i> HB27d	HB27 transformada con DNA de la estirpe PRQ25. Desnitrificante.	Estirpe de laboratorio (Alvarez y cols., 2011)
<i>T. thermophilus</i> Δ <i>norC</i>	HB27d mutante de delección del gen <i>norC</i>	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> Δ <i>norB::Kat</i>	HB27d Δ <i>norB::kat</i> , Kan ^r	Esta Tesis

<i>T. thermophilus</i> $\Delta norB$	HB27d mutante de delección del gen <i>norB</i>	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> $\Delta norH$	HB27d mutante de delección del gen <i>norH</i>	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> $\Delta norC$ pMKcNOR	HB27d $\Delta norC$ pMKcNOR, Kan ^r	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> HB27 pMKcNOR	HB27 pMKcNOR, Kan ^r	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> HB27d <i>norH-his</i>	HB27d pK18 <i>norH-his</i> tag, Kan ^r	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> HB27 [lac]	HB27 pK18 <i>accase</i> , Kan ^r	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> HB27d [lac]	HB27d pK18 <i>laccase</i> , Kan ^r	Esta Tesis
<i>T. thermophilus</i> HB27d <i>cytba3</i>	HB27d pH18 <i>cytba3</i> , Hyg ^r	Esta Tesis

4.1.2. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción/ Enzima de restricción
1b	AAAA TCTAGA CTCCGGCT- CATAAACTCCGAC	Reverso para amplificar la región anterior (800 pb) al gen <i>norC</i> . <i>Xba</i> I
1b-dir	AAAA GTCGA - CGCGGGCCTTTTCCAA - GAGGT	Directo para amplificar la región anterior (800 pb) al gen <i>norC</i> . <i>Sa</i> II

1c	AAAAT <u>TCTAGA</u> GGAGGT- GAAGCATGACCCAG	Directo para amplificar la región posterior (800pb) al gen <i>norC</i> . <i>XbaI</i>
1c-rev	AAAA <u>GAATTC</u> CGATCCA- GAAGTAGTGGTGGC	Reverso para amplificar la región posterior (800pb) al gen <i>norC</i> . <i>EcoRI</i>
2b	AAAAT <u>TCTAGA</u> CTACTC- CGCCGCCGCAAA	Reverso para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norB</i> . <i>XbaI</i>
2b-dir	AAAA <u>AAGCTT</u> GCCAT- GGCCCCATGCTAAC	Directo para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norB</i> . <i>HindIII</i>
2c	AAAAT <u>TCTAGA</u> GGAGGT- GGGGGCCCATGA	Directo para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norB</i> . <i>XbaI</i>
2c-rev	AAAA <u>GAATTC</u> CCTTCCA- GGTCTTGCGGATCT	Reverso para amplificar la región posterior (800pb) al gen <i>norB</i> . <i>EcoRI</i>
3a	AAAA <u>GAATTC</u> CCATCGCC- CAGGCCTTCG	Directo para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norH</i> . <i>EcoRI</i>
3b	AAAAT <u>TCTAGA</u> CTAGTCAT- GGGCCCCAC	Reverso para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norH</i> . <i>XbaI</i>
3b-dir	AAAA <u>GAATTC</u> GAGGC- CACTTGGGAGGTC	Directo para amplificar <i>norH</i> fusionado a una extensión de histidinas. <i>EcoRI</i>
3c	AAAAT <u>TCTAGA</u> TCCCGGTC- CGGACCCC	Directo para amplificar la región posterior (800pb) al gen <i>norH</i> . <i>XbaI</i>
3c-rev	AAAA <u>GAATTC</u> CCTTGA- ACTTGCTGGACTCGATG	Reverso para amplificar la región anterior (800 pb) al gen <i>norH</i> . <i>EcoRI</i>
3d	AAAAG <u>TCTGAC</u> GGCACG- TAGACCTTCCAGGT	Reverso para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norH</i> . <i>Sall</i>
5b	AAAAT <u>TCTAGA</u> GT- GGGGGCGCGTTTCCAT	Reverso. Amplificación del gen <i>nirS</i> . <i>XbaI</i>

7a	AAAAG GAATTC CTTCCC- CGGCCTTGGCC	Directo para amplificar la región anterior (500 pb) al gen <i>norR</i> (sentido opuesto al de transcripción). <i>EcoRI</i>
badM-Fw	AAAAC CATATG GCCCTTCG- GAGCCTTC	Directo para comprobar mutante $\Delta norC$. <i>NdeI</i>
cytba3_Frag_Fw	AAAAT TCTAG ACT- GGCGGCGCTGGAAG	Directo para mutante de inserción en la subunidad I del citocromo ba3. <i>XbaI</i>
cytba3_Frag_Rv	AAAAG GAATTC CCCAGGG- GAGGGCCC	Reverso para mutante de inserción en la subunidad I del citocromo ba3. <i>EcoRI</i>
H45	ACGC GTCTGA - CGATGGCCTT - GCCCTCGGGCCT	Directo para amplificar <i>nrcE</i> . <i>SalI</i>
H46'	ATTC GATATC GCTTCTC- CACCAGAAACCGGT	Reverso para amplificar <i>nrcE</i> . <i>EcoRI</i>
kat1	CCTTTTTCCCCGCATCC	Reverso. Amplificación/secuenciación aguas arriba del gen kat.
kat2	GAAACTTCTGGAATCGC	Directo. Amplificación/secuenciación aguas abajo del gen kat.
kat3	GGAACGAATATTGGATA	Directo. Amplificación/secuenciación del gen kat.
kat4	AGAAATTCTCTAGCGAT	Reverso. Amplificación/secuenciación del gen kat.
laccase1021	AAAAG GAATTC CGGGCA- GGGTGGGGAA	Reverso para mutante de inserción en el gen de la lacasa. <i>EcoRI</i>
laccase483	AAAAT TCTAG CGC- CATCCCCGAGCTCA	Directo para mutante de inserción en el gen de la lacasa. <i>XbaI</i>
M13 dir	GTAAAACGACGGCCAGT	Secuenciación de clones en derivados pUC, pK, pH, pMK, pMH y pWUR.
M13 rev*	CAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación de clones en derivados pUC, pK, pH, pMK y pMH.

narC Bcul dir	<u>ACTAGT</u> GGAGGTGAG- GATGGCGAGAAGGCTCC- TACCC	Directo. Amplificar <i>narC</i> . <i>Bcul</i>
narC Clal rev	<u>ATCGAT</u> CCTCCTAAGCT- GGGCGCGGATCC	Reverso. Amplificar <i>narC</i> . <i>Clal</i>
norB_Fw	AAAA <u>TCTAGA</u> ATGACCCA- GGCTTTACCGCAG	Directo para amplificar el gen <i>norB</i> . <i>XbaI</i>
norB_Rv	AAAA <u>GAATTC</u> CTAGTCAT- GGGCCCCAC	Reverso para amplificar el gen <i>norB</i> . <i>EcoRI</i>
norC_Fw	AAAA <u>TCTAGA</u> ATGGA- GATCGGCTGGATAGAAC	Directo para amplificar el gen <i>norC</i> . <i>XbaI</i>
norC_Rv	AAAA <u>GAATTC</u> CTACTC- CGCCGCCGCAA	Reverso para amplificar el gen <i>norC</i> . <i>EcoRI</i>
norH-histag Rev	AAA <u>AAGCTT</u> CAGTGGT- GGTGGTGGTGGTGGCCG- GATCCGTGAGCGTGCTC	Reverso para amplificar <i>norH</i> fusionado a una extensión de histidinas. <i>HindIII</i>
orf85_Rv	AAAA <u>GAATTC</u> TCAGTGA- GCGTGCTCCTTCT	Reverso para amplificar al gen <i>norH</i> . <i>EcoRI</i>
PcNor-Fw	AAAA <u>TCTAGA</u> GGTCCAG- GACCACGGG	Directo para amplificar la región promotora de <i>nor</i> . <i>XbaI</i>
PcNor-Rv	AAAA <u>CATAT-</u> <u>GCTTACCCTCCTTT-</u> CACCTCC	Reverso para amplificar la región promotora de <i>nor</i> . <i>NdeI</i>
TTHB144-Fw	CCTGAAGGGGCTGGA- AGC	Directo para amplificar el gen <i>TTHB144</i>
TTHB144-Rv	GGTCTCAGTCCAGCCC- CAT	Reverso para amplificar el gen <i>TTHB144</i>

4.1.3. Plásmidos utilizados

A continuación se muestran los plásmidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Tabla 3. Plásmidos de otras investigaciones empleados en este trabajo.

Nombre	Características	Referencia
pH118	Hyg ^r . pUC118 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por higromicina	Fernández-Herrero (datos de laboratorio)
pK18	Kan ^r . pUC118 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por kanamicina.	Fernández-Herrero (datos de laboratorio)
pMH <i>Pnor</i> β-gal	Hyg ^r . Derivado de pMH184 en el que se ha clonado <i>Pnor-bgaA</i>	Tesis Doctoral de Laura Álvarez
pMH184	Hyg ^r . Derivado del plásmido pMK184. El gen de resistencia frente a higromicina (<i>hph5</i>) sustituye al <i>kat</i> (<i>NdeI-BglII</i>)	Cava y cols., 2007
pMK18	Kan ^r , <i>PlacZ'</i> , promotor del gen <i>slpA</i> (<i>PslpA</i>). Vector bifuncional, <i>Thermus-E. Coli</i>	de Grado y cols., 1998
pMK184	Kan ^r . Derivado del plásmido pMK18. <i>BamHI</i> es diana única en el sitio de multiclonaje	Cava y cols., 2007
pMKcNOR	Kan ^r . Derivado del plásmido pMKbc con una extensión de histidinas fusionada a <i>norB</i>	Cedido por el Dr. Gennis
pUC18/19	Amp ^r , <i>PlacZ'</i> . Vector de clonaje	Vieira y Messing, 1982

Tabla 4. Plásmidos construidos en esta Tesis.

Nombre	Características	Referencia
pH118 <i>cytba3</i>	Hyg ^r . Plásmido derivado del pH118, con la región interna del gen de la subunidad I <i>cytba3</i> clonada para hacer un mutante de inserción.	Esta Tesis
pK18 <i>lacc</i>	Kan ^r . Plásmido derivado del pK18, con la región interna del gen <i>lacasa</i> para hacer un mutante de inserción.	Esta Tesis
pK18 <i>norH</i> -his	Kan ^r . Plásmido derivado del pK18, con el gen <i>norH</i> fusionado a una extensión de histidinas.	Esta Tesis
pK18Δ <i>norC</i>	Kan ^r . Plásmido derivado del pK18, con las regiones anterior (800 pb) y posterior (800 pb) del gen <i>norC</i> clonadas para generar un mutante de delección limpio.	Esta Tesis
pK18Δ <i>norH</i>	Kan ^r . Plásmido derivado del pK18, con las regiones anterior (800 pb) y posterior (800 pb) del gen <i>norH</i> clonadas para generar un mutante de delección limpio.	Esta Tesis
pH118Δ <i>norB</i>	Hyg ^r . Plásmido derivado de pH118, con las regiones anterior (500 pb) y posterior (500 pb) del gen <i>norB</i> clonadas para generar un mutante limpio.	Esta Tesis
pUC19Δ <i>norB</i> -kat	Amp ^r , Kan ^r . Plásmido derivado del pUC19, con las regiones anterior (500 pb) y posterior (500 pb) del gen <i>norB</i> clonadas con el cassette de kanamicina en medio, para generar un mutante de inserción del gen de la kanamicina.	Esta Tesis

4.1.4. Material químico y bioquímico

Los tampones, soluciones y medios de cultivo utilizados en esta Tesis se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición y utilidad de los tampones y soluciones empleados.

Nombre	Composición	Utilidad
Medio LB	8 g/l de Triptona, 4 g/l de extracto de levadura y 3 g/l de	Medio de crecimiento para <i>E. coli</i> .
Medio TB	8 g/l de triptona, 4 g/l de extracto de levadura y 3 g/l de NaCl. pH 7,5.	Medio de crecimiento para <i>T. thermophilus</i> .
RNasa A	2 mg/ml de RNasa A en Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0.1M, glicerol 20% y hervido durante 10 minutos para eliminar DNAsas.	Eliminación de RNA de muestras.
Solución ácida de sulfato ferroso	13,5 g $\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 36 ml H_2O , 4 ml H_2SO_4 (concentrado).	Producción de óxido nítrico.
Solución de ONPG	Tampón fosfato 80 mM pH 7,5, ONPG 2 mg/ml.	Actividad β -galactosidasa.
Solución de revelado	1.25 mM Luminol, 36 μM Luciferina y 0.022% H_2O_2 en Tris-HCl 100 mM pH 8,0.	Revelado de membranas de Western-Blot.
Solución I	Tris 25 mM pH 7,5, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM.	Purificación de DNA genómico.
Tampón de carga de DNA 10x	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%.	Preparación de muestras para electroforesis de DNA.

Tampón de carga laemlli 5x	Tris-HCl 300 mM pH 6,8, SDS 5%, β -mercaptoetanol 10 %, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.002%, 25mM EDTA.	Preparación de muestras de proteínas para su análisis en SDS-PAGE.
Tampón de diálisis	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, glicerol 10%, DDM 0,05%.	Diálisis de las proteínas de membrana purificadas.
Tampón de electroforesis 5x	Tris 125 mM pH 8,8, glicina 1M, SDS 20 mM.	Tampón para geles de SDS-PAGE.
Tampón de elución	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 250 mM.	Eluir proteínas de membrana adheridas a la resina.
Tampón de equilibrado	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM.	Equilibrar la resina de purificación de proteínas de membrana.
Tampón de lavado	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 30 mM.	Lavado de la resina de purificación de proteínas de membrana.
Tampón de resuspensión	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, $MgSO_4$ 5 mM.	Resuspender células para purificación de proteínas de membrana.
Tampón de solubilización	Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, DDM 0,05%.	Solubilizar membranas durante la purificación de proteínas de membrana.
Tampón de stripping	62'5 mM Tris-HCl pH 6'7, 100 mM de β -mercaptoetanol, 2% SDS.	Eliminar interacción anticuerpo-proteína en membrana.
Tampón de transferencia	Tris 48 mM pH 8,5, glicina 39 mM, SDS 0.037% (p/v) y metanol 20%.	Transferencia de proteínas a membrana de PVDF en semisecco.
Tampón NOR-M	Tris-HCl 100 mM pH 7,7, ascorbato 10 mM, TMPD 0,5 mM, NO 0,1-0,2 mM .	Actividad óxido nítrico reductasa para extracto de membrana.

Tampón NOR-P	Citrato de sodio 50 mM pH 6, ascorbato 5 mM, TMPD 0,5 mM, NO 0,1-0,2 mM .	Actividad óxido nítrico reductasa para proteína purificada.
Tampón TAE 1x	Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM.	Electroforesis en geles de agarosa.
Tampón TE 1x	Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM.	Lavado de extractos celulares.
TBS-Tween 1x	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%.	Solución de bloqueo, lavado y dilución de anticuerpos para ensayos en Western-Blot.
TES	Tris 25 mM pH 7,5, sacarosa 50 mM, EDTA 5 mM.	Lavado de células, purificación de DNA genómico.

4.1.5. Anticuerpos

A continuación se describen los anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Tabla 6. Antisueros utilizados en esta Tesis.

Nombre	Características	Referencia
α -NarG	Anticuerpo de conejo contra la proteína NarG desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-Blot.	(Ramírez-Arcos y cols., 1998a)
α -Nirs	Anticuerpo de conejo contra la proteína NirS desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> PRQ25. Usado en ensayos de Western-Blot.	(Alvarez y cols., 2011)
α -NorC	Anticuerpo de conejo contra la proteína NorC desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> PRQ25. Usado en ensayos de Western-Blot.	(Alvarez y cols., 2011)

α-DnrT	Anticuerpo de conejo contra la proteína DnrT desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-Blot.	(Cava y cols., 2007)
α-DnrS	Anticuerpo de conejo contra la proteína DnrS desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-Blot.	(Cava y cols., 2007)
α-DrpA	Anticuerpo de conejo contra la proteína DrpA desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Anticuerpo primario en ensayos de Western-Blot.	Tesis Doctoral de Zahra Chahlafi.
α-DrpB	Anticuerpo de conejo contra la proteína DrpB desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> . Usado en ensayos de Western-Blot.	Tesis doctoral de Zahra Chahlafi.
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Usado como anticuerpo secundario en Western-Blot.	Biorad.

4.2. Métodos microbiológicos

4.2.1. Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

El crecimiento aerobio de las estirpes de *T. thermophilus* se realizó a 60-70° C en agitación (180 r.p.m.), en matraces con medio TB (Tabla 5) preparado con agua mineral (Fontjaraba, Zaragoza) (Fernández-Herrero y cols., 1995) rellenos hasta 1/5 de su capacidad. Para el crecimiento en placas, se añadió Agar (1,5% p/v) al medio TB, y se incubaron a la misma temperatura en una cámara húmeda para impedir su desecación. En los experimento que lo requerían, se añadió el antibiótico necesario para la selección: higromicina (50 µg/ml) y/o kanamicina (30 µg/ml).

E. coli fue crecido a 37°C con agitación en medio LB (Lennox, 1955) (Tabla 5) en matraces o tubos rellenos hasta ¼ de su capacidad, o en placas con Agar (1,5% p/v). Cuando fue necesario, se incluyeron los siguientes antibióticos: Ampicilina (100 µg/ml), higromicina (50 µg/ml) y/o kanamicina (30 µg/ml) .

La conservación de las estirpes se realizó a -20°C en forma de sedimentos celulares húmedos en el caso de *T. thermophilus*, mientras que las estirpes de *E. coli* se guardaron a -70°C en LB suplementado con glicerol 40% (concentración final) como crioprotector.

El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió, midiendo la densidad óptica a 550 nm (D.O._{550}) en un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

4.2.2. Crecimientos de *T. thermophilus* en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis

Para la inducción de la maquinaria desnitrificante en las estirpes de *T. thermophilus*, éstas fueron crecidas en aerobiosis en medio TB hecho con agua desionizada (Milli-Q) o destilada, hasta alcanzar una D.O._{550} de aproximadamente 0,4 unidades, momento en el que se detuvo la aireación y se le añadieron los óxidos de nitrógeno apropiados como oxidantes: nitrato 20 mM, nitrito 5 mM o nitroprusiato sódico (SNP) 0,1 mM. En estas condiciones la concentración de oxígeno es muy baja y se agota rápidamente, permitiendo a las bacterias la utilización de aceptores de electrones alternativos. Las inducciones en microaerobiosis se llevaron a cabo durante 4 ó 16 horas.

Los cultivos en anaerobiosis se realizaron en medio TB con agua desionizada (o destilada), en tubos de cristal de 20 ml rellenos hasta $\frac{1}{2}$ de su capacidad, sellados con un tapón de caucho o goma y sin agitación. El medio, según el experimento, fue suplementado con diferentes óxidos de nitrógeno: nitrato 40 mM, 20 mM, 10 mM; nitrito 5 mM. Las botellas inoculadas fueron incubadas entre 1 y 5 días a 70°C según el experimento.

Para clasificar como desnitrificantes parciales o completos las estirpes de *T. thermophilus*, se utilizó una campana Durham en el interior de los tubos de anaerobiosis para detectar de manera rápida la producción de óxidos de nitrógeno gaseosos mediante la aparición de una burbuja.

4.2.3. Transformación bacteriana

Se indujo la competencia en *E. coli* mediante el método Inoue (Inoue y cols., 1990). Las transformaciones se realizaron siguiendo el método de Hanahan (Hanahan, 1985). Tras la transformación, las células fueron incubadas el tiempo necesario para expresar la resistencia a los antibióticos correspondientes: 1 hora en el caso de la ampicilina y 2 horas en el caso de la kanamicina.

Las células de *T. thermophilus* fueron transformadas por competencia natural (Koyama y cols., 1986) añadiendo 0,1-0,5 µg de DNA a 500 µl de cultivo crecido hasta una D.O.₅₅₀ de aproximadamente 0,3 unidades en medio TB con agua mineral Fontjaraba. Para expresar la resistencia a cualquier antibiótico, los cultivos se incubaron durante 4 horas a 60-70°C.

En ambos casos la selección se llevó a cabo en placas del medio correspondiente con el antibiótico adecuado.

4.2.4. Conjugación entre estirpes de *T. thermophilus*

Se crecieron las estirpes donadora y receptora hasta llegar a fase estacionaria en medio TB a 70°C con sus antibióticos correspondientes. Las células fueron sedimentadas y lavadas con medio TB. Posteriormente, 30 µl de cada una fueron colocados juntos sobre una membrana de nitrocelulosa en una placa de medio TB y se incubó la placa durante 24 horas a 60°C. Los respectivos controles se llevaron a cabo paralelamente con cada estirpe por separado. Para separar las células de la membrana, ésta se introdujo en un tubo con medio TB y se agitó vigorosamente con un vortex. Se añadieron 100 µl de las células resuspendidas en tubos de anaerobiosis con 10 ml de medio TB suplementado con 40 mM de nitrato o 5 mM de nitrito más los antibióticos de selección necesarios y se incubaron durante 48 horas a 70°C. A partir de este cultivo se realizó una segunda selección en las mismas condiciones. Posteriormente se seleccionaron colonias individuales en placas de medio TB con el antibiótico necesario y se comprobó su capacidad de desnitrificación mediante crecimientos en anaerobiosis con nitrato o nitrito y la presencia de los genes de desnitrificación por PCR.

4.2.5. Generación de mutantes en *Thermus*

Se utilizaron tres métodos para la generación de mutantes en *T. thermophilus*: inserción, deleción y sustitución.

Para los mutantes de inserción, se interrumpió el gen de interés con un plásmido suicida. Para ello se clonó un fragmento de la región central del gen que se deseaba bloquear (500 pb aproximadamente), en un plásmido suicida (pK18 o pH118). De tal manera que el plásmido se insertó en el genoma de *Thermus* por recombinación homóloga y confirió al mutante la resistencia al antibiótico presente en el plásmido (kanamicina o higromicina).

En el caso de los mutantes de deleción, el objetivo era eliminar completamente el gen del genoma de *T. thermophilus*. En este caso, se clonaron una región anterior y otra posterior del gen que se quería eliminar (de al menos 500 pb cada una) en el plásmido suicida pK18. Estas regiones servirían como puntos de recombinación homóloga para la inserción del plásmido en el genoma de *T. thermophilus*, para así poder seleccionar los mutantes que habían incorporado el plásmido por resistencia a kanamicina. Una vez seleccionado el mutante, se procedió a crecerlo en un medio líquido, carente de antibiótico, durante 2-5 ciclos de crecimiento (10-25 generaciones) con el fin de provocar la pérdida del plásmido. Los clones que perdieron la resistencia al antibiótico fueron seleccionados estriando colonias aisladas en placas sin antibiótico y haciendo una replica de las mismas en una placa con kanamicina. De los clones seleccionados algunos revertieron al genotipo silvestre y otros pasaron a ser mutantes de deleción. Las estirpes mutantes fueron comprobadas por PCR y Western-Blot.

En los mutantes de sustitución, se sustituyó el gen de interés por el gen de resistencia a kanamicina. Para ello se utilizó el plásmido pUC19, donde se clonaron la región anterior y posterior del gen que se quería mutar, de la misma manera que en la generación de mutantes de deleción, pero en esta ocasión se clonó el gen de la kanamicina entre medias de ambas regiones. Se analizó la orientación del gen de la kanamicina por digestión del plásmido y secuenciación para comprobar que estuviese en el mismo sentido que el gen a sustituir. Al transformar *Thermus* con el plásmido, se generaron mutantes por recombinación homóloga en los que el gen objetivo fue sustituido por el de resistencia a kanamicina. El mutante se comprobó por PCR y por Western-Blot. Para eliminar el gen de resistencia a kanamicina se realizó una segunda

transformación de la cepa mutante de sustitución con un derivado de pH118, un plásmido no replicativo en *T. thermophilus* en el que también se clonaron las mismas regiones que flanqueaban el gen a deletar.

Tras la integración de esta construcción por recombinación homóloga, se sometió el cultivo a sucesivos pases de crecimiento en medio rico sin antibiótico para forzar la salida del plásmido. El clon que habían perdido las resistencias a los dos antibióticos fue seleccionado.

4.2.6. Aislamiento de envolturas celulares y solubilización de membranas totales de *T. thermophilus*

Para la obtención de membranas de *T. thermophilus* para la purificación de proteínas de membrana, se crecieron 10 litros de cultivo en las condiciones necesarias para cada estirpe y se llevó a cabo una inducción con nitrato 20 mM como viene indicado en el apartado de crecimiento de *T. thermophilus*. A continuación, se sedimentaron las células por centrifugación a 8.000 rpm, a 4°C durante 10 minutos y se resuspendieron en 100 ml de tampón de resuspensión (Tabla 5). Durante la homogeneización de la muestra se añadieron 50 U/ml de DNAsa y una pastilla de cóctel de inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Las células se rompieron mediante prensa de French y posteriormente se ultracentrifugaron a 40.000 rpm durante 4 horas a 4°C. El sedimento se resuspendió en 100 ml de tampón de resuspensión, previa adición de otra pastilla de inhibidor de proteasas. Finalmente, para solubilizar las membranas, se añadió por goteo *n*-Dodecyl β -D-maltoside (DDM) a una concentración final del 1% y se dejó en agitación suave durante 16 horas a 4°C. Los extractos de membrana se fraccionaron y se guardaron a -20°C.

En el caso de la extracción de membranas para los ensayos de actividad óxido nítrico reductasa se escaló el protocolo anterior a 1 litro de cultivo.

4.3. Manipulación de ácidos nucleicos

4.3.1. Preparación del DNA

El DNA plasmídico de *E. coli* se obtuvo de cultivos en fase estacionaria utilizando un kit comercial basado en la unión del DNA a una columna de sílice (Wizard plus SV Minipreps de Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

El DNA cromosómico de *T. thermophilus* se obtuvo a partir de 2 ml de cultivo en fase de saturación mediante el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante, o sin kit siguiendo el protocolo descrito por Marmur (Marmur, 1961). Las células recogidas por centrifugación fueron lavadas con tampón TES y resuspendidas en Solución I, suplementado con RNasa A 0.1 mg/ml (Roche) y lisozima 0.1 mg/ml (Roche) preparada en EDTA 0.25 M (Merck). Tras 1 hora a 37°C, el volumen fue incrementado con TE 1X y las células fueron lisadas con N-Dodecanoil-N-metilglicina de sodio al 0.5% (Sarkosyl, Sigma) y pronasa E 0.1 mg/ml (Merck) a 56°C durante una hora; posteriormente, las muestras fueron incubadas a 37°C con proteinasa K 3 mg/ml (Sigma) durante 30 minutos. Por último, las muestras fueron sometidas a varias extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) y con cloroformo:isoamílico (24:1). El DNA obtenido fue precipitado con dos volúmenes de etanol puro (Merck) y acetato amónico pH 5 hasta una concentración final de 100 mM, y finalmente resuspendido en 50 µl de agua Milli-Q.

4.3.2. Amplificación de DNA

Para la amplificación de DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la DNA polimerasa de *T. thermophilus* (Biotools B&M). En los casos en los que se quería aumentar la fidelidad de la secuencia del fragmento amplificado se añadió la DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Biotools B&M), en una relación 3:1 para con la de *T. thermophilus*.

Se utilizó 1 unidad de la enzima con el tampón suministrado por la casa comercial que contenía una concentración de 2 mM de MgCl₂, 4% de DMSO, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de una mezcla igualada de dNTP, 50 pmol de los oligonucleótido necesarios (Sigma-Aldrich), y aproximadamente 20 ng de molde de DNA, con un volumen final

de reacción de 25 o 50 μ l. Como molde se utilizó DNA plasmídico, DNA cromosómico, DNA procedente de una PCR previa, o cultivos celulares. Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador iCycler de Bio-Rad. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y colaboradores (Ausubel y cols., 1994).

4.3.3. Clonación de DNA

Las digestiones de plásmidos y de fragmentos de DNA se llevaron a cabo utilizando las enzimas de restricción seleccionadas para el clonaje, con los tampones y condiciones recomendados por la casa comercial (MBI Fermentas) tanto para digestiones simples como dobles.

La ligación de fragmentos de DNA fue llevada a cabo con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs), utilizando las condiciones recomendadas por la casa comercial, con 0,5 unidades en un volumen final de 10 μ l, ajustando la relación vector:inserto a 1:4. Las muestras fueron incubadas a 16°C durante una noche. El producto de estas ligaciones fue utilizado para transformar 50 μ l de células competentes de *E. coli*, siguiendo el protocolo indicado en métodos microbiológicos.

4.3.4. Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

La separación electroforética de DNA se llevó a cabo mediante geles de agarosa de entre 0,4 y 1% (Conda Pronadisa, low EEO) en TAE 1x (Tabla 5) sumergidos en la misma solución.

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa y de producto de PCR, se utilizó el kit PCR-Prep de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.3.5. Extracción de RNA y retrotranscripción

El RNA total de cultivos de *T. thermophilus* en fase exponencial se extrajo empleando el kit RNeasy Mini (Qiagen). La extracción se realizó a partir de cultivos sin inducir e inducidos durante 4 horas con nitrato potásico 20 mM en anaerobiosis. El RNA se utilizó como molde en reacciones de retrotranscripción utilizando la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4. Manipulación de proteínas

4.4.1. Preparación de extractos de electroforesis.

Para la obtención de proteínas totales de *Thermus*, las células fueron recogidas por centrifugación suave y resuspendidas en tampón de ruptura de Laemmli 1X (Tabla 5). Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 15.000 g en una minicentrífuga Hettich Zentrifugen Mikro para separar los restos insolubles correspondientes a la pared celular. El extracto obtenido fue analizado mediante SDS-PAGE.

Para observar el patrón de proteínas de membrana, las células recogidas fueron lavadas y resuspendidas en tampón TrisHCl 50 mM y posteriormente sometidas a sonicación a máxima amplitud cada 0,5 segundos, durante 1 minuto, seguido de 1 minuto a 4°C, en 3 ciclos. Una vez sonicados, los extractos se centrifugaron durante 10 minutos a 15.000 g para separar las membranas y el precipitado se resuspendió en tampón de ruptura Laemmli 1X para ser analizado posteriormente mediante SDS-PAGE.

4.4.2. Electroforesis de proteínas

La separación electroforética de proteínas fue realizada mediante geles SDS-PAGE discontinuos (10-15%) (Laemmli y Favre, 1973). La visualización de las proteínas fue realizada mediante tinción con Azul de Coomassie (0,25% Brilliant Blue-R en 45% metanol, 10% acético) y posterior lavado con 45% metanol, 10% acético, o bien por transferencia de las proteínas a membrana para su inmunodetección (Western-Blot) con los anticuerpos conjugados correspondientes.

4.4.3. Inmunodetección de proteínas (Western-Blot)

Las proteínas desnaturalizadas en un gel SDS-PAGE fueron transferidas en semiseco a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Para este proceso se utilizó un aparato Transblot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) durante 35 minutos a 3 mA/cm², en tampón de transferencia (Tabla 5). A continuación, las membranas fueron bloqueadas en leche desnatada al 3% en TBS-Tween (Tabla 5) durante 1 hora y fueron

incubadas posteriormente con el anticuerpo primario correspondiente durante otra hora a temperatura ambiente. En general, la concentración de anticuerpo utilizada fue de 1:5.000 en TBS-Tween. Después se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween durante 10 minutos por lavado para eliminar el exceso de anticuerpo. Como anticuerpo secundario se empleó IgG anti-conejo de cabra, conjugado con peroxidasa (GAR-HRP, Bio-Rad), diluido 1:5.000 en TBS-Tween, e incubándolo con la membrana durante 1 hora. La señal del anticuerpo se detectó utilizando las soluciones de revelado por luminiscencia y exponiendo autorradiografías frente a las membranas, que posteriormente fueron reveladas.

4.4.4. Medición de concentración de proteínas

Para medir la concentración de proteínas de las muestras, se utilizó el kit comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4.5. Purificación de proteínas de membrana con extensión de histidinas

La obtención de proteínas de membrana de *T. thermophilus* se llevó a cabo a partir de los extractos totales de membrana obtenidos mediante el protocolo de extracción con detergente explicado en el apartado de métodos microbiológicos. Las membranas obtenidas se centrifugaron durante 1 hora a 40.000 rpm para descartar aquellas proteínas que no habían sido solubilizadas por el detergente. Para rescatar las proteínas que presentaban etiquetas (tags) de polihistidinas, la fracción soluble fue añadida a una columna de resina de níquel-agarosa (ABT) equilibrada con tampón de equilibrado (Tabla 5). Alternativamente se incubó durante 16 horas en la resina, girando en una noria a 4°C. Después se procedió al lavado de la resina para eliminar las interacciones no específicas de otras proteínas con el tampón de lavado (Tabla 5), siempre a 4°C. Tras esto se eluyó la proteína en dos pasos utilizando el mismo tampón con 250 mM y 500 mM de imidazol (Merck).

La óxido nítrico reductasa purificada fue identificada por espectrometría y Western-Blot. El espectro de absorción de la proteína reducida se obtuvo añadiendo ditionito a la muestra, para mantenerla reducida.

Para obtener una purificación más limpia se realizó una diálisis de las alícuotas obtenidas de la columna de níquel, en tampón de diálisis (Tabla 5) durante 3 horas, con el objetivo de eliminar el imidazol, y posteriormente se pasó la muestra por una columna de resina de cobalto (Clontech). El lavado y elución de la resina se realizó de la misma manera que en el caso de la resina de níquel.

4.5. Ensayos químicos y enzimáticos

4.5.1. Detección de producción y consumo de nitrito

La presencia de nitrito en el medio fue determinada mediante un método colorimétrico con N-(1-naftil) etilendiamina 0,02% (Sigma) y con sulfanilamida 1% en HCl 2,5 N (Sigma) (Snell, F.D. Snell, 1949).

4.5.2. Ensayos β -galactosidasa en *T. thermophilus*

Para el ensayo, las estirpes de *T. thermophilus* fueron inducidas con el sustrato necesario, tal como se describe en el apartado de métodos microbiológicos. Posteriormente se precipitaron las células por centrifugación y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón fosfato 80 mM pH 7,5.

El ensayo se llevó a cabo adaptando el protocolo descrito por Miller (Miller, 1992) a placas multipocillo, utilizando SDS al 0,2% e incubando las células durante 15 minutos a 37°C para permeabilizarlas. Las muestras se prepararon en placas de 96 pocillos *clear flat bottom* (Greiner) y las mediciones de D.O. a 420 nm se llevaron a cabo en un lector de placas *FLUOstar Optima* (BMG Labtech) durante 15 minutos. La actividad β -galactosidasa es la media de dos ensayos independientes con tres réplicas y se expresó como la variación de $D.O._{420}$ en función del tiempo ($\Delta D.O._{420}$) relativizados a la $D.O._{550}$ de los cultivos. Las barras de error corresponden al error estándar de las mediciones.

4.5.3. Ensayo de actividad óxido nítrico reductasa

El óxido nítrico utilizado en estos ensayos se produjo mediante la reacción química que se muestra a continuación:



La reacción se llevó a cabo en una botella de 20 ml con un tapón de goma, añadiendo primero 0,25 g de NaNO_2 y posteriormente haciendo vacío para eliminar el oxígeno del interior de la botella. Después se inyectaron 3 ml de la solución ácida de sulfato ferroso (Tabla 5) y se recogió el gas producido en jeringuillas de 10 ml. Inmediatamente después se inyectaron 8 ml de este gas en vacutainers® (BD) de 5 ml que contenían 2 ml de agua-HCl a pH 3, que se usó finalmente como solución saturada de NO (2 mM) para los ensayos.

La actividad óxido nítrico reductasa se midió desde extractos de membrana o con proteína purificada.

Para los ensayos con extractos de membrana se inyectaron 100 μl de solución saturada de NO en 1,8 ml de tampón NOR-M (Tabla 5) en vacutainers® de 5 ml, al que finalmente se añadieron 10 μl de extracto de membrana (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas) de las diferentes estirpes. La mezcla de reacción se incubó a 60°C durante 16 horas y posteriormente se midió el óxido nítrico producido. Las barras de error corresponden al error estándar de las mediciones.

En los ensayos con proteína purificada se llevó a cabo una medición amperométrica con un electrodo de NO de tipo Clark. El vástago del electrodo estaba sumergido en una cámara de 2 ml con tampón NOR-P (Tabla 5) que se mantenía gaseado con nitrógeno. En cada medición, una vez estabilizada la señal del electrodo, se realizaron dos inyecciones sucesivas de 30 μl de la solución saturada de NO (concentración final 50 μM). La pendiente inicial observada en la señal es debida a la reducción espontánea de NO. A continuación se inyectaron 20 μl de proteína purificada (1,15 mg/ml) y se monitorizó la desaparición de NO. Todo el proceso se mantuvo en agitación constante y a 45°C. La actividad catalítica fue obtenida ajustando la mejor tangente a la caída de señal de NO y restándole la caída inicial de NO.

A todos los tampones se les hizo pasar un flujo de nitrógeno gas para eliminar el oxígeno disuelto.

4.5.4. Medición de óxidos de nitrógeno gaseosos

El óxido nitroso fue medido a partir de muestras de gas obtenidas del espacio de cabeza de tubos de anaerobiosis sellados con tapones de goma o Vacutainers®. Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases de captura de electrones. Para este trabajo se han utilizado dos cromatógrafos de gases: un *Perkin-Elmer Clarus 500 gas chromatograph* con una columna *Elite-Plot Q* 30-m, 0.53-mm (diámetro interno) instalada, y un *Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph* con una columna *porapak* 80-100 instalada, conectado a un integrador *Spectra Physics SP 4290*. En el caso del *Perkin-Elmer*, la temperatura del inyector se mantuvo a 115°C, la columna a 90°C y el detector a 350°C. Para el *Hewlett Packard* (HP) la columna se mantuvo a 40°C y la temperatura del detector y del inyector fue de 300°C. El integrador se configuró con un valor de atenuación (ATT) de 128. El tiempo de retención del pico de N₂O era de aproximadamente 5,3 minutos para el *Perkin-Elmer* y de 4,6 minutos para el HP, y su concentración fue calculada usando una curva de calibrado con muestras de óxido nitroso de 0,4-, 100-, y 1.000-ppm (Stg gas mix- tures). Las barras de error corresponden al error estándar de las mediciones.

La detección de óxido nítrico en el espacio de cabeza de los cultivos en anaerobiosis se llevó a cabo utilizando un *Sievers Nitric Oxide Analyzer NOA 280* (GE Analytical Instruments) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras del espacio de cabeza de los cultivos en anaerobiosis se inyectaron en la cámara de análisis del NOA. Las concentraciones de NO en los cultivos fueron calculadas utilizando una curva patrón con cantidades crecientes de óxido nítrico.

La posible producción de N₂ por las estirpes de *T. thermophilus* se estudió utilizando nitrato sódico 5 mM marcado con [¹⁵N] al 30% en cultivos en anaerobiosis de 1 l. Las muestras de gas del espacio de cabeza de los cultivos en anaerobiosis después de 5 días de incubación a 70°C se analizaron utilizando un espectrómetro de masas (SerCon, Ltd.) en la Universidad de Aberdeen, Escocia, y la cantidad de N₂ y N₂O acumulado se midió como se ha descrito previamente (Baggs y cols., 2010).

4.6. Análisis bioinformático

Los programas informáticos utilizados en este trabajo para el análisis, ensamblado, traducción y comparación de secuencias han sido: BioEdit (Hall, 1999), VectorNTI 10 (Invitrogen), MUMmer (Arabidopsis Genome Initiative, 2.000) y M-GCAT (Treangen y Messeguer, 2006). También se utilizó el servidor NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov] para la búsqueda de proteínas homólogas.

La predicción de las estructuras, puntos isoeléctricos y pesos moleculares de las proteínas se hizo utilizando diferentes herramientas disponibles en el servidor ExPASy [www.expasy.ch].

Las secuencias de los genomas completos y publicados de *T. thermophilus* se obtuvieron de la consulta del servidor BacMap (Stothard y cols., 2005).

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1. Los genes de desnitrificación en distintas estirpes de *Thermus thermophilus*

En los trabajos publicados por Manaia y da Costa (Manaia y da Costa, 1991; Manaia y cols., 1995) se describieron una serie de estirpes de *Thermus thermophilus* halotolerantes capaces de reducir nitrato y producir nitrito en anaerobiosis, y por lo tanto capaces, en principio, de llevar a cabo el primer paso de la desnitrificación. Una de las cepas descritas es *T. thermophilus* PRQ25, capaz de crecer en anaerobiosis en presencia de 40 mM de nitrato o 5 mM de nitrito produciendo gas en el proceso (Figura 8), tal y como había sido descrito en los trabajos de Felipe Cava (Cava y cols., 2008a, b).

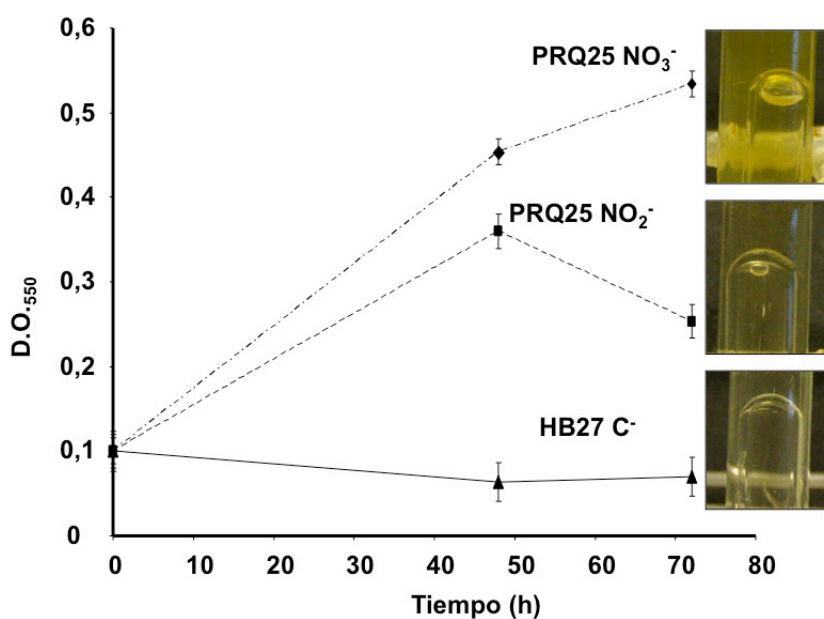


Figura 8. Crecimiento de la estirpe *T. thermophilus* PRQ25. Se muestra la curva de crecimiento anaerobio a 70°C en presencia de 40 mM de nitrato (NO_3^-) y 5 mM de nitrito (NO_2^-) de la estirpe PRQ25, así como la acumulación de gas en campana Durham. La estirpe aerobia HB27 se utilizó como control negativo.

Gracias a la secuenciación y anotación del genoma de la estirpe desnitrificante tipo *T. thermophilus* PRQ25, llevada a cabo como parte de esta Tesis y de la de Laura Álvarez en nuestro laboratorio (Álvarez, 2012), se pudieron localizar agrupamientos génicos codificantes de homólogos de enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación en distintos microorganismos modelo. En concreto, dentro de una región de alta

variabilidad de un megaplásmido, homólogo al pTT27 de la cepa aerobia de HB27, se localizaron dos agrupaciones: un elemento conjugativo de respiración de nitrato (NCE) similar al de la cepa NAR1 (Cava y cols., 2007) y la agrupación *nor-nir*, donde se encontraban codificadas una posible nitrito reductasa de tipo cd1, una posible óxido nítrico reductasa (*norCBH*) (Alvarez y cols., 2011; Bricio y cols., 2011) así como el operón *norRST*, que codifica un posible sistema de regulación implicado en la modulación del proceso de desnitrificación (Figura 9). La caracterización de los genes codificantes de una posible nitrito reductasa fue llevada a cabo en la Tesis de Laura Álvarez (Alvarez, 2012), mientras que la de los genes *nor* han sido el objetivo de esta tesis.

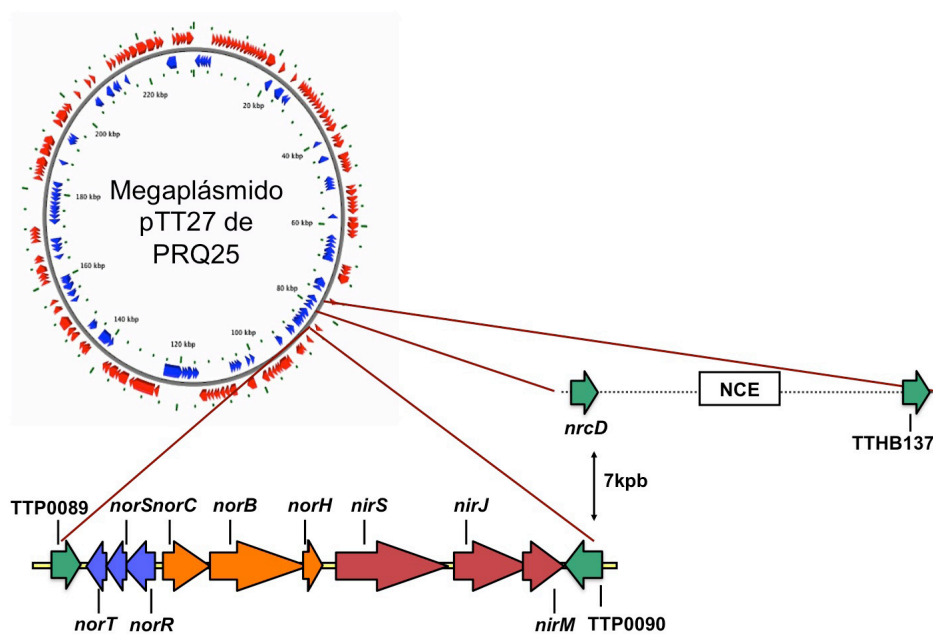


Figura 9. Esquema de los agrupamientos génicos NCE y *nor-nir* en el megaplásmido de PRQ25. También se representan en color verde los genes homólogos a los del megaplásmido de HB27 y HB8.

5.1.1. Las proteínas Nor de *T. thermophilus* PRQ25

El posible operón *nor* de *T. thermophilus* PRQ25 codifica un homólogo de óxido nítrico reductasas de tipo c (NOR). Comparando su secuencia con las de otras cepas de *Thermus* spp. recientemente secuenciadas, se ha podido observar que el operón *nor* se encuentra bien conservado en *T. scotoductus* (Gounder y cols., 2011) y en las cepas de *T. thermophilus* SG0.5JP17-16 (SG0.5) y JL-18 (añadidos a la base de datos por DOE Joint Genome Institute) (Tabla 7). Este posible operón está formado por tres genes: *norC*, *norB* y *norH*.

		NOR		
		C	B	H
Tamaño (aa)		221	476	98
Localización		Membrana	Membrana	Membrana
Función putativa		NO reductasa	NO reductasa	?
% identidad				
	<i>T.th.</i> NAR1	-	-	-
	<i>T.th.</i> SG0.5JP17-16	99	99	98
	<i>T.th.</i> JL-18	99	99	98
	<i>Thermus scotoductus</i>	92	95	90
	<i>Meiothermus silvanus</i>	-	-	-
	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	62	68	55
	<i>Hydrogenivirga</i> sp.	56	67	34
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	38	40	-
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	35	40	-

Tabla 7. Características de NorC, NorB y NorH de *T. thermophilus* PRQ25. También se muestra el porcentaje de identidad con otras óxido nítrico reductasas presentes en diferentes organismos.

El gen *norC* codifica una proteína de 221 aminoácidos homóloga a un citocromo de tipo c que corresponde a la subunidad C de la óxido nítrico reductasa de otros organismos desnitrificantes. Al realizar un análisis de secuencia se observó que el tamaño de esta proteína es 71 y 75 aminoácidos mayor que sus homólogas en *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente, y al llevar a cabo una predicción de su estructura se mostró la presencia de dos posibles hélices transmembrana en la región aminoterminal y una gran región periplásmica que se localizaría a partir del aminoácido 58 de la proteína (Figura 10.A). Según este análisis también se ha encontrado un punto de unión a grupo hemo c altamente conservado (secuencia CMDCH) en la posible región periplásmica, lo que concuerda con el hecho de que la subunidad C sea homóloga a la subunidad NorC de las cNOR descritas.

El gen *norB* se localiza 11 pb después de *norC* y codifica una proteína de 476 aminoácidos (tamaño predicho) que, según las predicciones bioinformáticas, presenta 12 hélices transmembrana (Figura 10.B). Al realizar un alineamiento de secuencia con las proteínas presentes en la base de datos, se observó un alto nivel de homología con la subunidad grande (NorB) de las óxido nítrico reductasas de diferentes organismos, conservando además las seis histidinas características de la familia de las oxidasas de hemo-cobre.

Paralelamente, se decidió comparar la subunidad NorB con la secuencia de la recientemente cristalizada qNOR de *Geobacillus stearothermophilus*. A pesar de que qNOR es una única proteína, su estructura se asemeja a la predicha para la NOR de *T. thermophilus*, ya que ambas presentan el mismo número de dominios transmembrana. Al realizar el alineamiento con NorB, ambas proteínas presentan un nivel de identidad del 57% (Tabla 7).

