

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Control del metabolismo respiratorio en
Thermus thermophilus por el elemento
genético conjugativo NCE

TESIS DOCTORAL
Felipe Cava Valenciano
Madrid 2007

Memoria presentada por Felipe Cava Valenciano para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. José Berenguer Carlos en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid 2007.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La respiración bacteriana

1.1.1. Organización de las CTE

1.1.2. Componentes generales de las cadenas de transporte electrónico

1.1.2.1. Componentes respiratorios reductores de quinonas

1.1.2.2. Quinonas

1.1.2.3. Componentes respiratorios oxidadores de quinonas

- Multiplicidad de reductasas terminales de oxígeno: ¿redundancia o versatilidad?
- Reductasas alternativas al oxígeno. Flexibilidad frente a cambios ambientales

1.2. La ruta desnitrificante

1.2.1. Reductasas de la vía de desnitrificación

• Nitrito reductasas

• Nitrito reductasas

• Óxido nítrico reductasa

• Óxido nítrico reductasa

1.3. Regulación general del metabolismo facultativo

1.3.1. La regulación ambiental: respuesta a señales integradas

1.3.2. Reguladores transcripcionales de procesos respiratorios

1.3.2.1. Sensores de oxígeno y potencial redox

- Sensores basados en cisteínas
- Sensores basados en centros Fe-S
- Sensores basados en grupos hemo
- Sensores basados en cofactores de flavina
- Sensores basados en nucleótidos de piridina

1.3.2.2. Reguladores que responden a óxidos de nitrógeno

- Regulación por nitrato y nitrito
- Regulación por NO

1.4. El Género *Thermus*

1.4.1. Características del género *Thermus*

1.4.2. Enzimas respiratorias de *Thermus*

1.4.3. Metabolismo facultativo de *Thermus*: Respiración anaeróbica de nitrato

1.4.3.1. El operón *nar*

1.4.3.2. El elemento genético transferible (NCE)

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.2. Métodos microbiológicos

Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

Crecimiento de *T. thermophilus* en distintas condiciones de oxigenación

Transformación bacteriana

Ensayo de interacciones entre proteínas mediante doble híbrido

3.3. Manipulación de ácidos nucleicos

Preparación de DNA.

Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnicas de clonaje de DNA

Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

Marcaje isotópico del DNA

Paseo cromosómico e hibridación sobre réplica de placa

Southern-blot

Detección de mRNA

Ensayos de extensión del cebador

3.4. Manipulación de proteínas

Preparación de extractos para electroforesis

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Inmunodetección de proteínas (Western blot)

Cuantificación y determinación del tamaño de proteínas

Sobreexpresión y purificación de proteínas

Purificación y reconstitución de la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus*

Ensayos de sensibilidad a la tripsina

3.5. Ensayos de interacción DNA-proteínas

Ensayos de afinidad de unión entre DnrT y promotores en columna

Ensayo de protección frente a la DNasa I

Ensayo de protección frente a permanganato potásico

Ensayos de reclutamiento de la RNA polimerasa

Transcripción *in vitro* con RNA