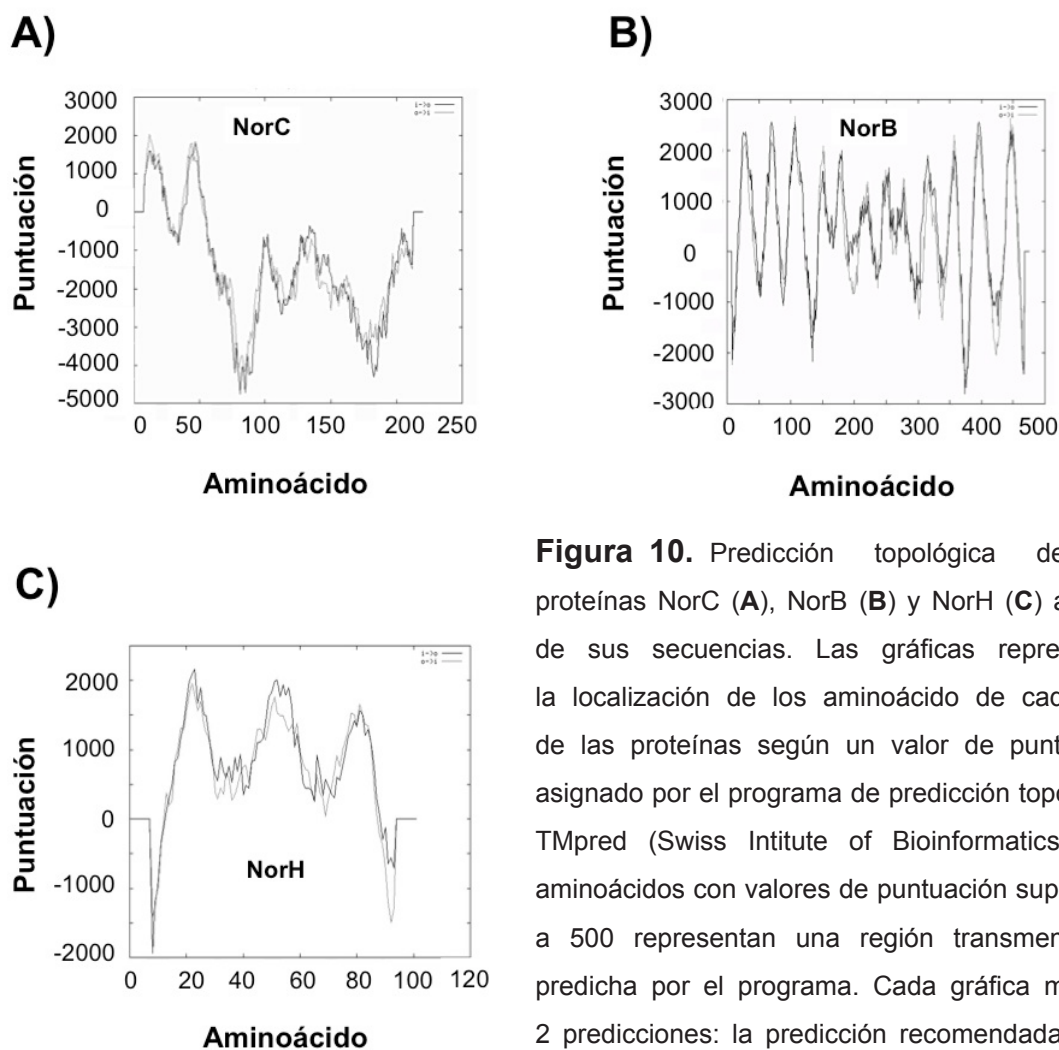


Figura 10. Predicción topológica de las proteínas NorC (A), NorB (B) y NorH (C) a partir de sus secuencias. Las gráficas representan la localización de los aminoácido de cada una de las proteínas según un valor de puntuación asignado por el programa de predicción topológica TMpred (Swiss Intitute of Bioinformatics). Los aminoácidos con valores de puntuación superiores a 500 representan una región transmembrana predicha por el programa. Cada gráfica muestra 2 predicciones: la predicción recomendada (línea negra) y otra menos probable (línea gris).

Solapado en 7 pb con el final de *norB* se encontró un marco de lectura abierto que corresponde a un gen denominado *norH*. Este gen codifica una proteína pequeña de 98 aminoácidos (11,23 KDa) que, según las predicciones bioinformáticas, está formada por tres hélices transmembrana (Figura 10.C) y, por lo tanto, localizada en la membrana plasmática. Desde el punto de vista filogenético es interesante comprobar cómo este posible gen está conservado en diferentes bacterias de grupo Aquificales como *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, además de en otros *Thermus* spp..

5.1.2. Conservación de los genes *nor* en otros *T. thermophilus*

A continuación decidimos determinar si el operón *nor* estaba conservado en distintas cepas desnitrificantes de *T. thermophilus* y si su presencia estaba relacionada con la capacidad de producir gas. Para ello se utilizaron 14 cepas aisladas de Riberia Quente (Isla de San Miguel, Azores) (PRQ's y RQ-1), y la cepa B (NCIMB 11247) aislada en Islandia por R. A. D. Williams (Pask-Hughes y Williams, 1977). Mediante una campana Durham situada en el interior de los tubos pudimos detectar la producción de gas por acumulación de una burbuja en su interior. Para detectar la presencia de los genes se extrajo DNA total de las quince estirpes y se comprobó por PCR la presencia de los genes *nor* en sus genomas utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de PRQ25. Los resultados mostraron cómo los genes de la óxido nítrico reductasa se encuentran altamente conservados en estas estirpes, lo que concuerda con el hecho de que sean capaces de producir gas durante la desnitrificación (Tabla 8). Sin embargo, las cepas B y RQ-1 a pesar de no presentar los genes de la óxido nítrico reductasa, fueron capaces de producir gas durante el crecimiento en anaerobiosis con nitrato, sugiriendo así la existencia de diferencias en las enzimas implicadas en el proceso.

Estirpes	Presencia de genes			Producción de gas
	<i>norC</i>	<i>norB</i>	<i>norH</i>	
HB27	-	-	-	-
NAR1	-	-	-	-
RQ1	-	-	-	+
B	-	-	-	+
PRQ14	+	+	+	+
PRQ15	+	+	+	+
PRQ16	+	+	+	+
PRQ17	+	+	+	+
PRQ21	+	+	+	+
PRQ23	+	+	+	+
PRQ24	+	+	+	+
PRQ25	+	+	+	+
PRQ26	+	+	+	+
PRQ27	+	+	+	+
PRQ28	+	+	+	+
PRQ30	+	+	+	+
PRQ31	+	+	+	+

Tabla 8. Desnitrificación en distintas estirpes de *T. thermophilus*. Caracterización de la capacidad positiva (+), o negativa (-) de producción de gas en cultivos anaerobios de distintas estirpes de *T. thermophilus* en presencia de 40 mM nitrato a 70°C crecidos durante 48 horas. Se muestran también los resultados de amplificación por PCR (positiva +, o negativa -) de los genes del operón *nor* utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2.

5.1.3. NorCBH se expresan como un operón

Al analizar la secuencia que rodea al operón *nor* se localizó un posible terminador transcripcional tras *norH*, lo que sustentaba la hipótesis de que *norCBH* constituirían un operón. Para confirmarlo se llevó a cabo un ensayo de retrotranscripción a partir del mRNA total de la cepa PRQ25 inducida en anaerobiosis con nitrato 20 mM. Los resultados mostraron que el operón *nor* se transcribe en condiciones de anaerobiosis con nitrato como inductor, y que el transcrito incluye los 3 genes *norC*, *norB* y *norH* (Figura 11). Estos datos unidos a los resultados obtenidos en la Tesis de Laura Álvarez donde se confirmó que no existía transcripción entre el operón *nor* y el operón *nir* (Alvarez, 2012), permiten concluir que *norC*, *norB* y *norH* se cotranscriben a partir de un promotor común.

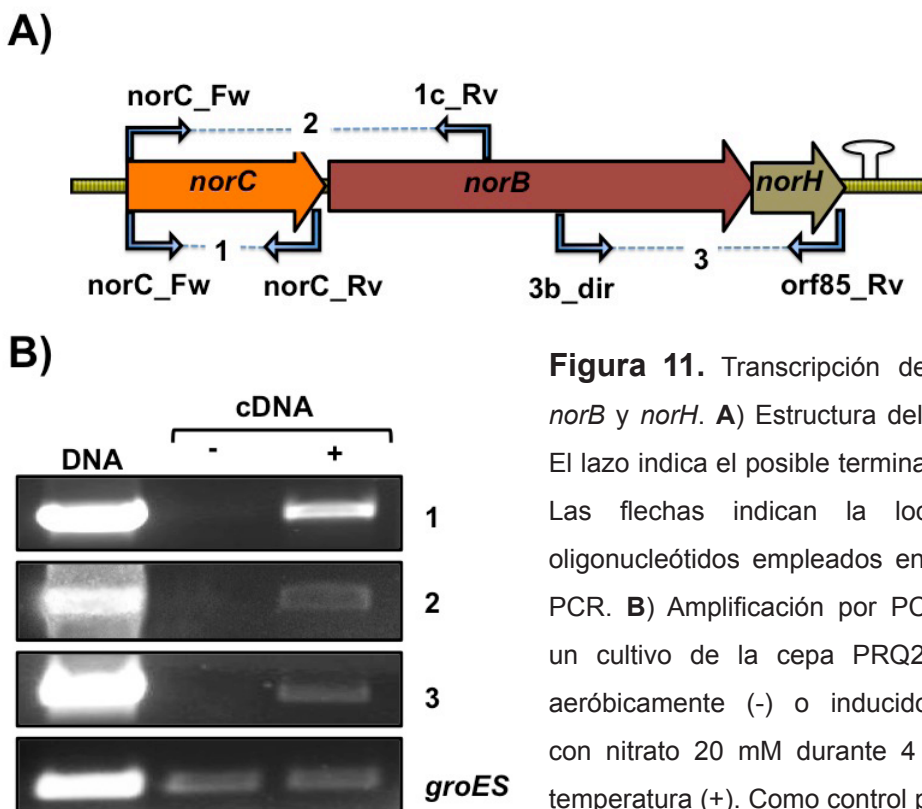


Figura 11. Transcripción de los genes *norC*, *norB* y *norH*. **A)** Estructura del agrupamiento *nor*. El lazo indica el posible terminador transcripcional. Las flechas indican la localización de los oligonucleótidos empleados en el ensayo de RT-PCR. **B)** Amplificación por PCR sobre cDNA de un cultivo de la cepa PRQ25 crecida a 60°C aeróbicamente (-) o inducido en anaerobiosis con nitrato 20 mM durante 4 horas a la misma temperatura (+). Como control positivo se amplificó *groES*.

5.1.4. Integridad del complejo donador de electrones Nrc en diferentes estirpes de *T. thermophilus*

Según los datos obtenidos en la secuenciación de PRQ25 (Alvarez, 2012), en esta cepa el gen *nrcE* se encuentra prácticamente deletado, conservando sólo los 10

primeros aminoácidos de los 363 que se habían descrito para NrcE de NAR1. Esta subunidad es la responsable del anclaje a la membrana del complejo de la NADH deshidrogenasa (Nrc), encargado de transferir electrones a la nitrato reductasa a través de la menaquinona durante la desnitrificación en la estirpe NAR1, y fue propuesta como donador también para la NIR y NOR en la cepa PRQ25 (Cava y cols., 2008a). Es por ello que las implicaciones que conlleva la pérdida de esta subunidad son muy importantes tanto a nivel de estructura y funcionamiento de la enzima como del funcionamiento de la propia maquinaria desnitrificante.

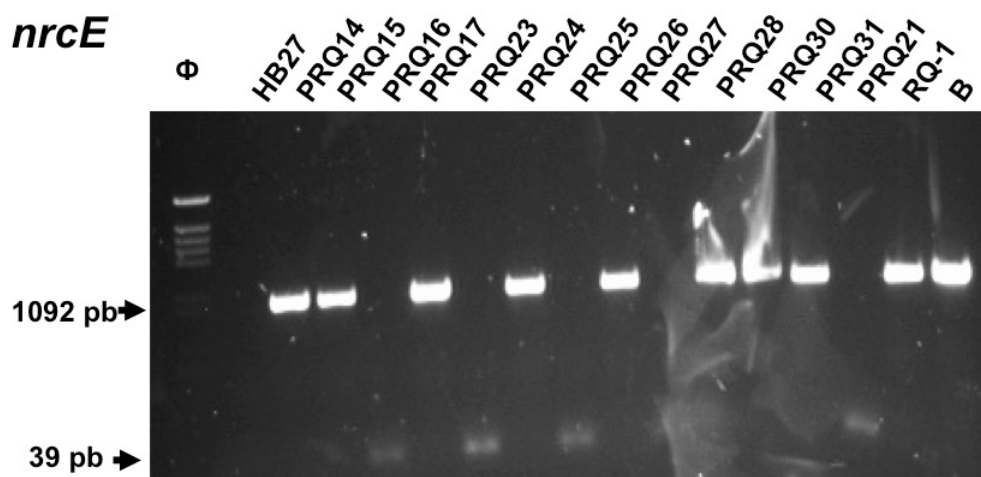


Figura 12. Integridad de NrcE en las cepas desnitrificantes. PCR para detectar el gen *nrcE* en las diferentes estirpes de *T. thermophilus* utilizando los oligonucleótidos H45 y H46' como cebadores.

Al analizar los genomas recientemente publicados de *T. scotoductus* y de la cepa de *T. thermophilus* SG0.5JP17-16, se pudo comprobar que en ambos casos *nrcE* también se encuentra deletado, aunque no de la misma manera. Así, mientras *T. scotoductus* presenta exactamente la misma delección que PRQ25, en SG0.5 la delección afecta a los genes *nrcEFN*. Esto nos hizo plantearnos si el caso de NAR1 era una excepción dentro de los organismos desnitrificantes del género *Thermus*, en cuanto a disponer de una NADH deshidrogenasa específica para la desnitrificación. Para estudiarlo decidimos analizar la integridad del gen *nrcE* en las estirpes PRQ's junto a RQ-1 y B. Utilizando el DNA total de estas estirpes, se ensayó la amplificación del gen *nrcE* por PCR utilizando los oligonucleótidos H45 y H46' (Tabla 2). Tal como se aprecia en la Figura 12, la mayoría de las estirpes desnitrificantes de *T. thermophilus* analizadas muestran un amplicón de 1092 pb, que equivale al tamaño del gen *nrcE* en la estirpe NAR1, incluyendo las cepas B y RQ-1, mientras que las cepas PRQ16, PRQ21, PRQ23 y PRQ27 presentan un amplicón de 39 pb, igual al tamaño de *nrcE* que se había descrito al analizar el genoma de PRQ25. Por ello, podemos concluir

por un lado que la ausencia de *NrcE* es menos frecuente en las cepas estudiadas de lo que hacen suponer las secuencias publicadas en la base de datos (PRQ25, SG0.5 o *T. scotoductus*) y por otro lado, que no hay relación clara entre la presencia de *nrcE* en el genoma de las diferentes cepas y la presencia de los genes *nor*.

5.2. Transferencia horizontal de la maquinaria desnitrificante por conjugación

En un experimento de transferencia lateral de genes se quiso comprobar si las estirpes desnitrificantes de *T. thermophilus* podían transferir por conjugación todos los genes implicados en la desnitrificación, al igual que ya se había demostrado con el elemento NCE codificante de la respiración de nitrato (Ramírez-Arcos y cols., 1998a). Para comprobarlo se decidió hacer un ensayo de conjugación entre la cepa desnitrificante PRQ25 y la cepa aerobia HB27_{gdh}. Para ello, ambas estirpes se incubaron juntas durante 16 horas sobre un filtro de nitrocelulosa en placas de TB. Posteriormente, las células extraídas del filtro se seleccionaron por crecimiento anaerobio con nitrato o nitrito en medio líquido con kanamicina, como se detalla en Materiales y Métodos.

Una vez seleccionados los transconjugantes, se encontró que un gran número de ellos eran capaces de reducir nitrato y que, a su vez, muchos de ellos (20 de 50 analizados), que en su mayoría habían sido seleccionados inicialmente con nitrito, eran capaces de consumir tanto el nitrato como el nitrito. De todos éstos se seleccionaron 2 clones para su análisis: un derivado capaz de reducir sólo nitrato (C-5) y otro capaz de reducir tanto el nitrato como el nitrito (C-15) (Figura 13.A). Utilizando el DNA total de ambos derivados como molde, se amplificaron por PCR los genes *narC*, *nirS* y *norC*. Como se observa en la Figura 13.B, *narC* está presente en ambas estirpes, C-5 y C-15, mientras que *nirS* y *norC* sólo se encuentra en la cepa C-15. Paralelamente se hicieron inducciones de ambas estirpes con nitrato 20 mM en anaerobiosis, para después detectar por Western-Blot las proteínas NarG, NirS y NorC, confirmando que los genes no solo habían sido transferidos sino que también se expresaban correctamente (Figura 13.C). De hecho, la proteína NarG se detecta en ambas cepas, mientras que NirS y NorC sólo son detectadas en la cepa C-15. Para confirmar que los transconjugantes C-5 y C-15 eran derivados de HB27_{gdh} y no mutantes resistentes a kanamicina derivados de PRQ25, se obtuvieron las proteínas de membrana y se comparó su patrón de bandas con el de los parentales en un gel SDS-PAGE. El resultado mostró que tanto C-5 como C-15 eran derivados de la cepa HB27_{gdh} (Figura 13.D).

Estos datos demuestran que, además de la respiración de nitrato, la respiración de nitrito y de óxido nítrico pueden ser transferidas por un proceso de conjugación a cepas aerobias de *T. thermophilus* en un solo paso.

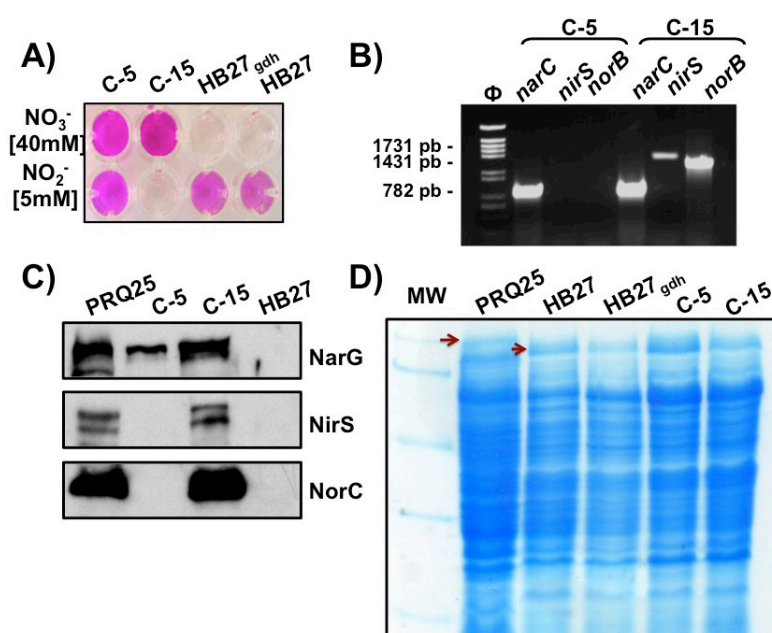


Figura 13. Caracterización de las cepas transconjugantes C-5 y C-15. **A)** Detección de producción y consumo de nitrito de los transconjugantes C-5 y C-15 a partir de 40 mM de nitrato y 5 mM de nitrito después de incubarlos a 70°C durante 2 días. HB27 y HB27_{gdh} (estirpe receptora) se utilizaron como controles negativos. **B)** Amplificación de los genes *narC* (782 pb), *nirS* (1620 pb) y *norB* (1431 pb) en

las estirpes transconjugantes C-5 y C-15. El tamaño del producto de PCR de *nirS* (1731 pb) corresponde a amplificar *nirS* desde una región anterior (a 121 pb del origen del gen) utilizando el oligonucleótido 3c (Tabla 2). **C)** Western-Blot para detectar NarG, NirS y NorC en C-5 y C-15 inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C. Se utilizaron como controles HB27 y PRQ25. **D)** Comparación del patrón de bandas de proteínas de membrana de las estirpes donadora (PRQ25) y receptora (HB27_{gdh}) con las estirpes transconjugantes (C-5 y C-15). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales de la capa S de cada cepa. Como control se utilizó la cepa HB27.

Paralelamente, debido a la dificultad que ofrece la cepa PRQ25 en su manipulación genética, en el laboratorio se trató de obtener por transformación otra cepa desnitrificante para usar como modelo de trabajo. Para ello se llevó a cabo un ensayo de transformación en dos pasos, con DNA total de PRQ25, de la estirpe HB27 que es mas fácilmente manipulable genéticamente que PRQ25. En el primer paso se aisló una cepa respiradora de nitrato que en un segundo paso adquirió la capacidad adicional de respirar nitrito. El resultado fue la estirpe derivada HB27d, que es capaz de llevar a cabo el proceso de desnitrificación de la misma manera que la cepa PRQ25 (Alvarez y cols., 2011) y que no presenta la limitación de selección por resistencia a antibiótico de la estirpe C-15 (resistente a kanamicina).

en su totalidad por el elemento NCE. Ésto explicaba por qué el contig 38 no pudo ser alineado con la secuencia del megaplásmido pTT27 de la cepa aerobia HB27. Un anotación a mano de los contigs junto con alineamientos de las secuencias con el genoma de PRQ25 nos permitió determinar que el entorno génico de la maquinaria desnitrificante en el genoma de C-15 tenía una identidad muy alta con el encontrado en PRQ25. Al realizar un alineamiento entre los posibles 33 contigs del megaplásmido de C-15 con un borrador de la secuencia completa del megaplásmido de PRQ25, solo pudimos alinear y ordenar 15 de estos contigs, con una cobertura menor a la obtenida en el alineamiento con el pTT27 de HB27. Paralelamente, se llevó a cabo una búsqueda en el genoma de C-15 del gen TTHB144 de la estirpe HB8, que codifica una proteína hipotética en uno de sus megaplásmidos y se encuentra también en PRQ25 pero no en HB27. El gen se encontró también en el contig 38 de la cepa transconjugante que, como mostraban los datos anteriores, pertenece a los 33 contigs seleccionados para formar parte del megaplásmido. Todos estos datos nos llevaron a pensar que una región del megaplásmido de PRQ25 se había transferido por conjugación habiéndose podido producir un fenómeno de reorganización por recombinación homóloga.

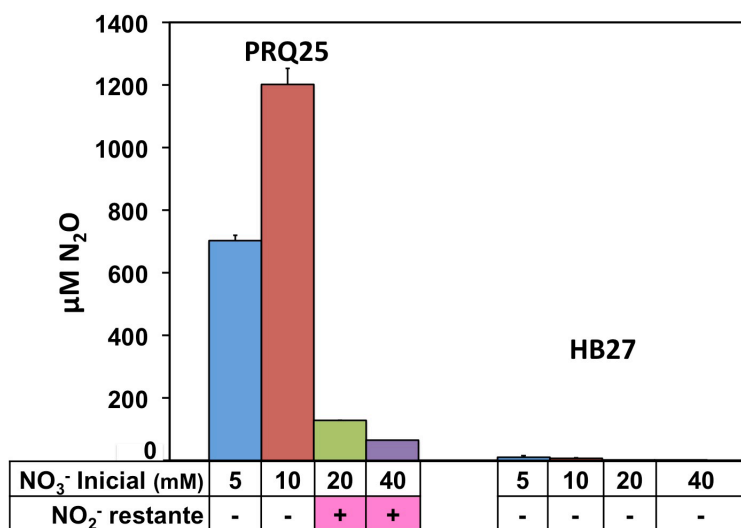


Figura 15. Producción de N₂O por la cepa PRQ25. Comparación de las concentraciones de óxido nítrico producido por la cepa PRQ25 a partir de la cantidad de nitrato indicada después de 2 días de incubación a 70°C en condiciones de anaerobiosis. También se indica la presencia (+) o ausencia (-) de nitrito después del periodo de incubación. La cepa aerobia se utilizó como control negativo.

5.3. Identificación del producto final de la desnitrificación

Utilizando la cepa PRQ25 como modelo en la desnitrificación quisimos determinar qué cantidad de nitrato era la más adecuada para estudiar la acumulación de óxidos de nitrógeno gaseosos en *T. thermophilus*. Para ello, la cepa PRQ25 se creció en anaerobiosis, en presencia de concentraciones crecientes de nitrato (5, 10, 20 y 40 mM) y posteriormente se midió la cantidad de óxido nítrico producido mediante cromatografía de gases, así como la presencia de nitrito remanente en el medio al cabo de dos días.

Como se puede observar en la Figura 15, PRQ25 no consume todo el nitrito producido cuando se parte de una concentración de nitrato igual o superior a 20 mM, siendo éste acumulado en el medio. Sin embargo por debajo de 10 mM de nitrato, el nitrito producido se consume completamente y la producción de N_2O es entre 3 y 5 veces mayor.

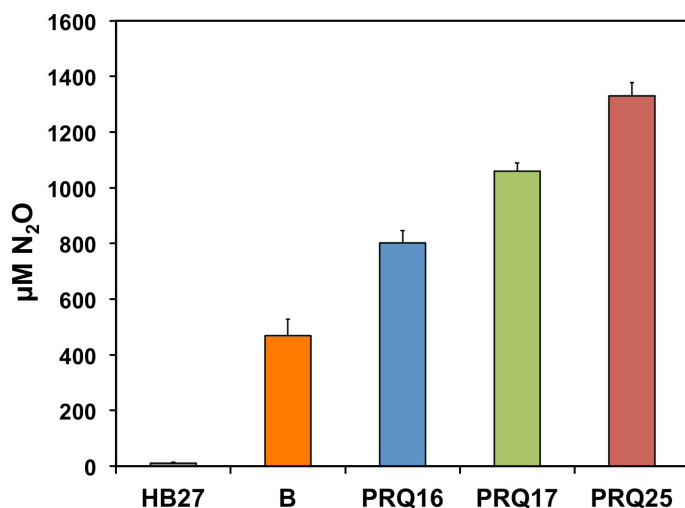


Figura 16. La acumulación de N_2O en cepas desnitrificantes de *T. thermophilus*. Producción de óxido nitroso en cultivos anaerobios de diferentes estirpes de *T. thermophilus* crecidas durante 5 días a 70°C en presencia de 10 mM de nitrato.

Analizando por cromatografía de gases el espacio de cabeza de cultivos en anaerobiosis con nitrato 10 mM de algunas de las estirpes de *T. thermophilus* utilizadas previamente, pudimos comprobar que, al menos, el proceso de desnitrificación llegaba hasta la producción de óxido nitroso en todas ellas (Figura 16), incluyendo la cepa B para la que no se habían detectado los genes correspondientes a la óxido nítrico reductasa.

5.3.1. ¿Existe una óxido nitroso reductasa en PRQ25?

La concentración de óxido nitroso producido por PRQ25, una vez consumido el nitrato a 5 y 10 mM, fue de alrededor de 0,7 y 1,2 mM respectivamente (Figura 15) y la cantidad aparente acumulada por las otras estirpes fue incluso inferior (Figura 16). Estas concentraciones equivalen a menos del 30% de la concentración esperable por la estequiometría del experimento si el óxido nitroso fuese el producto final de la desnitrificación. Este resultado sugería la posible existencia de una óxido nitroso reductasa que estuviese reduciendo el óxido nitroso que no estaba siendo detectado, a nitrógeno gaseoso (N_2).

Sin embargo, el análisis bioinformático de la secuencia preliminar de PRQ25 no permitió identificar ningún homólogo a la óxido nitroso reductasa (NosZ) de otros organismos,

lo que nos llevó a conjeturar sobre la existencia de una actividad NOS no relacionada con las óxido nitroso reductasas publicadas. Puesto que recientemente ha sido descrita la actividad reductasa de N₂O a N₂ asociada a una oxidasa de múltiples centros de cobre con actividad lacasa (McoP) de *Pyrobaculum aerophilum* (Fernandes y cols., 2010), y dado que existen homólogos de esta enzima en la cepa HB27 (TTC1370, lacasa) (Miyazaki, 2005) e incluso en la estirpe PRQ25 (Figura 17), nos planteamos la posibilidad de que fuera ésta la enzima responsable de la aparente desaparición de N₂O en los ensayos de crecimiento anaerobio.

	1				50
Pyro._aerophilum_McoP	MITRRRFLQI	GLGAGAMLAM	GFTLQYILRT	GEVKRPETSA	PVPPLIKEAT
HB27_TTC1370	MLARRSFLQA	AAGS...LVL	GLARAQGPSF	PEPKVVRSQG	GLLSLKLKLSAT
PRQ25_Lacasa	MLARRSFLQA	AAGS...LVL	GLARAQGPSF	PEPKVVRSQG	GLLSLKLKLSAT
	51				100
Pyro._aerophilum_McoP	YIEATASGYM	AEGVLN...	..PTIILRRG	QRVDMTLKNK	LTEPTIVHWH
HB27_TTC1370	PTPLALAGQR	ATLLTYGGSF	PGPTLRVVRPR	DTVRLTLENR	LPEPTNLHWH
PRQ25_Lacasa	PTPLALAGQR	ATLLTYGGSF	PGPTLRVVRPR	DTVRLTLENR	LPEPTNLHWH
	101				150
Pyro._aerophilum_McoP	GFDVNWANDA	HPSFAITPGE	SYNYSFDVVN	R.AGTYLYHP	HPHGLTAKQF
HB27_TTC1370	GLPISPKVDD	.PFLEIPPGE	SWTYEFTVPK	ELAGTFWYHP	HLHGRVAPQL
PRQ25_Lacasa	GLPISPKVDD	.PFLEIPPGE	SWTYEFAVPK	ELAGTFWYHP	HLHGRVAPQL
	151				200
Pyro._aerophilum_McoP	YMGQLGLVIV	EDSGSDLGFK	YGVNDLPLVI	SDRRFIGGAP	VYNPTPMEMI
HB27_TTC1370	FAGLLGALV	ESSLDAIPEL	REAEHLLVL	KDLALQGGRP	AP.HTPMDWM
PRQ25_Lacasa	FAGLLGALV	ESSLDAIPEL	REAEHLLVL	KDLALQGGRP	AP.HTPMDWM
	201				250
Pyro._aerophilum_McoP	AGFLGNAVLV	NGVKDAVFKL	SGGSYRLRLV	NGSNARLYML	SIVKKNQDVV
HB27_TTC1370	NGKEGDLVLV	NGALRPTLVA	QKATLRLRL	NASNARYYRL	ALQDH.....
PRQ25_Lacasa	NGKEGDLVLV	NGALRPTLVA	QKATLRLRL	NASNARYYRL	ALQDH.....
	251				300
Pyro._aerophilum_McoP	PMRLIAVDQG	FLARPIEVRA	LFLAPAERA	VVVELG.EGV	YLLKNTPFDP
HB27_TTC1370	PLYLIAADGG	FLEEPLEVSE	LLLAPGERAE	VLVRLRKEGR	FLLQALPYDR
PRQ25_Lacasa	PLYLIAADGG	FLEEPLEVSE	LLLAPGERAE	VLVRLRKEGR	FLLQALPYDR
	301				350
Pyro._aerophilum_McoP	..MHLEMHG	MQEALPEG.S	EYTIATFLVE	GKG.EAVPVE	ALSDPPPEPP
HB27_TTC1370	GAMGMMDMGG	MAHAMPQGPS	RPETLLYLIA	PKNPKPLPLP	KALSFPTLP
PRQ25_Lacasa	GAMGMMDMGG	MAHAMPQGPS	RPETLLYLIA	PKNPKPLPLP	KALSFPTLP
	351				400
Pyro._aerophilum_McoP	KPTRTRRFAL	S..LSGMQWT	INGMFWNASN	PLFEHVSVEG	VELWEIVNDK
HB27_TTC1370	APVVTRRLVL	TEDMMAARFF	INGQVFDHRR	.VDLKGQAQT	VEVWEVEN.Q
PRQ25_Lacasa	APVVTRRLVL	TEDMMAARFF	INGQVFDHRR	.VDLKGQAQT	VEVWEVEN.Q
	401				450
Pyro._aerophilum_McoP	ASMPHPMHLH	GFPMWIIERK	DSPRQVAELA	VDNRGRLPTD	LGLKDTVLIW
HB27_TTC1370	GDMDHFPFHLH	VHPFQVLSVG	GRP.....FPY	RAWKDVVNLK
PRQ25_Lacasa	GDMDHFPFHLH	VHPFQVLSVG	GRP.....FPY	RAWKDVVNLK
	451				491
Pyro._aerophilum_McoP	PGETVKIVVN	FDAKKGQLF	PFHCHNLEHE	DGGMMINIAV	K
HB27_TTC1370	AGEVARLLVP	LREKGR...T	VFHCHIVEHE	DRGMMGVLEV	G
PRQ25_Lacasa	AGEVARLLVP	LREKGR...T	VFHCHIVEHE	DRGMMGVLEV	G

Figura 17. Alineamiento de McoP de *Pyrobaculum aerophilum* con TTC1370 de *T. thermophilus* HB27 y Lacasa de PRQ25.

Para analizar la implicación de esta proteína en el proceso de desnitrificación, se generaron mutantes de inserción en el gen TTC1370 de la estirpe desnitrificante HB27d (HB27d [lac]) y de la estirpe aerobia HB27 (HB27 [lac]), utilizando para ello el plásmido pK18/lac (Tabla 4) que tenía clonado un fragmento interno de 500 pb del gen. La transformación de ambas estirpes con esta construcción no replicativa, requiere la inserción recombinativa para su mantenimiento, lo que provoca la generación de mutantes en el gen afectado (Figura 18.A). Con los mutantes Δ/lac se comparó la concentración de óxido nitroso producido con la de sus cepas parentales tras una incubación anaerobia de 5 días en presencia de 10 mM de nitrato. Los resultados del experimento (Figura 18.B) mostraron que el mutante HB27d [lac] producía los mismos niveles de N_2O que su estirpe parental, lo que nos permitió concluir de que este gen no está implicado en la posible reducción de óxido nitroso *in vivo* en *T. thermophilus*.

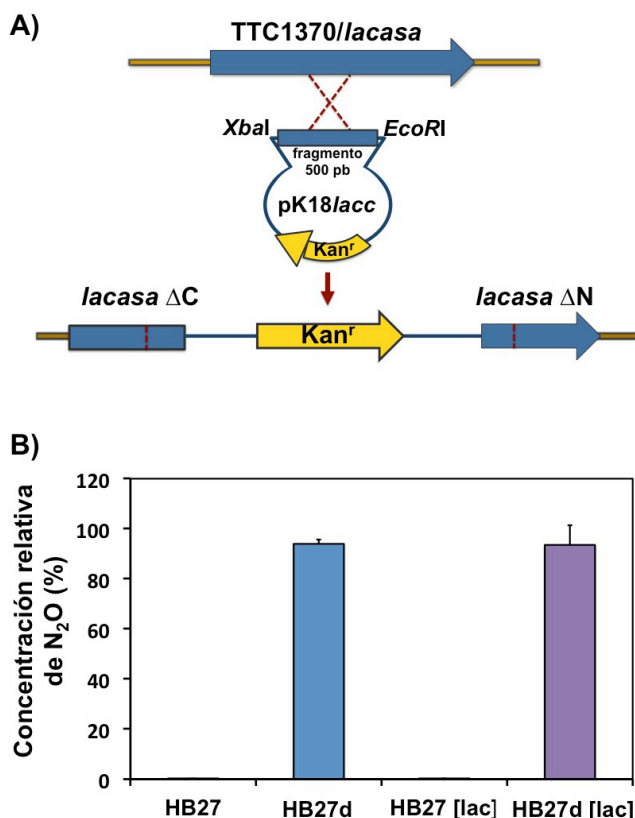


Figura 18. Mutantes de inserción en la lacase. **A)** Esquema de la construcción de mutantes de inserción del gen TTC1370 (lacase), por recombinación homóloga, utilizando el plásmido no replicativo pK18 con un fragmento interno del gen de 538 pb, clonado a XbaI, EcoRI. **B)** Comparación de las concentraciones relativas de óxido nitroso producido a partir de 10 mM de nitrato después de 5 días de incubación anaerobia a 70°C de los mutantes de inserción en el gen TTC1370 (HB27d [lac] y HB27 [lac]) con sus estirpes parentales.

5.3.2. Óxido nitroso como producto final de la desnitrificación en *T. thermophilus* PRQ25

Dado que no se detectaron diferencias en la cantidad de N_2O producido en los mutantes Δ/lac , sospechamos que el bajo nivel de conversión de nitrato a óxido nitroso detectado (<30%) podría ser consecuencia del escape del gas del sistema de ensayo y no a su

conversión a N_2 . Esto nos llevó a efectuar ensayos con trazadores isotópicos. Para ello se realizaron ensayos de crecimiento anaerobio de las estirpes PRQ25 y HB27d en presencia de 5 mM de nitrato marcado con $[^{15}N]$. Como se muestra en la Figura 19, se detectó la acumulación de óxido nitroso en el espacio de cabeza de los cultivos de las cepas desnitrificantes, mientras que no se apreció acumulación alguna de N_2 . Este dato muestra claramente que el proceso de desnitrificación en *T. thermophilus* termina realmente con la producción de óxido nitroso, sin ser reducido con posterioridad a N_2 .

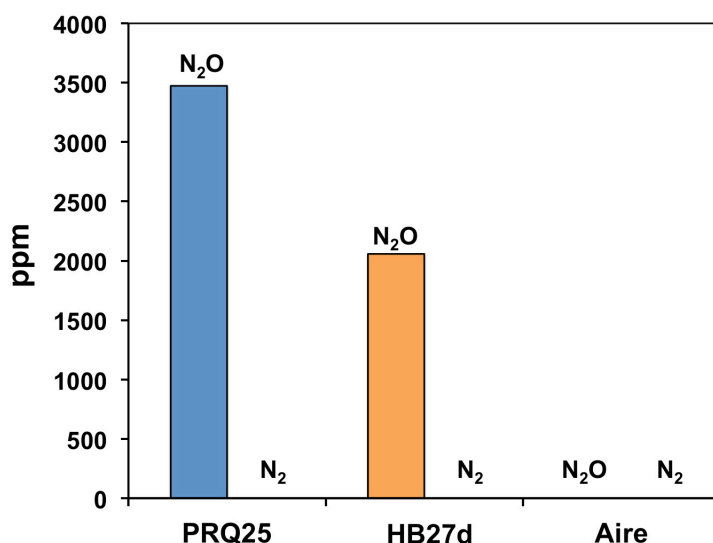


Figura 19. Comparación de las concentraciones en ppm de ^{15}N en forma de óxido nitroso y di-nitrógeno en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 5 mM de nitrato de las cepas desnitrificantes PRQ25 y HB27d después de una incubación de 5 días a 70°C. Como control se utilizó una muestra de aire sin cultivo.

5.4. Análisis funcional de los genes *nor*

Al realizar mediciones de producción de óxido nitroso por cromatografía de gases de las cepas HB27d, C-5 y C-15 después de crecimientos anaerobios en presencia de 10 mM de nitrato, se pudo detectar la presencia de óxido nitroso sólo en las cepas que habían adquirido los genes del operón *nor* (HB27d y C-15), pero no en la cepa C-5 (Figura 20). Este resultado parecía apoyar la hipótesis de que los genes *nor* forman parte de la maquinaria de desnitrificación.

Sin embargo, a la vista de los resultados publicados en 1999 sobre la capacidad del citocromo *ba3* de *T. thermophilus* de reducir NO a óxido nitroso *in vitro* (Giuffrè y cols., 1999) decidimos comprobar si esta enzima podía estar interviniendo en la producción de óxido nitroso durante el proceso de desnitrificación. Para ello se construyeron mutantes del gen que codifica el citocromo *ba3* (*cytba3*) por inserción del plásmido no replicativo pH118*cytba3* en las cepas HB27 y HB27d. El plásmido se insertaba en medio de *cytba3* por recombinación homóloga provocando la mutación del gen, dotando a

la cepa de la resistencia a higromicina, de la misma manera que se habían obtenido los mutantes Δ/acc (Figura 18). Las estirpes mutantes resultantes se utilizaron en un experimento de crecimiento anaerobio en presencia de 10 mM de nitrato a 60°C y se midió la cantidad de óxido nitroso en el espacio de cabeza del cultivo después de 24 horas de incubación. Este experimento se realizó a 60°C debido a que, a temperaturas superiores, la termo-estabilidad de la resistencia a la higromicina se ve comprometida.

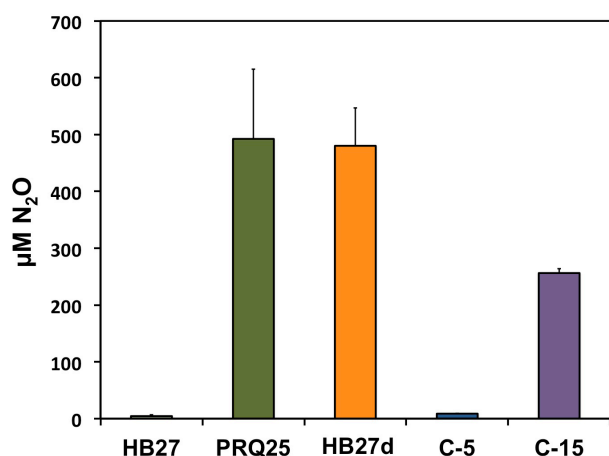
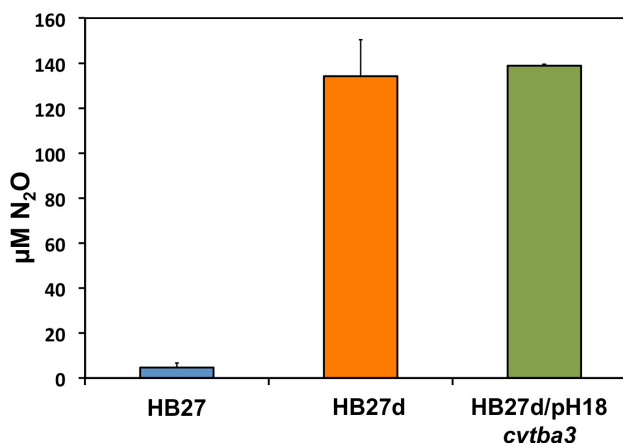


Figura 20. Producción de óxido nitroso en cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de las estirpes transconjugantes C-5 y C-15 al cabo de 24 horas a 70°C . Se utilizó como control negativo las cepa aerobia HB27 y como control positivo la estirpe PRQ25.

Tal y como se puede observar en la Figura 21 no se detectaron diferencias significativas en los niveles de N₂O entre los mutantes del gen *cytba3* y sus estirpes parentales, lo que sugiere que el citocromo *ba3* no utiliza el NO como sustrato *in vivo* durante la desnitrificación, dejando como único candidato para la reducción de NO a la óxido nítrico reductasa codificada por el operón *nor*.

Figura 21. Comparación de la producción de óxido nitroso entre los mutantes de inserción del gen *cytba3* y sus estirpes parentales después de 24 horas de incubación a 60°C.



5.4.1. Aislamientos de mutantes *nor*

Para estudiar la implicación de las proteínas del operón *nor* en el proceso de reducción de óxido nítrico, y por lo tanto en el proceso de desnitrificación de *T. thermophilus*, se

decidió construir mutantes en cada uno de los tres genes, siguiendo los protocolos explicados en la sección de generación de mutantes de materiales y métodos. En todos los casos se empleó la cepa HB27d por su sensibilidad a kanamicina y alta eficiencia de transformación.

Los mutantes $\Delta norC$ y $\Delta norH$ se llevaron a cabo mediante el protocolo de generación de mutantes de delección, mientras que el mutante $\Delta norB::kat$ es un mutante de sustitución al que se le introdujo el gen de resistencia a kanamicina reemplazando al gen *norB* en su misma orientación para evitar efectos polares sobre el promotor *Pnor*, a causa del promotor fuerte que controla la expresión de la resistencia a kanamicina (*PslpA*) (Figura 22.A). En la Figura 22.B se pueden ver las PCR de comprobación de la presencia o pérdida del gen en el caso de $\Delta norC$ y $\Delta norH$ y sus respectivos controles, y la diferencia de tamaño entre el gen de la resistencia a kanamicina y el gen *norB* en el mutante de sustitución y su control.

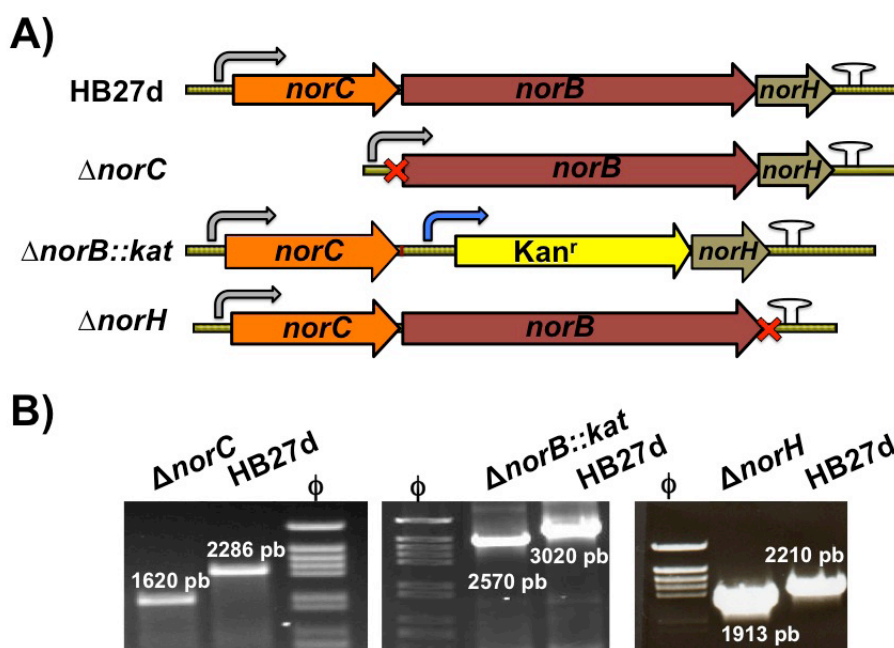


Figura 22. Mutantes del operón *nor*. **A)** Esquema de la construcción de los mutantes en el operón *nor*; las cruces rojas (X) marcan la delección de los genes que se encontraban en esa posición; la flecha gris indica el origen de transcripción del operón *Pnor*; la flecha azul indica el promotor *PslpA* utilizado para expresar el gen de la resistencia a kanamicina y el lazo marca el posible terminador transcripcional. **B)** Productos de PCRs de comprobación de las mutaciones de delección y sustitución de los genes del operón *nor*. Se utilizaron oligonucleótidos que hibridaban de una región anterior de entre 500 y 800 pb (oligonucleótidos badM-Fw, 2b-dir, 3b-dir) y una región posterior entre 500 y 800 pb (oligonucleótidos 1c-rev, 2c-rev, 3c-rev) (Tabla 2) del gen que se quería comprobar la mutación.

5.4.2. Análisis funcional de los mutantes *nor*

Una vez contruidos los mutantes se decidió estudiar el efecto de cada una de las mutaciones en el crecimiento y la producción de óxido nítrico en anaerobiosis utilizando nitrato 10 mM como aceptor de electrones. Las cinéticas mostraron cómo todos los mutantes crecieron menos que la cepa parental HB27d (Figura 23.A). Al analizar la producción de óxido nítrico durante la misma cinética pudo observarse cómo la cantidad de N_2O acumulada por los mutantes $\Delta norC$ y $\Delta norB::kat$ fue cercana a la producida por el control negativo, mientras que en $\Delta norH$, el óxido nítrico producido fue menos de la tercera parte del generado por la estirpe parental HB27d, pero 10 veces mayor a la del mutante $\Delta norC$ (Figura 23.B).

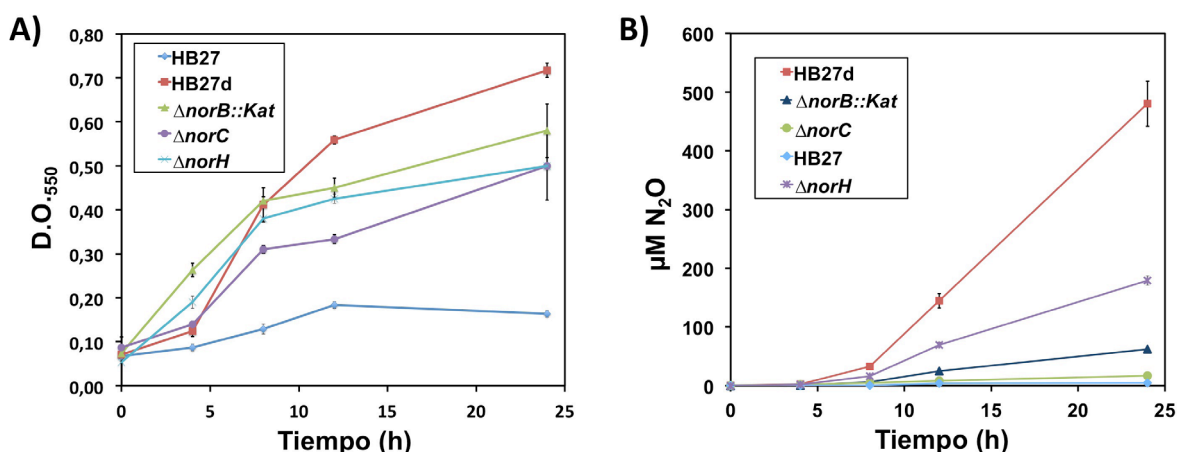


Figura 23. Crecimientos anaerobios de los mutantes *nor*. **A)** Cinética de crecimiento anaerobio con 10mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de los mutantes del operón *nor*. Se midió la turbidez de los cultivos a una D.O.₅₅₀. Como controles se utilizaron las cepas HB27d y HB27. **B)** Cinética de producción de óxido nítrico a partir de 10 mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de las cepas mutantes del operón *nor*. Como controles se utilizaron las estirpes HB27d y HB27.

Al hacer un Western-Blot para detectar la presencia de NorC en los mutantes inducidos con nitrato pudimos comprobar cómo la proteína sólo se detectaba en el mutante $\Delta norH$ (Figura 24.A). Este resultado, junto con los valores de producción de óxido nítrico, indicaron que el mutante $\Delta norH$ es capaz de expresar la óxido nítrico reductasa a nivel equivalente al parental, pero presentando defectos en cuanto a su actividad catalítica.

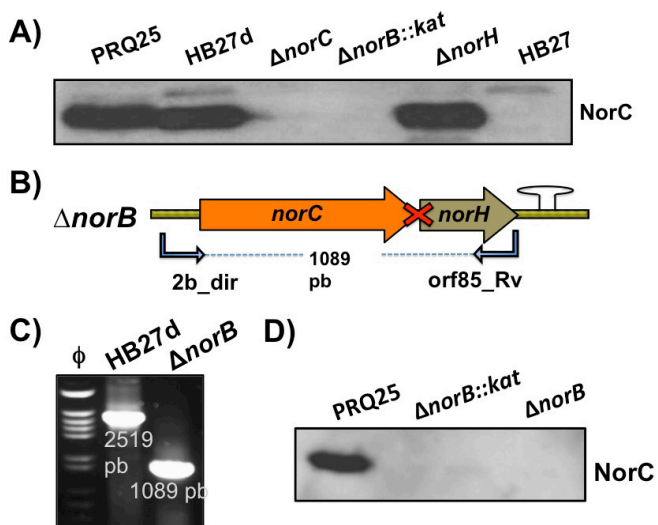


Figura 24. Detección de NorC en los mutantes *nor* **A)** Western-Blot para detectar la expresión de NorC en células totales de las diferentes cepas de *T. thermophilus*, tras ser inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C. **B)** Esquema del mutante limpio $\Delta norB$. La cruz roja (X) marca la delección del gen de resistencia a kanamicina y las flechas azules indican los oligonucleótidos utilizados para la PCR de comprobación del mutante. **C)** Producto de PCR de comprobación del mutante de

delección $\Delta norB$ utilizando como control positivo DNA de la cepa HB27d. **D)** Western-Blot para detectar la expresión de NorC en células totales de los mutantes $\Delta norB::kat$ y $\Delta norB$ tras ser inducidas con nitrato 20 mM durante 16 horas a 70°C, utilizando como control positivo la estirpe PRQ25.

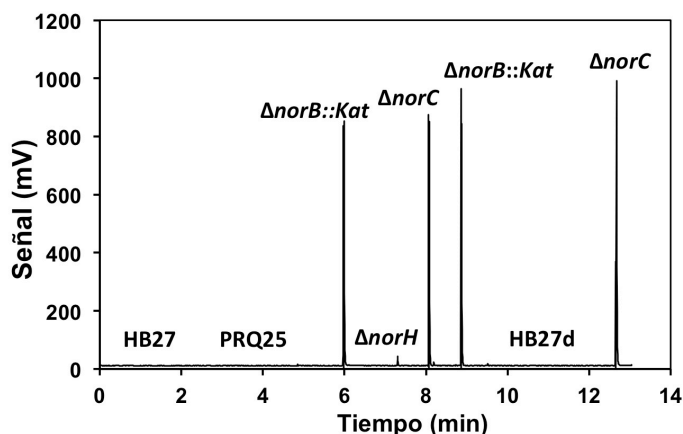
5.4.3. NorB es requerida para la síntesis de NorC

Sorprendentemente, NorC no aparece en el mutante $\Delta norB::kat$ (Figura 24.A). Esto podría ser debido a un problema de regulación o a la pérdida de estabilidad en su síntesis. Para asegurarnos de que esta deficiencia no se debía a efectos polares producidos por el cassette de kanamicina, se generó el mutante limpio $\Delta norB$ a partir de la cepa $\Delta norB::kat$, utilizando el plásmido pH118 $\Delta norB$ (Figura 24 B y C). Al realizar un Western-Blot para detectar NorC en el nuevo mutante inducido en anaerobiosis con nitrato, se pudo comprobar que NorC tampoco se expresaba (Figura 24.D), lo que demuestra que o bien existe un problema de regulación transcripcional o bien lo hay de estabilidad de la proteína NorC motivado por la ausencia de NorB.

5.4.4. Acumulación de NO en los mutantes *nor*

Para comprobar si los mutantes del operón *nor* acumulaban otros óxidos de nitrógeno durante el proceso de desnitrificación, se llevó a cabo una incubación en anaerobiosis con nitrato 10 mM durante 5 días. Las muestras de gas del espacio de cabeza de los cultivos se pasaron por un detector de óxido nítrico y se analizó en paralelo la presencia de nitrito en el medio. Los resultados mostraron que los tres mutantes acumulaban nitrito en el medio, mientras que en las cepas HB27d y PRQ25, no se

apreciaba nitrito, indicando una limitación en su reducción en esos mutantes. Por otro lado, mientras las estirpes desnitrificantes PRQ25 y HB27d no acumularon óxido nítrico a nivel detectable, los mutantes $\Delta norB::kat$ y $\Delta norC$ presentaron un espacio de cabeza saturado de este gas, en contraposición al mutante $\Delta norH$ que sólo acumulaba una pequeña cantidad de NO (17,8 μ M). Ésto confirma que la actividad óxido nítrico reductasa es funcional en este mutante, aunque menos eficiente (Figura 25).



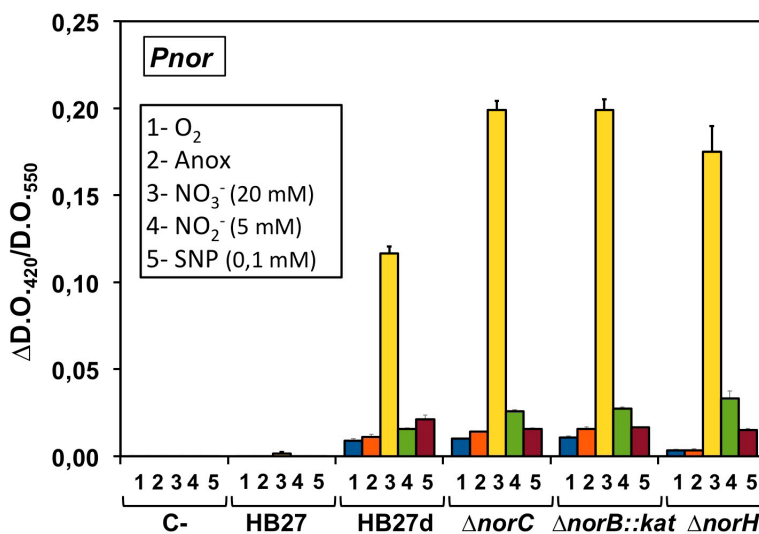
Estirpes	HB27	PRQ25	HB27d	$\Delta norB::Kat$	$\Delta norC$	$\Delta norH$
NO ₂ ⁻ restante	-	-	-	+	+	+

Figura 25. Acumulación de NO en los mutantes *nor*. Detección de óxido nítrico en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de los mutantes del operón *nor*, junto con las cepas HB27, HB27d y PRQ25, después de 5 días de incubación a 70°C. La tabla representa la presencia (+) o ausencia (-) de nitrito en el medio de los cultivos anaerobios de las mismas cepas después del período de incubación.

5.4.5. Inducibilidad del promotor *Pnor* en los mutantes *nor*

Dada la no detección de NorC en el mutante $\Delta norB::kat$, y como parte del estudio de los mutantes del operón *nor*, se decidió comparar la inducibilidad del promotor *Pnor* en los tres mutantes respecto a la cepa parental. Para ello, se transformaron todas las estirpes con el plásmido pMHP*nor* β -gal, que contiene la región que promotor *Pnor*, controlando el gen codificante de una β -galactosidasa termoestable, y se realizaron mediciones de actividad β -galactosidasa de cada una en diferentes condiciones de inducción (aerobiosis, anaerobiosis sin óxido de nitrógeno, o con nitrato 20 mM, nitrito 5 mM o SNP 100 μ M). Los resultados confirmaron que el nitrato es el inductor principal del promotor *Pnor*, aunque parece observarse un mayor nivel de actividad β -galactosidasa con este inductor en los mutantes que en la cepa parental HB27d (Figura 26). Por otro lado, estos datos demuestran que la ausencia de NorC en el mutante $\Delta norB::kat$ no es consecuencia del bloqueo en la transcripción desde este promotor, sino que ocurre a nivel posterior en el proceso de expresión génica.

Figura 26. Expresión del promotor *Pnor* en los mutantes *nor*. Actividad β -galactosidasa de los mutantes del operón *nor*, inducida en diferentes condiciones utilizando el plásmido pMH *Pnor*- β gal (Tabla 3). Como control negativo se utilizó la cepa HB27 sin plásmido. La actividad β -galactosidasa viene representada como variación de D.O.₄₂₀ (Δ D.O.₄₂₀) relativizada con la turbidez de cada cultivo.



5.5. Aislamiento, purificación y caracterización de la óxido nítrico reductasa de *T. thermophilus*

5.5.1. La actividad óxido nítrico reductasa está asociada a la membrana

Con el objetivo de confirmar la relación entre la actividad óxido nítrico reductasa y la membrana de *T. thermophilus*, que había sido predicha en el análisis bioinformático de NOR, se extrajeron las membranas de las cepas *T. thermophilus* HB27, HB27d y de sus mutantes en el operón *nor*, después de haber sido inducidos con nitrato, para llevar a cabo ensayos bioquímicos de actividad óxido nítrico reductasa como se detalla en la sección correspondiente de materiales y métodos. La concentración de proteínas de membrana presentes en los extractos obtenidos fue de aproximadamente 25 μ g/ml para todas las cepas. Después de incubar a 60°C los tubos con la mezcla de reacción, que incluye ascorbato como donador de electrones y NO como aceptor, se tomaron muestras del espacio de cabeza y se midió la cantidad de N₂O por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos mostraron que la muestra con membranas de la estirpe HB27d presentaba la mayor cantidad de N₂O acumulado, junto con el mutante Δ *norH*, mientras que los niveles del mutante Δ *norB::kat* quedaban en un punto intermedio entre los del mutante Δ *norC* y Δ *norH* (Figura 27). Paralelamente se pudo observar que existe una reducción de óxido nítrico a óxido nitroso en el tubo control sin membranas (C-), equivalente al obtenido a partir de las membranas de HB27 y similar al del mutante Δ *norC*, lo que parece indicarnos que existe una reducción natural de NO a N₂O en esas condiciones de reacción.

Los resultados obtenidos confirmaron que la actividad óxido nítrico reductasa está localizada en la membrana de *T. thermophilus*, tal y como se predice por la secuencia de NorC y NorB.

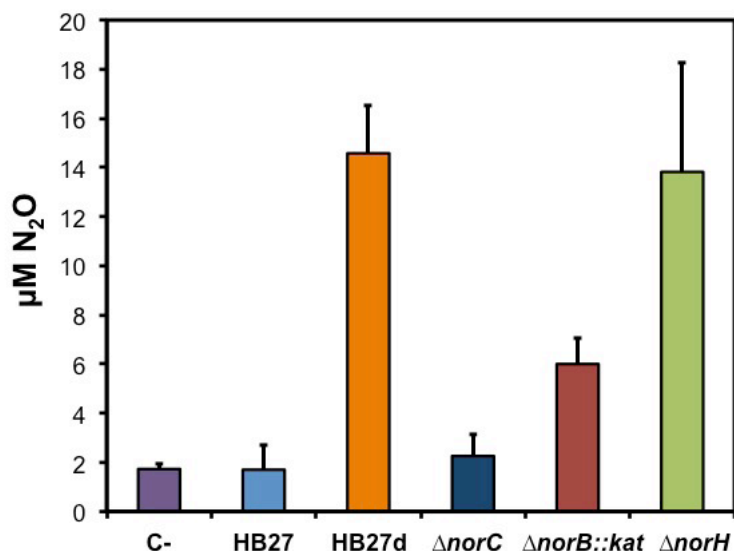


Figura 27. Producción de N₂O *in vitro*. Producción de óxido nítrico después de 24 horas, a partir de 100 µM de NO, utilizando extractos de membranas de las estirpes indicadas inducidas durante 16 horas con nitrato. Se utilizó como donador de electrones ascorbato 5 mM y 0,5 mM de TMP para transferir los electrones directamente hasta NOR.

5.5.2. NorH interacciona con NorC

Aunque la ausencia de *norH* no afecta a la actividad óxido nítrico reductasa *in vitro* (Figura 27), pero sí a la capacidad de crecimiento anaerobio y a la producción de N₂O *in vivo* (Figura 23.B), su conservación en las estirpes de *Thermus* sp. y entre algunas Aquificales indica un papel funcional relevante en la actividad NOR y sugiere la participación de NorH en la enzima. Para comprobar si la proteína NorH interacciona de alguna manera con las otras dos subunidades de la óxido nítrico reductasa, se generó un mutante de inserción de la cepa HB27d con el plásmido pK18*norH*-his. De esta manera, el mutante tenía sustituido el gen *norH* silvestre por *norH*-his, una fusión con una extensión carboxilo terminal de seis histidinas (Figura 28.A).

Para analizar el efecto de la mutación en la producción de óxido nítrico de la cepa HB27d *norH*-his, se realizó un crecimiento en anaerobiosis en presencia de nitrato 10 mM del mutante y se midió por cromatografía de gases la presencia de N₂O en el espacio de cabeza de los tubos después de 24 horas de incubación. Como se puede observar en la Figura 28.B, los niveles del gas en el mutante HB27d *norH*-his fueron muy similares a los del mutante de delección Δ*norH* y, por tanto, inferiores a los de la cepa parental HB27d, lo que nos hizo pensar que cualquier modificación de esta subunidad afectaba al rendimiento de la actividad óxido nítrico reductasa.

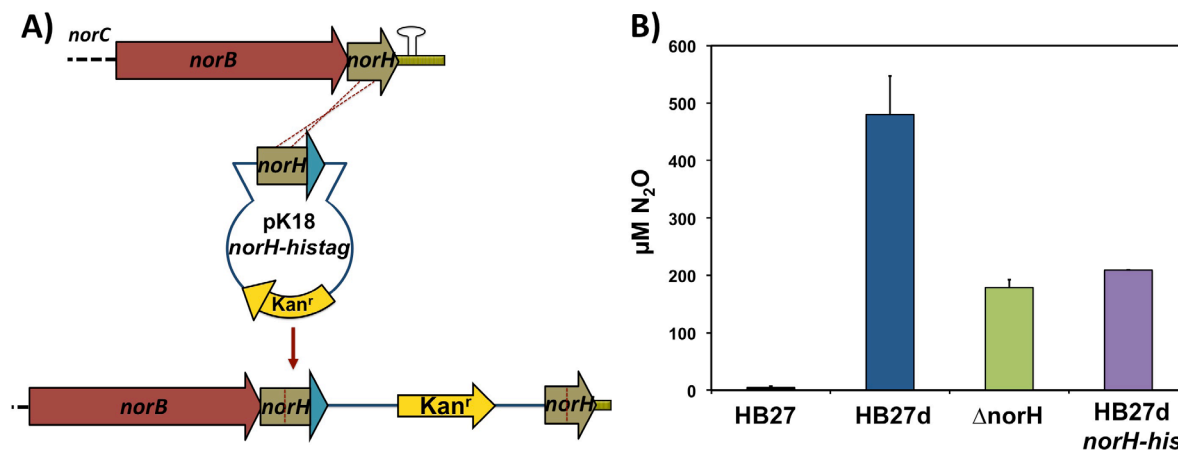
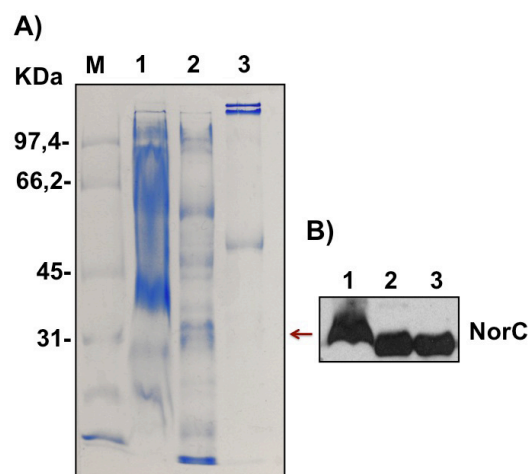


Figura 28. Generación del mutante *norH-his*. **A)** Esquema de la construcción del mutante HB27d *norH-his*, por recombinación homóloga, utilizando el plásmido no replicativo pK18*norH-his* con el gen *norH* fusionado a una extensión de 6 histidinas en el extremo 3' de su secuencia. El triángulo azul representa la extensión de secuencia codificante de 6 histidinas fusionada a *norH*. **B)** Actividad del mutante *norH-his*. Producción de óxido nítrico a partir de 10 mM de nitrato del mutante HB27d *norH-his* después de 24 horas de incubación a 70°C. Se utilizaron como controles las cepas HB27, HB27d y Δ *norH*.

Posteriormente, se llevó a cabo un experimento de extracción de membranas celulares a partir de 10 litros de cultivo del mutante HB27d *norH-his* inducido con nitrato. El producto de este procedimiento fue solubilizado con DDM y sometido a un protocolo de purificación de proteínas con resina de intercambio iónico de níquel. Las membranas solubilizadas se dejaron junto a la resina, girando a 4°C durante 16 horas para mejorar la interacción entre la etiqueta de polihistidinas y la resina de níquel. Tras los lavados, el eluido con imidazol fue analizado por SDS-PAGE y Western-Blot utilizando como anticuerpo primario α -NorC. Como se puede apreciar en la Figura 29.B, se pudo detectar NorC tanto en el eluido a 250 mM de imidazol (carril 2) como a 500 mM de imidazol (carril 3), así como en el extracto completo de membrana. Este dato confirma que NorH interacciona específicamente, al menos, con NorC.

Figura 29. Purificación de NOR a partir de membranas de HB27d *norH-his*. **A)** Extracto de proteínas de membrana totales y eluidas de la columna de níquel. El carril M corresponde al marcador de tamaños indicados a la izquierda en KDa. **B)** Western blot para detectar NorC en los extractos de proteínas. 1- extracto total de membrana solubilizado con DDM, 2- eluido con 250 mM de imidazol y 3- eluido con 500 mM de imidazo.



5.5.3. Sobreexpresión de NOR

Con el objetivo de comprobar si podíamos sobreexpresar NOR de forma activa de cara a su purificación, decidimos realizar un ensayo de complementación de la cepa mutante $\Delta norC$ con el plásmido pMKcNOR, cedido por el laboratorio del profesor Robert Gennis de la University of Illinois, Urbana, IL. El plásmido tenía clonado el operón *nor* bajo el control del promotor aerobio del gen codificante del citocromo *bc1* de *T. thermophilus*, con una extensión de polihistidinas fusionada al extremo carboxilo terminal de la proteína NorB y otro a la proteína NorH. Se escogió la estirpe mutante $\Delta norC$ para el ensayo ya que no presentaba resistencia a ningún antibiótico y mostraba un fenotipo bien identificable, por ser defectivo en NorC y no producir óxido nítrico durante el proceso de desnitrificación, aunque sí posee el resto de la maquinaria de desnitrificación activa, lo que permitiría seleccionar aquellos derivados que estuviesen produciendo la enzima funcional. Después de transformar la cepa mutante y obtener posibles clones positivos de $\Delta norC/pMKcNOR$, se llevó a cabo un crecimiento anaerobio en presencia de 10 mM de nitrato para después realizar una serie de ensayos de comprobación.

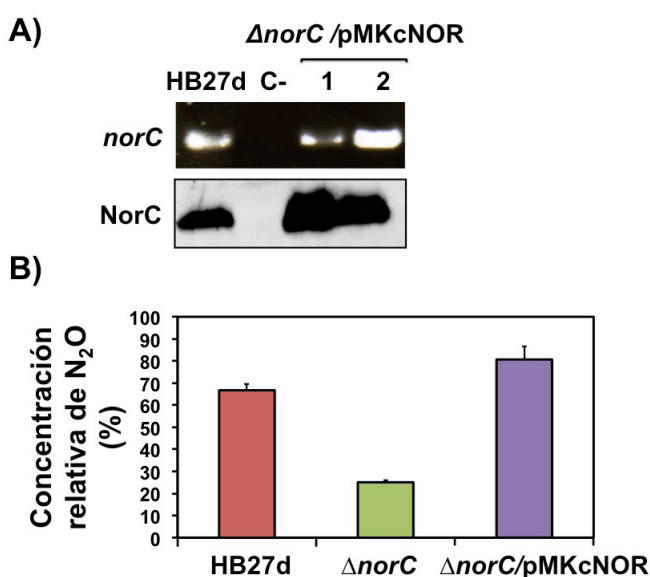


Figura 30. Complementación del mutante $\Delta norC$. **A)** Comprobación de la complementación de $\Delta norC$ con el plásmido pMKcNOR mediante amplificación de gen *norC*, y por Western blot para detectar NorC en las estirpes mutantes complementadas. 1 y 2 corresponden a dos clones de $\Delta norC$ complementados con el plásmido pMKcNOR. En ambos casos se utilizó el mutante $\Delta norC$ como control negativo. **B)** Producción relativa de óxido nítrico a partir de 10 mM de nitrato del mutante $\Delta norC/pMKcNOR$, al cabo de 5 días a 70°C. Las cepas HB27d y $\Delta norC$ se utilizaron como controles.

Como se puede observar en la Figura 30.A, la recuperación del gen *norC* en los mutantes complementados con el plásmido se confirmó por PCR. Por Western-Blot se volvió a detectar la presencia de la proteína NorC en los extractos totales de los mutantes complementados, pudiéndose observar unos niveles de NorC mayores que en la estirpe parental, lo que confirma la sobreexpresión de la proteína.

Al medir la cantidad de N₂O en el espacio de cabeza de los cultivos anaerobios en presencia de nitrato se pudo detectar un aumento en los niveles de este gas con respecto a la cepa mutante, que a su vez eran ligeramente superiores a los de la cepa HB27d (Figura 30.B). Estos resultados confirmaron que el mutante había sido complementado utilizando pMKcNOR y, por lo tanto, que NOR se estaba sobreexpresando de forma activa.

5.5.4. Expresión y purificación de NOR a partir del plásmido pMKcNOR

Una vez comprobado que el plásmido pMKcNOR daba lugar una proteína funcional, en colaboración con el laboratorio del Dr. Robert Gennis, se transformó la estirpe aerobia HB27 para tratar de purificar NOR. Se crecieron 12 litros de esta cepa para la extracción y solubilización de membranas y posterior purificación de proteínas por columna de afinidad de níquel como se describe en Materiales y Métodos. Para limpiar la muestra eluida de la columna de níquel, se utilizó además una columna de cobalto. La cantidad de proteína purificada finalmente fue de 1,15 mg/ml.

Tanto en la muestra obtenida de la columna de níquel como en la obtenida finalmente de la columna de cobalto, pudo detectarse por Western-Blot la presencia de NorC (Figura 31.B). Al realizar un espectro de absorción de la proteína purificada y reducida con ditionito, se pudieron detectar dos picos a 550 nm y a 560 nm, que correspondían a los grupos hemo *c* y hemo *b* de NorC y NorB respectivamente (Figura 32.A).

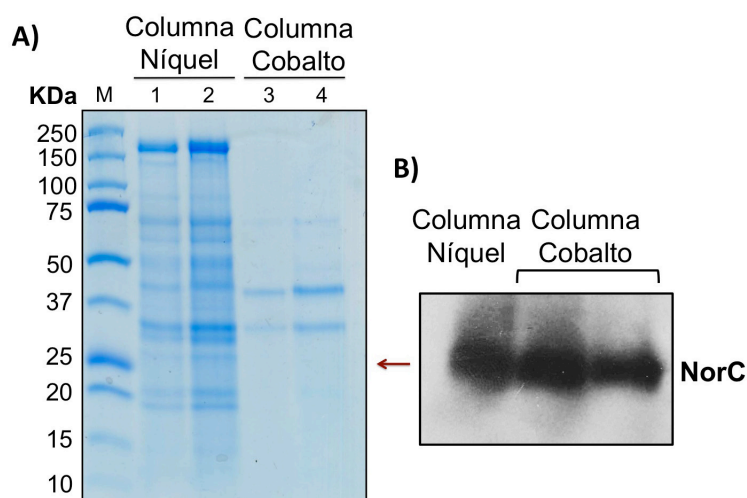


Figura 31. Purificación de NOR a partir membranas de HB27 pMKcNOR. **A)** Extracto de proteínas de mebrana eluidas de la columna de níquel (carriles 1 y 2 cargando 10 y 15 µl de muestra respectivamente) y tras diálisis y pasar la muestra por una columna de cobalto (carriles 3 y 4 cargando 10 y 15 µl de muestra respectivamente). El carril M

corresponde al marcador de tamaños indicados a la izquierda en kDa. **B)** Western-Blot para detectar NorC en los extractos de proteínas eluidos con ambas columnas.

Finalmente quisimos comprobar si la NOR purificada seguía siendo activa. Para ello se utilizó un electrodo de tipo Clark con el fin de medir el consumo de óxido nítrico en función del tiempo. La gráfica que se observa en la Figura 32.B muestra cómo la señal del electrodo aumenta en el momento en el que se añadió el NO a la cámara de reacción y la caída de la misma después de añadir la enzima. Después de realizar los cálculos se pudo determinar que en las condiciones del ensayo la tasa de consumo de NO fue de $8,84 \times 10^{-3}$ $\mu\text{moles de NO/seg.}\mu\text{gr de proteína}$.

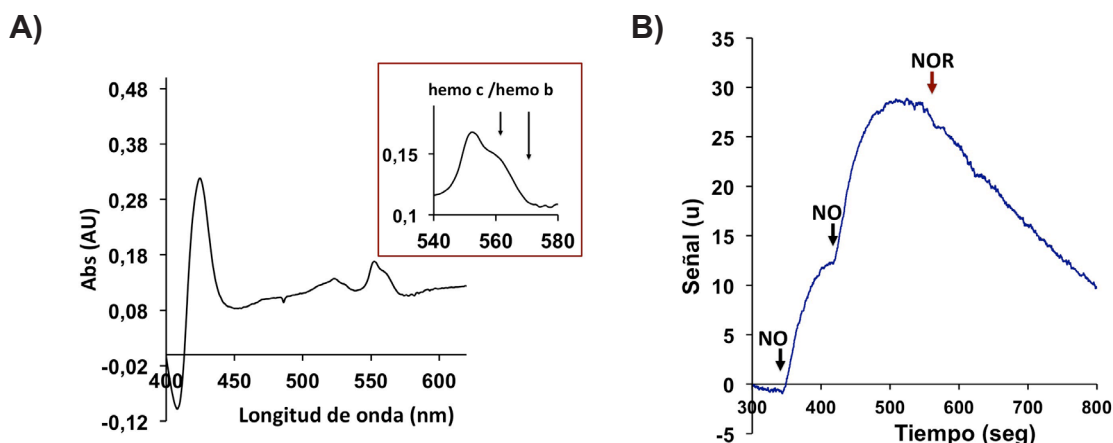


Figura 32. NOR de *T. thermophilus*. **A)** Espectro de absorción de NOR purificada reducida con ditionito. Recuadrado se ha ampliado el detalle de los picos del espectro correspondientes a los grupos hemo c y hemo b. **B)** Medición amperométrica del consumo de óxido nítrico. Las flechas negras marcan la adición de óxido nítrico (NO) a la mezcla de reacción; la flecha roja indica la adición de la óxido nítrico reductasa purificada (NOR) a la mezcla de reacción, que incluía ascorbato 10 mM y TMPD 0,5 mM para transferir los electrones directamente hasta el centro de reacción de NOR.

5.6. Desnitrificación en la cepa *T. thermophilus* B

Como se describe en los apartados anteriores, una de las estirpes que llamó nuestra atención fue *T. thermophilus* B, puesto que según los resultados obtenidos no presenta los genes del operón *nor*, pero es capaz de producir óxido nítrico en anaerobiosis a partir de nitrato.

Al llevar a cabo inducciones con nitrato de la estirpe B para detectar por Western-Blot la presencia de las proteínas implicadas en la desnitrificación, se descubrió que NorC no se expresaba (Figura 33). Este resultado se ajustaba a la imposibilidad de detectar el operón *nor* por PCR (Tabla 8), confirmando que esta cepa no presenta *norC*, pero volvía a contrastar con el hecho de que la cepa fuese capaz de producir óxido nítrico (Figura 16). Este hecho nos hizo pensar que otra enzima diferente estaba llevando a cabo la reducción de NO a N_2O .

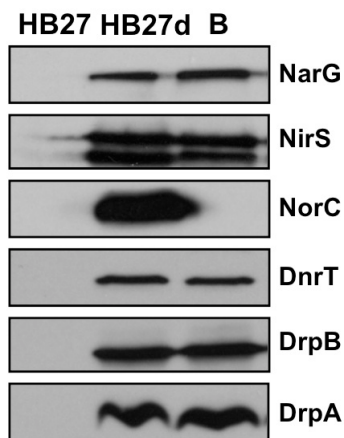


Figura 33. Expresión de las proteínas de la desnitrificación en *T. thermophilus* B. Western-Blot para detectar la expresión de las proteínas NarG, NirS, NorC, DnrT, DrpA y DrpB en las estirpes HB27, HB27d y B, después de ser inducidas con 20 mM de nitrato durante 16 horas a 70°C.

Para comparar el proceso de la desnitrificación en la cepa B con el de las cepas desnitrificantes tipo (PRQ25 y HB27d), se realizó una cinética de crecimiento en anaerobiosis con nitrato. El resultado confirmó que la estirpe *T. thermophilus* B es capaz de crecer con nitrato (Figura 34.A) y producir óxido nitroso, aunque mostrando una concentración de óxido nitroso en el espacio de cabeza al cabo de 24 horas de, aproximadamente, la mitad que la producida por las estirpes desnitrificantes (Figura 34.B). Por otro lado, después de 5 días de incubación en anaerobiosis con 10 mM de nitrato, la cepa B no fue capaz de consumir por completo el nitrito producido y acumuló una pequeña cantidad de NO en el espacio de cabeza (entre 10 y 95 µM) (Figura 35), mientras que, como ya habíamos visto en los ensayos de detección de óxido nítrico de los mutantes *nor*, las estirpes desnitrificantes PRQ25 y HB27d no acumulaban NO en el espacio de cabeza. Estos resultados indicaron que la cepa B llevaba a cabo el proceso de desnitrificación de manera menos eficiente que las cepas PRQ25 y HB27d, en ausencia de NorC.

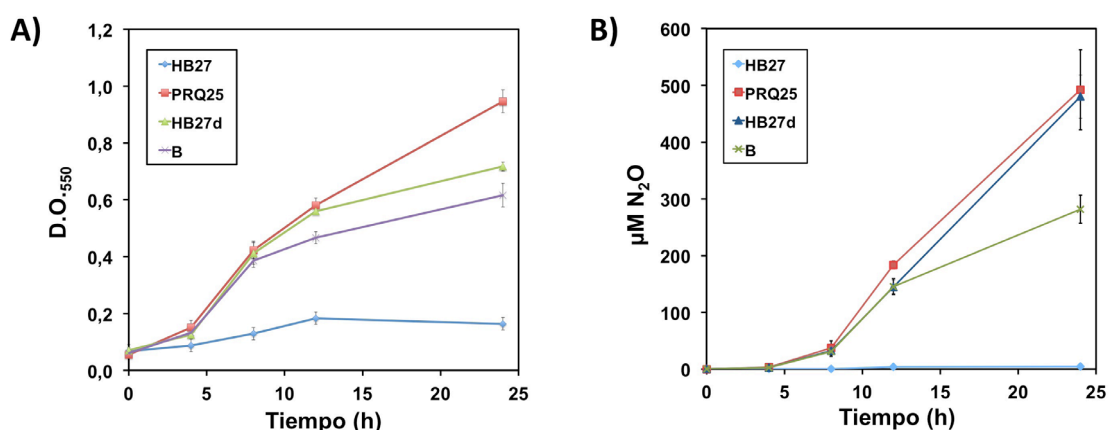


Figura 34. Desnitrificación en *T. thermophilus* B. **A)** Crecimiento en anaerobiosis con 10 mM de nitrato durante 24 horas a 70°C de las estirpes de *T. thermophilus* HB27, PRQ25, HB27d y B. Se midió la turbidez de los cultivos a una D.O.₅₅₀. Las barras de error corresponden al error típico. **B)** Producción de óxido nitroso a partir de 10 mM de nitrato a 70°C de las cepas de *T. thermophilus* HB27, B, PRQ25 y HB27d durante 24 horas. Las barras de error corresponden al error típico.

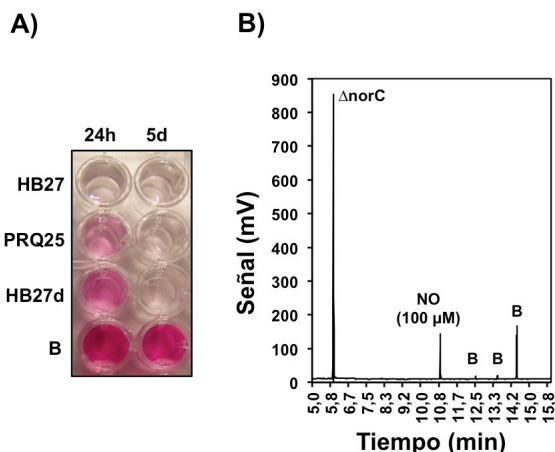


Figura 35. Detección de óxidos de nitrógeno en la cepa *T. thermophilus* B. **A)** Presencia de nitrito en los cultivos anaerobios de las cepas HB27, PRQ25, HB27d y B a partir de 10 mM de nitrato después de 24 horas y 5 días de incubación a 70°C. **B)** Detección de óxido nítrico en el espacio de cabeza de cultivos anaerobios con 10 mM de nitrato de la estirpe B después de 5 días de incubación a 70°C. Una solución de óxido nítrico 100 μM y una muestra del espacio de cabeza saturado de NO de la cepa $\Delta norC$ fueron usadas como controles.

Para profundizar más en el estudio de esta cepa decidimos secuenciar su genoma mediante la plataforma Illumina (Solexa). El resultado fue la obtención de 307 fragmentos de DNA secuenciados (contigs) de entre 200 pb y 67,4 Kpb con una cobertura media de 141,73 (Figura 36) y que cubrían un genoma de aproximadamente 2,3 Mpb, con un contenido en G+C del 68,6%. Utilizando el programa bioinformático M-GCAT pudo alinearse el 78% de la secuencia tanto con el genoma completo de HB27 como con el de la cepa HB8. Utilizando las secuencias conocidas de los genes de PRQ25 pudimos localizar los genes implicados en la desnitrificación de la cepa B repartidos en cinco de los contigs obtenidos.

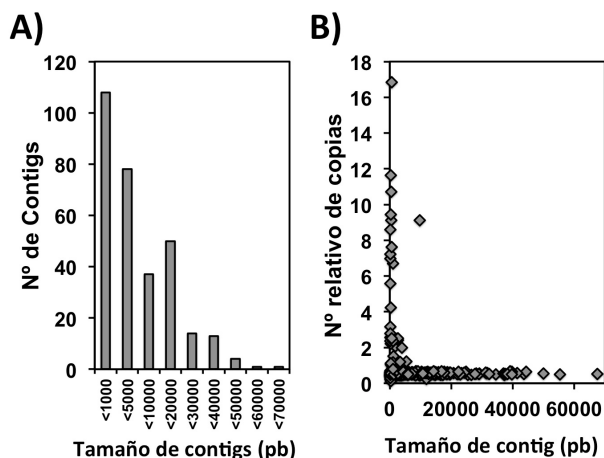


Figura 36. Análisis de la secuencia de *T. thermophilus* B. **A)** Distribución de tamaños de los contigs. **B)** Número relativo de copias de cada contig, calculado a partir del número de lecturas en función de su longitud y la cobertura media del genoma.

El elemento NCE de la cepa B se localizó en los contigs 146 y 45, que pudieron unirse a mano. Éste presenta los mismos agrupamientos génicos que el de NAR1 o PRQ25, aunque su secuencia tiene un grado de similitud de prácticamente el 100% con el de la cepa NAR1. De tal manera que pudimos comprobar cómo todos los genes del operón *nrc* están completos, incluso *nrcE* (como ya se había comprobado por PCR), confirmando su diferencia con PRQ25. De estos datos también se concluyó que el posible operón

feo que separa los operones *nrc* y *nar* y podría codificar un transportador de hierro homólogo al de *E. coli* (Kammler y cols., 1993), está deletado de idéntica forma a lo observado en la cepa NAR1. Además, y a diferencia de PRQ25, los transportadores NarK y NarT vuelven a estar presentes en el agrupamiento génico (Figura 37).

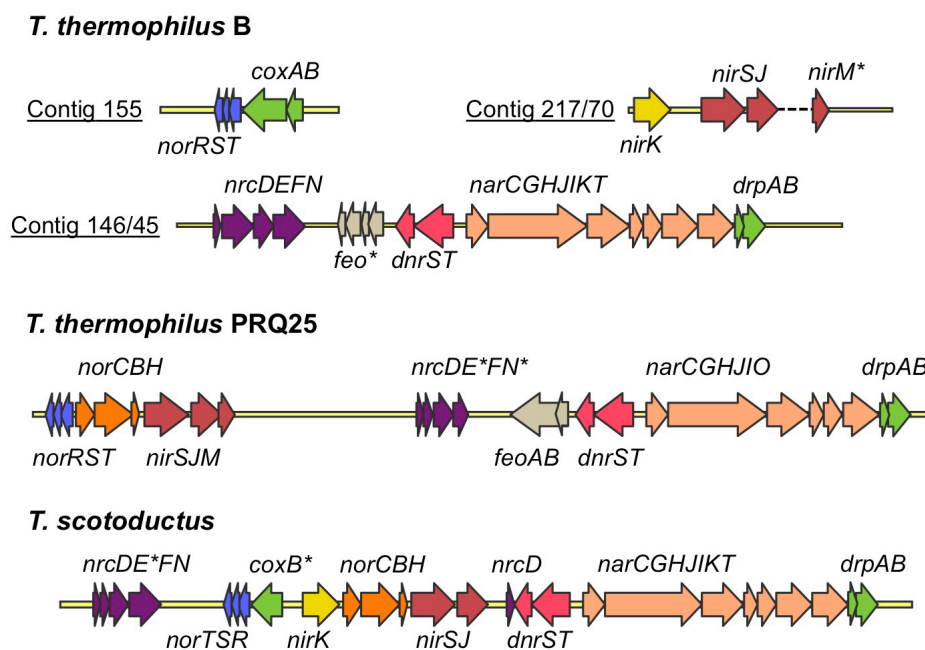


Figura 37. Comparación de los agrupamientos génicos de la maquinaria desnitrificante de *T. thermophilus* B, NAR1, PRQ25 y *T. scotoductus* SA.01. Los genes que presentan un asterisco (*) se encuentran mutados o incompletos.

Los genes que codifican la nitrito reductasa (*nirS*, *nirJ* y *nirM*) se localizaron en otros dos contigs, 70 y 217, que se reconstruyeron a mano. Junto a éstos, se encontró un gen homólogo a una posible nitrito reductasa de cobre (*nirK*) con un alto nivel de homología (92%) al gen *nirK* que está presente en *T. scotoductus* SA1.

Al hacer una búsqueda de los genes *norCBH* en el genoma secuenciado de la estirpe B no se obtuvo ningún resultado, lo que concordaba con los resultados previos donde no se pudo amplificar por PCR ninguno de los genes del operón y no se detectó NorC por Western-Blot. Sin embargo, los reguladores *norRST* sí se pudieron localizar en la secuencia de B en el contig 155. Justo a continuación de los reguladores (a 52 pb), en vez de encontrar los genes del operón *norCBH*, se halló un posible operón, al que se denominó *coxAB*, que codifica una posible citocromo/quinol oxidasa de hemo-cobre de dos subunidades, cuya predicción topológica la localiza en la membrana (Figura 38) y es homóloga a una identificada en *Hydrogenobacter thermophilus*. La subunidad

B del posible operón *cox* también tiene homología con una proteína de *T. scotocustus* de 383 aminoácidos que se encuentra codificada a 61 pb de los reguladores *norRST*. Sin embargo en *T. scotoductus* SA1, el posible operón *cox* parece estar truncado, ya que el gen que codifica la subunidad B de la citocromo/quinol oxidasa es 177 pb más pequeño que el que se observa en *T. thermophilus* B, y además no se encontró ningún gen que codifique la subunidad A.

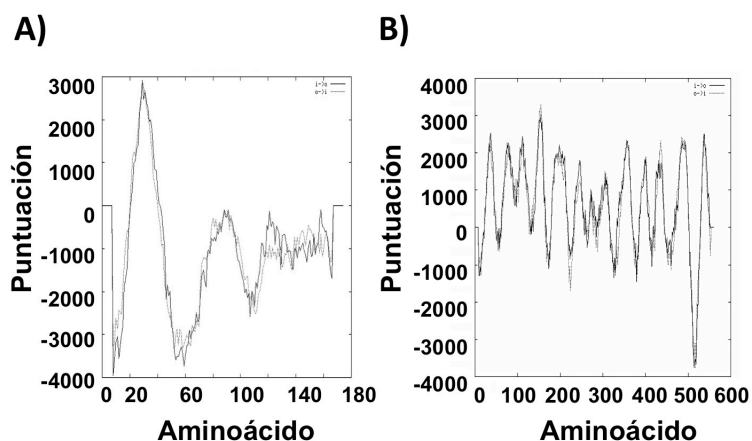


Figura 38. Predicción topológica de las proteínas CoxA (A), CoxB (B) a partir de sus secuencias. Las gráficas representan la localización de los aminoácidos de cada una de las proteínas según un valor de puntuación asignado por el programa de predicción topológica TMpred (Swiss Institute of Bioinformatics). Los aminoácidos con valores de puntuación superiores a 500 representan una región transmembrana predicha por el programa. Cada gráfica muestra 2 predicciones: la predicción recomendada (línea negra) y otra menos probable (línea gris)

of Bioinformatics). Los aminoácidos con valores de puntuación superiores a 500 representan una región transmembrana predicha por el programa. Cada gráfica muestra 2 predicciones: la predicción recomendada (línea negra) y otra menos probable (línea gris)

La presencia de los genes *cox* en vez del operón *nor* en la estirpe B, y que podrían codificar una posible citocromo oxidasa de hemo-cobre, nos ha llevado a pensar que estos genes pueden ser buenos candidatos para codificar una enzima capaz de llevar a cabo la reducción de óxido nítrico observada en la cepa B. Actualmente se está llevando a cabo ensayos para obtener mutantes en este posible operón con el fin de analizar su presunta implicación en el proceso de desnitrificación.

DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

En esta Tesis se han estudiado los pasos finales del proceso de desnitrificación en *Thermus* spp., un género perteneciente a uno de los grupos filogenéticos más antiguos según diversos métodos de evaluación filogenética, incluyendo desde el 16S RNA (Hartmann y Erdmann, 1989) hasta un conjunto de proteínas altamente conservadas (Wu y cols., 2009). Esta característica del género podría sugerir que el proceso estudiado es ancestral respecto a sus versiones “modernas” bien estudiadas entre las Proteobacterias, aunque su carácter móvil, también estudiado en este trabajo de investigación, hace arriesgado asociar ambas ideas. En todo caso, de este estudio se extraen una serie de conclusiones que se discuten a continuación.

6.1. Desnitrificación parcial frente a completa

En trabajos anteriores de nuestro grupo se identificaron una serie de cepas de *Thermus thermophilus* como desnitrificantes “parciales” por ser capaces de crecer en anaerobiosis únicamente con nitrato como aceptor de electrones, acumulando nitrito en el medio de manera indefinida como producto de la respiración, frente a desnitrificantes “completos”, capaces además de emplear el nitrito como aceptor de electrones, con la consiguiente producción final de gas. Sin embargo, en ningún momento se analizó la naturaleza del gas acumulado. Una de las cepas estudiadas y clasificada como desnitrificante completo (Cava y cols., 2008a) fue la cepa PRQ25, aislada de las Islas Azores (Manaiá y da Costa, 1991), y sobre la que se ha centrado la mayor parte del trabajo experimental de esta Tesis.

En nuestros primeros intentos de determinar la naturaleza del gas acumulado en los cultivos anaerobios con nitrato evaluamos la cantidad de N_2O acumulado llegando a la conclusión de que ésta era inferior a la esperable de un proceso de desnitrificación completa, pues detectábamos concentraciones por debajo del 30% esperable si todo el nitrato se hubiera convertido en N_2O (Figura 16 y Figura 25), lo que nos llevó inicialmente a considerar que la mayor parte pasaba a N_2 . Sin embargo, los datos obtenidos de la secuenciación del genoma de la estirpe *T. thermophilus* PRQ25 nos hicieron dudar de esta hipótesis, puesto que no conseguimos identificar un buen homólogo a óxido nitroso reductasas clásicas (tipo NosZ, de Proteobacterias) dentro de la secuencia de la cepa. El genoma de PRQ25 ha sido secuenciado y anotado en el transcurso de esta Tesis y en la de Laura Álvarez (Álvarez, 2012), llevada en paralelo en nuestro

laboratorio, y, aunque aún no está cerrado, se tiene certeza de que el borrador obtenido incluye todos sus genes (cobertura 1600x). Por tanto, el hecho un tanto inesperado de no encontrar un homólogo a una óxido nitroso reductasa nos llevó a pensar en la existencia de alguna enzima alternativa capaz de catalizar dicha reacción, enfocando nuestras sospechas hacia otras enzimas multicobre como una lacasa descrita en *T. thermophilus* (Miyazaki, 2005) homóloga a otra (McoP) de *Pyrobaculum aerophilum* para la que se describió una muy eficaz capacidad para reducir N_2O a N_2 (Fernandes y cols., 2010). Tras obtener mutantes en el gen correspondiente en la cepa HB27d nos encontramos con que la cantidad de N_2O producida a partir de nitrato durante el crecimiento anaerobio no cambió respecto a la de su estirpe parental, mostrando que dicha lacasa no estaba catalizando la reducción de N_2O *in vivo* en nuestro sistema de ensayo.

Una explicación alternativa al bajo acúmulo de N_2O observado puede ser su pérdida a través del sistema de sellado de los tubos empleados para dicho estudio. En este sentido, hay que tener en cuenta que, aunque en principio los tapones de caucho y goma empleados son adecuados para mantener sellados los tubos, en nuestros experimentos los cultivos anaerobios se incuban a $70^\circ C$, muy por encima de lo habitual en este tipo de ensayos, facilitando sin duda la dilatación y difusión de los gases, y, posiblemente, su pérdida parcial. En este contexto, decidimos llevar a cabo experimentos con isótopos de nitrógeno (nitrato marcado con ^{15}N) en los cultivos anaerobios de *T. thermophilus*, en colaboración con el grupo del Prof. Richardson, lo que nos llevó a la conclusión de que el producto final de este proceso es N_2O , no detectándose prácticamente nada de N_2 (Figura 19), en contra de lo que pensábamos originalmente. Por tanto, la cepa PRQ25 es claramente un desnitrificante parcial, capaz de catalizar tres pasos del proceso de la desnitrificación ($2NO_3^- \rightarrow 2NO_2^- \rightarrow 2NO \rightarrow N_2O$) produciendo óxido nitroso como producto final del proceso.

La cuestión que no es posible contestar con certeza en estos momentos es si la ausencia de óxido nitroso reductasa (Nos), la enzima encargada de producir el N_2 , es una propiedad definitoria en el género, o si se trata de algo específico de esta cepa y de su derivado HB27d. En principio, dos datos apuntan a la primera posibilidad. Por un lado, Hedlund y colaboradores publicaron recientemente un artículo donde demostraban la producción de elevados niveles de óxido nitroso en un manantial a $80^\circ C$ de la Great Basin en Estados Unidos, donde simultáneamente mediante crecimiento y técnicas moleculares fueron identificadas mayoritariamente estirpes de *T. thermophilus* (Hedlund y cols., 2011). Por otro lado, en las cepas de *Thermus*

spp. secuenciadas hasta la fecha, en las que aparecen homólogos de la óxido nítrico reductasa (NOR), tampoco se encuentran homólogos de la NOS, y en secuencias de otros genomas de *T. thermophilus* llevadas a cabo en nuestro laboratorio tampoco se han encontrado tales homólogos. Por tanto, es probable que la incapacidad de reducir N_2O a N_2 sea una propiedad general de *Thermus* spp., aunque por la experiencia adquirida en este trabajo, únicamente el empleo de un trazador isotópico sobre un amplio conjunto de cepas desnitrificantes como las descritas en la Tabla 8 podría resolver esta duda.

6.2. La óxido nítrico reductasa cNOR de *T. thermophilus*

Al contrario de lo ocurrido en la infructuosa búsqueda de una óxido nítrico reductasa, el análisis de la secuencia de la cepa PRQ25 nos llevó rápidamente a la identificación de un agrupamiento génico que incluía homólogos de nitrito reductasas de tipo *cd1* (NirS) y de óxido nítrico reductasa dependiente de citocromo c (cNOR) (Alvarez y cols., 2011; Bricio y cols., 2011). Posteriormente a nuestra publicación de estos genes, fueron hechas públicas las secuencias de dos nuevas cepas de *T. thermophilus*, SG0.5 y JL-18 (añadidos a la base de datos por DOE Joint Genome Institute), y *T. scotoductus* SA1 (Gounder y cols., 2011) en cuyos genomas aparecen agrupamientos génicos casi idénticos al *nor-nir* encontrado en la estirpe PRQ25, lo que nos hace sospechar la, aún por demostrar, capacidad de estas cepas para desnitrificar.

El análisis de los genes *nir*, desarrollado en la Tesis de Laura Álvarez (Alvarez, 2012), llevó a la conclusión de la existencia de alguna actividad nitrito reductasa adicional en la cepa aerobia HB27 que no pudo ser identificada, de manera que su mutación no impedía el crecimiento anaeróbico con nitrito siempre y cuando la cepa presentara el operón *norCBH*. De hecho, en nuestros experimentos realizados con mutantes $\Delta norC$ y $\Delta norB::kat$ ha quedado claro que el crecimiento anaerobio con nitrato como aceptor de electrones se ve afectado por la deficiencia de ambas proteínas (Figura 23.A) y la producción de N_2O requiere absolutamente de ambas (Figura 23.B). Por tanto, la reducción de NO a N_2O constituye el paso limitante de la respiración de nitrito. Este hecho, demostrado fisiológicamente a través de los mutantes, no implica que *T. thermophilus* no disponga de mecanismos de desintoxicación capaces de eliminar el NO o incluso de alguna enzima capaz de catalizar *in vitro* su reducción a N_2O . En este sentido, ha sido descrito que el citocromo *ba3* de *T. thermophilus* es capaz de reducir NO a N_2O , quizás como reminiscencia de un posible origen ancestral de este tipo de

enzimas cuando el oxígeno no estaba presente en la atmósfera terrestre (Hayashi y *cols.*, 2007). Estos datos de la bibliografía nos llevaron a estudiar la posible influencia de este citocromo en la desnitrificación, y finalmente a descartarla, dado que los resultados con el mutante mostraron que la ausencia del citocromo *ba3* no afectaba a la cantidad de N₂O producida (Figura 21). No obstante, no es descartable que el citocromo *ba3* pueda actuar como sistema de desintoxicación de NO, generando algo de N₂O, por debajo de nuestro nivel de detección.

Los datos de crecimiento y producción de N₂O de los mutantes *nor*, junto con los ensayos de consumo y acumulación de NO por sus fracciones de membrana (Figura 23, Figura 25 y Figura 27) nos sirvieron para confirmar que tanto NorC como NorB son absolutamente necesarias para la actividad óxido nítrico reductasa. Para confirmarlo también a nivel bioquímico, llevamos a cabo la purificación de la enzima a partir de cultivos de la estirpe aerobia HB27 transformada con un vector que contenía NorB modificada para su purificación por cromatografía de afinidad. Puesto que la cromatografía de afinidad empleando NorB fusionada a una extensión de histidinas, arrastró NorC (Figura 31), queda claro que las subunidades NorC y NorB forman un complejo de membrana, y puesto que éste mostró actividad reductora de NO *in vitro* (Figura 32), no cabe duda de que el complejo NorC-NorB forma una enzima NOR activa homóloga a la cNOR descrita en Proteobacterias desnitrificantes (Braun y Zumft, 1991; Hino y *cols.*, 2010; Zumft y Körner, 1997). De hecho, la predicción estructural del complejo NorCBth encaja con la estructura de la cNOR de *P. aeruginosa* (Hino y *cols.*, 2010) con cuyas subunidades presenta una identidad de secuencia del 38% y 40%, respectivamente, y sobre el que ha sido posible realizar un modelado de la proteína por el grupo del Dr. Gennis, con en el que existe un trabajo de colaboración.

Un punto que llama la atención de manera importante en los resultados obtenidos es que la ausencia de NorB (mutante $\Delta norB::kat$ y mutante $\Delta norB$) impide la síntesis de NorC (Figura 24). La ausencia de NorC en el mutante limpio $\Delta norB$ confirmó que la ausencia de la misma proteína en el mutante $\Delta norB::kat$ no se debía a efectos polares del gen *kat* sobre *norC*. Desde otro punto de vista, la ausencia de la proteína tampoco parece estar relacionada con la disminución de la transcripción, puesto que el promotor *Pnor* se expresa de forma similar en la estirpe $\Delta norB::kat$ y en la silvestre (Figura 26). Por otro lado, tampoco se trata de un problema de localización, pues lo analizado por Western-Blot es el extracto celular total. Por tanto, o bien se produce un bloqueo a nivel de traducción del mRNA, algo que no parece muy probable en base a la posible secuencia de éste (Figura 11), o bien la ausencia de NorB impide el correcto

plegamiento y localización de NorC, haciendo a esta proteína hipersensible frente a proteasas al no poder formar un complejo con NorB. En tal caso, esta degradación de NorC debe producirse de manera muy eficaz para impedir la detección ni tan siquiera de fragmentos de la proteína, a pesar de emplear un antisuero policlonal contra la muestra de extracto total.

6.2.1. Una subunidad adicional para la cNOR de *T. thermophilus*

Una de las sorpresas que ha deparado el análisis del operón *nor* en las estirpes de *Thermus* spp. es la presencia de un gen adicional en su extremo 3' que codifica una pequeña proteína de membrana (NorH) de la que aparecen homólogos codificados en los operones *nor* de bacterias del grupo *Aquificales*. Según los resultados obtenidos de la purificación por afinidad de esta pequeña proteína fusionada a una extensión de histidinas, hemos podido comprobar que NorH arrastra, al menos, a NorC (Figura 29), y puesto que ésta a su vez interacciona con NorB, debemos concluir que las tres forman un complejo. De hecho, la ausencia (delección $\Delta norH$) o modificación de NorH (NorH-his) afecta negativamente al crecimiento anaerobio con nitrato y a la cantidad de N_2O producida (Figura 23, Figura 28), lo cual, sin duda, implica a esta enzima en la eficacia de la reducción de NO. De manera similar, en *P. denitrificans* se han descrito dos genes *nor* adicionales, *norE* y *norF*, que codifican dos posibles proteínas de membrana de pequeño tamaño, cuyas mutaciones provocaban una disminución en la actividad de la óxido nítrico reductasa sin pérdida de expresión (de Boer y cols., 1996), lo que ha llevado a especular sobre su papel en la óxido nítrico reductasa de este organismo (Zumft, 2005).

Sin embargo, NorH no parece ser requerida para la actividad óxido nítrico reductasa *in vitro*, puesto que membranas del mutante $\Delta norH$ producen tanto N_2O como las silvestres (Figura 27). Dado que el donador de electrones de estos ensayos *in vitro* es el ascorbato junto con TMPD y que éste dona los electrones directamente a las cNOR "clásicas" (Bell y cols., 1992), es posible que la actividad *in vitro* no refleje el papel jugado por NorH *in vivo*, que podría consistir en mejorar la eficacia de llegada de electrones al sistema hasta NorC, con quien interacciona. En este sentido, se puede especular sobre una función tipo chaperona que estabilizaría la enzima en la membrana a las altas temperaturas de funcionamiento de este microorganismo. Alternativamente, podría ocurrir que NorH estuviera asociada a la conservación de energía participando en la formación de un canal de protones en la enzima, ausente

en las cNOR heterodiméricas (Hendriks y cols., 2002; Reimann y cols., 2007). Esta función hipotética explicaría por qué una mutación en *norH* genera una disminución en el crecimiento de la bacteria.

En todo caso, cualquiera de estas dos hipótesis implicaría importantes diferencias estructurales con la cNOR cristalizada de *P. aeruginosa* (Hino y cols., 2010) por lo que sería interesante llevar a cabo en el futuro una cristalización del complejo y analizar la implicación de NorH en la enzima a nivel estructural.

6.3. Adquisición de genes de desnitrificación mediante conjugación

La comparación de secuencias y entornos génicos de los agrupamientos implicados en desnitrificación en distintas cepas de *T. thermophilus* desnitrificantes revela, por un lado, un importante grado de conservación de los genes más directamente implicados en la reducción de los correspondientes óxidos de nitrógeno (*narCGHI*, *nirSJ* y *norCBH*) y sus posibles sistemas de regulación (*dnrST*, *drpAB*, *norRST*), pero con variantes en otros genes auxiliares (transportadores de hierro y nitrato, citocromos o deshidrogenasas) que podrían ser útiles para informar sobre la filogenia de los agrupamientos. Por otro lado, en las cepas de *T. thermophilus* estudiadas, los genes de desnitrificación están asociados a un megaplásmido similar al pTT27 de la cepa aerobia HB27 y que parece concentrar la mayor parte de la diversidad genética (el pangenoma) entre cepas de la especie. Es más, tanto en las cepas con genomas publicados como en las cepas PRQ25 y B, los genes mencionados parecen concentrarse en una zona equivalente de los respectivos megaplásmidos. Así, el agrupamiento de la nitrato reductasa se localiza en ambas cepas entre genes homólogos a TTHB134 y TTHB137 del pTT27 de la estirpe aerobia *T. thermophilus* HB8, y los correspondientes al agrupamiento *nor-nir*, unas 7 kpb aguas abajo.

La cuestión es: ¿qué hace que estos genes se concentren en esa zona del megaplásmido y no aparezcan en el cromosoma?. En nuestra opinión esto es debido a la existencia de mecanismos de transferencia horizontal que favorecen más la dispersión de los genes asociados al megaplásmido que los genes ligados al cromosoma. En principio tal diferencia en la frecuencia de transferencia sería difícil achacarla al extraordinariamente eficiente sistema de competencia natural, del que se esperaría que no distinguiese la procedencia de los genes (cromosómicos o plasmídicos) cuando el número de copias de ambos parece similar. En este sentido, experimentos realizados

en nuestro laboratorio por la Dra. Carolina E. César demuestran la existencia de un mecanismo parecido a la conjugación que permite la transferencia de genes asociados al megaplásmido con una frecuencia aproximadamente nueve veces mayor que la correspondiente a genes cromosómicos y que podría justificar la presencia y difusión preferencial de estos agrupamientos (C. E. Cesar, en preparación). Por eso no es de extrañar que la incubación conjunta de la cepa PRQ25 y HB27_{gdh} diera lugar a una estirpe derivada de ésta última, capaz de desnitrificar de manera prácticamente indistinguible respecto a PRQ25 (cepa C-15), y tampoco resulta sorprendente que en ésta, a su vez, los genes de desnitrificación también aparezcan asociados a la misma región del megaplásmido. De hecho, podría ocurrir que un fragmento portador de la capacidad desnitrificante fuera incorporado al genoma de la cepa receptora por recombinación homóloga sustituyendo la región homóloga del megaplásmido de HB27, o por el contrario que la cepa receptora incorporara completamente el plásmido de PRQ25 y fuera la presión selectiva de la anaerobiosis en presencia de óxidos de nitrógeno la responsable del desplazamiento del megaplásmido de HB27 en favor del de PRQ25. Los resultados de alineamiento entre el genoma secuenciado de la cepa C-15 y el de la estirpe aerobia HB27 mostraron un grado de similitud muy alto (mucho mayor que el obtenido con la estirpe PRQ25), siendo posible realizar, con relativa facilidad, un borrador de ensamblaje del cromosoma y el megaplásmido de la estirpe transconjugante utilizando como molde la secuencia de HB27.

Teniendo en cuenta estos resultados y la elevada capacidad para la recombinación existente en estas cepas, junto a la presencia de un elevado número de secuencias de inserción y transposasas asociadas al megaplásmido, nos inclinamos a pensar en un proceso de recombinación e integración tras la entrada del megaplásmido “exógeno” que apunta la primera hipótesis. Asimismo y en apoyo a esta hipótesis, tras los ensayos de conjugación encontramos algunas cepas que inicialmente poseían capacidad desnitrificante pero que la perdieron al crecerlas en placa en aerobiosis (dato no mostrado).

6.4. Otras actividades Nor en *T. thermophilus*: la cepa B

Al igual que nos ha sido posible demostrar que la desnitrificación es objeto de transferencia horizontal a cepas aerobias mediante conjugación, también disponemos de indicios acerca de la pérdida de dicha capacidad.

Uno de tales indicios procede de la secuenciación de la cepa *T. thermophilus* B, capaz de desnitrificar y producir lentamente óxido nitroso pero en la que no se detecta NorC (Figura 33 y Figura 34). Este dato nos indica la existencia en esta estirpe de una actividad NOR alternativa menos eficiente que la cNORTh. En este sentido, existen dos genes en la cepa B y ausentes en PRQ25 que nos llamaron la atención. Por un lado, aguas arriba de los reguladores *norRST*, en la cepa B, aparecen los genes *coxAB*, probablemente formando un operón, en vez de los *norCBH* (Figura 37). Como hemos comentado en resultados, estos genes codifican una posible oxidasa de hemo-cobre que pertenece a la misma familia de enzimas que la óxido nítrico reductasa y que podría ser un buen candidato para llevar a cabo la reducción de NO en esta estirpe. Por otro lado, aparece un homólogo a nitrito reductasas dependientes de cobre (*nirK*) inmediatamente aguas arriba de *nirS*. Dado que la coexistencia de dos nitrito reductasas de tipo tan diferente en un mismo microorganismo es un hecho excepcional, existe la posibilidad de que en realidad esta enzima de cobre pueda actuar como una óxido nitroso reductasa.

La futura obtención de mutantes en estos genes permitirá definir con exactitud si están realmente implicados en la reducción de óxido nítrico observada en estas cepas.

CONCLUSIONS



7. CONCLUSIONS

As a result of this work, we can reach the following conclusions:

1. Several isolates of *T. thermophilus* are able to grow anaerobically with nitrate as electrons acceptor with the concomitant production of gas.
2. Nitrous oxide is the final denitrification product of the *T. thermophilus* strain PRQ25 and HB27d.
3. A three genes operon (*norCBH*) encoding a *c*-type nitric oxide reductase is conserved in most denitrifying strains of *T. thermophilus*, and clustered in a megaplasmid along the genes encoding a *cd1* nitrite reductase.
4. The *nor-nir* cluster of *T. thermophilus* can be laterally transferred by conjugation to aerobic strains of the same species. In the recipient strain the cluster is integrated into a megaplasmid.
5. The nitric oxide reductase of *T. thermophilus* contains NorH as third membrane-bound subunit.
6. The NorH subunit is required for efficient anaerobic growth with nitrate, but not for *in vitro* NOR activity with artificial electrons donors.
7. NorB is required for the expression of NorC.
8. A new type of nitric oxide reductase activity unrelated to cNOR is responsible for nitrous oxide production in *T. thermophilus* B.

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- **Alarico, S., Empadinhas, N., Simões, C., Silva, Z., Henne, A., Mingote, A., Santos, H. & da Costa, M. S. (2005).** Distribution of genes for synthesis of trehalose and Mannosylglycerate in *Thermus* spp. and direct correlation of these genes with halotolerance. *Applied and environmental microbiology* **71**, 2460–6.
- **Alarico, S., Empadinhas, N., Mingote, A., Simões, C., Santos, M. S. & da Costa, M. S. (2007).** Mannosylglycerate is essential for osmotic adjustment in *Thermus thermophilus* strains HB27 and RQ-1. *Extremophiles : life under extreme conditions* **11**, 833–40.
- **Alvarez, L. (2012).** *Análisis de la respiración de nitrito en Thermus thermophilus.* Universidad Autónoma de Madrid.
- **Alvarez, L., Bricio, C., Gómez, M. J. & Berenguer, J. (2011).** Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. *Applied and environmental microbiology* **77**, 1352–8.
- **Arabidopsis Genome Initiative. (2000).** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1994).** *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Ed.). New York.
- **Baggs, E. M., Smales, C. L. & Bateman, E. J. (2010).** Changing pH shifts the microbial sources as well as the magnitude of N₂O emission from soil. *Biology and Fertility of Soils* **46**, 793–805.
- **Becker, R. & Starzyk, M. (1984).** Morphology and rotund body formation in *Thermus aquaticus*. *Microbios* **41**, 115–129.
- **Bell, L. C., Richardson, D. J. & Ferguson, S. J. (1992).** Identification of nitric oxide reductase activity in *Rhodobacter capsulatus*: the electron transport pathway can either use or bypass both cytochrome c₂ and the cytochrome bc₁ complex. *Journal of General Microbiology* **138**, 437–443.
- **Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. & Richardson, D. J. (1995a).** Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et biophysica acta* **1232**, 97–173.

- **Berks, B. C., Richardson, D. J., Reilly, A., Willis, A. C. & Ferguson, S. J. (1995b).** The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *The Biochemical journal* **309** (Pt 3), 983–92.
- **Betlach, M. R. (1982).** Evolution of bacterial denitrification and denitrifier diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**, 585–607.
- **Blas-Galindo, E., Cava, F., López-Viñas, E., Mendieta, J. & Berenguer, J. (2007).** Use of a dominant rpsL allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology* **73**, 5138–45.
- **Blasco, F., Iobbi, C., Giordano, G., Chippaux, M. & Bonnefoy, V. (1989).** Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer. *Molecular & general genetics : MGG* **218**, 249–56.
- **Blomberg, L. M., Blomberg, M. R. A. & Siegbahn, P. E. M. (2006a).** Reduction of nitric oxide in bacterial nitric oxide reductase--a theoretical model study. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 240–52.
- **Blomberg, L. M., Blomberg, M. R. A. & Siegbahn, P. E. M. (2006b).** A theoretical study on nitric oxide reductase activity in a ba(3)-type heme-copper oxidase. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 31–46.
- **de Boer, a P., van der Oost, J., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., Stouthamer, a H. & van Spanning, R. J. (1996).** Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *European journal of biochemistry / FEBS* **242**, 592–600.
- **Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B. & Witzel, K. (2000).** Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS microbiology reviews* **24**, 673–90.
- **Bothe, H., Ferguson, S. J. & Newton, W. E. (2006).** *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier (H. Bothe, S. J. Ferguson & W. E. Newton, Eds.).
- **Braun, C. & Zumft, W. G. (1991).** Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* **266**, 22785–8.

- **Bricio, C., Alvarez, L., Gómez, M. J. & Berenguer, J. (2011).** Partial and complete denitrification in *Thermus thermophilus*: lessons from genome drafts. *Biochemical Society transactions* **39**, 249–53.
- **Brock, T. D. & Edwards, M. R. (1970).** Fine structure of *Thermus aquaticus*, an extreme thermophile. *Journal of bacteriology* **104**, 509–17.
- **Brock, T. D. & Freeze, H. (1969).** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology* **98**, 289–97.
- **Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A. S., Besson, S., Moura, J. J., Moura, I. & Cambillau, C. (2000).** A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nature structural biology* **7**, 191–5.
- **Brzezinski, P. & Adelroth, P. (2006).** Design principles of proton-pumping haem-copper oxidases. *Current opinion in structural biology* **16**, 465–72.
- **Cabello, P., Roldán, M. D. & Moreno-Vivián, C. (2004).** Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 3527–46.
- **Cava, F. & Berenguer, J. (2006).** Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochemical Society transactions* **34**, 97–100.
- **Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F. & Berenguer, J. (2004).** A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45369–78.
- **Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafi, Z., Blas-Galindo, E., Gómez-Puertas, P. & Berenguer, J. (2007).** Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Molecular microbiology* **64**, 630–46.
- **Cava, F., Zafra, O., da Costa, M. S. & Berenguer, J. (2008a).** The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environmental microbiology* **10**, 522–33.
- **Cava, F., Zafra, O. & Berenguer, J. (2008b).** A cytochrome c containing nitrate reductase plays a role in electron transport for denitrification in *Thermus thermophilus* without involvement of the bc respiratory complex. *Molecular microbiology* **70**, 507–18.

- **Cava, F., Hidalgo, A. & Berenguer, J. (2009).** *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles : life under extreme conditions* **13**, 213–31.
- **Chahlaflí, Z. (2012).** *Caracterización de la regulación por nitrato en la respiración aerobia de Thermus thermophilus*. Universidad Autónoma de Madrid.
- **da Costa, M. S., Nobre, M. F. & Rainey, F. (2001).** Genus *Thermus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 404–414.
- **Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A. & Tiedje, J. M. (1989).** Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and environmental microbiology* **55**, 2924–31.
- **Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A. & Glaser, P. (1995).** Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *The EMBO journal* **14**, 5984–94.
- **Elser, J. J., Andersen, T., Baron, J. S., Bergström, A.-K., Jansson, M., Kyle, M., Nydick, K. R., Steger, L. & Hessen, D. O. (2009).** Shifts in lake N:P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. *Science (New York, NY)* **326**, 835–7.
- **Empadinhas, N., Albuquerque, L., Henne, A., Santos, H. & da Costa, M. S. (2003).** The bacterium *Thermus thermophilus*, like hyperthermophilic archaea, uses a two-step pathway for the synthesis of mannosylglycerate. *Applied and environmental microbiology* **69**, 3272–9.
- **Falkowski, P. G. (1997).** Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* **387**, 170–170. Nature Publishing Group.
- **Fee, J. A., Kuila, D., Mather, M. W. & Yoshida, T. (1986).** Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **853**, 153–85.
- **Fernandes, A. T., Damas, J. M., Todorovic, S., Huber, R., Baratto, M. C., Pogni, R., Soares, C. M. & Martins, L. O. (2010).** The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *The FEBS journal* **277**, 3176–89.

- **Fernández-Herrero, L. A., Olabarria, G., Castón, J. R., Lasa, I. & Berenguer, J. (1995).** Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *Journal of bacteriology* **177**, 5460–6.
- **Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., & other authors. (2007).** Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Edited by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor & H. L. Miller. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- **Fülöp, V., Moir, J.W.B., Ferguson S. J., Hajdu, J. (1993).** Crystallization and preliminary crystallographic study of cytochrome cd1 nitrite reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *Journal of molecular biology* **232**, 1211–1212.
- **Fülöp, V., Moir, J. W., Ferguson, S. J. & Hajdu, J. (1995).** The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell* **81**, 369–77.
- **Garrity, G. M. & Holt, J. G. (2001).** Phylum BIV. “*Deinococcus–Thermus*.” In *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 395–420. Edited by D. R. Boone & R. W. Castenholz. New York, NY: Springer New York.
- **Gihring, T. M., Druschel, G. K., McCleskey, R. B., Hamers, R. J. & Banfield, J. F. (2001).** Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environmental science & technology* **35**, 3857–62.
- **Giuffrè, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G. & Soulimane, T. (1999).** The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14718–23.
- **Glockner, A. B., Jüngst, A. & Zumft, W. G. (1993).** Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of microbiology* **160**, 18–26.

- **Gordon, E. H. J., Sjögren, T., Löfqvist, M., Richter, C. D., Allen, J. W. A., Higham, C. W., Hajdu, J., Fülöp, V. & Ferguson, S. J. (2003).** Structure and kinetic properties of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome cd1 nitrite reductase with the d1 heme active site ligand tyrosine 25 replaced by serine. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11773–81.
- **Gounder, K., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Wolherr, A., Daniel, R., Gottschalk, G., Reva, O., Kumwenda, B., Srivastava, M., & other authors. (2011).** Sequence of the hyperplastic genome of the naturally competent *Thermus scotoductus* SA-01. *BMC genomics* **12**, 577. BioMed Central Ltd.
- **de Grado, M., Lasa, I. & Berenguer, J. (1998).** Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. *FEMS microbiology letters* **165**, 51–7.
- **Greenberg, E. P. & Becker, G. E. (1977).** Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Canadian journal of microbiology* **23**, 903–7.
- **Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- **Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557–80.
- **Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. in DNA cloning: a practical approach. ed Glover D M, IRL Press **1**, 109–135.
- **Hart, L. T., Larson, A. D. & McCleskey, C. S. (1965).** Denitrification by *Corynebacterium nephridii*. *Journal of bacteriology* **89**, 1104–8.
- **Hartmann, R. K. & Erdmann, V. A. (1989).** *Thermus thermophilus* 16S rRNA is transcribed from an isolated transcription unit. *Journal of bacteriology* **171**, 2933–41.
- **Hayashi, T., Lin, I.-J., Chen, Y., Fee, J. A. & Moëne-Loccoz, P. (2007).** Fourier transform infrared characterization of a CuB-nitrosyl complex in cytochrome ba3 from *Thermus thermophilus*: relevance to NO reductase activity in heme-copper terminal oxidases. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 14952–8.

- **Hedlund, B. P., McDonald, A. I., Lam, J., Dodsworth, J. A., Brown, J. R. & Hungate, B. A. (2011).** Potential role of *Thermus thermophilus* and *T. oshimai* in high rates of nitrous oxide (N₂O) production in ~80 °C hot springs in the US Great Basin. *Geobiology* **9**, 471–80.
- **Hellwig, P., Soulimane, T. & Mäntele, W. (2002).** Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the *caa3* oxidase from *T. thermophilus*. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 4830–8.
- **Hendriks, J. H. M., Jasaitis, A., Saraste, M. & Verkhovsky, M. I. (2002).** Proton and electron pathways in the bacterial nitric oxide reductase. *Biochemistry* **41**, 2331–40.
- **Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., & other authors. (2004).** The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature biotechnology* **22**, 547–53.
- **Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S. & Shiro, Y. (2010).** Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science (New York, NY)* **330**, 1666–70.
- **Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C. & Jahn, D. (1995).** The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS microbiology letters* **131**, 219–25.
- **Hon-Nami, K. & Oshima, T. (1977).** Purification and some properties of cytochrome c-552 from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of biochemistry* **82**, 769–76.
- **Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–8.
- **Jacobson, F., Guo, H., Olesen, K., Okvist, M., Neutze, R. & Sjölin, L. (2005).** Structures of the oxidized and reduced forms of nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 at high pH: changes in the interactions of the type 2 copper. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **61**, 1190–8.
- **Jormakka, M., Richardson, D., Byrne, B. & Iwata, S. (2004).** Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure (London, England : 1993)* **12**, 95–104.

- **Jormakka, M., Yokoyama, K., Yano, T., Tamakoshi, M., Akimoto, S., Shimamura, T., Curmi, P. & Iwata, S. (2008).** Molecular mechanism of energy conservation in polysulfide respiration. *Nature structural & molecular biology* **15**, 730–7.
- **Jüngst, A., Braun, C. & Zumft, W. G. (1991).** Close linkage in *Pseudomonas stutzeri* of the structural genes for respiratory nitrite reductase and nitrous oxide reductase, and other essential genes for denitrification. *Molecular & general genetics : MGG* **225**, 241–8.
- **Kakishima, K., Shiratsuchi, A., Taoka, A., Nakanishi, Y. & Fukumori, Y. (2007).** Participation of nitric oxide reductase in survival of *Pseudomonas aeruginosa* in LPS-activated macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **355**, 587–91.
- **Kammler, M., Schön, C. & Hantke, K. (1993).** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **175**, 6212–9.
- **Kaspar, H. F. (1982).** Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: Detoxication mechanism. *Archives of Microbiology* **133**, 126–130.
- **Keightley, J. A., Zimmermann, B. H., Mather, M. W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D. M. & Fee, J. A. (1995).** Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome ba3 from *Thermus thermophilus* HB8. *The Journal of biological chemistry* **270**, 20345–58.
- **Kieft, T. L., Fredrickson, J. K., Onstott, T. C., Gorby, Y. A., Kostandarithes, H. M., Bailey, T. J., Kennedy, D. W., Li, S. W., Plymale, A. E., & other authors. (1999).** Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1214–21.
- **Kluyver, A. J. & Donker, H. J. (1926).** Die Einheit in der Biochemie. *Chemie der Zelle und Gewebe* **13**, 134–190.
- **Kolaj-Robin, O., O’Kane, S. R., Nitschke, W., Léger, C., Baymann, F. & Soulimane, T. (2011).** Biochemical and biophysical characterization of succinate: quinone reductase from *Thermus thermophilus*. *Biochimica et biophysica acta* **1807**, 68–79.
- **Koshland, D. E. J. (1992).** The Molecule of the Year. *Science* **258**, 1861.

- **Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. & Furukawa, K. (1986).** Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *Journal of bacteriology* **166**, 338–40.
- **Kroneck, P. M. H. & Abt, D. J. (2002).** Molybdenum in nitrate reductase and nitrite oxidoreductase. *Metal ions in biological systems* **39**, 369–403.
- **Lennox, E. S. (1955).** Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190–206.
- **Machida, T., Nakazawa, T., Fujii, Y., Aoki, S. & Watanabe, O. (1995).** Increase in the atmospheric nitrous oxide concentration during the last 250 years. *Geophysical Research Letters* **22**, 2921. American Geophysical Union.
- **Manaia, C. M. & da Costa, M. S. (1991).** Characterization of halotolerant *Thermus* isolates from shallow marine hot springs on S. Miguel, Azores. *Microbiology* **137**, 2643–2648.
- **Manaia, C. M., Hoste, B., Carmen Gutierrez, M., Gillis, M., Ventosa, A., Kersters, K. & da Costa, M. S. (1995).** Halotolerant *Thermus* Strains from Marine and Terrestrial Hot Springs Belong to *Thermus thermophilus* (ex Oshima and Imahori, 1974) nom. rev. emend. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 526–532.
- **Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208–218.
- **Martínez-Espinosa, R. M., Cole, J. A., Richardson, D. J. & Watmough, N. J. (2011).** Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society transactions* **39**, 175–8.
- **Mather, M. W., Springer, P., Hensel, S., Buse, G. & Fee, J. A. (1993).** Cytochrome oxidase genes from *Thermus thermophilus*. Nucleotide sequence of the fused gene and analysis of the deduced primary structures for subunits I and III of cytochrome *caa3*. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5395–408.
- **Matsumoto, Y., Toshi, T., Pisljakov, A. V., Hino, T., Sugimoto, H., Nagano, S., Sugita, Y. & Shiro, Y. (2012).** Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nature structural & molecular biology* **19**, 238–45.

- **Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.*
- **Mills, D. A. & Ferguson-Miller, S. (2003).** Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome c oxidase: lessons from other proteins. *FEBS Letters* **545**, 47–51.
- **Miyazaki, K. (2005).** A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles : life under extreme conditions* **9**, 415–25.
- **Mooser, D., Maneg, O., Corvey, C., Steiner, T., Malatesta, F., Karas, M., Soulimane, T. & Ludwig, B. (2005).** A four-subunit cytochrome bc(1) complex complements the respiratory chain of *Thermus thermophilus*. *Biochimica et biophysica acta* **1708**, 262–74.
- **Mooser, D., Maneg, O., MacMillan, F., Malatesta, F., Soulimane, T. & Ludwig, B. (2006).** The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from *Thermus thermophilus*: protein domains and subunits. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 1084–95.
- **Moreno, R., Zafra, O., Cava, F. & Berenguer, J. (2003).** Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid* **49**, 2–8.
- **Nishiyama, M., Suzuki, J., Kukimoto, M., Ohnuki, T., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1993).** Cloning and characterization of a nitrite reductase gene from *Alcaligenes faecalis* and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology* **139**, 725–33.
- **Nunes, O. C., Manaia, C. M., Da Costa, M. S. & Santos, H. (1995).** Compatible Solutes in the Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus* and “*Thermus thermophilus*”. *Applied and environmental microbiology* **61**, 2351–7.
- **Nurizzo, D., Silvestrini, M. C., Mathieu, M., Cutruzzolà, F., Bourgeois, D., Fülöp, V., Hajdu, J., Brunori, M., Tegoni, M. & Cambillau, C. (1997).** N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure (London, England : 1993)* **5**, 1157–71.

- **Oshima, T. & Imahori, K. (1974).** Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**, 102–112.
- **Oshima, T. & Imahori, K. (1971).** Isolation of an extreme thermophile and thermostability of its transfer ribonucleic acid and ribosomes. *Journal of General and Applied Microbiology* **17**, 513–517.
- **Pask-Hughes, R. & Williams, R. A. D. (1977).** Yellow-pigmented strains of *Thermus* spp. from Icelandic hot springs. *Journal of general microbiology* **102**, 375–383.
- **Philippot, L. (2002).** Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et biophysica acta* **1577**, 355–76.
- **Pomowski, A., Zumft, W. G., Kroneck, P. M. H. & Einsle, O. (2010).** Crystallization of purple nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications* **66**, 1541–3.
- **Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., Stackebrandt, E. & da Costa, M. S. (1997).** Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *International journal of systematic bacteriology* **47**, 510–4.
- **Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L. A., Marín, I. & Berenguer, J. (1998a).** Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *Journal of bacteriology* **180**, 3137–43.
- **Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L. A. & Berenguer, J. (1998b).** A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochimica et biophysica acta* **1396**, 215–27.
- **Reimann, J., Flock, U., Lepp, H., Honigmann, A. & Adelroth, P. (2007).** A pathway for protons in nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et biophysica acta* **1767**, 362–73.
- **Renner, E. D. & Becker, G. E. (1970).** Production of nitric oxide and nitrous oxide during denitrification by *Corynebacterium nephridii*. *Journal of bacteriology* **101**, 821–6.

- **Reyes, F., Gavira, M., Castillo, F. & Moreno-Vivián, C. (1998).** Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the napKEFDABC gene cluster. *The Biochemical journal* **331 (Pt 3)**, 897–904.
- **Richardson, D. J. (2000).** Bacterial respiration : a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146**, 551–571.
- **Santos, M. A., Williams, R. A. D. & da Costa, M. S. (1989).** Numerical Taxonomy of *Thermus* Isolates from Hot Springs in Portugal. *Systematic and Applied Microbiology* **12**, 310–315.
- **Sazanov, L. A. & Hinchliffe, P. (2006).** Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science (New York, NY)* **311**, 1430–6.
- **Schlesinger, W. H. (2009).** On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 203–8.
- **Shiro, Y. (2012).** Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: Anaerobic respiratory enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 1–7. Elsevier B.V.
- **Sias, S. R., Stouthamer, A. H. & Ingraham, J. L. (1980).** The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes. *Journal of general microbiology* **118**, 229–34.
- **Siddiqui, R. A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. & Friedrich, B. (1993).** Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of bacteriology* **175**, 5867–76.
- **Silva, Z., Alarico, S., Nobre, A., Horlacher, R., Marugg, J., Boos, W., Mingote, A. I. & da Costa, M. S. (2003).** Osmotic adaptation of *Thermus thermophilus* RQ-1: lesson from a mutant deficient in synthesis of trehalose. *Journal of bacteriology* **185**, 5943–52.
- **Silvestrini, M. C., Galeotti, C. L., Gervais, M., Schininà, E., Barra, D., Bossa, F. & Brunori, M. (1989).** Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: sequence of the gene and the protein. *FEBS letters* **254**, 33–8.
- **Simon, J., Einsle, O., Kroneck, P. M. H. & Zumft, W. G. (2004).** The unprecedented nos gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase. *FEBS letters* **569**, 7–12.

- **Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. & Skerman, V.B.D., McGowan, V. Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 225–420.
- **Snell, F.D. Snell, C. T. (1949).** *Colometric Methods of Analysis*. D Van Nostrand Company.
- **Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M. E., Huber, R. & Buse, G. (1997).** Cytochrome-c552 from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation. *Biochemical and biophysical research communications* **237**, 572–6.
- **Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. & Than, M. E. (2000).** Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. *The EMBO journal* **19**, 1766–76.
- **Van Spanning, R. J., Wansell, C., Harms, N., Oltmann, L. F. & Stouthamer, A. H. (1990).** Mutagenesis of the gene encoding cytochrome c550 of *Paracoccus denitrificans* and analysis of the resultant physiological effects. *Journal of bacteriology* **172**, 3534.
- **Stothard, P., Van Domselaar, G., Shrivastava, S., Guo, A., O'Neill, B., Cruz, J., Ellison, M. & Wishart, D. S. (2005).** BacMap: an interactive picture atlas of annotated bacterial genomes. *Nucleic acids research* **33**, D317–20.
- **Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. G. & Moura, I. (2006).** Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of inorganic biochemistry* **100**, 2087–100.
- **Thiemens, M. H. & Trogler, W. C. (1991).** Nylon production: an unknown source of atmospheric nitrous oxide. *Science (New York, NY)* **251**, 932–4.
- **Thorndycroft, F. H., Butland, G., Richardson, D. J. & Watmough, N. J. (2007).** A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme. *The Biochemical journal* **401**, 111–9.
- **Treangen, T. J. & Messeguer, X. (2006).** M-GCAT: interactively and efficiently constructing large-scale multiple genome comparison frameworks in closely related species. *BMC bioinformatics* **7**, 433.
- **Vieira, J. & Messing, J. (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259–268. Elsevier.

- **Vollack, K. U., Xie, J., Härtig, E., Römling, U. & Zumft, W. G. (1998).** Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* **144 (Pt 2)**, 441–8.
- **Watmough, N. J., Butland, G., Cheesman, M. R., Moir, J. W., Richardson, D. J. & Spiro, S. (1999).** Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochimica et biophysica acta* **1411**, 456–74.
- **Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. & Woese, C. R. (1989).** The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Systematic and applied microbiology* **11**, 128–34.
- **Wikström, M. (2004).** Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochimica et biophysica acta* **1655**, 241–7.
- **Williams, R. A., Smith, K. E., Welch, S. G., Micallef, J. & Sharp, R. J. (1995).** DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus Brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). *International journal of systematic bacteriology* **45**, 495–9.
- **Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N. N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M., & other authors. (2009).** A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* **462**, 1056–60.
- **Ye, R. W., Fries, M. R., Bezborodnikov, S. G., Averill, B. A. & Tiedje, J. M. (1993).** Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Applied and environmental microbiology* **59**, 250–4.
- **Zafra, O., Cava, F., Blasco, F., Magalon, A. & Berenguer, J. (2005).** Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *Journal of bacteriology* **187**, 3990–6.
- **Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F. & Münck, E. (1988).** Properties of a copper-containing cytochrome ba₃: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5779–83.
- **Zumft, W. G. (1993).** The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology* 253–264.

- **Zumft, W. G. (1997).** Cell biology and molecular basis of Cell Biology of Denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR Mol Biol Rev* **61**.
- **Zumft, W. G. (2005).** Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of inorganic biochemistry* **99**, 194–215.
- **Zumft, W. G. & Körner, H. (1997).** Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek* **14405**, 43–58.
- **Zumft, W. G. & Kronek, P. (2006).** Respiratory Transformation of Nitrous Oxide (N₂O) to Dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology* **52**, 107–227.

ANEXOS



Anexo I. Secuencias de DNA y alineamientos

1. Secuencia del operón *nor*

8512 ACGGGGCCGG AGAGGGCTTC CATCACCTTG AGGAGGGAGA
 TCTCCCCCGG GGAAGCTTG GGCCACACCC CTCCTTTCCG
 CCCCACGCGG CTTTCCACAA GGCCCGCCTT GGCGAGCTTC
 TGGAGCACCT TGGCCATGAA GCGGGGCGGG GCCTTGAGCC
 TCTCGGCGAT CTCCAAGGCG GAAAGGCCGG GCTCCTCGGC
 8712 CAAGAGGAGA AGGGCGTGAA GGGCGTAGGA CTCCTCCCGC
 TTTAGAAGGC TCCGAAGGGC CATGGCCCCA TGCTAACCCC
 GGGCGTAGAA GGTCCGCGGA GGCCCAAGGG ACGTTCGCC
 TTGACCTAGG TCATGGAAAA AGGGAAGGAA GGGTCGGAGT
 TTATGAGCCG GAGGTGAAAG GAGGGTAAGG GT**ATGGAGAT**
 8912 **CGGCTGGATA GAAACCACCA TCGGGGCCCT CTTCGCCACC**
GTGGTCTCA CCCTGTGGCT CTCCCGAGGG TCGGGCTGGC
TGGAGCCCCG CTTCTGGCGG AACGCCGCGG TGGTGAGCTC
CCTCATCATG TCGGGCATCC TCGTCTACCT GACGGTGGAC
TCCGTGAACC AGATCCGCGA GGGCTCGGCG CGGGTGCCTG
 9112 **CCTACACGGT CATCAACCAC GAGATCGGCC TCAAGCGGGA**
CTACGAGAAG CGCCGGGACG TTCCCGTGAT CGGCGAGGAG
GTGGGCTTCT TCGGCAAGGT CTGGAGCGAG GCGGAGGCCT
ACGCCCTGGT CAACAAGGGC AAGATGACCC TGCAGAGCCG
CAACTGCATG GACTGCCACA CCCTCCTCGG CAACGGGGCT
 9312 **TACTTCGCTC CGGACCTGAC CCGGGCCTGG CTTGACCCCA**
AGTGGGAGGC CATGGTCATG CCCATGACCG GGAAGGCCAC
CCCGGAGGAG GCCATGGCCG AGTGGCTGCA GCACCCGGAC
CGCTACCCCA CCTTCGCCCG GCGCATGCC AACCTCCGCC
TCACGGAGGA GGAGGCCAAG GCCCTGGTGG CCTTCCTGAA
 9512 **GTGGATGTCG GCCATAGACA CGAACGGCTT CCCCAGCCG**
TTTGCGGCGG CGGAGTAGGA GGTGAAGCAT GACCCAGGCT
TTACCGCAGG GAAAGCTTTA CGAGTCCAG AAGCTCGCCC
TCTGGTACTT CTGGGTGGCC CTCGCCCTCT TCGGGGCGCA
GGTCTCTTC GGCCTTCTGG CCGCTGGCA GTACCTGGAC
 9712 **CCTGGCTTCC TCTACGGCAA GCTCAACTTC ATGACCAACC**
GGATGCTCCA CGTGAACGCC ATGATCGTCT GGCTCCTTTT
GGGCTTCATG GGTGGGTCT ACTGGTTCCT GCCCATGGAG
CTCGGGCGCG AGGTGGTGGG CATCCGGCTC GCCAAGGCCG

*P_{nor}**norC**norB*

9912 CCTTCTTCAC CCTGGTGGGC GCCGTGGCGG TGGTGGTCCT
 GGTCTACCTC CTGGTCCAGT ACGGCCCGG CAACGCCTTC
 ACCCTTTGGT TCATCACCGA GGGAAGGGAG TACATCGAGG
 CTCCCCGCTG GCGGACATC GGCATCGTGG CGGTGATGGC
 CATCTTCCTC TACAACGTGG TGGCCACCGC CCTGAAGGCG
 CAGCGGATCA CCGGGGTGGT GGCCGTGCTC ATGTTTGACC
 10112 TCGTGGCCCT GCGGGGCTC TACACGGCGG GGATGCACTA
 CACCCCAAC ATCTCCATGG ACCAGTACTT CTGGTGGTGG
 GTGGTGCACC TCTGGGTGGA GGCCACTTGG GAGGTCTCA
 CCGGGGCCAT CATGGCCATG GCCCTCATGC ACCTTTTGGG
 GACGCCGAGG CGCATCGTGG AGACCTGGCT TTACCTCGAG
 10312 GTCGCCCTGG TCTTCGGCAC GGGGATCCTG GGCCTCGGCC
 ACCACTACTT CTGGATCGGC ACCCCGGAGT ACTGGCTCGG
 CCTCGGCGGC TTCTTCAGCG CCCTCGAGCC CATCCCCCTC
 GTGGCCATGG TGGTCCACGC CGTCTACGAC GCCGGGGTCC
 ACCGCATGCA GACCGTGAAC CAGCCCGCCC TCTTCTGGGC
 10512 CATCGCCCAG GCCTTCGGCA ACTTCATCGG GCGGGGGTG
 TGGGGCTTCA TGCAGACCCT GCCCCAGATC AACCTCTACT
 CCCACGGCAC CCAGCTCGCC CCGGCCACG GGCACCTGGC
 CTTCTTCGGG GCCTACGTGA CCGCCATCCT CACCGTCATC
 TACATGGCCT TGCACCAGGT GCGCAGGCCG GACCTGCCCC
 10712 GGTTTGACTC CAGGCTCTGG AAGTGGGCCT TCGTCCTGAT
 GGTGGTGGGC ATCTTCGGCA TGTCCGCGGC CATGACGGTG
 GCGGGCTTCA CCCAGACCAT GGTGGAGCGG GCCATCGGGG
 GGAGCACCTG GCAGGCCTAC ATTGAGGCCC AGCAGCACCC
 CTGGTTCCAG AACGGCATGG TCTGGCGGTT TGTGTTTGGC
 10912 GTCTTCTTCT TCGTAAGCTA CCTGGTCCTC CTGTGGGACC
 TCGCCACCAT CGGCAAGGGC GAGGCCAGGG CCGTGAAGGA
 GGTGGGGGCC CATGACTAGC GAGGCGGTGC GCGACCTTAT
 GCTCTACGGC ATGCTCATGG TCTCCGCCGC CGGGTTCTAC
 GCCATGTTCT ACGCCCTGGG GCGCATGTGG GGAAGGCCCT
 11112 CCGTGGTGGC CTTCTCCTAC GTCTTCGCCC TGCTCCAGGC
 GGTGGGGGCC TTGGGCATGA TCCTGCCTCC CTACCTGGAC
 CCCTTCTGGA GGTACCTCAT CGGCTTCAGC TCCCTGGTGT
 ACCTCTTCGT TCCCCAGGGC ATGTGGTGGG TGGTGACCAC
 CTTCCACGAG AAGGAGCACG CTCACTGATC CCGTCCGGA
 11312 CCCCCGGGCC CCTCGAGGGG CCCGGGGGTC TTTTGTAGG
 GACTTTTGTG TTAGGACATC TGTCCATTTC GGGCGAGGCT

*norB**norH*

2. Alineamiento de secuencias de homólogos de NorC. En rojo se marcan los aminoácidos conservados en todas las secuencias del alineamiento, en azul, los aminoácidos conservados en la mayoría de las secuencias del alineamiento, y en verde, los aminoácidos equivalentes al resto en esa posición del alineamiento.

		1	50
NorC PRQ25	(1)	MEIGWIETTIGALFATVVLTWL	SRGSGWLEPRFWRNAAVVSSLIMSGIL
NorC JL18	(1)	MEIGWIETTIGALFATVVLTWL	SRGSGWLEPRFWRNAAVVSSLIMSGIL
NorC SG0	(1)	MEIGWIETTIGALFATVVLTWL	SRGSGWLEPRFWRNAAVVSSLIMSGIL
NorC Tsc0	(1)	MEIGWIETTIGALFATVVLTWL	SRGSGWLEPRFWRNAAVVSSLIMSGIL
NorC Hth	(1)	MSVGVLEVVVATLFI	SIVVSLILARGRHWLEPGFWKIAAVITSSVMAITL
NorC Psau	(1)	-----	MSETFTKGMARNIYFGGSVFFILLF
NorC Pden	(1)	-----	MSEIMTKNMARNVIFYGGSIFFILIF
		51	100
NorC PRQ25	(51)	VYLLTVDSVNQIREGSARVPAYTVIN	HEIGLKRDEYKRRDVPVIGEEVGFF
NorC JL18	(51)	VYLLTVDSVNQIREGSARVPAYTVIN	HEIGLKRDEYKRRDVPVIGEEVGFF
NorC SG0	(51)	VYLLTVDSVNQIREGSARVPAYTVIN	HEIGLKRDEYKRRDVPVIGEEVGFF
NorC Tsc0	(51)	VYLLTIDSLNQIREGSARVPAYTVIN	KAIGLKRDEYKRRDIPVIGEEVGFF
NorC Hth	(51)	VLLTVDTSRQISMGSKRVPSPSVIN	REIGYVYDAERMAMVPALGKEVGLF
NorC Psau	(26)	LALTYHTEKTLPER	-----
NorC Pden	(26)	GALTVHSHIYARTK	-----
		101	150
NorC PRQ25	(101)	GKVWSEAEAYALVNKGKMTLQSRNCMD	CHTLLGNGAYFAPDLTRAWLDPK
NorC JL18	(101)	GKVWSEAEAYALVNKGKMTLQSRNCMD	CHTLLGNGAYFAPDLTRAWLDPK
NorC SG0	(101)	GKVWSEAEAYALVNKGKMTLQSRNCMD	CHTLLGNGAYFAPDLTRAWLDPK
NorC Tsc0	(101)	DKVWSEEEAYTLVNKGKMTLQSRNCMD	CHTLLGNGAYFAPDLTRAWLDPK
NorC Hth	(101)	GRVWSEEEAEKLVTKGKLVIQSRNCMD	CHTLLGNGAYYAPDLTKAWLDPK
NorC Psau	(40)	---TNEAAMSAAVVRGKLVWEQNN	CVGCHTLLGEGAYFAPELG-----
NorC Pden	(40)	--AVDESQLTSPVVEGKHIWERNACID	CHTLLGEGAYFAPELG-----N
		151	200
NorC PRQ25	(151)	WEAMVMPMTGKATPEEAMAEWLQHPDRYPTF	FARRMPNLRRLTEEEAKALVA
NorC JL18	(151)	WEAMVMPMTGKATREEAMAEWLQHPDRYPTF	FARRMPNLRRLTEEEARALVA
NorC SG0	(151)	WEAMVMPMTGKATREEAMAEWLQHPDRYPTF	FARRMPNLRRLTEEEAKALVA
NorC Tsc0	(151)	WETMVKGMTGKATKEEAMAEWLQHPDRYPTF	FVRRMPNLGLSEEEAKALVA
NorC Hth	(151)	WEKQLMPMTGAKTREETEAMRAFLMNP	KYPTWVRRMPNLKLSDEAMAVVA
NorC Psau	(80)	--NVVGRRGEEGFNTFLQAWMNIQPLNVP	GRRAMPQFHLSSEGQVDDLAE
NorC Pden	(82)	VMKRWGVQDDPDSAFE	TLKGWME SMPTGIEGRQMPRFDLTDEEFRALSD

	201	224
NorC PRQ25	(201)	FLKWMSAIDTNGFPDRFAAAE---
NorC JL18	(201)	FLKWMSAIDTNGFPDRFAAAE---
NorC SG0	(201)	FLKWMSAIDTNGFPDRFAAAE---
NorC Tsco	(201)	FLKWMSAIDTNGFPDRFAGVQ---
NorC Hth	(201)	YLKWMS ^T IDTNGFPANFPEVKVSQ
NorC Psau	(128)	FLKWSSKIDTNQWPPNKEG-----
NorC Pden	(132)	FLLWTGTINTQNWPPNDAG-----

3. Alineamiento de secuencias de homólogos de NorB. En rojo se marcan los aminoácidos conservados en todas las secuencias del alineamiento, en azul los aminoácidos conservados en la mayoría de las secuencias del alineamiento, y en verde los aminoácidos equivalentes al resto en esa posición del alineamiento.

	1	50
NorB PRQ25	(1)	MTQALPQ GKLYESQKLALWYFWVALALFGAQVLFGLLAAWQYLDPGFLYG
NorB JL18	(1)	MTQALPQ GKLYESQKLALWYFWVALALFGAQVLFGLLAAWQYLDPGFLYG
NorB SG0	(1)	MTQALPQ GKLYESQKLALWYFWVALALFGAQVLFGLLAAWQYLDPGFLYG
NorB Tsco	(1)	MTQALPQ GKLYESQKLALWYFWVALALFGAQVLFGLLAAWQYLDPNFLYG
NorB Hth	(1)	-----MERLYESQRLAIWYFWTAIALFGAQLLFGLLAAYQFINPDFLYG
NorB Psau	(1)	-MMSPNGSLKFASQAVAKPYFVFALILFVQILFGLIMGLQYVVGDFLFP
NorB Pden	(1)	-----MRYHSQRIAYAYFLVAMVLFVAVQVTIGLIMGWIVSPNFLSE
	51	100
NorB PRQ25	(51)	KLNFMTNRMLHVNAMIVWLLLLGFMGGVYWFLELPMELGREVVGIRLAKAAFF
NorB JL18	(51)	KLNFMTNRMLHVNAMIVWLLLLGFMGGVYWFLELPMELGREVVGIRLAKAAFF
NorB SG0	(51)	KLNFMTNRMLHVNAMIVWLLLLGFMGGVYWFLELPMELGREVVGIRLAKAAFF
NorB Tsco	(51)	KLNFMTNRMLHVNAMIVWLLLLGFMGGVYWFLELPMELGREVVGIRLARFAFF
NorB Hth	(45)	TLNFMTNRMLHINAMVIWLLLMGFIGGIYWFLEPLETQREIVGIKLGKLAYF
NorB Psau	(50)	AIPFNVARMVHTNLLIVWLLLFGMGAAYYLVPEESDCELYSPKLAWILFW
NorB Pden	(43)	LLPFNIARMLHTNSLVVWLLLLGFFGATYYILPEEAEREIHSPLLAWIQLG
	101	150
NorB PRQ25	(101)	TLVGAVAVVVLVYLLVQYGPNAFT--LWFITEGREYIEAPRWADIGIVA
NorB JL18	(101)	TLVGAVAVVVLVYLLVQYGPNAFT--LWFITEGREYIEAPRWADIGIVA
NorB SG0	(101)	TLVGAVAVVVLVYLLVQYGPNAFT--LWFITEGREYIEAPRWADIGIVA
NorB Tsco	(101)	TLIAAVGIVVLVYLLVQYGPNAFT--LWFITEGREYIEAPRWADFGIVA
NorB Hth	(95)	AFVITVAIVVLVFLIKQFGKGDFFT--LWFITEGREYVEAPRWADIGVVA
NorB Psau	(100)	VFAAAGVLTILGYLLVPYAGLARLTGNELWPTMGREFLEQPTISKAGIVI
NorB Pden	(93)	IFVLGTAGVVVTVLFDLFGHWLLG-----KEGREFLEQPKWVKLGIAV

	151	200
NorB PRQ25	(149)	VMAIFLYNVVATALKAQRITGVVAVLMFDLVALAGLYTAGMHYTPNISMD
NorB JL18	(149)	VMAIFLYNVVATALKAQRITGVVAVLMFDLVALAGLYTAGMHYTPNISMD
NorB SG0	(149)	VMAIFLYNVVATALKAQRITGVVAVLMFDLVALAGLYTAGMHYTPNISMD
NorB Tsco	(149)	VMAIFLYNVVATALKAQRITGVVAVLMFDLVALAGLYMAGMHYTPNISMD
NorB Hth	(143)	VALIVAYNVVATVLRGR-KTAISMVLMTGLIGLALLFLFSFYNPENLTRD
NorB Psau	(150)	VALGFLFNVTGLRGR-KTAISMVLMTGLIGLALLFLFSFYNPENLTRD
NorB Pden	(137)	AAVIFMYNVSMTALKGR-RTAVTNVLLMGLWGLVLLWLFAYNPANLVLD
	201	250
NorB PRQ25	(199)	QYFWWWVHLWVEATWEVLTGAIMAMALMHLIGTPRRIVETWLYLEVALV
NorB JL18	(199)	QYFWWWVHLWVEATWEVLTGAIMAMALMHLIGTPRRIVETWLYLEVALV
NorB SG0	(199)	QYFWWWVHLWVEATWEVLTGAIMAMALMHLIGTPRRIVETWLYLEVALV
NorB Tsco	(199)	QYFWWWVHLWVEATWEVLVGSIMAMALMHLIGTPRRIVETWLYLEVALV
NorB Hth	(193)	QYFWWWVHLWVEATWEVLEGLMGLWLLMHLIGTPRKIEAWLYIEVMLV
NorB Psau	(199)	KFYFWWWVHLWVEGVWELIMGAILAFVLVKITGVDRVIEKWLVIYIAMA
NorB Pden	(186)	KQYFWWWVHLWVEGVWELIMAAAILAFMLKLTVDRVIEKWLVIYIATA
	251	300
NorB PRQ25	(249)	FGTGILGLGHYFWIGTPEYWLGLGGFFSALEPIPLVAMVVHAVYDAGVH
NorB JL18	(249)	FGTGILGLGHYFWIGTPEYWLGLGGFFSALEPIPLVAMVVHAVYDAGVH
NorB SG0	(249)	FGTGILGLGHYFWIGTPEYWLGLGGFFSALEPIPLVAMVVHAVYDAGVH
NorB Tsco	(249)	FGTGILGLGHYFWIGTPEYWLGLGGFFSALEPIPLVAMVVHAVYDAGMH
NorB Hth	(243)	FGTGILGLGHYFWIGTPPYWLGLGGFFSSLEPLPLVAMVIHAVYDAGVH
NorB Psau	(249)	LISGIIGTGHYFWIGVPGYWLWLVSALEPLPFFAMVLFVAFNTINRR
NorB Pden	(236)	LFSGILGTGHYFWIGLPAYWQWIGSIFSSFEIVPFFAMMSFAFVMVWKG
	301	350
NorB PRQ25	(299)	RM-QTVNQPALFWAIAQAFGNFIGAGVWGMQTLQPINLYSHGTQLAPAH
NorB JL18	(299)	RM-QTVNQPALFWAIAQAFGNFIGAGVWGMQTLQPINLYSHGTQLAPAH
NorB SG0	(299)	RM-QTVNQPALFWAIAQAFGNFIGAGVWGMQTLQPINLYSHGTQLAPAH
NorB Tsco	(299)	RM-QTVNQPALFWAIAQAFGNFIGAGVWGMQTLQPINLYSHGTQLAASH
NorB Hth	(293)	RL-QTVNRPALFWAFAQAFGNLFGAGVWGMHTLQPINLFSHGTQLAAAH
NorB Psau	(299)	RRRDYPNRAVALWAMGTTVMAFVAGVWGMHTLAPVNYTHGTQLTAAH
NorB Pden	(286)	RR-DHPNKAALVWSLGC'TVLAFFGAGVWGFLLH'TLHG'VNYTHGTQITAAH

	351	400
NorB PRQ25	(348) GH L A F F G A Y V T A I L T V I Y M A L H Q V R R P-- D L P R F D S R L W K W A F V L M V V G I	
NorB JL18	(348) GH L A F F G A Y V T A I L T V I Y M A L H Q V R R P-- D L P R F D S R L W K W A F V L M V V G I	
NorB SG0	(348) GH L A F F G A Y V T A I L T V I Y M A L H Q V R R P-- D L P R F D S R L W K W A F V L M V V G I	
NorB Tsc0	(348) GH L A F F G A Y V T A I L T V I Y M A L H Q V R R P-- D L P R F D S R L W K W A F V L M I I G I	
NorB Hth	(342) GH L A F F G A Y V A N L A I F Y I L G K T R V K-- E G Y I M N G A V W R I A Y I G L I I G M	
NorB Psau	(349) G H M A F Y G A Y A M I V M T I I S Y A M P R L R G I G E A M D N R S Q V L E M W G F W L M T V A M	
NorB Pden	(335) GH L A F Y G A Y V CL V L A L V T Y C M PL M K N R---- D P Y N Q V L N M A S F W L M S S G M	
	401	450
NorB PRQ25	(396) F G M S A A M T V A G F T Q T M V E R A I G G S T W Q A Y I E A Q Q H P W F Q N G M V W R F V F G V	
NorB JL18	(396) F G M S A A M T V A G F T Q T M V E R A I G G S T W Q A Y I E A Q M H P W F Q N G M V W R F V F G V	
NorB SG0	(396) F G M S A A M T V A G F T Q T M V E R A I G G S T W Q A Y I E A Q T H P W F Q N G M V W R F V F G V	
NorB Tsc0	(396) F G M S A A M T I A G F T Q T M V E R A I G G S T W Q A Y I D A Q Q H P W F Q N G M V W R F A F G V	
NorB Hth	(390) F G M V A S L T V A G F A Q T M I E R A S L G S T W E A Y I Q A Q M H P W M E H A Y R W R F F F G L	
NorB Psau	(399) V F I T L F L S A A G V L Q V W L Q R M P A D G-- A A M T F M A T Q D Q L A I F Y W L R E G A G V	
NorB Pden	(381) V F M T V T L T F A G T V Q T H L Q R V E G G ----- F F M D V Q D G L A L F Y W M R F G S G V	
	451	488
NorB PRQ25	(446) F F F V S Y L V L L W D L A T I G K G E A R A V K E V G A H D -----	
NorB JL18	(446) F F F V S Y L V L L W D L A T I G R G R A E A K G V G A H D-----	
NorB SG0	(446) F F F V S Y L V L L W D L A T I G R G R A E A K G V G A H D-----	
NorB Tsc0	(446) F F L V S Y L V L L W D L V T I G K G E A K A A K G V G A H D -----	
NorB Hth	(440) I F A L S Y M A L L Y D L L T A G K R V E Q V K E A E L A R-----	
NorB Psau	(447) V F L I G L V A Y L L S F R R ----- G K A A A -----	
NorB Pden	(425) A V V L G A L L F I Y A V L F P R R E V V K A G P V Q A H K D G H L E A E	

4. Alineamiento de secuencias de homólogos de NorH. En rojo se marcan los aminoácidos conservados en todas las secuencias del alineamiento, en azul los aminoácidos conservados en la mayoría de las secuencias del alineamiento y en verde los aminoácidos equivalentes al resto en esa posición del alineamiento.

		1	50
NorH PRQ25	(1)	MTSEAVRDL M LYG M LMVSAAGFYAMFYALGRMWGRPSVVAFSYVFALLQA	
NorH SG0	(1)	MTSEAVRDL M LYG M LMVSAAGFYAMFYALGRM W EKPSVVAFSYVFALLQA	
NorH JL18	(1)	MTSEAVRDL M LYG M LMVSAAGFYAMFYALGRM W EKPSVVAFSYVFALLQA	
NorH Tsco	(1)	MTSEAVRDL M LYG M LMVSAAGFYAMFYALGR M LGRPSIVTFSYLF A ALQA	
NorH Hth	(1)	----- M LYG F LMVLFACFYA I LYALGRASHLPSLQ R LSYGF G VLE F	
		51	98
NorH PRQ25	(51)	VGALGMILPPYLD P FWRYLIGFSSSLVYLFVPQGM W VVTT F HEKEHA H	
NorH SG0	(51)	VGALGMILPPYLD P FWRYLIGFSSSLVYLFVPQGM W VVTT F HEKEHA H	
NorH JL18	(51)	VGALGMILPPYLD P FWRYLIGFSSSLVYLFVPQGM W VVTT F HEKEHA H	
NorH Tsco	(51)	LGALGMILPPYLD P FW K YLIAFSSAVYLFIPQGM W VVTT F HEKEHA H	
NorH Hth	(42)	LSGLGMV A SDYLD T FW R VLIL F SI A YLFIP P IM R V V AF F HER----	

PUBLICACIONES



Partial and complete denitrification in *Thermus thermophilus*: lessons from genome drafts

Carlos Bricio*, Laura Alvarez*, Manuel J. Gómez† and José Berenguer*¹

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain, and †Centro de Astrobiología (CSIC/INTA), Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, 28850 Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain

Abstract

We have obtained draft genomic sequences of PD (partial denitrificant) and CD (complete denitrificant) strains of *Thermus thermophilus*. Their genomes are similar in size to that of the aerobic strains sequenced to date and probably contain a similar megaplasmid. In the CD strain, the genes encoding a putative cytochrome *cd*₁ Nir (nitrite reductase) and ancillary proteins were clustered with a cytochrome *c*-dependent Nor (nitric oxide reductase), and with genes that are probably implicated in their regulation. The Nar (nitrate reductase) and associated genes were also clustered and located 7 kb downstream of the genes coding for the Nir. The whole *nar-nir-nor* denitrification supercluster was identified as part of a variable region of a megaplasmid. No homologues of NosZ were found despite nitrogen balance supports the idea that such activity actually exists.

The genus *Thermus*

The genus *Thermus* is widespread in natural and man-made thermophilic environments all over the world. It includes hundreds of strains that constitute an important source of enzymes of biotechnological interest [1]. In addition, most strains can grow up to high cell densities under laboratory conditions and at least some of them can be genetically manipulated because of the presence of a highly efficient natural competence system [2]. These properties and the greater ability of protein complexes from thermophiles to crystallize compared with their counterparts from mesophiles [3] have led to the use of isolates of this species as the main model in structural biology. Examples such as the high-resolution structures of the 70S ribosome [4], the bacterial RNA polymerase [5] and the respiratory Complex I [6] are based on the analysis of these complexes from *Thermus* spp.

At the ultrastructural level, the envelope of *Thermus* spp. shows characteristics typical of Gram-negative bacteria, with an external membrane that defines a periplasmic space. However, at the biochemical level, the peptidoglycan composition and the presence of an S-layer homology domain attached to secondary cell wall polymers is more common among Gram-positive bacteria [1]. In any case, it is relevant to state that *Thermus* forms, along with *Deinococcus*, a distinct bacterial phylum [7], for which an ancient origin has been proposed and discussed [8].

Among the great panoply of *Thermus* spp. isolates in existence, *T. thermophilus* strains HB27 and HB8 have been by far the most studied under laboratory conditions. Both

strains are strict aerobes, despite the presence of some genes usually associated with anaerobic metabolism, which was revealed when their sequences were published [9]. Natural competence, in particular in the HB27 strain, is highly efficient and apparently constitutive, allowing incorporation rates of 40 kb per cell and secondly without much difference regarding its origin [10]. This promiscuity has made this strain an ideal laboratory model, allowing the development of a complete genetic toolbox, through which it is possible to analyse the actual function of a given protein *in vivo* [1].

Energy metabolism in *T. thermophilus*

Energy is obtained in *T. thermophilus* preferentially through aerobic respiration. Its respiratory enzymes have been the subject of many biochemical as well as structural studies, making it one of the best known respiratory systems. A great variety of carbon substrates can be catabolized, including most amino acids, different sugars and fatty acids. NADH from a complete tricarboxylic acid cycle is oxidized by Complex I, the proton-translocating type I NADH dehydrogenase (NqoA-N). The 3D (three-dimensional) structure of the soluble domain of this complex enzyme has been solved at high resolution, and that of the whole enzyme, including the membrane domain, has been also obtained recently [11]. Complex II (succinate dehydrogenase) also provides electrons to the respiratory chain. A putative type II NADH oxidase (TTC1829) could also provide electrons to the respiratory chain. Menaquinone-8, the major quinone in membranes of this organism, is oxidized by Complex III, encoded by the operon *fbC-CXFB*. Electrons are then transported to the terminal oxidases through a soluble periplasmic cytochrome *c*₅₅₂, or directly through Complex III. There are two terminal cytochrome oxidases: a *caa*₃-type expressed under fully aerobic growth and a *ba*₃-type that

Key words: denitrification, genomics, nitrate, nitrite, reductase, thermophile, *Thermus thermophilus*.

Abbreviations used: CD, complete denitrificant; Nar, nitrate reductase; NCE, nitrate respiration conjugative element; Nir, nitrite reductase; Nor, nitric oxide reductase; Nos, nitrous oxide reductase; ORF, open reading frame; PD, partial denitrificant; 3D, three-dimensional.

¹To whom correspondence should be addressed (email jberenguer@cblm.uam.es).

is induced under low oxygen pressures. The 3D structure of the latter enzyme is also available. ATP is synthesized by Complex V, a V/A-type ATP-synthase that could have been the consequence of a lateral gene transfer from Archaea (reviewed in [1]).

Despite the sequenced HB27 and HB8 strains not being able to grow in the absence of oxygen, there are other isolates of *Thermus* spp. that are able to grow anaerobically by using nitrogen oxides, sulfur or even metals as electron acceptors. Actually, different isolates identified as *T. thermophilus* have been shown to grow anaerobically by reducing nitrate to nitrite [PD (partial denitrificant)] or by reducing nitrite to a gas form [CD (complete denitrificant)] [12].

The ability to grow by nitrate respiration is encoded by a cluster of genes that could be transferred from the NAR1 PD strain to the aerobic HB27 strain. The group of genes encoding this capability was named NCE (nitrate respiration conjugative element) and included a cryptic replicative origin [13]. The sequence of NCE from NAR1 includes a seven-gene operon that encodes a heterotetrameric Nar (nitrate reductase) (NarCGHI), its dedicated chaperone (NarJ) and two nitrate/nitrite transporters (NarK and NarT). A second operon was found to encode a four-subunit NADH dehydrogenase (NrcDEFN). In addition, an operon (*dnrST*) was found between *nrc* and *nar* that encoded putative transcription factors. DnrT is a CRP (cAMP receptor protein) family member required as an activator of the Pnar, Pnrc and Pdnr promoters, whereas DnrS is required for Pnar and Pdnr expression [14]. Our findings support the hypothesis that the oxygen sensitivity of DnrS is the factor that triggers the activation of the nitrate respiration by low oxygen pressure as there is no FNR (fumarate-nitrate reduction regulator)-like factors in the genome [15]. Probably, its N-terminal GAF domain constitutes the oxygen sensor. Another operon exists downstream of *nar* that encodes two small proteins (provisional names DrpA and DrpB). Their actual function is not known, but there is evidence suggesting a possible role in nitrate sensing (Z. Chahlafi, F. Cava, L. Alvarez and J. Berenguer, unpublished work).

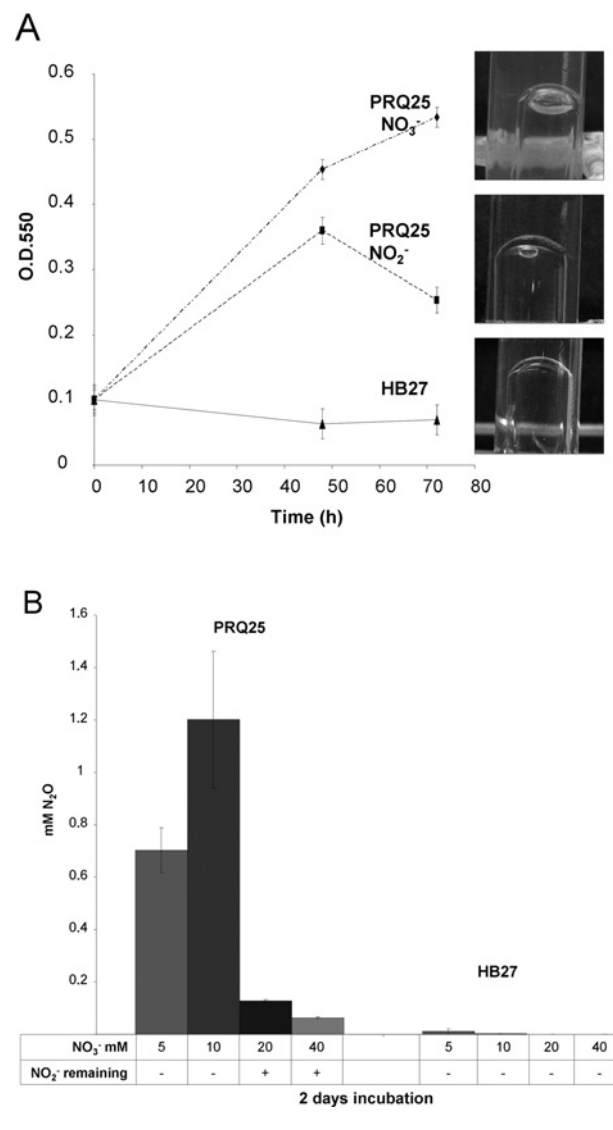
In contrast with nitrate respiration, the enzymes implicated in further reduction steps of the denitrification pathway in CD strains are not known. Actually, it is not known whether or not the denitrification proceeds up to N_2 . To understand the whole process, we have sequenced in parallel the CD strain PRQ25 and the PD strain NAR1 of *T. thermophilus*. In the following sections, we provide some clues to the denitrification process derived from physiological and genomic data.

Completeness of the denitrification pathway in *T. thermophilus* PRQ25

The PRQ25 strain grows anaerobically with nitrate and nitrite, with the concomitant production of gas (Figure 1A), suggesting that nitrogen was reduced at least to the level of N_2O (nitrous oxide) (L. Alvarez, C. Bricio, M.J. Gómez

Figure 1 | Denitrification in *T. thermophilus*

(A) Growth curve of PRQ25 in TB (*Thermus* broth) medium with nitrate (40 mM) or nitrite (5 mM) under anaerobic conditions and the corresponding production of gas. The aerobic HB27 strain was incubated anaerobically with nitrate (40 mM) as a control. (B) Concentration of N_2O produced from the indicated amount of nitrate after 2 days of incubation at 70°C under anaerobic conditions (Hungate tubes). The presence (+) or absence (–) of nitrite after the incubation period is indicated. The aerobic HB27 strain was used as control. O.D., optical density (attenuance).



and J. Berenguer, unpublished work). This was confirmed by gas chromatography on cultures grown anaerobically for 48 h at 70°C in the presence of different concentrations of nitrate. From these assays, we observed that the production of N_2O reached a maximum with 10 mM nitrate and decreased to almost undetectable levels above 20 mM (Figure 1B), in agreement with the decrease in the size of the bubble accumulated inside inverted tubes (results not shown). It is noteworthy that nitrite accumulated in cultures at high nitrate concentrations and that residual nitrate remained at 40 mM. Therefore it seems that an excess of nitrate inhibits the

Table 1 | Main genome data from the NAR1 and PRQ25 strains

Parameter	HB27 (chromosome)	HB27 (pTT27)	NAR1 (total)	PRQ25 (total)
Size (bp)	1 894 877	232 605	2 168 704	2 185 944
G+C (%)	69.4	69.2	67.8	68.9
Coding sequence (%)	95	89	91.3	91.5
Total genes (<i>n</i>)	1988	230	2564	2351
tRNAs (<i>n</i>)	47	–	64	47
Transposases (<i>n</i>)	12	9	11	11

production of N₂O either directly or through an indirect way. Actually, the excess of nitrate does not result in an increase in cell growth, which is lower with 20 or 40 mM nitrate than with 10 mM, supporting a toxic effect probably associated with the accumulation of nitrite/NO. This inhibition was not detected in the PD strain NAR1, despite being able to quantitatively reduce nitrate to nitrite.

These findings support the hypothesis that PRQ25 has active Nars, Nirs (nitrite reductases) and Nors (nitric oxide reductases). The presence of Nos (nitrous oxide reductase) activity is also likely, because the amount of N₂O produced with 10 mM nitrate is much smaller (1.4 mM) than that expected if all of the nitrate used was reduced to this gas. Actually, neither nitrate nor nitrite remains in the medium, and NO accumulation is too toxic to be a possible means of nitrogen losses.

Comparative genomics of the PD and CD strains

Draft sequences of the PRQ25 and NAR1 strains were obtained through pyrosequencing (454 technology; Roche). An average of ten reads/sequence was obtained. The raw reads obtained were assembled into contigs using the 454 *de novo* Newbler Assembly software, and the resulting contigs were annotated through an automatic pipeline developed by the Sequencing and Bioinformatic Unit of the Centro de Astrobiología (CSIC-INTA). Manual inspection of the automatic annotations was focused on genes with putative interest in the denitrification pathway.

The comparison of the sequences obtained with the genome of the HB27 strain shown in Table 1 indicates that PRQ25 and NAR1 have a C+G genome content similar to that of HB27. If we assume that a genome size for a typical *T. thermophilus* strain is 2.15–2.2 Mb, our findings indicate that almost all of the genome from both strains has been sequenced. The higher number of ORFs (open reading frames) predicted in NAR1 and PRQ25 in comparison with the HB27 genome is because the system computes as different ORF fragments of a single gene found at the extreme of two different contigs, and we probably have many of these cases. It is also relevant that approx. 40% of the sequences of the pTT27 megaplasmid from the HB27 strain are identified in both NAR1 and PRQ25, supporting the idea that a similar megaplasmid exists in both strains.

Nitrate respiration genes

A search revealed the presence of NCE in NAR1 and PRQ25. The corresponding NCEs, however, were not identical in both strains. For example, the *nar* operon of PRQ25 encodes a single nitrate/nitrite transporter (NarO) that shows relatively low identity with either NarK or NarT from NAR1. The other genes of the *nar* operon are well conserved between both strains, as well as the regulatory operon *dnrST* and the *dryAB* operon. The *nrc* operon of this strain seems to lack the membrane subunit of the complex (NrcE), so it is not clear how the complex can provide electrons to the Nar. The NCE of PRQ25, however, encodes a putative ferrous iron transporter that is mutated (pseudogene) in NAR1.

The analysis of the regions flanking the NCE, i.e. a search for sequences upstream and downstream of the NCE that show high identity with sequences of the aerobic strains HB27 and/or HB8, indicated that the NCE of both strains was inserted between sequences almost identically with those encoding TTHB134 (5') and TTHB137 (3') of the pTT27 megaplasmid from HB8. These genes are part of one of the variable regions of this megaplasmid [16] (Figure 2). Therefore our data support the hypothesis that the NCE of NAR1 and PRQ25 is located in a variable region of a megaplasmid equivalent to pTT27.

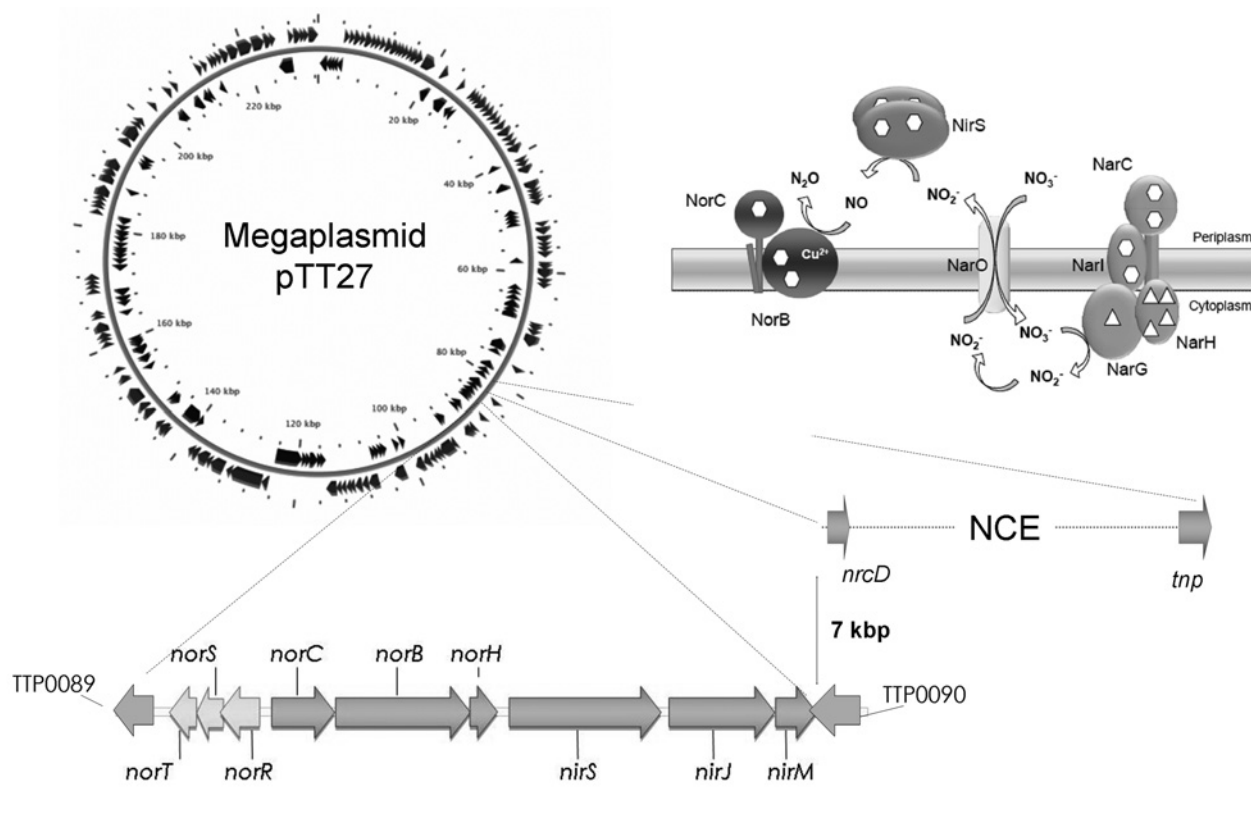
Nitrite respiration genes

In our search among the PRQ25 sequences, we found genes encoding putative Nirs and Nors that were absent from the NAR1 and from the aerobic HB27 and HB8 strains. Actually the *nor* and *nir* genes were clustered in a 6.9 kb DNA fragment that is probably responsible for the reduction of nitrite into N₂O in PRQ25 (Figure 2). The cluster encodes homologues of the subunits of the cytochrome-dependent Nor (NorC and NorB) within an operon that includes a third gene (*norH*) encoding a small membrane protein. Downstream of *norH*, a homologue of *cytochrome cd₁* Nir (*nirS*) is encoded apparently within a monocistronic operon. This is followed by a two-gene operon (*nirJM*) encoding homologues of proteins found in the Nir clusters of other bacteria. Upstream of *norC* there are three genes encoding small proteins, the first of which (*norR*) shows similarities to NO-sensory transcription factors of the MarR family.

Interestingly, genes around this *nor–nir* cluster are almost identical with genes TTP89 (5') and TTP90 (3') from the

Figure 2 | The denitrification supercluster of *T. thermophilus* PRQ25

Left-hand panel: structure of the *nor-nir* cluster and its approximate location on the map of the pTT27 megaplasmid of the aerobic HB27 strain. The NCE was found 7 kb downstream of this cluster and surrounded by genes belonging to the same region of the pTT27 plasmid in the HB8 strain. The names of the genes are explained in the text, except for *tnp*, which encodes a putative transposase. Right-hand panel: putative localization of the proteins implicated in denitrification of PRQ25 is shown. Triangles indicate Fe-S clusters, and hexagons represent haem groups.



pTT27 plasmid of the HB27 strain. These genes also belong to the same variable region in which the NCE gene was found, supporting that they are clustered. This was finally confirmed by joining the corresponding contigs through PCR, leading us to the conclusion that the *nor-nir* cluster is 7 kb upstream of the first NCE gene (*nrcD*). Therefore three of the enzymes in the denitrification pathway (Nar, Nir and Nor) are clustered in a variable region of a megaplasmid from PRQ25.

Despite our efforts, no homologues of typical Nos were found within the proteins encoded by the PRQ25 and NAR1 genomes, suggesting that either this process is not carried out in PRQ25 or that another enzyme plays this role.

Concluding remarks

Our draft genomic data from the CD strain PRQ25 shows the existence of a supercluster of genes encoding homologues of Nar, Nir and Nor from other organisms. This denitrification supercluster is surrounded by genes belonging to a variable region of the pTT27 megaplasmid found in the aerobic strains

HB8 and HB27. In the NAR1 strain, only the NCE was present, but, unexpectedly, within an equivalent position to that of PRQ25, supporting that it was integrated in such a position in an ancestral *T. thermophilus* strain from which both NAR1 and PRQ25 derive. It is interesting to note that the last gene in the NCE insertion in both organisms encodes a putative transposase (Figure 2) that could be implicated in its integration. It is also relevant to note that, despite this likely common origin, differences such as a single nitrate-nitrite transporter in PRQ25 (NarO) instead of the two found in NAR1 (NarK and NarT) were found. Such differences could be related with the ability of the former to eliminate the nitrite through reduction to N₂O, whereas the latter has to synthesize a more efficient nitrite secretion system to tolerate its toxicity. Other differences such as the lack of a full-size *nrcE* gene in PRQ25 and the presence of a complete iron transporter gene in this strain instead of the pseudogene found in NAR1 are not so straightforward to explain.

The denitrification supercluster also encodes homologues of putative regulatory proteins (NorR) and of proteins

probably implicated in electron transport (NirM) or in the synthesis of the *haem d₁* (NirJ). It is interesting to note that genes hypothetically essential for NirS maturation are not part of the cluster. An example is NirE (uroporphyrinogen-III methyltransferase), usually encoded in *nir* operons of other bacteria. As a homologue of this enzyme is encoded within the chromosome of PRQ25 and HB27 (PRQ25_1676, 95% identical with TTC0308), no need for the clustering with *nirS* of additional homologues of this enzyme exists in *T. thermophilus*.

Regarding the completeness or not of the denitrification pathway carried out by PRQ25, our results suggest that, despite no homologues of NosZ appearing in the genome draft, part of the N₂O could be reduced to N₂ by another enzyme, as the nitrogen balance reveals a loss of nitrogen in the process. An alternative explanation could be that part of the nitrite was transformed into ammonia by an enzyme (PRQ25_1681) 98% identical with TTC0313 from HB27, a protein annotated as a ferredoxin-nitrite reductase. However, this enzyme more likely represents a sulfite reductase, as it clusters with enzymes such as phosphoadenonine phosphosulfate reductase (PRQ25_1678), which has been implicated in the assimilation of sulfate. Future genetic work will allow us to definitively confirm or to discard this possibility.

Acknowledgement

We thank Professor David Richardson for his advice.

Funding

This work was supported the Ministerio de Ciencia e Innovación [grant number BIO2007-60245]. L.A. and C.B. are supported by fellowships from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and the Ministerio de Educación respectively. An institutional grant from Fundación Ramón Areces to Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) is also acknowledged.

References

- 1 Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J. (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* **13**, 213–231
- 2 Averhoff, B. (2009) Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 611–626
- 3 Jenney, Jr, F.E. and Adams, M.W. (2008) The impact of extremophiles on structural genomics (and vice versa). *Extremophiles* **12**, 39–50
- 4 Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883–896
- 5 Severinov, K. (2000) RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 118–125
- 6 Sazanov, L.A. and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430–1436
- 7 Weisburg, W.G., Giovannoni, S.J. and Woese, C.R. (1989) The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**, 128–134
- 8 Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B. and Bork, P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**, 1283–1287
- 9 Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R. et al. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 547–553
- 10 Schwarzenlander, C. and Averhoff, B. (2006) Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* **273**, 4210–4218
- 11 Efremov, R.G., Baradaran, R. and Sazanov, L.A. (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**, 441–445
- 12 Cava, F., Zafra, O., da Costa, M.S. and Berenguer, J. (2008) The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ. Microbiol.* **10**, 522–533
- 13 Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., Marin, I. and Berenguer, J. (1998) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**, 3137–3143
- 14 Cava, F. and Berenguer, J. (2006) Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 97–100
- 15 Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafi, Z., Blas-Galindo, E., Gomez-Puertas, P. and Berenguer, J. (2007) Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol. Microbiol.* **64**, 630–646
- 16 Omelchenko, M.V., Wolf, Y.I., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M.J., Koonin, E.V. and Makarova, K.S. (2005) Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol. Biol.* **5**, 57

Received 9 September 2010
doi:10.1042/BST0390249

Lateral Transfer of the Denitrification Pathway Genes among *Thermus thermophilus* Strains[∇]

Laura Alvarez,¹ Carlos Bricio,¹ Manuel José Gómez,² and José Berenguer^{1*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, Spain,¹ and Centro de Astrobiología (CSIC/INTA), Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, 28850 Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain²

Received 31 August 2010/Accepted 7 December 2010

Nitrate respiration is a common and strain-specific property in *Thermus thermophilus* encoded by the nitrate respiration conjugative element (NCE) that can be laterally transferred by conjugation. In contrast, nitrite respiration and further denitrification steps are restricted to a few isolates of this species. These later steps of the denitrification pathway are under the regulatory control of an NCE-encoded transcription factor, but nothing is known about their coding sequences or its putative genetic linkage to the NCE. In this study we examine the genetic linkage between nitrate and nitrite respiration through lateral gene transfer (LGT) assays and describe a cluster of genes encoding the nitrite-nitric oxide respiration in *T. thermophilus* PRQ25. We show that the whole denitrification pathway can be transferred from the denitrificant strain PRQ25 to an aerobic strain, HB27, and that the genes coding for nitrite and nitric oxide respiration are encoded near the NCE. Sequence data from the draft genome of PRQ25 confirmed these results and allowed us to describe the most compact *nor-nir* cluster known thus far and to demonstrate the expression and activities of the encoded enzymes in the HB27 denitrificant derivatives obtained by LGT. We conclude that this NCE *nor-nir* super-cluster constitutes a whole denitrification island that can be spread by lateral transfer among *Thermus thermophilus* strains.

Several prokaryotes can respire nitrogen oxides by using one or more reduction steps of the denitrification pathway ($\text{NO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{NO} > \text{N}_2\text{O} > \text{N}_2$) (31). In the denitrificant mesophilic bacterial models studied thus far, this process starts with a heterotrimeric membrane-bound nitrate reductase (Nar). Nitrite produced in the cytoplasm is secreted and reduced to nitric oxide either by heme (NirS)- or by copper (NirK)-containing periplasmic nitrite reductases. The highly toxic product NO is immediately reduced to N_2O by a membrane-bound reductase depending on either cytochrome *c* (cNor) or quinones (qNor) as electron donors. In many but not all of the denitrificant microorganisms, N_2O is finally reduced to N_2 by a periplasmic reductase (NosZ). However, N_2 is also produced in organisms that encode no NosZ homologues, supporting that a different kind of N_2O reductase might exist (33). The *nir* and *nor* genes are frequently clustered in the genomes of denitrificant strains and expressed in a coordinated form to avoid the separate and potentially toxic accumulation of NO, whereas *nar* and *nos* genes usually appear at separate loci in the genome (32).

Denitrification is widespread among the prokaryotic phylogeny, including the genomes of ancient bacterial and archaeal lineages such as extreme thermophiles and hyperthermophiles. This and the discrepancies existent between the phylogeny of denitrification genes and that of the 16S RNA has been used to suggest an ancient origin for this pathway and its spread through lateral gene transfer (LGT) (15, 16, 22). However,

studies on the denitrification pathway and putative LGT in ancient bacterial or archaeal models are limited because of the difficulties associated with the laboratory handling of such microorganisms. The exception to this rule is *Thermus thermophilus*, an extreme thermophilic bacterium for which a complete genetic toolbox exists (7). The type strain and other isolates of this species are obligate aerobes, but many other strains have been isolated that can grow as facultative anaerobes through partial or, apparently, complete denitrification (9). Partial denitrificant strains such as NAR1 reduce nitrate with a final production of nitrite that accumulates in the growth medium. Nitrate reduction is carried out by a special kind of nitrate reductase (Nar) that contains a periplasmic cytochrome *c* in addition to the three subunits found in other nitrate reductases (30). Nar is encoded within the NCE (for nitrate conjugative element), a genetic element that can be transferred by conjugation to aerobic strains of the same species, allowing the receptor to grow anaerobically with nitrate (24). The NCE also encodes a nitrate-dependent NADH dehydrogenase, two nitrate/nitrite transporters, and genes required for their transcriptional control by oxygen and nitrate (reviewed in reference 6). In addition to the NCE, denitrificant strains such as PRQ25 are able to grow by reducing nitrite with the production of gas. However, the genetic analysis of the whole denitrification equipment of the PRQ25 strain has been hampered by the low efficiency of its natural competence system, which shows 1,000-fold-reduced plasmid transformation efficiency compared to the aerobic HB27 strain (unpublished data).

To analyze a putative genetic linkage between nitrate and nitrite respiration in *T. thermophilus* and concomitantly to gain genetic access to the denitrification process itself, we demonstrate the LGT of both pathways to the aerobic HB27 strain.

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 911964498. Fax: 34 911964420. E-mail: jberenguer@cbm.uam.es.

[∇] Published ahead of print on 17 December 2010.

TABLE 1. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')	Amplified gene
narC BcuI dir	ACTAGTGGAGGTGAGGATGGCGAGAAGGCTCCTACCC	<i>narC</i>
narC ClaI rev	ATCGATCCTCCTAAGCTGGGCGCGGATCC	<i>narC</i>
<i>nirS</i> Δ24NdeI dir	AAAACATATGACTCCGGAGGAGCGGG	<i>nirS</i>
<i>nirS</i> +stopEcoRI rev	AAAAGAATTCTCAGTAGATGTCGTGGGCGG	<i>nirS</i>
<i>norC</i> Δ58NdeI dir	AAAACATATGAACCAGATCCGGAGGGCT	<i>norC</i>
<i>norC</i> +stopHindIII rev	AAAAAAGCTTCTACTCCGCCGCCGCAAA	<i>norC</i>
<i>Tih</i> _GroES_Nco_fw3	AAAAAACCATGGATGGCCGCGGAGGTGAAGAC	<i>groE</i>
groES_ClaI_rv	AAAAAATCGATCTGCAGGACCGCAAGCAGGTC	<i>groE</i>

We show that the NCE, coding for the nitrate respiration, and a compact gene cluster coding for the Nir and Nor reductases are encoded together within a variable region of a megaplasmid of *T. thermophilus* PRQ25 forming a denitrification supercluster. The compactness of this supercluster allows the spread by LGT of the pathway as a single unit to aerobic strains of *T. thermophilus*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. *T. thermophilus* HB27 and its derivative HB27*gdh::kat* grow aerobically, whereas *T. thermophilus* PRQ25 is a facultative strain that can grow by denitrification (9, 19). *T. thermophilus* strains were grown aerobically in TB liquid medium (23) at 70°C with mild shaking (150 rpm). Anaerobic growth was achieved in screw-cap tubes containing 10 ml of TB medium supplemented with potassium nitrate (40 mM) or sodium nitrite (5 to 10 mM) overlaid by mineral oil. For gas detection, the strains were grown in TB with nitrate 10 mM in Hungate tubes, leaving a headspace for the collection of gas samples with a syringe. *T. thermophilus* colonies were grown aerobically on TB agar (1.5% [wt/vol] agar) plates. Kanamycin (30 mg/liter) was added to liquid or solid medium for selection when required. Nitrate reduction and nitrite consumption assays were carried out in 96-multiwell plates containing 250 μl of TB with either 40 mM potassium nitrate or 5 mM sodium nitrite. The plates were covered with an aluminum adhesive plate (Greiner Bio-One, catalog no. 676090), followed by incubation at 70°C for 16 h for nitrate reduction or for 48 h for nitrite consumption.

Escherichia coli DH5α (*supE44 ΔlacU169 [φ80lacZΔM15] hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) was used for the construction of plasmids. *E. coli* BL21(DE3) [*hsdS gal(λcIts857 ind-1 Sam7 nin-5 lacUV5-T7 gene 1)*] and Rosetta-gami 2 [BL21(DE3) (*lonA ompT txB/gor pRARE*); Novagen] were used for expression from T7-dependent promoters. *E. coli* strains were grown at 37°C on liquid or solid LB medium. Kanamycin (30 mg/liter), ampicillin (100 mg/liter), and chloramphenicol (30 mg/liter) were used when needed.

Transformation and conjugation experiments. Total DNA from *T. thermophilus* PRQ25 was isolated as described previously (20). For transformation experiments, total DNA (200 ng) from the donor strain was added to 0.8-ml exponential cultures (optical density at 550 nm = 0.2) of HB27 or HB27*gdh::kat* aerobic strains, allowing incubation at 70°C to continue for 4 h with standard shaking. The cells were then diluted to 10 ml with preheated TB and incubated under anaerobic conditions with nitrate or nitrite for the selection of facultative anaerobes. For conjugation, cultures of the acceptor (HB27*gdh::kat*) and donor (PRQ25) strains grown aerobically for 16 h in TB at 70°C to stationary phase were centrifuged (5,000 × g, 5 min, room temperature), washed with 1 volume of magnesium sulfate 10 mM at room temperature, and resuspended in the same volume of this buffer solution. Then, 10 μl of the each cell suspension containing ~10⁷ cells was added together on top of sterile nitrocellulose filters (Whatman Protran BA85) placed on TB plates. After 16 h at 70°C, the cells on the filters were resuspended in 10 ml of preheated TB medium containing kanamycin and nitrate or nitrite. After overnight incubation under anaerobic conditions, individual colonies were isolated on kanamycin-containing TB plates and subjected to nitrate reduction/nitrite consumption assays (25). The nature of the colonies derived from HB27 was confirmed by analysis of their membrane protein profiles.

Detection of denitrification genes and proteins. A draft sequence from *T. thermophilus* PRQ25 was obtained through pyrosequencing in a Roche-454 system (Lifesequencing, Valencia, Spain). The genes encoding enzymes implicated in the denitrification process were identified by BLAST sequence comparisons

(1). The sequence of the *nor-nir* cluster was deposited in the gene bank with the accession number FN666415. The presence of denitrification genes in the HB27 derivatives was assayed by PCR with the primers indicated in Table 1.

For the detection of the NirS and NorC proteins *in vivo*, N-terminal deletion derivatives of these proteins were overexpressed in *E. coli* and purified to further raise specific rabbit antisera as described previously (23). The NirSΔ24N protein was overproduced in *E. coli* Rosetta-gami 2/DE3 from a pET28b (Novagen) derivative carrying between its single NdeI and EcoRI sites a *nirS* fragment obtained by PCR with the primers *nirS*Δ24NdeI dir and *nirS*+stopEcoRI rev (Table 1). The NorCΔ58N protein was expressed in *E. coli* BL21 from a pET22b (Novagen) derivative in which the PCR-amplified sequence (primers *norC*Δ58NdeI dir and *norC*+stopHindIII rev in Table 1) was cloned between the NdeI and the HindIII sites. Expression was carried out at 37°C in 4-h induction experiments after the addition to exponential cultures of 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). The proteins from the soluble (NorCΔ58N) or insoluble (NirSΔ24N) fractions were separated by SDS-PAGE, excised from the gels, and used to immunize New Zealand rabbits in four bursts, separated by 15 days each. The antisera obtained after 2 months were used for immunodetection of NirS and NorC by Western blotting. For this, proteins analyzed by SDS-PAGE were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, followed by incubation for 2 h at room temperature with specific rabbit antiserum diluted (1:5,000) in PBST buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasic, 2 mM potassium phosphate monobasic [pH 7.4], 0.1% Tween 20). After being washed with the same buffer, the antibodies bound to the membrane were identified after incubation in similar conditions with secondary mouse monoclonal anti-rabbit antibodies (1:5,000) labeled with horseradish peroxidase. Detection was carried out by using bioluminescence. The antisera used to detect NarG and DnrT were previously described (8).

Nitrate reductase activity and N₂O detection. Nitrate reductase activity was measured by the amount of nitrite produced (25) with reduced methyl viologen as electron donor. Nitrous oxide was measured from gas samples taken from the headspace of cultures grown in Hungate tubes at 70°C after 5 days of incubation. Gas samples were injected into a Perkin-Elmer Clarus 500 gas chromatograph with an Elite-Plot Q 30-m, 0.53-mm (inner diameter) column installed. The injector temperature was maintained at 115°C, the column was maintained at 90°C, and the electron capture detector was maintained at 350°C. The N₂O peak has a retention time of 5.4 min (± 3%), and its concentration was calculated by using a standard curve with 0.4-, 100-, and 1,000-ppm standards (Stg gas mixtures).

The putative production of N₂ by the strains was studied by using 30% of ¹⁵N-labeled sodium nitrate 5 mM in the growth medium. Gas samples from the headspace of cultures grown in Hungate tubes for 5 days at 70°C were analyzed by using an isotope ratio mass spectrometer (SerCon, Ltd.) at the University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, and the amounts of N₂ and N₂O accumulated were measured as described previously (3).

RESULTS

LGT of the denitrification pathway through natural competence. The aerobic strain *T. thermophilus* HB27 expresses constitutively an extremely efficient natural competence system (2, 17). In order to check whether the genes encoding the denitrification pathway in *T. thermophilus* PRQ25 could be transferred by this system, we added genomic DNA (200 ng/ml) from this denitrificant strain to exponential cultures of a kanamycin-resistant derivative of HB27 (HB27*gdh::kat*) (8).

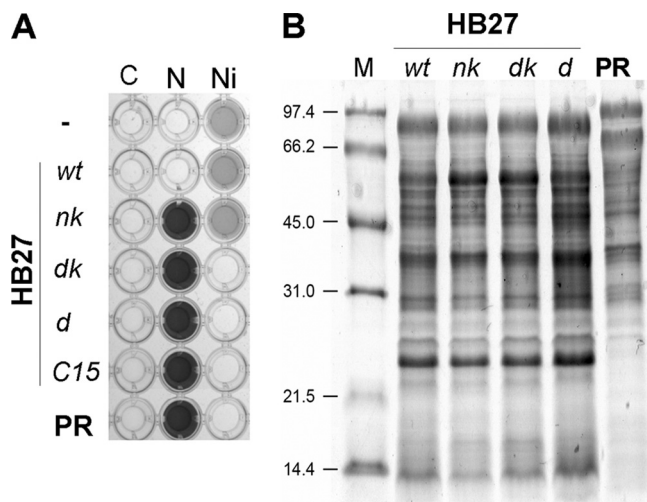


FIG. 1. LGT of the denitrification pathway. (A) Nitrite detection after 48 h of anaerobic incubation in the presence of nitrate 40 mM (column N), nitrite 5 mM (column Ni), or without electron acceptor (column C). Note that nitrate reduction results in the production of high nitrite concentrations (dark color), whereas nitrite consumption is detected as the lack of color. (B) SDS-PAGE of membrane proteins from the indicated strains stained with Coomassie blue. Strains: wild-type HB27 (lane *wt*); PRQ25 (lane PR); HB27 derivatives HB27 nk (lane *nk*), HB27 dk (lane *dk*), HB27 d (lane *d*), and HB27 $C15$ (lane *C15*).

After overnight selection for anaerobic growth at 70°C in the presence of nitrate (40 mM) (Materials and Methods), the colonies that grew on kanamycin plates were subjected to nitrate reductase presence assays. From 25 colonies assayed, 22 were able to reduce nitrate to nitrite (derivative *nk*, Fig. 1A), showing that the NCE can be the subject of LGT by natural competence. However, none of these nitrate-reducing colonies was able to consume (reduce) nitrite, despite several repetitions of the experiment were performed.

When overnight selection was carried out with nitrite as electron acceptor, none of the colonies analyzed were able to reduce nitrite in nitrite consumption assays. Thus, to check whether our inability to isolate nitrite-respiring strains was related to the absence of the NCE in the receptor strain, we transformed the nitrate-respiring (NCE-containing) *nk* derivative with DNA from PRQ25. In this case, the overnight enrichment by anaerobic growth with nitrite led to the selection of a high number (25 of 48) of nitrite-reducing clones (*dk* in Fig. 1). Since the *nk* derivatives are kanamycin resistant, as is their parental HB27 $gdh::kat$ strain, we repeated the isolation process with the HB27 strain as acceptor to obtain a kanamycin-sensitive denitrificant derivative for future genetic manipulations (strain *d* in Fig. 1). To verify that all of the nitrate and nitrite respiring strains isolated were derived from HB27, comparison of the respective membrane protein profiles to that of the parental HB27 (*wt*) and the PRQ25 strains was performed. As shown in Fig. 1B, the protein profiles of the isolates are indistinguishable from that of HB27 and are quite different from the protein profile of PRQ25.

LGT of the denitrification pathway by conjugation. The transformation experiments described above demonstrated that nitrate and nitrite respiration cannot be cotransferred

within a single 20- to 25-kbp DNA fragment of the genome but did not indicate how distant the genes encoding these properties were located in the genome. Since conjugation between strains of *T. thermophilus* has been addressed (24), we checked whether the PRQ25 strain could transfer the denitrification pathway to the HB27 strain by this method. For this, we incubated overnight the PRQ25 and HB27 $gdh::kat$ strains together on top of nitrocellulose filters placed on TB plates and then selected overnight by anaerobic growth on nitrate in kanamycin-containing medium (see Materials and Methods). After plating, we noted a high number of nitrate-reducing colonies, supporting that PRQ25 was also able to transfer DNA to the HB27 strain by conjugation. Interestingly, many of these nitrate-reducing colonies (20 of 50 examined) were also able to reduce nitrite (derivative *C15* in Fig. 1A). This genetic linkage between nitrate and nitrite reduction indicates that both properties are clustered within the genome of the PRQ25 strain, thus supporting the existence of a supercluster encoding the denitrification pathway. As expected, all of the nitrite-respiring derivatives isolated after selection for anaerobic growth with nitrite were also able to use nitrate, supporting again the NCE dependence of the nitrite respiration. The membrane protein profiles of some of these colonies were analyzed and found indistinguishable from that of the HB27 strain (not shown).

Anaerobic growth of HB27 derivatives. Figure 2A shows that all of the HB27 derivatives that were able to reduce nitrate in Fig. 1A were also able to grow anaerobically with this electron acceptor, whereas the parental HB27 strain showed only residual growth likely due to the oxygen remaining in the tubes from the start of the experiment. As expected, the denitrificant derivatives displayed a better cell yield than the nitrate-respiring strains, likely due to an increase in energy yield per mol of nitrate expected from the subsequent denitrification steps. Actually, the nitrite-reducing strains grew on nitrite only to slightly lesser cell yields than the PRQ25 strain (Fig. 2B). As previously stated, only residual growth due to residual oxygen was detected for the aerobic HB27 and its nitrate-respiring derivative *nk*.

In order to know whether nitrite respiration was also followed by NO reduction, we analyzed the production of N₂O on anaerobic cultures with nitrate. As shown in Fig. 2C, the transformant HB27 d , the exconjugant HB27 $C15$, and the PRQ25 strain produced similar amounts of N₂O. In contrast, no gas was detected in the parental HB27 strain incubated under the same conditions. Interestingly, the amount of N₂O detected (1.2 to 1.4 mM) was less than the maximum expected if all of the nitrate used was reduced to N₂O (5 mM), suggesting that most N₂O was reduced to N₂. To address this point, we carried out anaerobic growth assays in the presence of ¹⁵N-labeled nitrate and analyzed the amounts of ¹⁵N-labeled N₂ and N₂O formed (see Materials and Methods). Our data showed that no N₂ was formed from nitrate, despite the total amount of N₂O detected (ca. 0.35 and 0.2 mM for the PRQ25 and the HB27 d strains, respectively) was less than expected if all nitrate added to the culture was used for denitrification (2.5 mM). We concluded that NO reduction was the last step of the denitrification pathway in these strains.

***nor-nir* cluster of *T. thermophilus* PRQ25.** The data from Fig. 2C showing the production of N₂O in HB27 derivatives selected for anaerobic growth on nitrate (*C15*) or nitrite (*dk* or *d*)

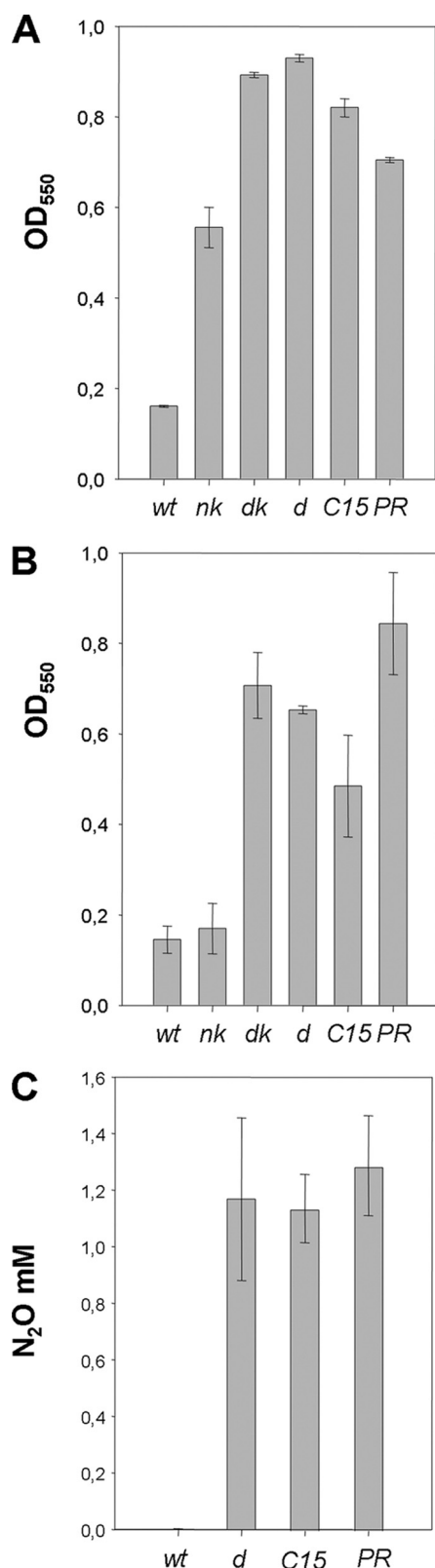


FIG. 2. Denitrification in HB27 derivatives. (A) Anaerobic growth of the indicated strains on nitrate (40 mM) after 48 h at 70°C. (B) Anaerobic growth with nitrite (10 mM) after 48 h at the same temperature. (C) N₂O production by the indicated strains after 5 days of anaerobic growth with nitrate (10 mM). Strains are named as in Fig. 1. The standard deviations are indicated.

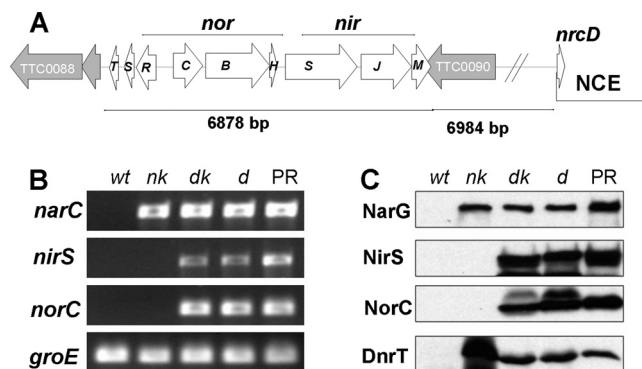


FIG. 3. Denitrification genes and proteins in HB27 derivatives. (A) Gene map of the *nor-nir* cluster and the surrounding genetic environment. (B) PCR amplification of *narC*, *nirS*, *norC*, and *groE* (housekeeping gene) using similar amounts of total DNA from the indicated strains as templates and the primer pair indicated in Table 1. (C) Western blots to detect NarG (nitrate reductase alpha subunit), NirS (putative cytochrome *cd*₁ nitrite reductase), NorC (putative nitric oxide reductase cytochrome *c* subunit), and DnrT (NCE transcription factor) on the indicated strains grown under anaerobic conditions with nitrate for 16 h. The strains are labeled as in Fig. 1.

suggest that the genes encoding the NO reductase are clustered close to those encoding for nitrate and nitrite respiration in the PRQ25 genome. To demonstrate this, we obtained a draft sequence of the PRQ25 strain through pyrosequencing. As schematized in Fig. 3A, we identified a 6.9-kbp gene cluster encoding homologues to nitrite and nitric oxide reductases from different organisms (*nor-nir* cluster). This cluster was surrounded by genes encoding homologues to proteins TTP0088 and TTP0090 from the megaplasmid of the aerobic strain HB27. No homologues to putative multi-copper oxidases were coded around the *nor-nir* cluster that could play a role in nitrous oxide reduction. However, the *nor-nir* cluster was located 7 kbp upstream from the first gene (*nrcD*) of the 23-kbp NCE. Therefore, we confirmed by sequencing the presence in the PRQ25 strain of a 37-kbp denitrification cluster encoding the nitrate, nitrite, and nitric oxide reductases.

In the *nor-nir* cluster, NorC (221 amino acids) and NorB (476 amino acids) are homologues to the subunits of cytochrome *c*-dependent nitric oxide reductases (cNor). Both coding genes are separated by 10 bases and preceded by a ribosome-binding site (RBS). As expected from their similarities to the subunits of the cNor, the topology predictions indicated that NorC is a periplasmic mono-heme *c* cytochrome anchored to the membrane through two transmembrane helices located near its N-terminal region. On the other hand, NorB is a polytopic (12 transmembrane helices) integral membrane protein. Overlapping *norB* and preceded by its RBS, we identified a putative gene (*norH*) that encodes a 98-amino-acid membrane protein, for which three transmembrane helices are predicted. A putative Rho-independent transcription terminator is found downstream of *norH*, suggesting that *norCBH* constitutes an operon. Interestingly, from a phylogenetic point of view, this *nor* operon and its encoded proteins are highly conserved in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 and other members of the ancient *Aquificae* phylum. The corresponding pro-

teins from this organism are 61, 67, and 54% identical to *T. thermophilus* PRQ25 NorC, NorB, and NorH, respectively.

At a position 120 bp downstream from *norH*, the *nor-nir* cluster contains a gene, *nirS*, which encodes a 536-amino-acid homologue to the cytochrome *cd*₁ nitrite reductases found in many denitrifiers. Like its homologues, the NirS precursor includes a *sec*-dependent signal peptide with a cutting site (LA-Q) common to several periplasmic proteins from *T. thermophilus*, including the cytochrome *c*₅₅₂ precursor. Sequence alignments and structure models based on the NirS protein from *Paracoccus pantotrophus* (PDB entries 1e2r, 1gq1, and 1hj5) confirm that mature NirS protein from *T. thermophilus* contains the amino acids implicated in the binding of heme *c* and heme *d*₁ groups (12). A putative rho-independent terminator follows *nirS*, supporting that this gene is transcribed as a monocistronic unit. Downstream and separated by 81 bp from the stop codon of *nirS*, a gene was found (*nirJ*) that encodes a 375-amino-acid membrane protein belonging to the radical SAM protein family. This protein has homologues of unknown function in most *nir* clusters from other origins. Downstream of *nirJ* and separated by 5-bp starts *nirM*, a gene that encodes a 144-amino-acid protein. The putative NirM precursor includes a *sec*-dependent signal peptide that ends with the LA-Q cutting site, and a heme *c* binding motif (CSSCH) near the N terminus of the mature form of the protein. Sequence comparison and topology predictions support that NirM is a soluble periplasmic cytochrome *c* homologue to cytochrome *c*₅₅₂ from *Thermus* sp. and to other periplasmic cytochromes *c* of unknown function clustered with *nirS* on different denitrificant bacteria. As above, each of the *nir* genes start codons is preceded by an RBS, supporting their actual translation in *T. thermophilus*.

A putative operon located upstream from *norC* and transcribed in opposite direction contains three small open reading frames (ORFs). The first ORF of this putative operon (*norR*) encodes a 141-amino-acid protein that shows similarities to transcription factors from the MarR family. The protein contains an N-terminal HTH DNA-binding motif and three cysteines at its C-terminal domain. A homologue of this putative protein—NsrR from *Streptomyces coelicolor*—has been implicated in NO sensing through a [2Fe-2S] cluster (29). Downstream of *norR*, two small proteins are encoded (NorS [78 amino acids] and NorT [98 amino acids]) that are homologues to uncharacterized proteins conserved in several bacteria. On the other hand, a search for homologues of NosZ in the PRQ25 genome draft yielded no significant hits.

Expression of the denitrification genes in HB27 derivatives. Figure 3B confirms through PCR that selected genes implicated in nitrate, nitrite, and nitric oxide respiration were transferred to the HB27 derivatives. The *narC* gene from the NCE was positively amplified in all of the facultative strains (PRQ25 and HB27 derivatives), whereas *nirS* and *norC* were found only in the nitrite-respiring strains and not in the nitrate-respiring ones. In the parental HB27 strain, only the housekeeping *groE* gene, used as a PCR control, was detected. To confirm the actual expression of the main genes of the *nor-nir* cluster in the receptor strain, we expressed NirS and NorC fragments in *E. coli* and prepared antisera against them (see Materials and Methods). As seen in Fig. 3C, the NirS and NorC proteins were detected only in the denitrificant strains upon anaerobic incubation with nitrate, whereas the major subunit of the ni-

trate reductase (NarG) and the DnrT transcription factor were expressed in all of the facultative strains. None of these proteins were detected in the aerobic HB27 parental strain. It is important to note that the NirS and NorC proteins sizes corresponded to that expected for their respective amino acid sequences.

The denitrification supercluster is surrounded by genes from a megaplasmid. Downstream (267 bp) of *norT*, we identified a DNA sequence almost identical to that encoding the C terminus of the TTC0089 ORF from the pTT27 megaplasmid of the HB27 strain. At the 3' extreme of the *nor-nir* cluster, the last 26 bases of *NirM* are complementary to a sequence encoding the C terminus of TTC0090, also from pTT27. Therefore, it appears as though in PRQ25 the *nor-nir* cluster was inserted within a group of preexisting genes from its megaplasmid. It is interesting that synteny comparisons between the pTT27 megaplasmids from the aerobic strains *T. thermophilus* HB27 and HB8 reveal that this region is highly variable (5). On the other hand, the first gene of the NCE (*nrcD*), located 6,984 bp downstream from *nirM*, is also preceded by genes homologous to those found in the pTT27 megaplasmid, including a putative transposase found downstream the NCE (data not shown). In conclusion, the NCE and the *nor-nir* cluster are inserted within homologues to genes belonging to a highly variable region of the pTT27 megaplasmid. Actually, our draft sequence shows that most of the core genes of the HB27 and HB8 pTT27 megaplasmid are conserved in PRQ25, strongly supporting the existence of an equivalent megaplasmid in PRQ25.

DISCUSSION

The availability of hundreds of genome sequences has revealed that the denitrification pathway is not associated with specific taxa but heterogeneously distributed among members of several phylogenetic phyla. Such analysis has led to the suggestion that this metabolic ability has been spread through several LGT events (15, 16, 22). Our data demonstrate that LGT of the denitrification pathway occurs between *T. thermophilus* strains.

The aerobic HB27 strain used as a receptor in our LGT experiments is well known for the high efficiency of its natural competence system, allowing individual cells to incorporate linear DNA at rates of ~40 kbp/s, irrespective of its origin (2). However, the processivity of the system, i.e., the size of a DNA fragment that can be incorporated into the cell in a continuous form by each competence apparatus, is not known. In our transformation experiments, we observed the efficient transfer of the whole NCE (23 kbp) when selection was carried out on nitrate, thus confirming that the competence system can handle DNA fragments of at least this size. Having in mind that the size of the *nor-nir* cluster was smaller than the NCE, the inability to obtain nitrite-respiring strains through a single transformation step confirms the dependence of this process from transcription factors encoded by the NCE (9). On the other hand, these data support that the transfer of a single DNA fragment encoding both properties—at least 37 kbp, as shown by sequencing—is not frequently achieved under the conditions used in our assays. In any case, it is likely that the natural competence system could incorporate the whole deni-

trification cluster if challenged with larger PRQ25 DNA fragments than those used in our assays.

In contrast to transformation, conjugation can handle even a whole chromosome (13, 18). Actually, the NAR1 strain can transfer chromosomal markers in a mating time-dependent way (24), supporting the existence of an integrated F-like conjugative plasmid wearing the NCE that leads the DNA transfer as in Hfr (high frequency of recombination) strains of *E. coli* (18). In the conjugation assays with PRQ25 as a donor, we detected a highly efficient transfer of the denitrification equipment, indicating that in this strain, too, the denitrification cluster is part of a conjugative element. Because the sequence data support that in NAR1 (not shown) and in PRQ25 the denitrification enzymes are integrated in the same region of the pTT27 megaplasmid, it is tempting to speculate that the conjugative element itself is the megaplasmid and that the transfer of chromosome-associated markers observed in the NAR1 strain is the consequence of its integration into the chromosome through any of the several insertion sequences common to both replicons (14) as happens with the F or R plasmids of *E. coli* (18). However, we did not find around the denitrification cluster any homologues to proteins implicated in conjugation in other bacteria, suggesting that the conjugative capability is not part of the denitrification cluster but likely is associated with separate genes from the megaplasmid. In this sense, our sequence shows the presence of genes encoding homologues to components of type IV pili but not to any other conserved protein implicated in conjugation in other organisms.

Though it was demonstrated that the whole denitrification capability could be transferred by natural competence and by conjugation, the question regarding the phylogenetic origin of the supercluster remains. The calculation of anomalous GC content and the codon adaptation index (11, 21) supports the idea that neither the *nor-nir* cluster nor the NCE had been acquired recently by *T. thermophilus* because these values are in good agreement with those for the housekeeping genes of the genus. However, protein sequence comparisons revealed high similarities between the sequences of the Nor and Nir proteins from *T. thermophilus* and those of *Hydrogenobacter thermophilus* (27, 28) and other members of the *Aquificae* phylum (e.g., *Persephonella maritima* and *Hydrogenovirga* sp.), which share with *T. thermophilus* a thermophilic lifestyle. In addition, the use of bipartition dissimilarity analysis (4) suggests an old LGT event from the *Aquificae* to *Thermus* as the origin of the *nor-nir* cluster. In this sense, it is important to note that *nor-nir* and the NCE clusters are likely inserted within a highly variable region from a pTT27-like megaplasmid of PRQ25. Therefore, the most likely phylogenetic analysis indicates that the NCE and the *nor-nir* clusters have been inserted recently in the genome of PRQ25, perhaps from another *Thermus* sp. or from a closely related species, where it has been adapted to fit the appropriate codon usage and the regulatory components that make it able to be expressed in response to the appropriate external signals.

The association between the presence of these *norC* and *nirS* genes and their expression and activity in the HB27 derivatives shows a direct relationship between the presence of these genes and anaerobic growth by denitrification. Thus, there are no doubts about the roles as reductases of the products of the

norCB and *nirS* genes. However, there are different genes in the cluster for which we can only speculate about their role. For example, the *norH* gene codes for a small membrane protein conserved in *nor* operons from the thermophilic members of the *Aquificae* group (27), supporting its putative role as a third unit or as a dedicated chaperone of the corresponding enzyme. On the other hand, the *nirJM* putative operon constitutes the smaller cluster of *nirS*-associated genes thus far described. The actual roles of NirJ, a radical SAM protein, and NirM, a periplasmic cytochrome *c*, are not known, but both have homologues in *nir* clusters from several bacteria. However, what seems to be quite unusual in the *nir* cluster of *T. thermophilus* is the absence of homologues to genes putatively implicated in the synthesis of heme *d1*. As an example, all of the *nir* clusters thus far described contain a gene (*nirE*) coding for uroporphyrinogen III methyltransferase (EC 2.1.1.107) (26). Its absence in the cluster of *T. thermophilus* could be explained by the presence of a homologue in the chromosome of *T. thermophilus* (TTC0308 in HB27). Therefore, it is likely that most of the enzymes required for the synthesis of the heme *d1* are encoded by the chromosome of the HB27 and other *T. thermophilus* strains, whereas only those specifically required for the maturation or the activity of NirS remain clustered with its coding gene.

In relation to the regulation of the expression of these *nor-nir* genes, there is a group of three proteins encoded upstream of *norC* that could be implicated in the process, as suggested by the similarities between NorR and the NO-dependent regulator NsrR (29). Details regarding the transcriptional control of *nor* and *nir* operons by these proteins are still to be unveiled, and only a combination of *in vitro* and *in vivo* analyses could answer this question. For this, the availability of a denitrificant derivative of HB27 would be extremely helpful for obtaining the corresponding mutants.

Despite the absence of any homologue to NosZ in the PRQ25 genome, a doubt remained about the completeness or not of the denitrification pathway in this strain because our nitrogen balance revealed that only part (1/4 approximately) of the nitrate was being reduced to N₂O (Fig. 2C). The putative presence of unusual nitrous oxide-reducing activity in hyperthermophiles has been suggested (31). Actually, a laccase from *Pyrobaculum aerophilum* for which a homologue exists in *T. thermophilus* HB27 (protein TTC1370) has been shown to produce N₂ actively (10). However, the experiments with [¹⁵N]nitrate demonstrated the absence of any significant N₂ production in PRQ25 and HB27 derivatives, leading to the conclusion that the final product of the denitrification process in these strains was N₂O. It is not known, however, if this is a general rule for other denitrificant strains of *T. thermophilus* or a specific trait of the PRQ25 donor strain. In any case, our data support that if this was the case, the nitrous oxide reductase will likely be encoded as a separate unit and not as part of the denitrification cluster described here. The final destination of most of the nitrogen from the nitrate used for anaerobic growth in *T. thermophilus* PRQ25 is also uncertain. In this sense, it is tempting to speculate about the presence of an ammonia-forming nitrite reductase by an enzyme (PRQ25_1681) 98% identical to TTC0313 from the HB27 strain. This protein has been annotated as a ferredoxin-nitrite reductase (14), despite its clustering with enzymes such as

phosphoadenosine-phosphosulfate reductase (PRQ25_1678). Although this enzyme more likely represents a sulfite reductase implicated in sulfate assimilation, the possibility exists that it could reduce nitrite to ammonia, masking the nitrogen balance. Future genetic and biochemical work will allow us to confirm or to discard definitively this possibility.

Finally, an important result of the present study is the isolation of a kanamycin-sensitive denitrificant HB27 derivative (isolate *d*), whose ease for genetic manipulation compared to the original PRQ25 strain advances our knowledge of the denitrification pathway and its regulation at high temperatures.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant of code BIO2007-60245 from the Ministerio de Ciencia e Innovación. L.A. and C.B. are supported by fellowships from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and the Ministerio de Educación, respectively. An institutional grant from the Fundación Ramón Areces to CBMSO is also acknowledged.

We thank D. Richardson, A. J. Gates, and H. Felgate for their help and advice.

REFERENCES

- Altschul, S. F., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Averhoff, B. 2009. Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:611–626.
- Baggs, E. M., C. L. Smales, and E. J. Bateman. 2010. Changing pH shifts the microbial source as well as the magnitude of N₂O emission from soil. *Biol. Fertil. Soils* **46**:793–805.
- Boc, A., H. A. Philippe, and V. Makarek. 2010. Inferring and validating horizontal gene transfer events using bipartition dissimilarity. *Syst. Biol.* **59**:195–211.
- Bruggemann, H., and C. Chen. 2006. Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. *J. Biotechnol.* **124**:654–661.
- Cava, F., and J. Berenguer. 2006. Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:97–100.
- Cava, F., A. Hidalgo, and J. Berenguer. 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* **13**:213–231.
- Cava, F., et al. 2007. Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol. Microbiol.* **64**:630–646.
- Cava, F., O. Zafra, M. S. da Costa, and J. Berenguer. 2008. The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ. Microbiol.* **10**:522–533.
- Fernandes, A. T., et al. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *FEBS J.* **277**:3176–3189.
- García-Vallve, S., A. Romeu, and J. Palau. 2000. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* **10**:1719–1725.
- Gordon, E. H., et al. 2003. Structure and kinetic properties of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome *cd*₁ nitrite reductase with the d1 heme active site ligand tyrosine 25 replaced by serine. *J. Biol. Chem.* **278**:11773–11781.
- Hayes, W. 1953. The mechanism of genetic recombination in *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **18**:75–93.
- Henne, A., et al. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* **22**:547–553.
- Heylen, K., et al. 2007. Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* **9**:1072–1077.
- Jones, C. M., B. Stres, M. Rosenquist, and S. Hallin. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol. Biol. Evol.* **25**:1955–1966.
- Koyama, Y., T. Hoshino, N. Tomizuka, and K. Furukawa. 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* **166**:338–340.
- Low, K. 1996. Hfr strains of *Escherichia coli* K-12, p. 2402–2405. In F. Neidhardt et al. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
- Manaia, C. M., et al. 1994. Halotolerant *Thermus* strains from marine and terrestrial hot springs belong to *Thermus thermophilus* (ex Oshima and Imahori, 1974) nom. rev. emend. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:526–532.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208–218.
- Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299–304.
- Philippot, L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**:355–376.
- Ramirez-Arcos, S., L. A. Fernandez-Herrero, and J. Berenguer. 1998. A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**:215–227.
- Ramirez-Arcos, S., L. A. Fernandez-Herrero, I. Marin, and J. Berenguer. 1998. Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**:3137–3143.
- Snell, F. D., and C. T. Snell. 1949. Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand, New York, NY.
- Storbeck, S., et al. 2009. The *Pseudomonas aeruginosa nirE* gene encodes the S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme *d(1)* biosynthesis. *FEBS J.* **276**:5973–5982.
- Suzuki, M., H. Arai, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2006. Gene structure and expression profile of cytochrome *bc* nitric oxide reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:1666–1671.
- Suzuki, M., T. Hirai, H. Arai, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2006. Purification, characterization, and gene cloning of thermophilic cytochrome *cd1* nitrite reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J. Biosci. Bioeng.* **101**:391–397.
- Tucker, N. P., et al. 2008. The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One* **3**:e3623.
- Zafra, O., et al. 2002. A cytochrome *c* encoded by the *nar* operon is required for the synthesis of active respiratory nitrate reductase in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **523**:99–102.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:533–616.
- Zumft, W. G., and H. Korner. 1997. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**:43–58.
- Zumft, W. G., and P. M. Kroneck. 2007. Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. *Adv. Microb. Physiol.* **52**:107–227.

Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria

Carolina E. César¹, Laura Alvarez,¹ Carlos Bricio,¹ Esta van Heerden,²
Dereck Littauer,² José Berenguer^{1*}

¹Center of Molecular Biology 'Severo Ochoa', Autonomous University of Madrid-CSIC, Madrid, Spain.

²Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa

Received 30 October 2011 · Accepted 17 November 2011

Summary. Conjugation and natural competence are two major mechanisms that explain the acquisition of foreign genes throughout bacterial evolution. In recent decades, several studies in model organisms have revealed in great detail the steps involved in such processes. The findings support the idea that the major basis of these mechanisms is essentially similar in all bacteria. However, recent work has pinpointed the existence of new, evolutionarily different processes underlying lateral gene transfer. In *Thermus thermophilus* HB27, at least 16 proteins are required for the activity of one of the most efficient natural competence systems known so far. Many of those proteins have no similarities to proteins involved in natural competence in other well-known models. This unusual competence system is conserved, in association with the chromosome, in all other *Thermus* spp. genomes so far available, it being functional even in strains from isolated environments, such as deep mines. Conjugation is also possible among *Thermus* spp. Homologues to proteins implicated in conjugation in model bacteria are encoded in the genome of a recently sequenced strain of *Thermus thermophilus* and shared by other members of the genus. Nevertheless, processive DNA transfer in the absence of a functional natural competence system in strains in which no conjugation homologous genes can be found hints at the existence of an additional and unconventional conjugation mechanism in these bacteria. [Int Microbiol 2011; 14(4):187-199]

Keywords: *Thermus* · thermophiles · lateral gene transfer (LGT) · conjugation · transformation

Introduction

Comparative whole-genome analyses have revealed that prokaryotic genomes are extraordinarily plastic. The enormous internal variation found within closely related species and strains is most likely produced by the rapid gain (and loss) of genetic material through lateral gene transfer (LGT) [26,29]. Indeed, lateral gene transfer is a leading force driving the accelerated evolution of prokaryotes, conferring on bacteria the

unique ability to rapidly adapt to various environmental changes. Of particular relevance is the capability of prokaryotes to colonize novel, previously restricted ecological niches. This characteristic has come about by the lateral inheritance of settlement modules or operons that can deliver an entire new physiological ability in a single evolutionary event [32,39].

There are three classical pathways described for LGT: transduction, transformation, and conjugation. While transduction involves the accidental packaging of bacterial DNA into prophage capsids and its ulterior propagation through defective bacteriophage infection, transformation and conjugation involve specialized DNA transport machineries able to actively acquire foreign DNA or to transfer it to recipient cells. Natural transformation is the least encountered of the three common LGT processes, with about 70 species of bac-

*Corresponding author: J. Berenguer
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC)
Universidad Autónoma de Madrid
28049 Cantoblanco (Madrid), Spain
Tel. +34-911964498. Fax +34-911964420
E-mail: jberenguer@cbm.uam.es

teria described as able to introduce external DNA into the cell through an energy-requiring mechanism [28]. In most cases this capability is not constitutive but is induced under specific, normally adverse, growth conditions during which cells become 'competent' for DNA uptake. This state implies the synthesis of a complex protein machinery that forces the entrance of external DNA through the various cell envelopes of gram-negative bacteria [17]. The induction of competence and the physiology of natural transformation models have been intensively studied in gram-positive and gram-negative bacteria [16,17,30,33,41]. These models are remarkably different among species; in fact, it is likely that many naturally competent bacteria have not been detected yet because of our inability to define the appropriate inducing conditions [15]. In contrast to these highly regulated pathways in well-studied naturally competent bacteria, there are at least two species, *Helicobacter pylori* and *Thermus thermophilus*, for which a high efficiency of DNA incorporation is found along the whole growth curve, such that these species are considered as constitutively competent [23,24]. The nature of the competence apparatus of *T. thermophilus* is discussed in this article.

An important issue regarding natural transformation is the fate of the DNA incorporated into the cells, which depends very much on the nature of the DNA itself. In most cases DNA that enters the cell as a single-stranded molecule is used as a nutrient, degraded by nucleases to enter catabolic cycles or to be used as building blocks for new cell material [45]. In some cases, single-stranded DNA (ssDNA) sequences that bear homology to genome sequences can undergo RecA-mediated homologous recombination, allowing gene alleles and even novel genes to be incorporated into the genome of the transformant strain, hence favoring the horizontal spread of new traits.

Contrary to natural transformation, which depends on the ability of the recipient cell to take up DNA, conjugation relies on the direct contact between a donor cell harboring all the essential genetic determinants for conjugation [42] and a susceptible recipient strain. Unlike transformation and transduction, conjugation is a highly specialized process in which the nature of the transferred DNA involves, in most cases, an episomal double-stranded DNA (dsDNA) molecule—rarely, chromosomal DNA—that either carries all the genetic material needed for conjugative transfer, i.e., self-transmissible mobile genetic elements, or requires an accessory, generally plasmid-borne, conjugative apparatus in order to be mobilized from one cell to another. However, in some cases, the integration of one of these conjugative episomes into the chromosome, either by specific integrases or through homol-

ogous recombination, results in the mobilization of the whole chromosome, as in the case of Hfr strains of *Escherichia coli* [25,47]. The existence of the so-called conjugative transposons, or integrative and conjugative elements (ICEs) that can integrate into the genome and be excised from it as a plasmid via a prophage-like mechanism, is also common. Such ICEs encode the conjugative apparatus required for their transfer to a recipient strain [53].

There is little doubt about the contribution of LGT in the exceeding dynamism of prokaryotic genomes. However, LGT is not random but instead has been shown to be greatly influenced by internal and external environmental variables that delimit particular gene-exchange communities on the basis of shared factors such as genome size, GC contents, and carbon and oxygen sources [26]. High-temperature environments could, in principle, be perceived as a limiting factor for LGT, as DNA from mesophiles rarely encodes thermostable proteins. Nonetheless, it has been shown that temperature tolerance is a factor heavily associated with elevated rates of LGT exchange [26]. Systematic genome-scale comparison analyses revealed a complex history of LGT events between and within thermophilic bacteria and archaea. Evidence of ample LGT from *Archaea* to *Bacteria* comes from the Aquificae class hyperthermophile *Aquifex aeolicus*, in which 16 % of the predicted coding sequences are likely derived from *Archaea* [6]. In another hyperthermophile, *Thermotoga maritima*, 24 % of the predicted coding regions have probably arisen as a consequence of extensive LGT from thermophilic archaea [37]. By contrast, in mesophilic bacteria the percentage of genes that have probably been acquired from *Archaea* is much lower, suggesting that thermal environments are especially prone to select for LGT events as a means to accelerate adaptation to such extreme conditions.

The *Thermus-Deinococcus* clade provides a good example of specialization and innovation through LGT, as evidenced by the thermophile *Thermus thermophilus* and the radiation-resistant mesophile *Deinococcus radiodurans*. Remarkably, both organisms are archetypical members of two very distinct lifestyles. Parsimonious evolutionary reconstruction methods predict that the two species share a mesophilic or moderately thermophilic ancestor, from which they evolved through LGT events that facilitated the gradual acquisition of either thermophile adaptations from other thermophilic bacteria and archaea or radiation resistance determinants [40]. This scenario supports the notion that the common ancestor of the two genomes was prone to receive genes by LGT, a property that nowadays is preserved in *Thermus* spp. but is apparently absent in the genus *Deinococcus*.

Moreover, a particularly interesting characteristic of *T. thermophilus* strain HB27 that makes it the thermophilic organism of choice for genetic modification is the constitutive expression of an extremely efficient natural competence system [7,23], which allows strain transformation at high frequencies under laboratory conditions [14]. Indeed, transformability seems to be a widespread characteristic in the genus *Thermus* [31]. In addition to the natural transformation phenotype of *Thermus*, DNase-resistant DNA transfer by means of conjugation has been demonstrated in *T. thermophilus*, namely, by the ability of aerobic strain HB27 to acquire from the facultative NAR1 strain a respiratory nitrate reductase gene cluster (*nar*) [43,44]. This conjugative process also has been shown to allow the transfer of a complete set of denitrification genes from strain PRQ25 to the same aerobic HB27 recipient strain [5,9].

In the following sections of this review, we aim to provide the reader with a general overview of the mechanisms and promiscuity of LGT in the genus *Thermus*, one of the most widespread genera of thermophilic bacteria. We focus in particular on *T. thermophilus*, a reference organism for the genetic study of thermophiles and for the structural characterization of proteins, as well as an exceptional source of enzymes of great biotechnological potential.

Natural competence systems. DNA uptake during competence is mediated by a complex macromolecular assembly comprising a large number of proteins. In order to achieve transfer of the incoming DNA into the cytoplasm, the natural barrier imposed by the cell envelope must be overcome. For gram-positive bacteria, this process means the breaching of a robust peptidoglycan (PG) layer and the cytoplasmic membrane (CM). In gram-negative bacteria, the presence of the outer membrane (OM) is an added barrier to this process. Despite the marked differences in the cell-envelope structures and the distinct characteristics of the DNA-uptake pathways, gram-positive and gram-negative bacteria use related proteins in the construction of the DNA transporter apparatus. Regarding the cell-envelope structure, and due to its unique nature which does not conform to the Gram staining method for classification, the genus *Thermus* is a fairly singular case. *Thermus thermophilus* cells are covered by an EDTA-extractable material with high sugar content that hides an array of hexagonal symmetry built up by the SlpA protein, a structure known as the S-layer but which more closely resembles a regular OM protein [8]. This structure constitutes the scaffold for an OM and is tightly bound to an underlying layer of peptidoglycan-associated secondary cell wall polymers (SCWP) [13].

These special features involving the anatomy of the *Thermus* cell envelope together with its thermophilic nature hint at an unusual model of DNA translocation in *T. thermophilus* strain HB27 [49]. Whole-genome analysis and directed knockout mutagenesis have led to the identification of 16 genes involved in natural competence that are arranged in seven transcriptional units. These competence proteins have been split into three distinct groups: (i) homologues to DNA-translocation-specific proteins from *Bacillus subtilis* and *Neisseria gonorrhoeae* (ComEC, ComEA, DrpA), (ii) homologues to components of the type IV pili (PilA1-4, PilD, F, C, Q), and (iii) homologues that are not related to any other natural transformation systems (ComZ, PilM, N, O, W) [7].

Localization and structural analyses performed on these proteins have yielded a model in which the core of the DNA translocator apparatus is a pseudopilus that originates from the cytoplasmic membrane (CM) and spans the periplasm (Fig. 1). This type IV-like pilus (T4P) is formed by the polymerization of small pilin proteins into long dynamic fibers, which in gram-negatives emerge through the OM via a ring formed by the oligomerization of a secretin-like protein (for a comprehensive review, see [7,17]). *T. thermophilus* HB27 encodes four pilin-like proteins, PilA1, PilA2, PilA3, and PilA4. Mutations in any of these lead to a transformation-negative phenotype but only *pilA4* mutants lack pili, as established by electron microscopy [20]. The multimeric secretin-like PilQ is also essential for transformation and its deletion results in a complete loss of DNA binding ability. PilQ localizes to the OM and forms an oligomeric structure of 15×34 nm that spans the periplasmic space, forming a channel-like structure wide enough to accommodate a pilus [11]. Localization of PilQ in the OM depends on the presence of the competence protein PilW, which is unique to the genus *Thermus* [46].

Similarly to other systems, prepilins must be processed into a mature form by a prepilin peptidase, probably encoded by *pilD* [20,38]. In addition, T4P systems require the presence of an AAA⁺ ATPase to drive the polymerization of pilins, which are required for both piliation and transformation in gram-negative bacteria [34]. In the *Thermus* system, the putative traffic NTPase function is covered by PilF; however, in contrast to other traffic NTPases, mutations in this gene that affect transformation ability result in a pilated phenotype, as seen under the electron microscope [21].

In the *Thermus* “system”, the well-conserved proteins ComEA and ComEC are thought to play roles analogous to those proposed for other species. ComEA is a periplasmic protein anchored to the membrane. Its function may be to

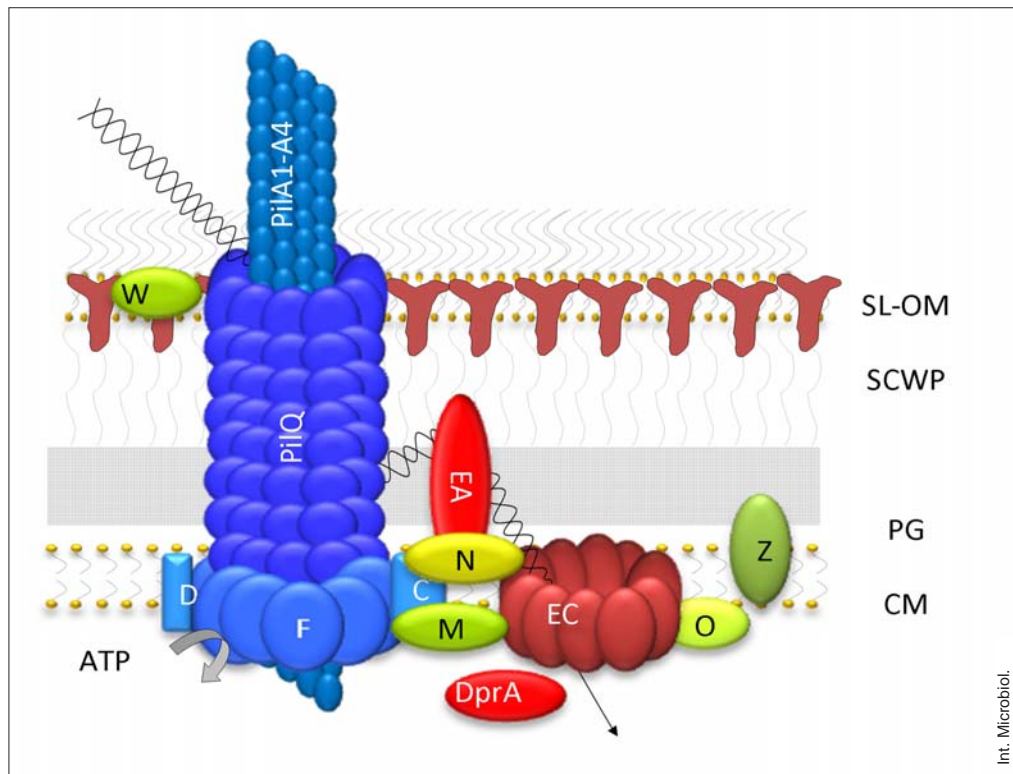


Fig. 1. Model of DNA translocation in *Thermus thermophilus* HB27, as described in [7]. Pre-pilins A1–A4 are processed to mature pilins by the cytoplasmic membrane peptidase PilD and secreted to the periplasm, where they are assembled into a fiber-like pilus, powered by the ATPase PilF. The pilin fiber emerges through the outer membrane (OM) via a secretin ring, formed by PilQ units. Localization of the secretin ring to the OM is strictly dependent on PilW. Retraction of the pilus (likely powered by PilF) facilitates DNA transport through the cell wall, where it binds ComEA and is then presented to ComEC. The latter transfers one strand of the DNA molecule to the cytoplasm, while the other strand is degraded in the cytoplasm by an unknown nuclease. PilC, PilN, and PilO are part of the multiprotein inner membrane complex. Type IV pilin proteins are shown in blue, homologous proteins found in *B. subtilis* and *N. gonorrhoeae* systems in red, and proteins present only in the *Thermus* transport system in green. SCWP: secondary cell wall polymers.

bind DNA in the periplasm and then deliver it to the cytoplasmic membrane channel formed by the polytopic ComEC [49]. PilC is another conserved competence protein essential for transformation. It lies on the CM, where it is believed to link the periplasmic and cytoplasmic components of the T2SS and T4P systems [20]. DprA is a cytosolic protein that is also present in other transformation systems. Although not essential for transformation, it has an active role in processing incoming DNA in the cytoplasm [35]. Very little is known about the remaining components of the *Thermus* competence system. Conservation of ComZ, PilM, PilN, or PilO in other studied systems is not evident. ComZ appears to be anchored to the CM as part of the transporter assembly scaffold [21]. PilM, PilN, and PilO are all located in the inner membrane [46]. Mutations in the *pilM*, *pilN*, or *pilO* genes render the cell incapable of being transformed, although no effect has been demonstrated on DNA binding or transport to the periplasm in any case [48,49].

These remarkable structural differences in the DNA translocator apparatus of *T. thermophilus* HB27 are conserved in other *Thermus* spp. isolates, as revealed by genome sequence analyses. pBLAST searches against the GenBank *Thermus* taxon (including whole-genome projects for *T. thermophilus* HB8, *T. thermophilus* SG0.5JP17-16, *T. aquaticus* Y51MC23, and *T. scotoductus* SA-01 strains) retrieved high-scoring homology matches at the protein level with all the components of six of the seven competence loci mentioned above for *T. thermophilus* HB27. These well-conserved loci comprise the *pilM-Q* and *comEA-comEC* operons, *pilD*, *pilC*, *pilF*, and *dprA*. Genetic organization of the competence genes is also preserved (Fig. 2A) (in our analyses we have included unpublished data from our laboratory involving the *T. thermophilus* strain PRQ25). Amino acid sequence alignments of each individual set of orthologous genes yielded overall identity scores ranging from 41 % (PilW) to 83 % (PilF).

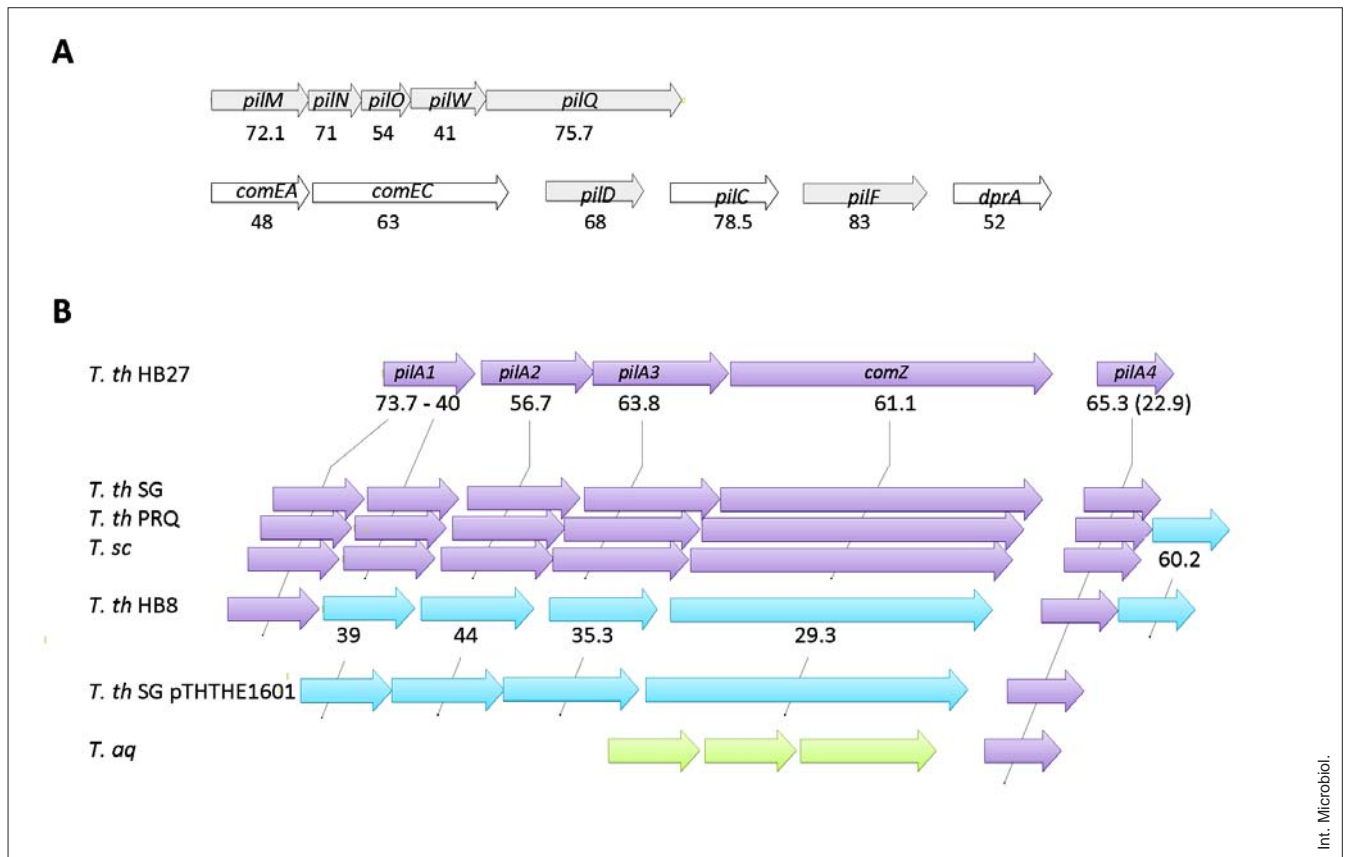


Fig. 2. Conservation of competence proteins and loci amongst *Thermus* spp., based on the transformation system defined for *T. thermophilus* HB27. Species include: *T. thermophilus* HB8, SG0.16-17, and PRQ25, *T. aquaticus* Y51MC23, and *T. scotoductus* SA-01 spp. and their corresponding megaplasmids, where applicable. (A) Competence loci presenting no deviation from those described in strain HB27. Numbers below the transcription units denote the percentage of overall identity amongst homologous proteins. (B) Conservation of the *pilA1-4* operon within *Thermus* spp. Blocks of proteins presenting significantly similar identity are represented in the same colors (purple for strain HB27-like proteins, blue for those of strain HB8, and green for those of *T. aquaticus*) and drawn together by broken lines. Overall identities are given below each transcription unit block.

The organization and protein array of the *pilA1-4* operon, on the other hand, are somehow less conserved (Fig. 2B). BLAST searches on the four prepilin-like proteins of strain HB27 retrieved positive matches for all the proteins in *T. thermophilus* strains SG0.5JP17-16 and PRQ25. In *T. scotoductus* SA-01, no results were obtained for PilA2-4; however, a detailed inspection of the genome context of *pilA1* and *comZ* in the genome of this strain revealed the presence of three putative genes coding for homologues to PilA2, PilA3, and PilA4. Overall identities range between 56.7 % for PilA2 and 72.7 % for PilA1 (also present in the *T. thermophilus* HB8 strain), with the exception of PilA4, which is conserved in all the analyzed strains with a low overall identity (22.9 %), except for the N-terminal 50 amino acids (65.3 %). This N-terminal part of the protein includes the conserved cleavage/methylation signal that is characteristic of all prepilin-like proteins [38]. Interestingly, all the strains that conserve the genetic

structure of the HB27 *pilA1-4* operon present a gene duplication involving *pilA1*. The protein products of these duplicates are more loosely conserved and have an identity of 40 % with HB27 PilA1, in contrast with the 73.7 % identity of the other HB27 PilA1 proteins.

In *T. thermophilus* HB8, a pBLAST approach did not identify any homologue to either PilA2, PilA3, or ComZ. Nevertheless, inspection of the genomic context of the conserved *pilA1* and *pilA4* genes revealed a genetic organization similar to that of the *pilA1-4* operon but comprising four prepilin-like proteins that bear no homology at the sequence level with any of HB27 competence pilins, the exceptions being the conserved PilA1 protein; a larger protein of similar size and operon position to ComZ, which is well conserved at the N-terminal leader region; and a PilA4 homologue and a PilinV like protein. A homologue (60.2 % identity) to this pilinV-like protein was also found downstream from *pilA4*, in

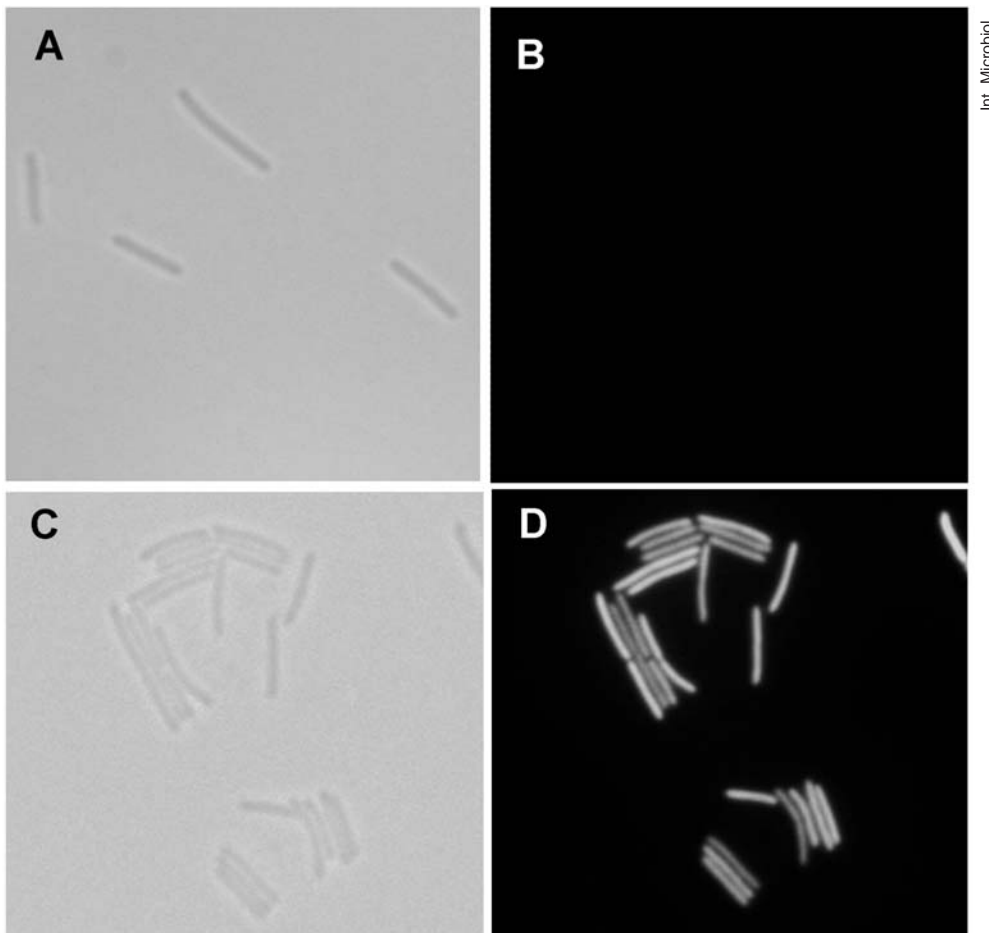


Fig. 3. Transformation in *Thermus scoto-ductus* SA1. Cells of exponential cultures *T. scoto-ductus* SA1 were observed by phase contrast (A,C) and fluorescence (B,D) microscopy. Panels C and D correspond to kanamycin-resistant cells of *T. scoto-ductus* SA1 obtained by transformation with a *Thermus-E. coli* bifunctional vector expressing a thermostable variant of GFP (green fluorescent protein). Panels A and B correspond to the untransformed controls.

the PRQ25 strain. We performed pBLAST searches with each individual protein sequence within HB8 *pilA1-4* (*ttha1217-ttha1220*) and found homologous proteins (29.3–44 % identity) in the *T. thermophilus* SG0.5JP17-16 plasmid pTHTHE1601 (*ththe16_2408-2411*), preceding the *PilA4* gene sequence. Therefore, two types of *pil-comZ* clusters (HB27- and HB8-like operons) are present within *Thermus* strains and they probably play similar roles in transformation. In this sense, it is worthy to note the presence of both types of clusters in *T. thermophilus* SG0.5JP17-16, one HB27-like in the chromosome and the other HB8-like in the megaplasmid, supporting the idea that their activities are compatible within the cell. Nevertheless, in natural competence assays parallel to those used with transformable strains, we were not able to obtain any transformants with this *Thermus* strain (C.E. César, unpublished results).

Thermus aquaticus Y51MC23 offers a very different picture. The pilin operon consists of only four coding sequences (TaqDRAFT_4097-4094) that code for four putative prepilin-like proteins, including a homologue to *PilA4*

(TaqDRAFT_4094). The first three prepilin-like proteins of the operon show no identity to any of the previously mentioned pilins. No trace of a putative *comZ* gene was found by manual inspection, and pBLAST searches did not retrieve any homologous protein in this organism. Assuming that the available genome draft is complete, the absence of this gene suggests that this strain cannot take up external DNA. Unfortunately, there are no experimental data to confirm these results.

The presence in the genome of homologues to all of the *T. thermophilus* HB27 competence proteins does not guarantee a high efficiency of transformation. Actually, there is a great difference in the transformation efficiencies of strain HB27 and any other strain so far studied. The extraordinary DNA transformation efficiency conspicuous to strain HB27 (10^{-2} transformants/viable cells [31]) is not shared by other *T. thermophilus* strains, such as HB8, which shows transformation frequencies one or two orders of magnitude lower than those of HB27, and PRQ25, which in spite of the high degree of homology and perfect conservation of the compe-

tence protein components shows very low transformability (four orders of magnitude lower) when transformed either with plasmids or with its own chromosomal DNA (our own results). Nevertheless, it is still possible to transfer genetic markers to other strains for genetic analysis if appropriate conditions for transformation and selection are chosen. An example is strain *T. scotoductus* SA-01, whose competence genes are remarkably similar to those of *T. thermophilus* HB27 and which can be transformed at low efficiencies with plasmids expressing fluorescent proteins, when a long expression period is used (Fig. 3).

Conjugation proteins in *Thermus* spp. Undoubtedly, LGT accounts for most of the plasticity found within the restricted thermophile environment, as demonstrated by the widespread presence of homologous clusters within thermophilic bacteria and archaea. Natural transformation in the genus *Thermus* is an example of the tremendous promiscuity shown by these bacteria, as inferred not only by the high frequency of transformation observed by its members but also by the broad range of DNA species they are able to accommodate, i.e., those from *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya* [40]. In this sense, note that several of the genes that can be considered as having been acquired by LGT in the aerobic strains HB27 and HB8 are located on their respective pTT27 megaplasmid. These include several genes encoding a DNA repair system found in thermophilic archaea and even a reverse gyrase in strain BH8 that could contribute to the thermophilic lifestyle of *Thermus* spp. [10]. Recently, genes for denitrification present in facultative strains of this species were identified in the megaplasmid [5,9]. However, whether this extraordinary natural competence ability is sufficient to explain the plasticity observed by *Thermus* spp. remains to be determined.

It is worth considering that conjugation, like DNA transformation, involves a DNA transport system that has to adapt to different environments and cell types in order to transport nucleoprotein complexes across cell membranes. The type 4 secretion system (T4SS) is a well-conserved and versatile system that mediates the transfer of DNA, toxins, and nucleoprotein complexes in both *Bacteria* and *Archaea* [3,4]. T4SSs have been recently classified in three functional types: a first type, involved in conjugation processes (cT4SS), which mediates the cell to cell transfer of proteins and DNA; a second type, involved in the translocation of virulence factors to the cytosol of eukaryotic cells by pathogenic species; and a third type, responsible for the specialized uptake and release of DNA [4].

The cT4SSs are large macromolecular assemblies that vary substantially in their subunit number and composition, they present a number of mating-pair-formation proteins and two or three dedicated ATPases that provide energy for DNA and protein transfer and for pilus assembly. The prototypical models for cT4SS (Fig. 4A) are derived from *E. coli* pKM101 plasmid and from *Agrobacterium tumefaciens* T4SS [51,52]; the latter does not participate in conjugation but is specialized in the delivery of oncogenic nucleoprotein complexes into plant cells. These systems are characterized by: three ATPases (VirB4, VirB11, and VirD4 or coupling protein, CP), which are postulated to pump ssDNA during conjugative transfer [12]; a series of scaffolding proteins (VirB6-VirB10, and possibly VirB3), that cross the entire cell envelope; and T4Ps similar to those involved in the competence DNA translocator system.

While the presence of VirB-like proteins is not apparent in those *T. thermophilus* strains in which conjugation has been addressed (*T. thermophilus* HB27, *T. thermophilus* HB8, *T. thermophilus* NAR1, and *T. thermophilus* PRQ25), the recently available *T. thermophilus* SG0.5JP17-16 megaplasmid pTHTHE1601 sequence contains a putative and structurally novel VirB operon consisting of 20 open reading frames (ORFs; conjugative transfer region, *ctr*, 1-20, *The16_2024-2005*, Fig. 4B). Three protein products display clear homologies in the amino acid sequence with VirB proteins: the pilin precursor TrbC/VirB2 and the VirB4 and VirD4 ATPases. pBLAST searches involving VirB4 and VirD4 retrieved matches in many different phyla, which is not surprising since VirB4 and T4CPs are extremely well conserved and systematically found in all T4SSs described to date [19]. VirB2 searches, on the other hand, produced significant alignments ($E < 0.01$) only with *T. aquaticus* Y51MC23, *T. scotoductus* SA-01, *Meiothermus ruber* DSM1279, and *M. silvanus* DSM9946 proteins. Routine pBLAST searches with each *orf* product revealed that the conservation of the *Thermus* VirB-like operon is restricted to these species (Fig. 5).

Assignment of VirB functions. Aside from the already mentioned VirB2, VirB4, and VirD4 coded by *ctr1*, 3, and 7, respectively, the predicted protein products of *ctr10*, 12, 13, 18, and 20 have annotated functions, while the remaining *ctr2*, 4-6, 8, 9, 11, 14-17, and 19 code for proteins of unknown function. Ctr10 is a putative lytic transglycosidase (LT). These murein-degrading enzymes are ubiquitous to gram-negative T4SS, where they participate in the degradation of the PG to allow pilus assembly [55,56]. In the

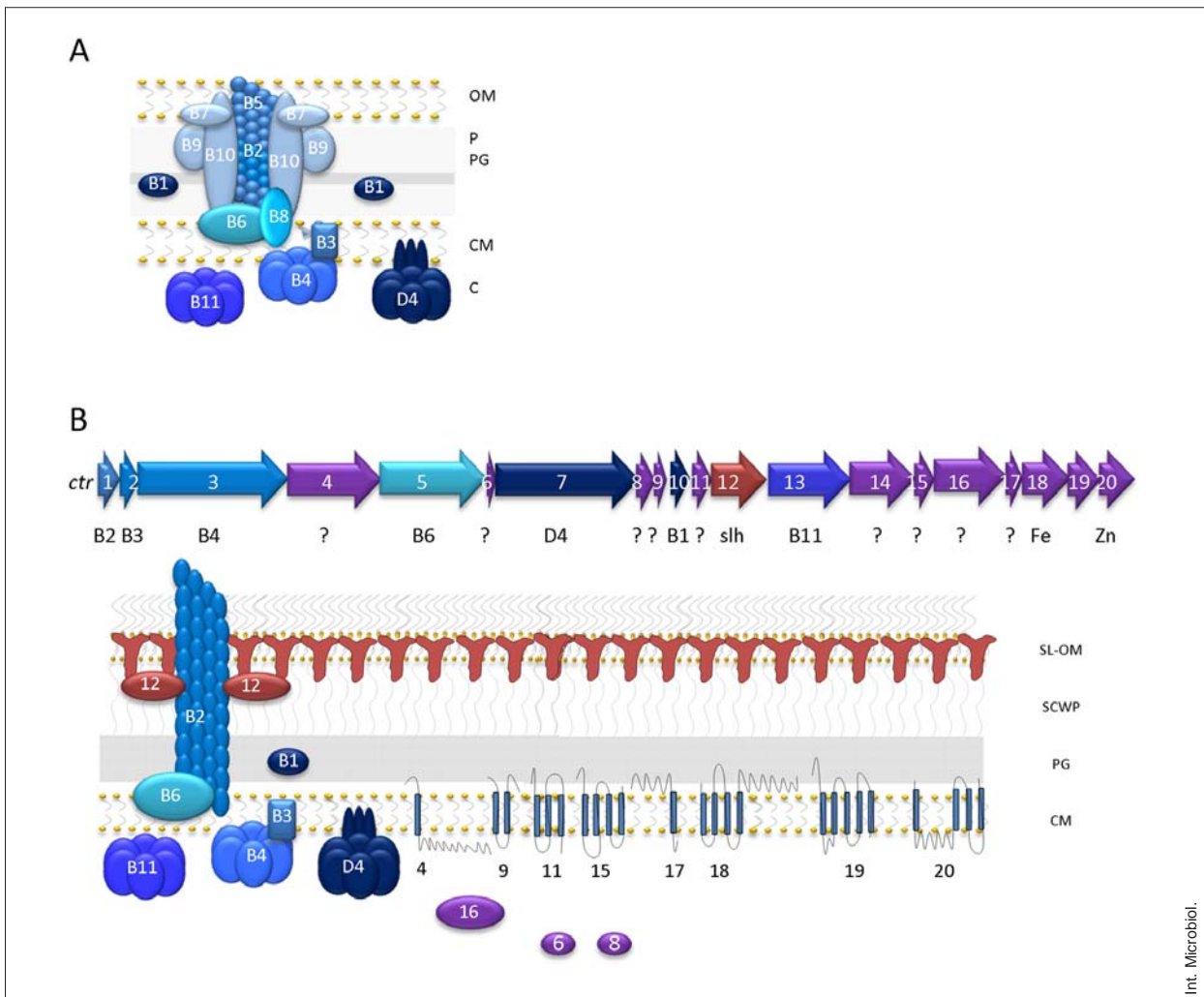


Fig. 4. Type 4 secretion system model structures. **(A)** Experimentally predicted conjugative VirB4/VirD4 transfer system, based on [51]. OM, outer membrane; CM, cytoplasmic membrane; P, periplasm; C, cytoplasm; PG, peptidoglycan. **(B)** Predicted subunits for the *Thermus thermophilus* SG0.J1 VirB-like system. Membrane disposition as well as the transmembrane (TM) domains of T4SS subunits are represented schematically, according to SOSUI predictions and the presence of putative peptide signals. The localizations of Ctr12, VirB1, VirB2, VirB3, VirB4, VirB6, VirB11, and VirD4 are based on the VirB4/VirD4 *Agrobacterium tumefaciens* model [52]. Proteins with homologous functions are depicted by the same color, proteins of unknown function are represented in purple. SL-OM, S-layer outer-membrane; SCWP, secondary cell wall polymers; PG, peptidoglycan; CM, cytoplasmic membrane.

A. tumefaciens system, the LT role is performed by VirB1. Based on the functional similarities and widespread presence of LTs in T4SS, we have defined Ctr10 as VirB1. *ctr12* codes for a 466-residue polypeptide that contains an N-terminal S-layer homology (SLH) domain, involved in the anchoring of secreted protein to the cell surface, and a spectrin-repeat domain typical of cytoskeletal structural proteins. Two other genes, *ctr4* and *ctr16*, code for proteins with 3D structures similar to actinin ($E = 0.65$) and contractile/cell adhesion proteins ($E = 2.5 \times 10^{-05}$). The conserved presence of cytoskeletal elements in the cluster is unforeseen. The

prokaryotic cytoskeleton is postulated to be a central organizer for the accurate positioning of proteins and nucleoprotein complexes, thereby controlling macromolecular trafficking in cells. We can only speculate that these three proteins are members of a novel cytoskeleton-like scaffold that provides a dynamic brace to the T4SS, with Ctr4 anchored to the inner membrane (topological predictions, SOSUI server, reveal the presence of a transmembrane helix (TM) at the N-terminal end of the protein), Ctr12 anchored to the cell surface via SLH, and the predicted soluble Ctr16 located in the cytoplasm (Fig. 4B).

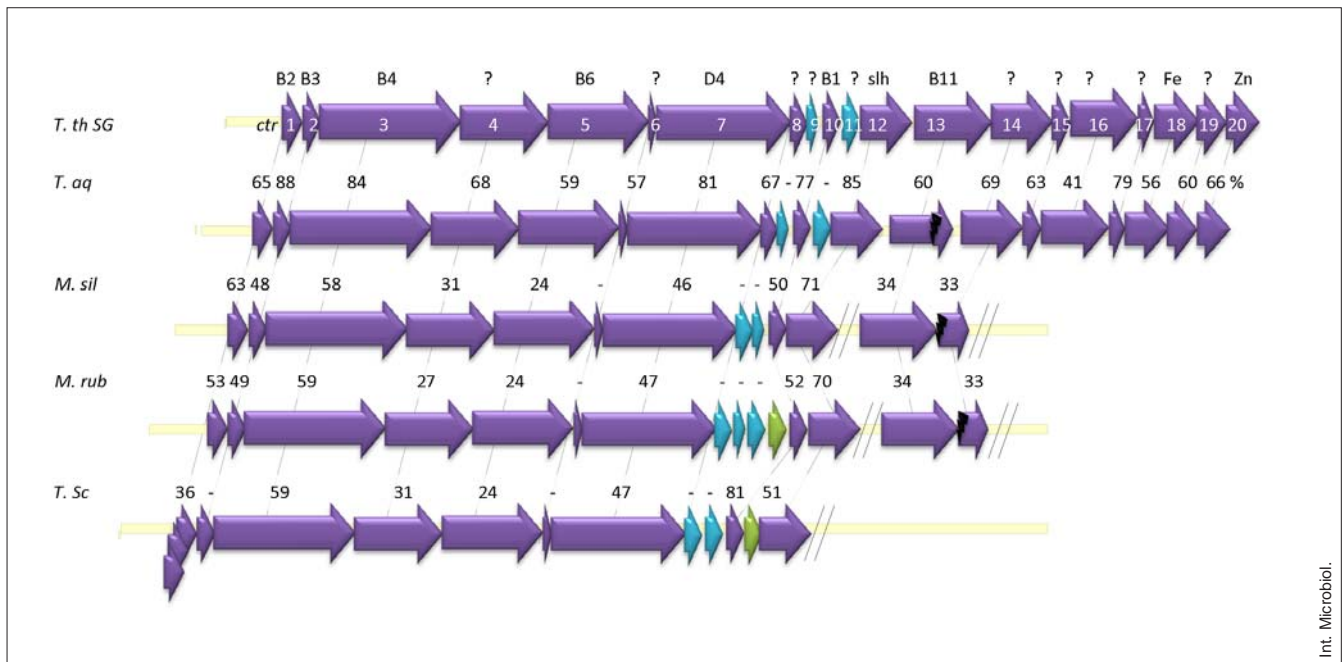


Fig. 5. Conservation of the putative conjugative *virB* operon in *Thermus* spp. Overall identities (as obtained by BLASTp searches) with respect to the *T. thermophilus* SG0.15-16 *virB* operon are shown above each open reading frame (ORF). The (–) symbol denotes homologous proteins whose score value is lower than the threshold for BLASTp retrieval. A hypothetical/predicted role for each gene product is given, whereas uncertain roles are denoted by question marks. Purple arrows represent ORFs with significant homology. Blue ORFs code for predicted homologous transmembrane proteins of reduced overall identity. Light green ORFs code for proteins that are unique for a particular spp. A black-filled lightning bolt represents either an interruption of the coding frame or a truncated product.

Ctr13 is an AAA⁺ type ATPase, as is VirB11. No sequence similarity is found between Ctr13 and VirB11-like proteins, and VirB11 is not part of all T4SS. T4SS, as it is absent from most gram-positive cT4SSs [22]. We have designated this protein as VirB11, since the protein structure prediction (Phyre version 0.2) of Ctr11 ATPase revealed a 100 % match with *Brucella suis* VirB11 ATPase ($E = 3.1 \times 10^{-20}$).

The two other annotated proteins are putative iron-dependent transcriptional repressors, Ctr18, of unknown function within the system, and a zinc-dependent metalloproteinase, Ctr20. While no peptidases are commonly found in VirB operons, many VirB-like proteins contain a signal peptide for translocation into the periplasm and that peptide is processed from the mature protein once the latter has been delivered. Hence, the presence of a membrane peptidase within the VirB-like operon could represent a novel feature of the *Thermus* T4SS, whose role is covered by an unknown accessory function not preserved in other well-characterized systems. The fact that *ctr20* is not conserved within other *Thermus* VirB-like operons, or anywhere in the genome, points to the existence of an alternative system, perhaps reminiscent of other, traditional VirB-like systems, for the pro-

cessing of T4SS subunits. Note that the protein product of *ctr19*, which shows no significant homology to any known function either at the amino acid sequence or structural level but is topologically predicted to be an integral membrane protein, yields multiple low-score pBLAST hits with eukaryotic zinc transporters. We can therefore hypothesize a putative role for this transporter, in which it would act in concert with the zinc-dependent metalloproteinase.

With the exception of Ctr6 and Ctr8, which failed to retrieve any sequence or structural similarities with any known protein and were not predicted to contain any signal peptide or TM helices, protein products from *ctr2*, 5, 9, 11, 15, and 17 contain one or more TM helices (Fig. 4B). Ctr2 is a small protein, 105 residues, that contains two TM helices; its gene is located immediately upstream from that of VirB4. These characteristics are reminiscent of those of VirB3, which in many systems is coded as a chimeric protein fused to the N-terminal portion of VirB4. The presence of VirB4, together with VirB7 and VirB8, is essential in stabilizing VirB3 during T-pilus biogenesis [36]. While we could infer the role of Ctr2 to be that of VirB3, we were unable to extend our analysis to predict putative VirB7 and VirB8 functions.

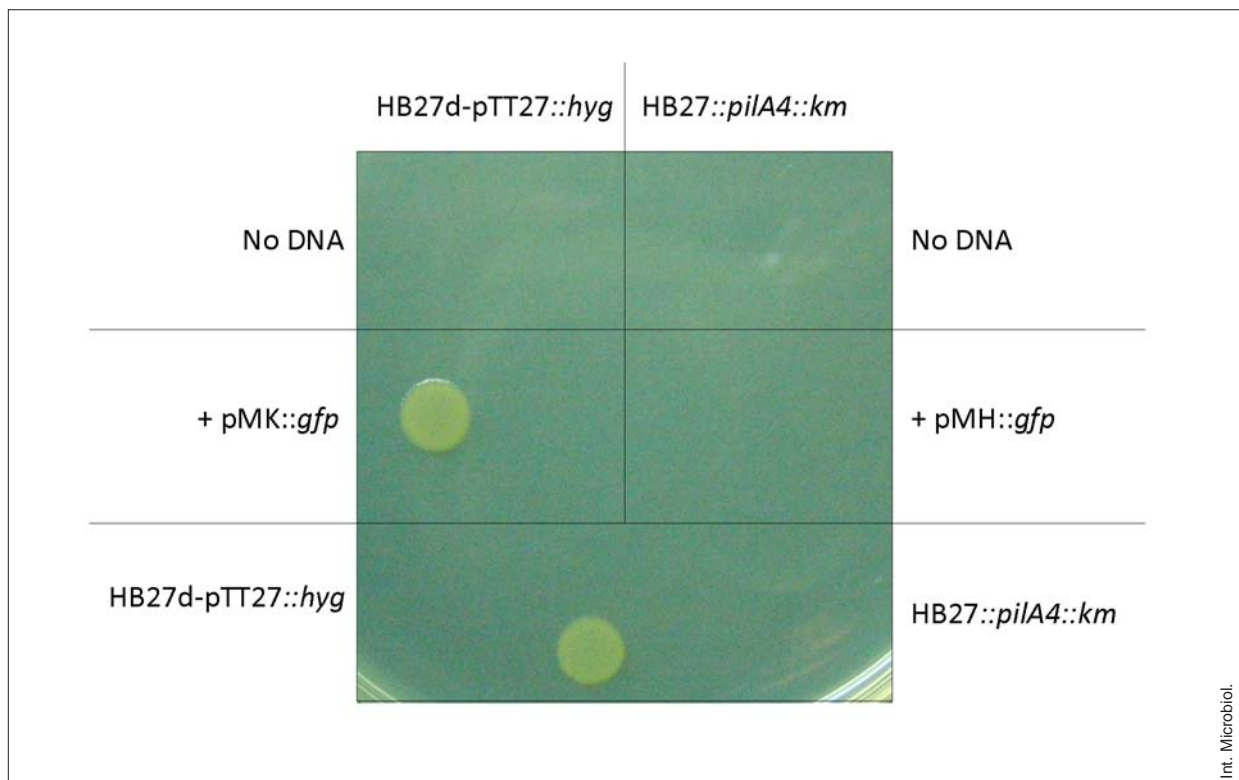


Fig. 6. Ten μl of saturated cultures of HB27d-pTT27::hyg strain (containing a plasmid-encoded hygromycin resistance marker, hyg), and HB27::pilA4::km (containing a chromosomally encoded kanamycin marker, km, and transformation-deficient) were plated on *hyg-km10* ng/ μl . Growth was observed only for the transformation-proficient HB27d-pTT27::hyg strain. When 10 μl of each strain were mixed together, growth was observed (bottom image), due to the conjugation-like transfer of marker genes.

Similarly, we could not assign identities to VirB9- or VirB10-like functions. VirB7-10, together with the already mentioned VirB3, and VirB6 are probably members of the theoretical scaffold that spans the cell envelope and supports substrate translocation [51,52]. VirB6-like proteins are large polytopic proteins ($5 \leq \text{TM}$ segments) characterized by the presence of a central periplasmic domain and a C-terminal hydrophilic domain [4, 27]. Like VirB6, Ctr5 is a polytopic protein containing nine TM segments as well as a central and a C-terminal hydrophilic domain. VirB6-like proteins display a low overall similarity at the sequence level but are ubiquitous to all T4SS described to date. They are proposed to be essential for conjugation and the absolute minimal requirement for substrate translocation across membranes together with the ATPases T4CP and VirB4 [4]. Because of the predicted structural similarities between Ctr5 and VirB6 proteins and corroborated by its position within the *Thermus* VirB-like operon in addition to the low conservation displayed between homologues present in the genus *Thermus* (Fig. 5), we have tentatively assigned Ctr5 to the large family of VirB6 proteins. It is likely that this scaffolding function is

provided by the above-mentioned cytoskeletal elements Ctr4, 12, and 16, together with some or all of the non-assigned proteins, Ctr8, 9, 11, 15–17. The presence of genes coding for small, non-conserved, TM-containing proteins overlapping *virB*-like genes is common to gram-positive VirB operons and very probably represents different strategies, with a common denominator, the T4SS, used by bacterial cells to translocate substances across the cell envelope, in cell surface recognition, and in the formation of mating pairs [4].

Thus, we propose that these unique features of the *Thermus* T4SS represent an imposed requirement due to the thermophile niche of the genus and the unusual structure and nature of the cell envelope of *Thermus* species. Our model is corroborated by the strict preservation of this unusual T4SS system within the *Thermus* group, including not only *Thermus* but also *Meiothermus* spp. It is feasible that with the gathering and sequencing of new *Thermus* strains other structurally similar *virB*-like operons will come to light.

Experimental evidence is still needed to address the participation of these T4SS in conjugation. All functioning cT4SSs are always associated, by CPs, with DNA transfer

replication systems, determined by the presence of a relaxase protein, a site-specific endonuclease that recognizes transferred DNA at a specific site, *origin of transfer* (OriT), cleaves it, and brings it to the recipient cell [18]. Remarkably, no relaxase-like sequence has ever been described for any *Thermus* organism. Whereas relaxases have been thoroughly characterized and categorized within six distinct families, there is a strong belief that new families of relaxases could emerge with the sequencing and characterization of novel conjugation systems, particularly in bacteria other than proteobacteria [50]. We believe the genus *Thermus*, and by extension thermophilic bacteria, are examples of this novel, yet ancient, family of relaxases and as such, part of an unusual conjugation system.

A new conjugation mechanism in *Thermus thermophilus*?

Although no conjugation-like homologous proteins have been found in *T. thermophilus* NAR1, HB27, or PRQ25, a conjugative-like mechanism has been described that involves these strains. This uncharacterized LGT mechanism is responsible for the transfer of a pTT27-plasmid-encoded *nar* operon from *T. thermophilus* NAR1 to strain HB27 [43,44], and from *T. thermophilus* PRQ25 to strain HB27 [5]. Further proof of the existence of this atypical LGT between *Thermus* strains comes from experiments involving the transfer of an antibiotic resistance marker, coded within the pTT27 megaplasmid, from HB27-pTT27::*hyg* (hygromycin resistant) to HB27*pilA4::Km*-pTT27 (transformation-deficient due to the insertion of kanamycin resistance cassette into *pilA4*, a gift from B. Averhoff) strain (C.E. César, unpublished results, Fig. 6) at frequencies up to 10^{-2} transconjugants per recipient cell. In all cases, this conjugation-like mechanism involves transfer of (part of) the pTT27 megaplasmid—which is ubiquitously found as part of the *T. thermophilus* genome, although chromosomal markers have also been shown to be transferred in what was reportedly an HFR-like process [44]—at much lower frequencies than those obtained with plasmid markers (C.E. César, unpublished results).

Transduction. Literature reports on *Thermus* bacteriophages are scarce, and despite the identification of 113 viruses in a single article [54], only a pair of them have been thoroughly studied. This small number of known strains probably correspond to the very tip of an unknown repertoire of thermophilic bacteriophages. A good indication of this misrepresentation is the presence in the HB8 strain of 12 cluster regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR) systems [1]. CRISPR systems are host genetic modules encoded

by several bacteria and most archaea to act against invading genetic elements, such as plasmids, transposons and, particularly, bacteriophages (for a comprehensive review see [2]). The unusually high number of CRISPR systems coded by HB8 supports a scenario of frequent foreign-DNA invasion events. Notably, the transcription profiles of most of the CRISPR-associated proteins are up-regulated after phage infection [1], supporting phage infection and probably transduction as a fairly active event in *Thermus* spp. strains. It is difficult to acknowledge and quantify LGT by transduction in the genus *Thermus*; nonetheless, transduction is yet another mechanism that likely participates in the extensive LGT shown by *Thermus* spp.

Concluding remarks. The ability of microorganisms to exploit and inhabit different environments relies on the plasticity of prokaryotes in acquiring those genetic determinants that facilitate the colonization of diverse, often extreme, niches. In extremophilic bacteria, LGT has been recognized as a major force in adaptation and diversification, and inter-domain gene flow between *Archaea* and *Bacteria* has been widely reported. The high-temperature habitat is a good example of this phenomenon, and *T. thermophilus*, due to its unique repertoire of LGT strategies, provides an excellent model to study horizontal gene flow in this harsh environment. The enormous LGT promiscuity observed in *Thermus* strains is manifested in the presence of a large megaplasmid as part of the genome, where most of the plasticity observed between *T. thermophilus* strains resides [11]. We believe that *T. thermophilus* megaplasmid acts as a reservoir for non-essential to life adaptation traits (e.g., denitrification and carotenoid biosynthesis clusters, CRISPR antiviral systems, etc.) and that the constant gene flow of these traits as needed is a common characteristic in the genus *Thermus*.

Acknowledgements. This work was supported by grant BIO2010-18875 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. An institutional grant from Ramón Areces Foundation to CBMSO is acknowledged. CEC holds a Juan de la Cierva postdoctoral contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. CB and LA are funded by FPI and JAE fellowships from the Ministry of Education and the Spanish National Research Council (CSIC), respectively. We thank Dr. B. Averhoff for sending us the *pilA4* mutant.

Competing interests: None declared.

References

1. Agari Y, Sakamoto K, Tamakoshi M, Oshima T, Kuramitsu S, Shinkai A (2010) Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J Mol Biol* 395:270-281

2. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJ (2011) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem* 392:277-289
3. Albers SV, Pohlschroder M (2009) Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles* 13:403-410
4. Álvarez-Martínez CE, Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:775-808
5. Álvarez L, Bricio C, Gómez MJ, Berenguer J (2011) Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:1352-1358
6. Aravind L, Tatusov RL, Wolf YI, Walker DR, Koonin EV (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet* 14:442-444
7. Averhoff B (2009) Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Rev* 33:611-626
8. Bahl H, Scholz H, Bayan N, Chami M, Leblon G, Gulik-Krzywicki T, Shechter E, Fouet A, Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M, Conway de Macario E, Macario AJ, Fernandez-Herrero LA, Olabarria G, Berenguer J, Blaser MJ, Kuen B, Lubitz W, Sara M, Pouwels PH, Kolen CP, Boot HJ, Resch S (1997) Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 20:47-98
9. Bricio C, Álvarez L, Gómez MJ, Berenguer J (2011) Partial and complete denitrification in *Thermus thermophilus*: lessons from genome drafts. *Biochem Soc Trans* 39:249-253
10. Bruggemann H, Chen C (2006) Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. *J Biotechnol* 124:654-661
11. Burkhardt J, Vonck J, Averhoff B (2011) Structure and function of PilQ, a secretin of the DNA transporter from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem* 286:9977-9984
12. Cabezón E, de la Cruz F (2006) TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol* 157:299-305
13. Cava F, de Pedro MA, Schwarz H, Henne A, Berenguer J (2004) Binding to pyruvylated compounds as an ancestral mechanism to anchor the outer envelope in primitive bacteria. *Mol Microbiol* 52:677-690
14. Cava F, Hidalgo A, Berenguer J (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13:213-231
15. Claverys JP, Martin B (2003) Bacterial "competence" genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiol* 11:161-165
16. Claverys JP, Prudhomme M, Martin B (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:451-475
17. Chen I, Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* 2:241-249
18. Draper O, César CE, Machón C, de la Cruz F, Llosa M (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16385-16390
19. Fernández-López R, Garcillán-Barcia MP, Revilla C, Lázaro M, Vielva L, de la Cruz F (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* 30:942-966
20. Friedrich A, Prust C, Hartsch T, Henne A, Averhoff B (2002) Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl Environ Microbiol* 68:745-755
21. Friedrich A, Rumszauer J, Henne A, Averhoff B (2003) Pilin-like proteins in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27: implication in competence for natural transformation and links to type IV pilus biogenesis. *Appl Environ Microbiol* 69:3695-3700
22. Grohmann E, Muth G, Espinosa M (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:277-301
23. Hidaka Y, Hasegawa M, Nakahara T, Hoshino T (1994) The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1338-1339
24. Israel DA, Lou AS, Blaser MJ (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett* 186:275-80
25. Jacob F, Wollman EL (1961) Viruses and genes. *Sci Am* 204:93-107
26. Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA (2003) Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol* 20:1598-1602
27. Jakubowski SJ, Krishnamoorthy V, Cascales E, Christie PJ (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. *J Mol Biol* 341:961-977
28. Johnsborg O, Eldholm V, Havarstein LS (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* 158:767-778
29. Koonin EV, Wolf YI (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* 36:6688-6719
30. Kovacs AT, Smits WK, Mironczuk AM, Kuipers OP (2009) Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environ Microbiol* 11:1911-1922
31. Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N, Furukawa K (1986) Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J Bacteriol* 166:338-340
32. Lawrence JG (1997) Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol* 5:355-359
33. Lorenz MG, Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58:563-602
34. Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS, Sheetz MP (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16012-16017
35. Mortier-Barriere I, Velten M, Dupaigne P, Mirouze N, Pietremont O, McGovern S, Fichant G, Martin B, Noirot P, Le Cam E, Polard P, Claverys JP (2007) A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* 130:824-836
36. Mossey P, Hudacek A, Das A (2010) *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol* 192:2830-2838
37. Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC, Fraser CM (1999) Evidence for lateral gene transfer between *Archaea* and *Bacteria* from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399:323-329
38. Nunn DN, Lory S (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3281-3285
39. Ochman H, Davalos LM (2006) The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 311:1730-1733
40. Omelchenko MV, Wolf YI, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Daly MJ, Koonin EV, Makarova KS (2005) Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol Biol* 5:57

41. Palmen R, Hellingwerf KJ (1997) Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*—a review. *Gene* 192:179-190
42. Pérez-Mendoza D, de la Cruz F (2009) *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? *BMC Genomics* 10:71
43. Ramírez-Arcos S, Fernández-Herrero LA, Berenguer J (1998) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim Biophys Acta* 1396:215-227
44. Ramírez-Arcos S, Fernández-Herrero LA, Marín I, Berenguer J (1998) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J Bacteriol* 180:3137-3143
45. Redfield RJ (1993) Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it-too of bacterial transformation. *J Hered* 84:400-404
46. Rumszauer J, Schwarzenlander C, Averhoff B (2006) Identification, subcellular localization and functional interactions of PilMNOWQ and PilA4 involved in transformation competency and pilus biogenesis in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J* 273:3261-3272
47. Ryan FJ, Lederberg J (1946) Reverse-mutation and adaptation in leucineless *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 32:163-173
48. Schwarzenlander C, Averhoff B (2006) Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J* 273: 4210-4218
49. Schwarzenlander C, Haase W, Averhoff B (2009) The role of single subunits of the DNA transport machinery of *Thermus thermophilus* HB27 in DNA binding and transport. *Environ Microbiol* 11:801-808
50. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:434-452
51. Waksman G, Fronzes R (2010) Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem Sci* 35:691-698
52. Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* 12:1203-1212
53. Wozniak RA, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8:852-863
54. Yu MX, Slater MR, Ackermann HW (2006) Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. *Arch Virol* 151:663-679
55. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckstuhl C, Zarfel GE, Koraimann G (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151:3455-3467
56. Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, Ward D, Zambryski P (2007) VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 189:6551-6563

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Sequence of the hyperplastic genome of the naturally competent *Thermus scotoductus* SA-01

Kamini Gounder^{1†}, Elzbieta Brzuszkiewicz^{2†}, Heiko Liesegang^{2†}, Antje Wollherr², Rolf Daniel², Gerhard Gottschalk², Oleg Reva³, Benjamin Kumwenda³, Malay Srivastava¹, Carlos Bricio⁴, José Berenguer⁴, Esta van Heerden¹ and Derek Litthauer^{1*†}

Abstract

Background: Many strains of *Thermus* have been isolated from hot environments around the world. *Thermus scotoductus* SA-01 was isolated from fissure water collected 3.2 km below surface in a South African gold mine. The isolate is capable of dissimilatory iron reduction, growth with oxygen and nitrate as terminal electron acceptors and the ability to reduce a variety of metal ions, including gold, chromate and uranium, was demonstrated. The genomes from two different *Thermus thermophilus* strains have been completed. This paper represents the completed genome from a second *Thermus* species - *T. scotoductus*.

Results: The genome of *Thermus scotoductus* SA-01 consists of a chromosome of 2,346,803 bp and a small plasmid which, together are about 11% larger than the *Thermus thermophilus* genomes. The *T. thermophilus* megaplasmid genes are part of the *T. scotoductus* chromosome and extensive rearrangement, deletion of nonessential genes and acquisition of gene islands have occurred, leading to a loss of synteny between the chromosomes of *T. scotoductus* and *T. thermophilus*. At least nine large inserts of which seven were identified as alien, were found, the most remarkable being a denitrification cluster and two operons relating to the metabolism of phenolics which appear to have been acquired from *Meiothermus ruber*. The majority of acquired genes are from closely related species of the Deinococcus-Thermus group, and many of the remaining genes are from microorganisms with a thermophilic or hyperthermophilic lifestyle. The natural competence of *Thermus scotoductus* was confirmed experimentally as expected as most of the proteins of the natural transformation system of *Thermus thermophilus* are present. Analysis of the metabolic capabilities revealed an extensive energy metabolism with many aerobic and anaerobic respiratory options. An abundance of sensor histidine kinases, response regulators and transporters for a wide variety of compounds are indicative of an oligotrophic lifestyle.

Conclusions: The genome of *Thermus scotoductus* SA-01 shows remarkable plasticity with the loss, acquisition and rearrangement of large portions of its genome compared to *Thermus thermophilus*. Its ability to naturally take up foreign DNA has helped it adapt rapidly to a subsurface lifestyle in the presence of a dense and diverse population which acted as source of nutrients. The genome of *Thermus scotoductus* illustrates how rapid adaptation can be achieved by a highly dynamic and plastic genome.

* Correspondence: litthad@ufs.ac.za

† Contributed equally

¹BioPAD Metagenomics Platform, Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa
Full list of author information is available at the end of the article

Background

The Witwatersrand Supergroup is a 2.9 billion year old formation of low-permeability sandstone and shale with minor volcanic units and conglomerates. The ambient temperature of the rock at levels in excess of 3 km is approximately 60°C [1,2]. These mines provide access to water emanating at levels up to 5 km [3,4]. Although approximately 300 bacterial and archaeal organisms have been identified using 16S rRNA gene sequencing, very few have been successfully cultivated. Detailed analysis of fissure water from many different sites in South African mines [5] has illustrated severe nutrient limitation which would require special adaptation by the microbial communities [6].

Hundreds of strains of *Thermus* have been isolated from various thermal environments around the world. All are thermophilic, Gram negative bacteria which grow optimally at temperatures between 65 to 70°C with no specific amino acid or vitamin requirements [7]. In 1999 Kieft *et al.* [1] described the isolation and characterization of a facultatively anaerobic *Thermus* strain from water collected 3.2 km below surface, which is capable of dissimilatory iron reduction as well as growth with oxygen and nitrate as terminal electron acceptors. The *Thermus* SA-01 strain (ATCC 700910) is closely related to *Thermus* strains NMX2, A.1 and VI-7 (previously isolated from thermal springs in New Mexico, USA and Portugal, respectively) and was identified as *T. scotoductus* [2]. Its ability to reduce chromate, gold and uranium was illustrated [8,9] and the chromate reductase was found to be an old yellow enzyme homologue [10]. In addition, a membrane associated “chromate reductase” [11] and “iron reductases” [12,13] were isolated.

The complete genome sequences of *Thermus thermophilus* strains HB8 and HB27 [14] have been determined. In both cases, a chromosome of slightly larger

than 1.8 Mbp and a megaplasmid of 230 to 260 kbp were found. In addition, HB8 harbors a smaller plasmid of 9.3 kbp (Table 1). A high degree of synteny is found between the chromosomes of the two strains, except for an inversion near the origin of replication and the majority of the genes are conserved. A degree of plasticity is observed in the megaplasmids and it has been suggested that the major portion of the genes on the plasmid may be involved with a thermophilic lifestyle [15]. Recently, Ohtani and co-workers [16] demonstrated that *Thermus thermophilus* is polyploid under certain growth conditions and that this could be part of the survival strategy in thermophilic environments, where homologous recombination of chromosomes could be a mechanism of chromosome repair, as in *Deinococcus radiodurans* [17,18]. This implies a dynamic genome where rearrangement of genes occurs with high frequency. In addition to the plasticity of *Thermus* genomes, their system of uptake and horizontal exchange of DNA fragments is the most efficient reported to date [19-22]. Together, these provide a mechanism for adaptation to harsh environments.

We report here the complete genome sequence of *Thermus scotoductus* SA-01 and demonstrate how its hyperplasticity and its natural ability to acquire genes have enabled its adaptation to the subsurface.

Results and Discussion

General features of the *T. scotoductus* SA-01 complete chromosome sequence

The genome was sequenced with an approx. 20-fold coverage. The 35 contigs obtained from a combination of GS20/FLX pyrosequence runs were assembled with additional Sanger sequencing to close the gaps between the contigs. The genome of *T. scotoductus* SA-01 consists of a 2,346,803 bp chromosome (TSCc) [GenBank: CP001962] and a draft plasmid sequence of 8,383 bp

Table 1 Genome features of two *T. thermophilus* strains and *T. scotoductus* SA-01

Feature	HB27	HB8	SA-01
Size in base pairs	1,894,877	1,849,742	2,346,803
Plasmid size in base pairs	232,605	256,992 + 9322	8,383
Total genome size	2,127,482	2,116,056	2,355,186
G+C content in percentage ^a	69.43 (69.15)	69.4 (69.3, 69.0)	64.9 (65.9)
Number of protein coding genes ^a	1,982 (228)	1,970 (251, 14)	2,506 (12)
Total number of genes	2,204	2,238	2,518
Conserved hypothetical genes	240 (39)	241 (36,2)	367 (3)
Hypothetical genes	64 (22)	107 (30,7)	168 (1)
Transposases ^{a,b}	12 (9)	16	22
tRNA genes	47	48	47
CRISPR sequences	9 + 1 candidate (8)	9 + 1 candidate (8)	3 + 1 candidate

Table adapted from [15]

^a values for the plasmids are given in brackets

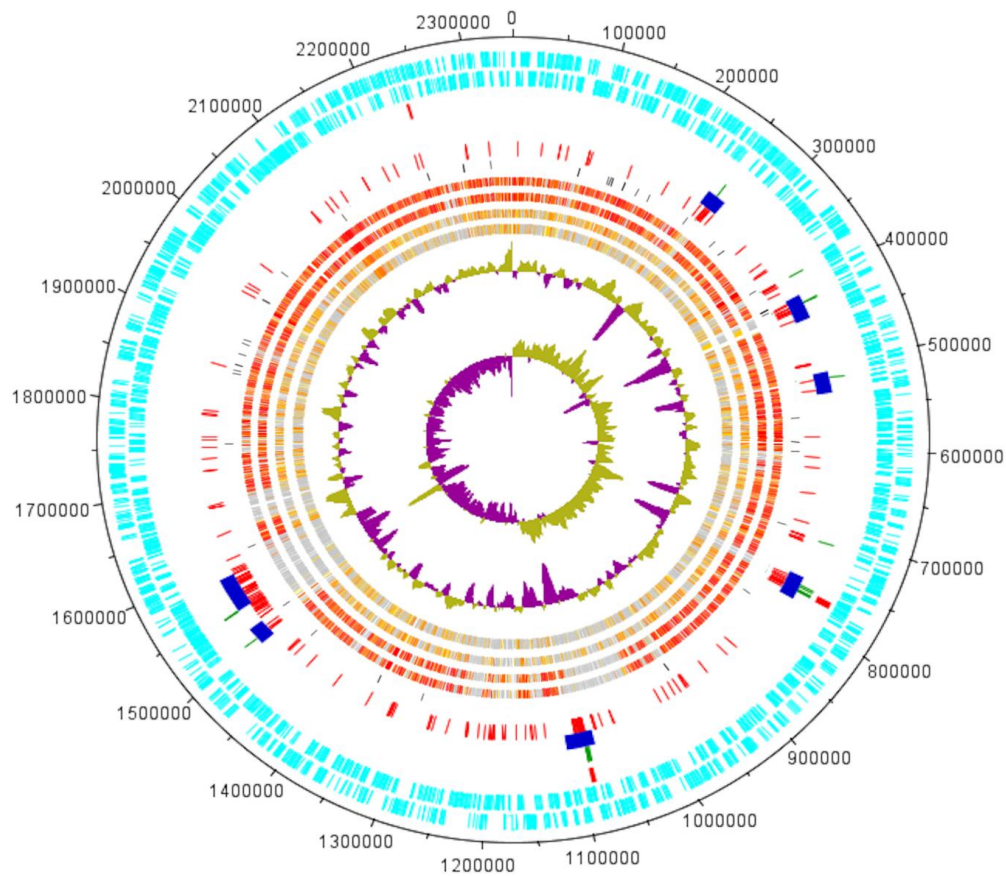


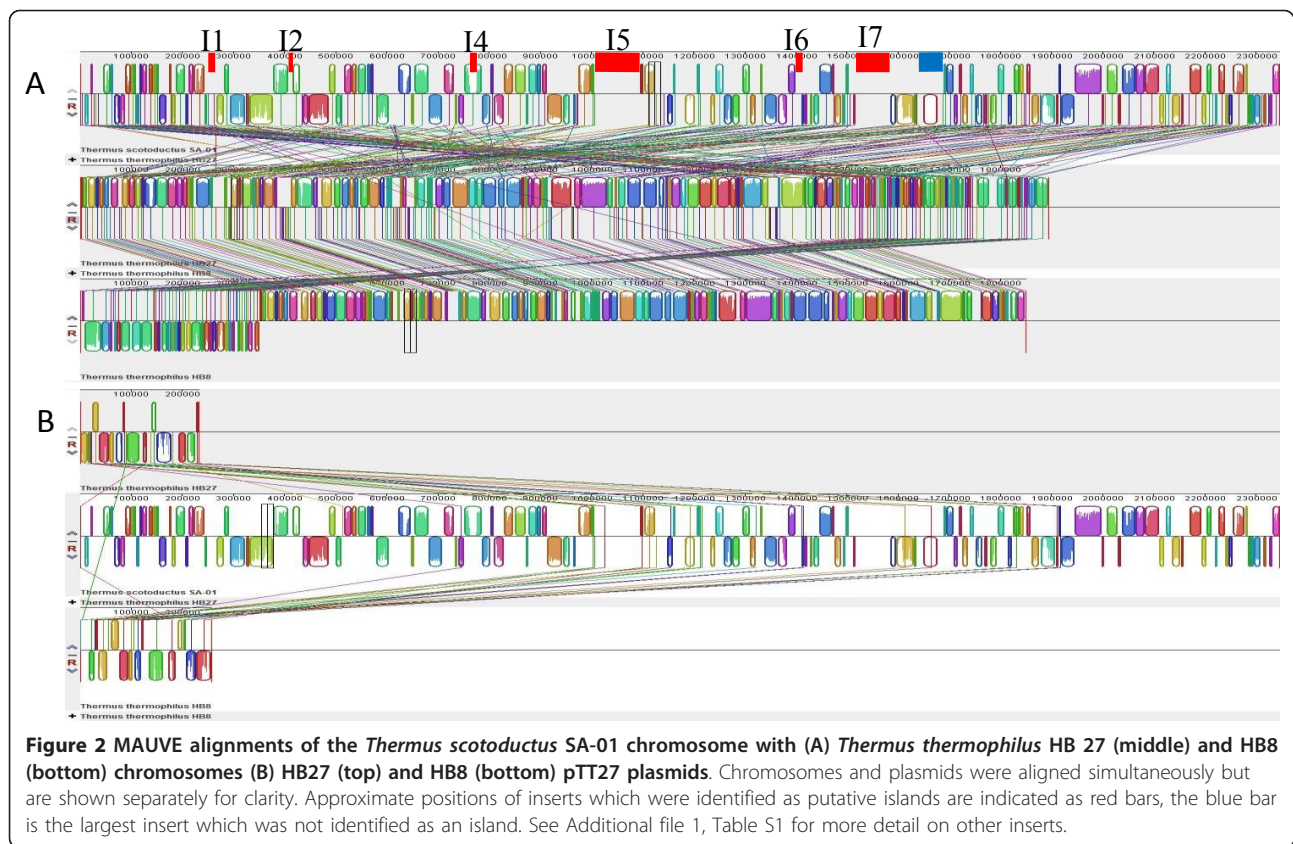
Figure 1 The *Thermus scotoductus* SA-01 chromosome. The different lanes represent (from outside): (a) CDS clockwise, (b) CDS anticlockwise, (c) Alien Genes by IslandView (Multiple Methods), (d) SIGI-HMM, (e) SeqWord sniffer, (f) Karlin's Method, (g) RNA genes, BI-BLAST comparisons for (h) *Thermus thermophilus* HB27, (i) HB8, (j) *Deinococcus radiodurans* (k) *Candidatus Desulfouridis audaxviator*, (l) G+C (m) G+C skew. BI-BLAST Sequence identities are colour coded from yellow (20%) to red (>90%). Genes missing in the comparison strain are indicated in grey.

(pTSC8) [GenBank: CP001963] with an average G+C content of 65.9%, similar to the *T. scotoductus* SA-01 chromosome of 64.9% (Table 1) and compared to the approximately 69% of *Thermus thermophilus*. Based on GC skew analysis, the origin of replication was identified as the location of the gene *dnaA* which encodes the chromosomal replication initiation protein DnaA (Figure 1). Manual curation of automatic annotation by deleting overlapping genes and curating gene starts resulted in 2,506 CDS on the chromosome. Proteins of unknown function, hypothetical and conserved hypothetical proteins constituted 21.4% of the total compared to 16.5% and 18.9% for HB27 and HB8, respectively (Table 1).

Genome comparisons

For the majority of genes present in the *T. scotoductus* SA-01 chromosome, their orthologous counterparts are found in the *T. thermophilus* chromosomes and plasmids. However, the synteny of genes have not been

preserved and the large plasmids of HB8 and HB27 contain genes, which are located on the chromosome in SA-01 (Figures 1+2). Several loci on the SA-01 chromosome are absent from the chromosomes of *T. thermophilus* (Figures 1+2). The distribution of *T. thermophilus* plasmid genes on the chromosome of *T. scotoductus* seems to be arbitrary (Figure 2). Functional analysis of the *T. thermophilus* megaplasmid genes using the Pathway Tools software showed that enzymes of several metabolic pathways are almost completely encoded by the plasmid genes, namely: coenzyme B12 synthesis and metabolism; adenosylcobalamin biosynthesis and adenosylcobalamin salvage pathways; dATP, dGTP and dUTP biosynthetic pathways; neurosporene and siroheme biosynthesis; and many other genes encoding acyl-CoA dehydrogenases, isomerases, oxidoreductase, glucosidases, galactosidases and other enzymes involved in the secondary metabolism. The plasmid genes form neat operon structures, for example the 9 genes of the



adenosylcobalamin biosynthesis pathway. This is consistent with the observation that operons might be considered as the basic unit of recombinational events between species [23]. It may be hypothesized that these operons were well organized within an ancestral genome, which served as a donor for the plasmid formation in *T. thermophilus* after which an unknown genetic burst randomized the genes on the chromosomes and parts of the *T. scotoductus* chromosome were lost (Figure 2) with only 30 of the original megaplasmid genes remaining (Additional file 1, Table S1). The lost genes include the cobalamine biosynthesis pathway, plasmid stability protein and parA and parB chromosome partitioning family proteins. The *T. scotoductus* loci which were not found in the *T. thermophilus* chromosomes, might represent sequences which were either deleted from the chromosome of an ancestral organism or could be genes acquired by lateral transfer.

Horizontally transferred genes and gene islands

The different approaches for identification of horizontally transferred genes, codon usage bias (Karlin's Codon Usage method and SIGI HMM), oligonucleotide usage patterns (SeqWord Sniffer), database comparisons (Island Pick as part of IslandView), G+C content, similarity searches or phylogenetic approaches for predicting

HT genes or gene islands show varying success. For this reason we combined different approaches to try and reach a consensus.

Based upon the initial analysis of the protein coding genes of *T. scotoductus* SA-01 using Karlin's codon usage method [24], 171 (6.8%) ORFs showed codon usage differences above the threshold values and were identified as horizontally transferred candidate genes (Additional file 2, Table S2). BLAST and phylogenetic analysis showed that 80% of the HT genes showed homology to those of organisms belonging to either closely or distantly related lineage. Laterally acquired genes in *T. scotoductus* SA-01 show close homology with species belonging to diverse phyla predominantly within the Bacterial domain (Additional file 3, Table S3). Putative donor prediction by BLAST, Neighbour Joining or Maximum Likelihood prediction produced essentially the same results. The majority of the acquired genes (72%) are from species of the phylum Deinococcus-Thermus, supporting the evidence of lateral transfer from other sister *Thermus* species [25]. Furthermore, most of the horizontally acquired genes excluding the Deinococcus-Thermus were either from distantly related Proteobacteria (6%) or Firmicutes (13%) and many of the genes have been transferred from microorganisms either having hyperthermophilic (25.2%) or thermophilic

(58.5%) lifestyles (Additional file 3, Table S3). The high proportion of genes from Firmicutes have been recently recognized in thermophilic bacteria, particularly in the genome sequence of *Thermosipho africanus* TCF52B, and they emerged as principal donors in thermophiles [26]. Phylogenetic analysis also identified the possible closest homolog, which was the same as the best hit in the majority of the cases (Additional file 3, Table S3).

Analysis of the *Thermus thermophilus* HB8 and HB27 genomes produced a similar number of putative HT genes, 116 (5.8%) and 104 (5.21%) on the chromosomes and 37 (14%) and 47 (21%) on the megaplasmids, respectively (Additional file 4, Table S4 for HB8 and additional file 5, Table S5 for HB27). BLAST search of the HT genes of *T. thermophilus* HB27 against the proteins of HB8 and SA-01 was performed to determine which of the HT genes were shared (Additional file 6, Table S6). Of the HB27 sequences, 56% and 35% had homologs, while 37% and 6% of the homologs were also predicted as alien, in HB8 and SA-01 respectively. Only 43 (29%) of the HB27 sequences had homologs in both HB8 and SA-01. The HT genes of HB27 which are absent in HB8 (and mostly in SA-01) are found in small groups on the chromosome and megaplasmid. A significant fraction of the HT gene homologs of HB27 were not predicted as HT genes in HB8 and SA-01. In some cases, the gene next to the HB27 homolog in HB8 or SA-01 were predicted as HT. This could be an effect of amelioration or may reflect errors in the prediction so the results should be interpreted with caution.

In SA-01 there are many inserts not found in *T. thermophilus*, which have an alternative oligonucleotide composition compared to the chromosome. Islands I1, I2, I5, I6 and I7 (Figure 1 + 2) of the predicted genomic islands of SA-01 are inside the chromosomal loci that are absent in *T. thermophilus* genomes (Figure 2), with a part of I4 not present in *T. thermophilus*. Other strain specific regions (e.g. Island 3) in the SA-01 genome were adapted to the SA-01 sequence composition by the genome amelioration process [27].

Hypothetical proteins form the major part of the island genes, especially so for island 7. Island 1 contains predominantly enzymes involved in O-antigen synthesis, while enzymes involved in DNA processing and integration are interspersed. Island 5 hosts a variety of proteins in common with *Meiothermus ruber* DSM 1279 (accession NC_013946) including von Willebrand factor (TSC_C11350), conserved hypothetical proteins (TSC_C11340, TSC_C11360 - TSC_C11380) and two operons relating to metabolism of phenolics, TSC_C11390 - TSC_C11440 and TSC_C11450 - TSC_C11520, corresponding to MRUB_2676 - MRUB_2681 and MRUB_2682 - MRUB2689, respectively. These appear to have been directly acquired from

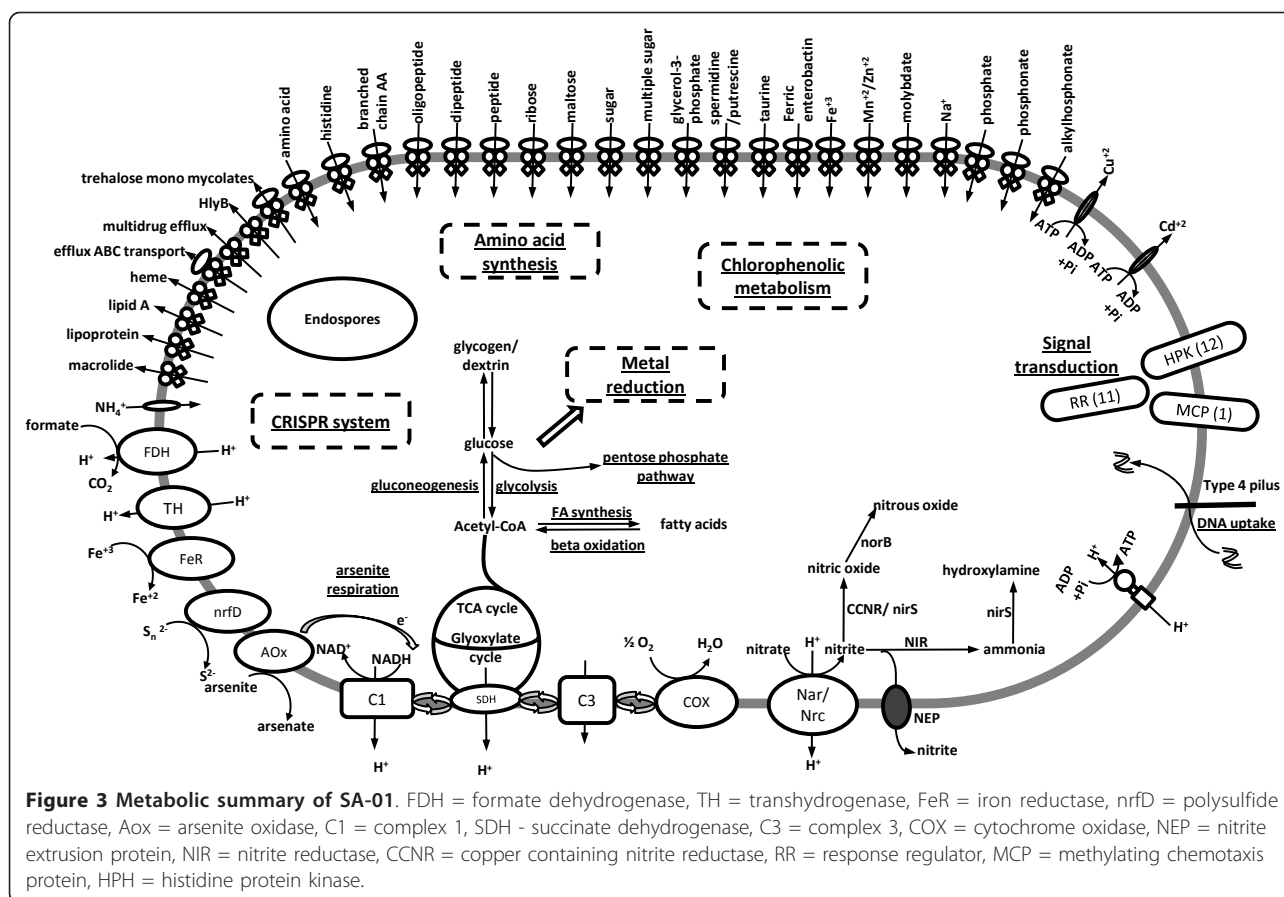
Meiothermus ruber DSM 1279, the former operon having undergone an inversion in SA-01 (Additional file 7, Figure S1). The remainder of the genes in I5 have the closest orthologs in *T. thermophilus* or a variety of organisms including *Geobacter*, *T. aquaticus*, *Deinococcus deserti*, *Leptospirillum* or *Anaeromyxobacter dehalogenans*.

A consensus prediction of HT islands can be seen in Figure 1, with clusters of HT genes corresponding to the predicted islands. The islands are also further highlighted by anomalous GC content. The association with t-RNA genes (islands 1 and 6), a phage integrase gene associated with tRNA-Ile and followed by 4 hypothetical genes in a reverse direction to the integrase (island 2), an ATP-dependent DNA helicase PcrA and a single-stranded nucleic acid binding protein which may be parts of the former plasmid replication machinery (island 3) and an IS4 family transposase (island 7), provide clues to the possible mechanism of integration. Taken together with the comparison of the genomes of SA-01, HB8 and HB27 and their putative HT genes, this suggests that *T. scotoductus* SA-01 has a highly plastic genome and that it has adapted to its subsurface environment by the acquisition or loss of genes or gene islands.

Transporters, Sensing and Energy Metabolism

We have identified 22 ABC transporters, including amino acid, phosphonate, phosphate, glucose, sugar, taurine, polyamine, ribose, cation, sodium-alanine symporter, trehalose mycolates, ammonium transporter, and other permeases (iron/zinc, glutathione, maltose, polypeptide, glycerol 3-phosphate, etc). Fe(III) iron import (fbpC) and two multidrug resistance proteins (Figure 3). *T. scotoductus* SA-01 retains pathways for glycolysis, gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway, pyruvate dehydrogenase, the tricarboxylic acid cycle (TCA), glyoxylate cycle and beta oxidation (Figure 3).

ATP synthesis is accomplished by type V ATPases, which appear in a cluster of nine genes (TSC_C08720 - TSC_C08800), compared to the V/A type in HB27. A cluster of Sox genes (*soxA*, *soxX*, *soxY*, *soxZ*) (TSC_C21050, TSC_C 21060, TSC_C 21090, TSC_C 21100, TSC_C 21110) are also present in the genome of SA-01, located downstream of a number of cytochrome c genes (TSC_C20900 - TSC_C20950; TSC_C20970), which have a high similarity to the same proteins present in *Thermus thermophilus* HB8 and HB27 strains. The cluster of *sox* genes present in *T. thermophilus* is homologous to the *sox* genes present in sulfur-oxidizing organisms [14] and might have been horizontally transferred from an *Aquifex aeolicus* like species with some local rearrangements [25]. The presence of this *sox* operon suggests that SA-01 can oxidize sulfur



compounds as a source of energy. The polysulfide reductase TSC_C03450 (annotated as molybdopterin oxidoreductase in SA-01) and NrfD (TSC_C10050) which is not present in HB27 or HB8 enables SA-01 to use S_0 as electron acceptor [1,2]. The ability to reduce sulfur using hydrogen or organic substrates is widespread amongst thermophiles. BLAST searches showed that the closest orthologs of the TSC_C10050 are from *Thermincola* sp. JR, *Thermobaculum terrenum* ATCC BAA-798 (Yellowstone), *Thermosinus carboxydivorans* Nor1 (hot spring), *Acidiphilium cryptum* JF-5, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Desulfitobacterium hafniense*. This suggests that the additional *nrfD* gene was obtained by horizontal gene transfer after separation of SA-01 from the other *Thermus* species.

The diverse metabolic capacity, abundance of sensor histidine kinases and transporters are indicative of oligotrophy, possibly in a dense and diverse population which could provide carbon and nitrogen compounds either from their metabolism or the breakdown of dead cells. Wanger *et al.* [28] illustrated that prolific, organic rich biofilms can be found at mineral surfaces in fracture zones in the deep subsurface and that these could serve as a, so far underestimated, source of C, N and P

for cells in these biofilms. The absence of flagella proteins, but the presence of twitching motility proteins (TSC_C01540 and TSC_C03160), chemotaxis transducer proteins (TSC_C11960), PilT proteins TSC_C05390, TSC_C12240, TSC_C 18160, TSC_C20130), enzymes for S-layer synthesis (TSC_C19830, TSC_C24230, TSC_c03240, TSC_C16520, TSC_C24210,) and an S-layer repressor (*slrA*) (TSC_C03800), suggest a sessile lifestyle. Even in a planktonic phase, sufficient nutrients could be available in the water to sustain essential metabolic processes [6], albeit slowly [28].

Aerobic respiration

The genome of *T. scotoductus* SA-01 encodes numerous genes assigned to a classical electron transport chain. Complex I NADH quinone oxidoreductases, *nuoA - nuoN* are in a cluster (TSC_C6050 - TSC_C5920), *nqo1* (TSC_C05330), and two quinone oxidoreductases, one found on the plasmid (TSC_C14840, TSC_P80006). Complex II consists of succinate dehydrogenase (cytochrome b556 subunit SdhC (TSC_C18990), SdhA (TSC_C17730), SdhB1 and SdhB2 (TSC_C18960, TSC_C18970). SA-01 has the 2-ketoglutarate dehydrogenase complex including dihydrolipoyl dehydrogenase LpdA1 (TSC_C02350) and

LpdA2 (TSC_C02700). The terminal cytochrome oxidase consists of 9 cytochrome c oxidase genes *ctaC1* (TSC_C00920), *caaA* (TSC_C00930), *ctaH*, *ctaE1*, *ctaE2*, *ctaD1*, *coxM* (TSC_C00960 - TSC_C01000) and *ctaD2*, *ctaC2* (TSC_C09680, TSC_C09681). Orthologous genes for the recently described complex III of HB27 (TTC1567-TTC1570) could be identified in SA-01 (TSC_C23640 - TSC_C23670) [29,30].

Metal reduction, arsenic detoxification and respiration

Many bacteria and archaea, including SA-01 [1,2,8] display the ability to reduce metals [31]. These may be dissimilatory, detoxification or “accidental” processes. In some cases, specific proteins have been isolated and characterized e.g. the “chromate reductases” but significance of these activities remains uncertain, as it may be a secondary activity unrelated to their physiological roles [9].

Dissimilatory metal reduction is possibly the best studied in *Shewanella oneidensis* and *Geobacter. sulfurreducens* with 42 and 90 c-type cytochromes respectively, which may be indicative of their highly branched electron transfer transport systems that convey extensive versatility in terms of electron acceptor utilization [32]. In addition, Marshall *et al.* [33] showed experimentally that the c-type cytochromes of *S. oneidensis* MR-1 are essential for the reduction of U(VI) and formation of extracellular UO₂ nanoparticles. The 12 c-type cytochromes found in SA-01 may explain its metal reducing abilities. BLAST analysis, however, indicate that none of the c-type cytochromes present in *T. scotoductus* SA-01 are similar to those in *S. oneidensis* or *G. sulfurreducens*.

Arsenite oxidase genes *aoxA* (TSC_C14700), *aoxB* (TSC_C14680) and the *arsR* transcription regulator (TSC_C14690), a hypothetical protein and a transcriptional repressor (TSC_C14720) form a cluster in SA-01. In HB8, the large and small subunit genes are found on the plasmid with the *arsR* located on the chromosome (TTHA0483). In addition SA-01 contains three more *arsR* transcriptional regulator genes; TSC_C04800 upstream of a nickel resistance protein, TSC_C14260 upstream of *hyfB,C,E,F,G*; NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 7 and a soluble hydrogenase small subunit in a cluster and TSC_C16260 upstream of a AAA-ATPase. The arsenite oxidase converts arsenite to arsenate and is probably part of a detoxification pathway [34] but the presence of an arsenite oxidase suggests that aerobic arsenic respiration is possible by SA-01. Aerobic arsenite respiration (using arsenite as electron donor) is well known in chemolithoautotrophs [35]. The dissimilatory use of As(V) as electron acceptor by a *Thermus* isolate HR13 was described by Gihring and Banfield [36] who proposed that HR13 could oscillate between arsenite

detoxification and arsenate respiration in microaerophilic culture. HR13 could however not grow with As(III) as sole energy source indicating that the As(III) oxidising system was probably not respiratory. Their cultures were however not aerated so this question is not resolved. Apart from the arsenate reductase (TSC_C23460), none of the other arsenate respiratory proteins are found in SA-01. Arsenite oxidation was also demonstrated for *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus* [37]. Complete arsenic redox cycling has so far been observed only in *Thermus* [36], *Bacillus* [38] species and *Marinobacter santoriniensis* [39,40].

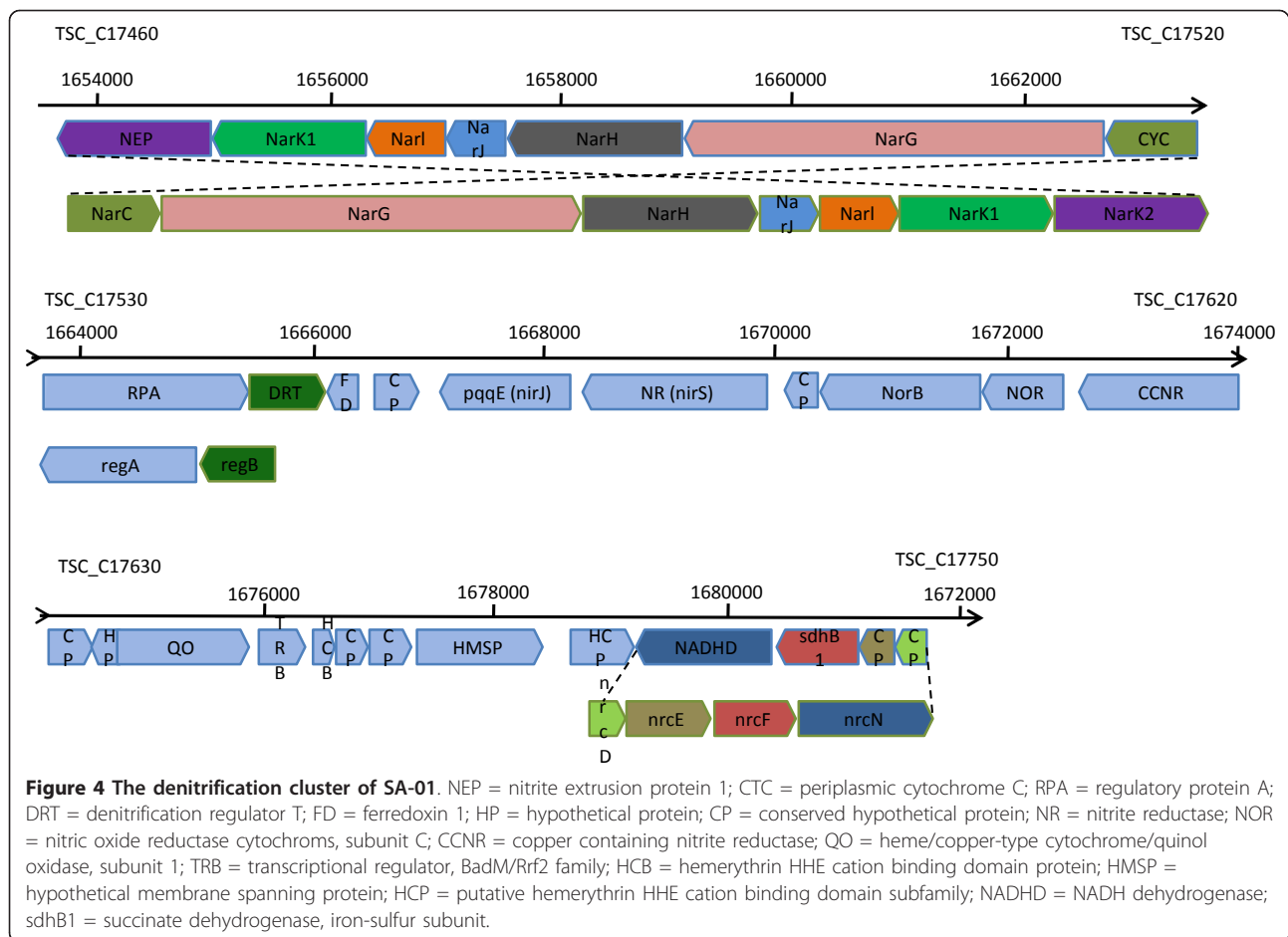
The ArsR family represents a class of transcriptional regulatory proteins that allowing prokaryotes to respond to stress induced by heavy metal toxicity [41]. TSC_C14260 has an ortholog in *Desulfouridis audaxviator* (e-value = 5e-11).

Denitrification

Complete reduction of nitrate to ammonia can occur via the assimilatory nitrate reductase and cytochrome c-552 (*cycA1,2,3*), (TSC_C00210, TSC_C07570, TSC_C31130) and a ferredoxin-nitrite reductase (TSC_C11790). A nitrate inducible formate dehydrogenase TSC_C10040 can also couple to the respiratory nitrate reductase to generate a proton-motive force across the cytoplasmic membrane.

A DNA fragment named the “nitrate respiratory conjugative element” in a different *Thermus thermophilus* strain [7,42] codes for the *nar* and *nrc* operons as well as their regulatory machinery. In *T. thermophilus*, the *nrcDEFN* operon is located upstream of the *nar* operon. The corresponding sequence in SA-01 codes for a NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase B subunit and two hypothetical proteins corresponding to NrcE and NrcD (TSC_C17720 - TSC_C17750) (Figure 4). The C-terminal 94 amino acids of the NrcE equivalent of SA-01, which consists of 111 amino acids, shows 87% identity with residues 270 - 363 of *T. thermophilus* NrcE which is absent in HB27 and HB8. Presumably this complex could be functional in SA-01.

Downstream of the *nrc* operon in *T. thermophilus* [7], lies the *nar* operon consisting of *narCGHJIKT*. In SA-01, the genes for a nitrite extrusion protein, *narK1*, *narI*, *narJ*, *narH*, *narG* and a periplasmic cytochrome c gene, which are not present in HB27 or HB8, form a cluster (TSC_C17460 - TSC_C17520) adjacent to regulatory protein A and a denitrification regulator (TSC_C17530 and TSC_C17540) which is the start of a large cluster of genes, completing the denitrification process up to nitrous oxide (Figures 3+4). The cluster contains ferredoxin 1, a conserved hypothetical proteins, coenzyme PQQ synthesis protein PqqE, nitrite reductase, conserved hypothetical protein, nitric oxide



reductase subunit b NorB, NorC and what seems a copper containing nitrite reductase (TSC_C17530 - TSC_C17620), transcriptional regulator, cation binding domain protein, NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase b subunit (Figure 4). A ferredoxin nitrite reductase (TSC_C11790) is also found in HB27 and HB8. The presence of both a cytochrome cd1 and a copper containing nitrite reductases in the same organism is exceptional. Distant orthologs of the NarK1 protein (only in HB27), the alpha and beta subunit of nitrate reductase and the periplasmic cytochrome are found in HB27 and HB8. BLAST searches, however, indicated that the closest orthologs of all the other genes, except for ferredoxin 1 (TSC_C17750) which is found in HB27 and HB8, were from *Thermus thermophilus* [7] (all except copper containing nitrite reductase and hypothetical protein TSC_C17590), *Meiothermus silvanus* DSM 9946, *Haloferax volcanii* DS2, *Persephonella marina* EX-H1, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 and *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (Additional file 1, Table S1). The entire segment of DNA therefore appears to have been acquired by the *Thermus thermophilus* and *Thermus scotoductus* SA-01 from a distant

donor/s. These genes were however not identified as acquired by any of the methods used. Balkwill *et al* [2] showed that *T. scotoductus* SA-01 could grow using nitrate as terminal electron acceptor.

DNA transformation

Natural competence (the ability to take up and process exogenous DNA in specific growth conditions) has been observed in *T. thermophilus* strains. High frequencies of natural transformation has been displayed by this organism [43,44] and Schwarzenlander and Averhoff [21] proposed that the extraordinary broad substrate specificity of the highly efficient *T. thermophilus* HB27 DNA uptake system may contribute significantly to thermoadaptation of the organism by interdomain DNA transfer in hot environments. The natural transformation system of HB27 comprises at least 16 distinct competence proteins [45,46]. Among the 16 competence proteins the genes encoding PilM, PilN, PilO, PilW, and PilQ are found to be most essential for rendering natural transformation [20]. Several genes associated with transformation have been identified in SA-01. These include pilQ (TSC_C20070), pilM, pilN, pilO, and pilW (TSC_C20660 - TSC_C20690), pilF

(TSC_C01550) pilC (TSC_C07140), pilD (TSC_C02040) comEA (TSC_C25010), comEC/rec2 (TSC_C25020), comF (TSC_C07880), comZ (TSC_C07710), dprA (TSC_C06380) and competence-damage protein ClnA (TSC_C04130). In addition a FimA (TSC_C24040) and four PilT domain proteins (TSC_C05390, TSC_C12240, TSC_C18160, TSC_C20130) are present. TSC_C12240 and TSC_C20130 are absent in HB8 and HB27 while TSC_C18160 is found in HB27. PilA is absent in SA-01 and HB8, but present in HB27. Four *Thermus* species, *T. thermophilus* HB27 and HB8, *T. flavus* AT62, *T. caldophilus* GK24, and *T. aquaticus* YT1 have been demonstrated to be naturally competent, with HB27 showing the highest transformation frequency [43] with a maximal uptake rate of about 40 kb/s per cell [21] and with a broad specificity [21,22].

The transformation assays with *T. scotoductus* SA-01 cultures consistently showed colonies (20-30) with the cells incubated with the pMKNor plasmid but not with those incubated without DNA. The number of *T. thermophilus* PRQ25 transformants was tenfold more with pMKNor than those obtained for *T. scotoductus*. Therefore, we concluded that *T. scotoductus* SA1 can be transformed with plasmids carrying DNA sequences homologues to its chromosome. To confirm transformation in *T. scotoductus* SA1, we compared the total protein pattern of the transformant colonies with that of the parental strain, and also carried out PCR amplification of the *nirK* gene, which is specific for *T. scotoductus* SA1. The results (Additional file 8, Figure S2) clearly demonstrate that transformants corresponds to *T. scotoductus* SA-01 and not to any contamination by other strain.

No putative self-replicating plasmid could be isolated by standard methods or by following a procedure for the isolation of total genomic DNA. No plasmid-like bands were detected by agarose gel electrophoresis, and transformation of *E. coli* ultra-competent cell preparations and selection on kanamycin plates was also unsuccessful. No colonies could be found which lost the kanamycin resistance after several rounds of growth without the antibiotic, whereas in *T. thermophilus* the pMK18 derivative was easily lost by this procedure [47]. Transformation with pMKNor is probably due to integration of the plasmid into the chromosome by homologous recombination.

It has been proposed [20] that the PilA 1-4 proteins may form a transformation shaft, which transports the DNA through the outer membrane into the periplasmic space. The possibility exists that the presence of PilA in HB27 and not in HB8 and SA-01 may be partly responsible for the superior transformability of HB27. Inactivation of the *Thermus* traffic ATPase PilF led to a loss of competence although the pili remained intact [45]. The

Thermus PilF could be functionally similar to the gonococcal [48,49] and *Pseudomonas stutzeri* retraction ATPase PilT [48,50], which was demonstrated to be essential for competence. The role of the four PilT domain proteins in SA-01 needs to be elucidated. It is however evident that SA-01 possesses the machinery enabling it to take up DNA and that this may be partly responsible for its adaptation to higher temperatures.

DNA protection and repair

The synthesis of carotenoids by HB27 and HB8, which imparts a yellow color to the cultures, has been proposed as an additional membrane and DNA protection mechanism [15,51]. The entire gene cluster TTP57-TTP67 as well as the UV endonuclease is absent in SA-01. Considering that SA-01 was isolated from water collected more than 3 kilometers underground and that it probably resided there for a significant period of time, it evidences in favor of the photo-protective role of the carotenoids.

T. scotoductus SA-01 has genes for repair pathways that include DNA replication, recombination and repair *recA* (TSC_C04150), *ruvB* (TSC_C19140), *uvrA* (TSC_C19840), *uvrB* (TSC_C24200), *gyrA* (TSC_C04920), *gyrB* (TSC_C22740), which were all upregulated in *Deinococcus radiodurans* after gamma radiation, but it is lacking in *katA*, *terB*, *terZ*, *mrsA* and *dps*, which encode for proteins alleviating oxidative stress [52]. In *Deinococcus radiodurans*, a *recA* deficient mutant was shown to be gamma ray sensitive. Wild type *recA* could complement the gamma ray sensitivity of *E. coli recA1*⁻ strain [53]. SA-01 contains the *cinA*, ligase and *recA* in a cluster (TSC_C04130-04150), as well as *recF* (TSC_C01050), *recR* (TSC_C21330) and *recO* (TSC_C13980). The RecA independent recombination repair system seems to be absent in SA-01. Of the hypothetical proteins upregulated by irradiation of *Deinococcus* [52], only DdrA showed homology to two proteins TSC_C06080 and TSC_C16120, which are Rad52/22 double-strand break repair protein in SA-01. These genes are also absent in the *Desulfouridis audaxviator* genome [6]. It seems then that the deep subsurface represents a less challenging environment, where mostly gamma radiation damage needs to be dealt with, possibly at lower levels. The RecA-dependent recombination repair system, similar to *D. radiodurans* could presumably be sufficient protection.

Viral Resistance

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are a distinctive feature of the genomes of most Bacteria and Archaea and are thought to be involved in resistance to bacteriophages with a resistance specificity determined by similarity between the spacers and phage sequences [54,55]. Using a

CRISPRFinder online program (<http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php/>) on the *T. scotoductus* SA-01 chromosome revealed three CRISPR regions (CRISPR1: 575014 - 575590; CRISPR2: 1182085 - 1184314; CRISPR3: 1194463 - 1197065). Regions 2 and 3 are associated with CRISPR associated proteins. In HB27 and HB8 we find 10 and 11 CRISPRs respectively, with only two on the chromosome and the remaining 8 or 9 on the megaplasmid. The presence of an intact CRISPR system could imply that the ancestral genome may have suffered an invasion of exogenous genetic components, but that with subsequent rearrangement and deletion events most of these were lost by SA-01 or that the *T. thermophilus* faced a more phage challenging environment after separation from *T. scotoductus*.

Conclusions

Members of the phylum Deinococcus-Thermus are known for their resistance to heat and radiation. The *Thermus* spp. are of the most widely spread [7] and have colonized a number of environments typical for thermophilic organisms. It should therefore come as no surprise that a *Thermus* species should be found in the deep subsurface with ambient rock temperatures of 60°C or higher [5] at the depth where *Thermus scotoductus* SA-01 was discovered (3.2.kmbs). Fission track analysis in apatite in the Wits basin suggests that only hyperthermophiles could have existed at these depths and that current microbial communities must have migrated to these depths more recently [56]. Hyperthermophilic organisms currently found at these depths could be descendants of those initial inhabitants [56] and could have served as donors of genetic material to SA-01, assisting in thermoadaptation. The natural competence of *T. scotoductus* SA-01 could have been instrumental in the adaptation to these hot environments [19]. The earlier notion that most of the megaplasmid genes of HB27 and HB8 may be responsible for thermophily [15] may need reconsideration as SA-01 has dispensed with many of them.

The adaptability of SA-01, and *Thermus* in general, is highlighted by the extreme genome plasticity, loss of nonessential genes (e.g. carotenoid synthesis and UV endonuclease) and the acquisition of large islands subsequent to separation of SA-01 and *Thermus thermophilus*, the most significant of these being island 5 (chlorophenolic metabolism) and the insert containing the "nitrate respiratory conjugative element". SA-01 also has a number of aerobic and anaerobic respiratory options, further highlighting its metabolic versatility and its ability to sustain itself under varying conditions.

The genome of *Thermus scotoductus* SA-01 illustrates how rapid adaptation can be achieved by maintaining a highly dynamic and plastic genome. The possibility that

it could sometimes be polyploid [16] has not been investigated, but it would be surprising if this was not the case.

Methods

Sequencing strategy

A 454 pyrosequencing/Sanger hybrid approach was used for whole genome sequencing of *T. scotoductus* SA-01. Genomic DNA from *T. scotoductus* SA-01 (ATCC 700910) was extracted from cells grown overnight at 65°C in TYG [5 g tryptone, 3 g yeast extract and 1 g glucose in 1 L dH₂O] liquid culture, using the FastDNA[®] SPIN Kit (Qbiogene). 454 sequencing was performed at Inqaba Biotech, Pretoria, South Africa. The methods were all standard protocols developed for the Roche GS20/FLX sequencer. The raw reads obtained were assembled into contigs using the 454 *de novo* Newbler Assembly software. A representative fosmid library of *T. scotoductus* SA-01 was constructed in *Escherichia coli* EPI300 cells using the pCC1FOS fosmid vector and the Copy Control Fosmid Library Production Kit (Epicentre Biotechnologies). Subsequently, 384 terminal DNA sequences of cloned genomic inserts were determined with an ABI 3730 × 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were processed with Phred [57,58] and assembled with existing contigs by using the Phrap assembly tool [59]. Sequence editing of fosmid-end sequences and 454 sequences was done using GAP4 as part of the Staden software package [60]. Ambiguities and gaps were resolved using PCR and primer walking on purified DNA of selected fosmid clones.

11.1.1. Gene Prediction and Annotation

The DNA sequence was submitted to the TIGR/JCVI Annotation Engine (<http://www.tigr.org/AnnotationEngine/>), where it was run through TIGR's prokaryotic annotation pipeline. This initial automated annotation was verified and edited manually by using criteria such as the presence of a ribosome-binding site, GC frame plot analysis and similarity to known protein-encoding sequences (CDS). Functional annotation was done by using the ERGO tool from Integrated Genomics with a two-step approach. Initially, all proteins were screened against Swiss-Prot data and publicly available protein sequences from other related organisms. All predictions were verified and modified manually by comparing the protein sequences with the Pfam, GenBank, ProDom, COG, and Prosite public databases. Tmpred was used to predict transmembrane helices within CDS (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

Comparative Genomics

The proteins obtained from the genome sequence of *T. scotoductus* SA-01 was bi-directionally blasted (A Wollherr - personal communication) against three chosen

organisms using blastp from the NCBI-Blast suite. The EMBOSS package was used to evaluate reciprocal blast hits by global Needleman-Wunsch-Alignments. The entire proteome from *T. scoto ductus* SA-01 has been compared to the proteins from the related species *Thermus thermophilus* HB8, *Thermus thermophilus* HB27 and the deep mine isolate *Desulfouridis auduxviator*. The global alignment of complete chromosomal sequences was performed by Mauve [61]. The Pathways Tools package [62-64] was used for reconstruction of metabolic pathways based on the genome annotation.

Horizontally transferred genes

Several methods have been proposed so far to identify putative horizontally acquired genes. These methods are based on either deciphering atypical DNA composition or anomalous phylogenetic distribution of the genes under investigation. To get the most reliable set of candidate horizontally transferred genes in *T. scoto ductus* SA-01 a combination of horizontally transferred genes detection methods/tools were applied. Horizontally transferred genomic islands were predicted by the SeqWord Genome Browser tool [65] and its semi-automatic implementation SeqWord Sniffer [66] available at <http://www.bi.up.ac.za/SeqWord/> and using the IslandViewer web portal (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/query.php>) that combines the prediction results of three genomic island identification algorithms: IslandPick [67,68], SIGI-HMM [69] and IslandPath-DIMOB [70]. Alien (horizontally transferred) genes in *T. scoto ductus* SA-01, *T. thermophilus* HB8 and *T. thermophilus* HB27 were identified by Karlins's codon bias method [24] using the Predicted Highly expressed and Putative Alien genes web tool (<http://www.cmbi.uga.edu/software/phxpa.html>). This method is suitable for identifying highly expressed genes and also genes which have been laterally acquired [71,72]. All the putative HT gene products of SA-01 were BLASTed against the non-redundant protein database using BlastP with an e-value cut-off $1e-10$ [73,74]. Paralogs were removed and the query sequence plus resultant hit sequences were used to infer the evolutionary history using the Neighbor-Joining [75] and Maximum Likelihood [76] methods with bootstrapping (1000 replicates) using MEGA5 [77]. Taxonomic and lifestyle based information of each predicted donor species was retrieved from the NCBI. The putative HT genes for *T. thermophilus* HB27 were also BLASTed against the genome sequences of *T. thermophilus* HB8 and *T. scoto ductus* SA-01 to compare the putative HT genes in the three genomes.

Natural competence

For transformation experiments *Thermus scoto ductus* SA1 pre-inocula were grown overnight at 60°C in TBmq

medium (8 g/L trypticase, 4g/L yeast extract, 3 g/L NaCl, MiliQ water) at half strength under aeration (180 rpm, 1/5 Erlenmeyer volume) and re-inoculated in a 1:100 ratio in the same medium. After 6 hours of incubation under the above conditions, 0.5 mL subcultures were separated into 12 mL sterile tubes to which 300 ng of plasmid DNA preparations was added. After 16 hours, the cells were plated on 1× TB prepared with carbonate-rich mineral water, and containing 30 mg/L of kanamycin. Parallel cultures without DNA were always plated as controls. Plates were incubated in a wet chamber for 48 hours at 60°C.

DNA samples used in these experiments were isolated from *E. coli* DH5 α [*supE44*, Δ (*lacZYA-argF*)U169 (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi I relA1*]. A derivative of a bifunctional plasmid (pMK18) that replicates in both *E. coli* and *T. thermophilus* and confers thermostable resistance to kanamycin in both organisms at their respective optimal growth temperatures [78], was used. The plasmid (pMKNor) contained a 2396 bp DNA fragment encoding the *nor* genes from *T. thermophilus* PRQ25 [79,80] [GenBank: FN666415]. This sequence is very similar (87% DNA identity) to the equivalent genes of *T. scoto ductus* SA1, so it was expected that homologous recombination could take place between the plasmid and the chromosome.

To confirm transformation in *T. scoto ductus* SA1, we compared the total proteins pattern of the transformant colonies with that of the parental strain, and also carried out PCR amplification of the *nirK* gene (Primers: Kdir CCGGAGTTTTTATGTACCACTGC;Krev GGCCCCACGTTTCAGGAAGTA), which is specific for *T. scoto ductus* SA-01.

Additional material

Additional file 1: Table S1. BLASTP comparisons between *Thermus scoto ductus* SA01 and *Thermus thermophilus* HB27 and HB8 genomes. This table provides a BLAST comparison between the predicted coding sequences of *Thermus scoto ductus* SA-01 and *Thermus thermophilus* HB27 and HB8 and illustrates the conserved genes, the SA-01 genes which are not present in HB27 or HB8 as well as the predicted gene islands of SA-01.

Additional file 2: Table S2. List of alien genes: *Thermus scoto ductus* SA01. Contains a list of putative alien genes in *Thermus scoto ductus* SA-01 as determined by codon bias relative to all genes using Karlins codon bias method.

Additional file 3: Table S3. Putative horizontally transferred genes in the *Thermus scoto ductus* SA-01 complete genome and their putative donor organisms based on BLAST best hits and on Neighbor-joining and Maximum likelihood trees. Contains a list of predicted horizontally transferred genes and the putative donors organisms.

Additional file 4: Table S4. List of alien genes: *Thermus thermophilus* HB8 chromosome and megaplasmid. Contains a list of putative alien genes in *Thermus thermophilus* HB8 as determined by codon bias relative to all genes using Karlins codon bias method.

Additional file 5: Table S5. List of alien genes: *Thermus thermophilus* HB27 chromosome and megaplasmid. Contains a list of putative alien genes in *Thermus thermophilus* HB27 as determined by codon bias relative to all genes using Karlin's codon bias method.

Additional file 6: Table S6. Putative alien genes in *Thermus thermophilus* HB27 and their homologs in HB8 and SA01. Contains a comparison of the putative horizontally transferred genes in *Thermus scotoductus* SA-01 and *Thermus thermophilus* HB27 and HB8.

Additional file 7: Figure S1. Part of Island 5 showing the DNA segment acquired by *T. scotoductus* SA01 from *Meiothermus ruber*. Illustrates the gene cluster for phenolic metabolism of SA-01 which was acquired from *Meiothermus ruber*.

Additional file 8: Figure S2. Identification of transformants as *T. scotoductus* SA1 derivatives. Illustrates that the pMKNor transformed cells were indeed SA-01 and not a contaminant.

Acknowledgements

Funding for the project was provided by:

DL and EvH: The Advanced Biomolecular Research Cluster of the Strategic Academic Cluster Initiative of the University of the Free State, the National Research Foundation (South Africa) HICD - Institutional Research Development Programme (IRDP - RNAs) (Grant number 62692), the SA/Germany Agreement on Cooperation in Science and Technology (UID 69440) and the Technology Innovation Agency/University of the Free State Metagenomics Platform.

OR and BK: The Southern African Biochemistry and Informatics for Natural Products Network (SABINA), the National Research Foundation (South Africa) grant for National Bioinformatics and Functional Genomics Programme (Grant number 71261).

RD: The Bundesministerium für Bildung und Forschung (grant number SUA 08/12)

JB: Bilateral, South Africa/Spain collaborative project (HS2007-0013)

Author details

¹BioPAD Metagenomics Platform, Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.

²Department of Genomic and Applied Microbiology & Göttingen Genomics Laboratory, Georg-August University Göttingen, Germany. ³Bioinformatics and Computational Biology Unit, Department of Biochemistry, University of Pretoria, Lynnwood Road, Hillcrest, 0002 Pretoria, South Africa. ⁴Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 28049, Spain.

Authors' contributions

All authors approved read and approved the final manuscript. KG performed the sequencing, assembly and annotation, and wrote the first draft. EB and HL supervised the completion of the genome sequencing, assembly and annotation. AW performed and interpreted the bidirectional BLASTs. RD and GG supervised the genome sequencing. EvH contributed toward writing the manuscript. OR, BK and MS identified gene islands and alien genes and helped with the interpretation of the data. JB and CB performed the experiments to illustrate natural competence. DL provided funding, coordinated the research and wrote the final manuscript.

Received: 19 January 2011 Accepted: 24 November 2011

Published: 24 November 2011

References

1. Kieft TL, Fredrickson JK, Onstott TC, Gorby YA, Kostandarithes HM, Bailey TJ, et al: **Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:1214-1221.
2. Balkwill DL, Kieft TL, Tsukuda T, Kostandarithes HM, Onstott TC, Macnaughton S, et al: **Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*.** *Extremophiles* 2004, **8**:37-44.
3. Lin LH, Gihring T, Sherwood Lollar B, Boice E, Pratt L, Lippmann-Pipke J, et al: **Heterogeneous microbial communities associated with a 0.7 to 1.4 kmbls section of the continental crust.** *Geomicrobiol J* 2006, **23**:369-414.
4. Moser DP, Gihring TM, Brockman FJ, Fredrickson JK, Balkwill DL, Dollhopf ME, et al: ***Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:8773-8783.
5. Onstott TC, Lin LH, Davidson M, Mislowski B, Borcsik M, Hall J, et al: **The origin and age of biogeochemical trends in deep fracture water of the Witwatersrand Basin, South Africa.** *Geomicrobiology Journal* 2006, **23**:369-414.
6. Chivian D, Brodie EL, Alm EJ, Culley DE, Dehal PS, DeSantis TZ, et al: **Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth.** *Science* 2008, **322**:275-278.
7. Cava F, Hidalgo A, Berenguer J: ***Thermus thermophilus* as biological model.** *Extremophiles* 2009, **13**:213-231.
8. Opperman DJ, van Heerden E: **Aerobic Cr(VI) reduction by *Thermus scotoductus* strain SA-01.** *J Appl Microbiol* 2007, **103**:1907-1913.
9. van Heerden E, Opperman DJ, Bester AP, Van Marwijk J, Cason ED, Litthauer D, et al: **Metabolic promiscuity from the deep subsurface: A story of Survival or Superiority.** *Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology XI; 12 August, 2008* San Diego, CA; 2008.
10. Opperman DJ, Piater LA, van Heerden E: **A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme.** *J Bacteriol* 2008, **190**:3076-3082.
11. Opperman DJ, van Heerden E: **A membrane-associated protein with Cr (VI)-reducing activity from *Thermus scotoductus* SA-01.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **280**:210-218.
12. Moller C, van Heerden E: **Isolation of a soluble and membrane-associated Fe(III) reductase from the thermophile, *Thermus scotoductus* (SA-01).** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **265**:237-243.
13. Bester PA, Litthauer D, Piater LA, van Heerden E: **A thioredoxin reductase-like protein from the thermophile, *Thermus scotoductus* SA-01, displaying iron reductase activity.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **302**:182-188.
14. Henne A, Brüggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, et al: **The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:547-553.
15. Brüggemann H, Chen C: **Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle.** *J Biotechnol* 2006, **124**:654-661.
16. Ohtani N, Tomita M, Itaya M: **An Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*, Is a Polyploid Bacterium.** *J Bacteriol* 2010, **192**:5499-5505.
17. Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M: **Recombination and Replication in DNA Repair of Heavily Irradiated *Deinococcus radiodurans*.** *Cell* 2009, **136**:1044-1055.
18. Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, Petranovic M, et al: **Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*.** *Nature* 2006, **443**:569-573.
19. Averbek D: **Shuffling genes around in hot environments: The unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*.** *FEMS MICROBIOL REV* 2009, **33**:611-626.
20. Averbek D, Müller V: **Exploring research frontiers in microbiology: Recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles.** *Res Microbiol* 2010, **161**:506-514.
21. Schwarzenlander C, Averbek D: **Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27.** *FEBS J* 2006, **273**:4210-4218.
22. Schwarzenlander C, Haase W, Averbek D: **The role of single subunits of the DNA transport machinery of *Thermus thermophilus* HB27 in DNA binding and transport.** *Environ Microbiol* 2009, **11**:801-808.
23. Wolf YI, Rogozin IB, Kondrashov AS, Koonin EV: **Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context.** *Genome Res* 2001, **11**:356-372.
24. Mrazek J, Karlin S: **Detecting alien genes in bacterial genomes.** *Molecular Strategies in Biological Evolution* 1999, **870**:314-329.
25. Omelchenko MV, Wolf YI, Gaidamakova EK, Matrosova VV, Vasilenko A, Zhai M, et al: **Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: Divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance.** *BMC Evol Biol* 2005, **5**.
26. Nesbo C, Baptiste E, Curtis B, Dahle H, Lopez P, Macleod D, et al: **The genome of thermophilic africanus TCF52B: Lateral genetic connections to the firmicutes and archaea.** *J Bacteriol* 2009, **191**:1974-1978.
27. Lawrence JG, Ochman H: **Amelioration of bacterial genomes: Rates of change and exchange.** *J Mol Evol* 1997, **44**:383-397.

28. Wanger G, Southam G: **Structural and chemical characterization of a natural fracture surface from 2.8 kilometers below land surface.** *Geochim Cosmochim Acta* 2005, **69**:A835.
29. Janzon J, Ludwig B, Malatesta F: **Electron transfer kinetics of soluble fragments indicate a direct interaction between complex III and the *caa3* oxidase in *Thermus thermophilus*.** *lubmb Life* 2007, **59**:563-569.
30. Mooser D, Maneg O, Corvey C, Steiner T, Malatesta F, Karas M, et al: **A four-subunit cytochrome bc₁ complex complements the respiratory chain of *Thermus thermophilus*.** *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2005, **1708**:262-274.
31. Lloyd JR: **Microbial reduction of metals and radionuclides.** *FEMS MICROBIOL REV* 2003, **27**:411-425.
32. Fredrickson JK, Romine MF: **Genome-assisted analysis of dissimilatory metal-reducing bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology* 2005, **16**:269-274.
33. Marshall MJ, Beliaev AS, Dohnalkova AC, Kennedy DW, Shi L, Wang ZM, et al: **c-Type cytochrome-dependent formation of U(IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*.** *PLoS Biology* 2006, **4**:1324-1333.
34. Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, Silver S: **Resistance to arsenic compounds in microorganisms.** *FEMS MICROBIOL REV* 1994, **15**:355-367.
35. Silver S, Phung LT: **Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:599-608.
36. Gihring TM, Banfield JF: **Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate.** *FEMS Microbiol Lett* 2001, **204**:335-340.
37. Gihring TM, Druschel GK, McCleskey RB, Hamers RJ, Banfield JF: **Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: Field and laboratory investigations.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:3857-3862.
38. Fisher JC, Hollibaugh JT: **Selenate-dependent anaerobic arsenite oxidation by a bacterium from Mono Lake, California.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:2588-2594.
39. Handley KM, Hery M, Lloyd JR: **Redox cycling of arsenic by the hydrothermal marine bacterium *Marinobacter santoriniensis*.** *Environ Microbiol* 2009, **11**:1601-1611.
40. Handley KM, Hery M, Lloyd JR: ***Marinobacter santoriniensis* sp nov., an arsenate-respiring and arsenite-oxidizing bacterium isolated from hydrothermal sediment.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, **59**:886-892.
41. Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP: **The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance.** *FEMS MICROBIOL REV* 2003, **27**:131-143.
42. Cava F, Berenguer J: **Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*.** *Biochem Soc Trans* 2006, **34**:97-100.
43. Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N, Furukawa K: **Genetic-Transformation of the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus* and of Other *Thermus* Spp.** *J Bacteriol* 1986, **166**:338-340.
44. Friedrich A, Rumszauer J, Henne A, Averhoff B: **Piliin-like proteins in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27: Implication in competence for natural transformation and links to type IV pilus biogenesis.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:3695-3700.
45. Friedrich A, Hartsch T, Averhoff B: **Natural Transformation in Mesophilic and Thermophilic Bacteria: Identification and Characterization of Novel, Closely Related Competence Genes in *Adnetobacter* sp. Strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:3140-3148.
46. Friedrich A, Prust C, Hartsch T, Henne A, Averhoff B: **Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:745-755.
47. De Grado M, Lasa I, Berenguer J: **Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **165**:51-57.
48. Wolfgang M, Park HS, Hayes SF, van Putten JPM, Koomey M: **Suppression of an absolute defect in Type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in *pilT*, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:14973-14978.
49. Wolfgang M, Lauer P, Park HS, Brossay L, Hebert J, Koomey M: ***PilT* mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in piliated *Neisseria gonorrhoeae*.** *Mol Microbiol* 1998, **29**:321-330.
50. Graupner S, Weger N, Sohni M, Wackernagel W: **Requirement of novel competence genes *pilT* and *pilU* of *Pseudomonas stutzeri* for natural transformation and suppression of *pilT* deficiency by a hexahistidine tag on the type IV pilus protein *PilAI*.** *J Bacteriol* 2001, **183**:4694-4701.
51. Williams RAD, Smith KE, Welch SG, Micallef J: ***Thermus oshimai* sp. nov., isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species.** *INT J SYST BACTERIOL* 1996, **46**:403-408.
52. Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, et al: **Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance.** *Genetics* 2004, **168**:21-33.
53. Narumi I, Satoh K, Kikuchi M, Funayama T, Kitayama S, Yanagisawa T, et al: **Molecular analysis of the *Deinococcus radiodurans* *recA* locus and identification of a mutation site in a DNA repair-deficient mutant, *rec30*.** *Mutation Research-Dna Repair* 1999, **435**:233-243.
54. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al: **CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.** *Science* 2007, **315**:1709-1712.
55. Agari Y, Sakamoto K, Tamakoshi M, Oshima T, Kuramitsu S, Shinkai A: **Transcription Profile of *Thermus thermophilus* CRISPR Systems after Phage Infection.** *J Mol Biol* 2010, **395**:270-281.
56. Omar GI, Onstott TC, Hoek J: **The origin of deep subsurface microbial communities in the Witwatersrand Basin, South Africa as deduced from apatite fission track analyses.** *Geofluids* 2003, **3**:69-80.
57. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Res* 1998, **8**:175-185.
58. Ewing B, Green P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.** *Genome Res* 1998, **8**:186-194.
59. de la Bastide M, McCombie WR: **Assembling genomic DNA sequences with PHRAP.** *Curr Protoc Bioinformatics* 2007, Chapter 11.
60. Bonfield JK, Smith KF, Staden R: **A new DNA sequence assembly program.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:4992-4999.
61. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT: **Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements.** *Genome Res* 2004, **14**:1394-1403.
62. Karp PD, Riley M, Saier M, Paulsen IT, Collado-Vides J, Paley SM, et al: **The EcoCyc database.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:56-58.
63. Karp PD, Riley M, Paley SM, Pellegrini-Toole A: **The MetaCyc database.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:59-61.
64. Karp PD: **Pathway databases: A case study in computational symbolic theories.** *Science* 2001, **293**:2040-2044.
65. Ganesan H, Rakitianskaia AS, Davenport CF, Tummler B, Reva ON: **The SeqWord Genome Browser: an online tool for the identification and visualization of atypical regions of bacterial genomes through oligonucleotide usage.** *BMC Bioinform* 2008, **9**.
66. Bezuidt O, Lima-Mendez G, Reva ON: **SEQWord Gene Island Sniffer: a program to study the lateral genetic exchange among bacteria.** *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2009, **58**:1169-11274.
67. Langille MGI, Hsiao WWL, Brinkman FSL: **Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach.** *BMC Bioinform* 2008, **9**.
68. Langille MGI, Brinkman FSL: **IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands.** *Bioinformatics* 2009, **25**:664-665.
69. Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C, Fricke WF, et al: **Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models.** *BMC Bioinform* 2006, **7**.
70. Hsiao W, Wan I, Jones SJ, Brinkman FSL: **IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes.** *Bioinformatics* 2003, **19**:418-420.
71. Karlin S, Mrazek J: **Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to ionizing radiation damage.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5240-5245.
72. Mrazek J, Bhaya D, Grossman AR, Karlin S: **Highly expressed and alien genes of the *Synechocystis* genome.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:1590-1601.
73. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, et al: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
74. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403-410.
75. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406-425.
76. Whelan S, Goldman N: **A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach.** *Mol Biol Evol* 2001, **18**:691-699.

77. Tamura K, Peterson D, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Mol Biol Evol* .
78. de Grado M, Castán P, Berenguer J: **A High-Transformation-Efficiency Cloning Vector for *Thermus thermophilus*.** *Plasmid* 1999, **42**:241-245.
79. Alvarez L, Bricio C, Gomez MJ, Berenguer J: **Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:1352-1358.
80. Bricio C, Alvarez L, Gomez MJ, Berenguer J: **Partial and complete denitrification in *Thermus thermophilus*: Lessons from genome drafts.** *Biochem Soc Trans* 2011, **39**:249-253.

doi:10.1186/1471-2164-12-577

Cite this article as: Gounder *et al.*: Sequence of the hyperplastic genome of the naturally competent *Thermus scotoductus* SA-01. *BMC Genomics* 2011 **12**:577.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

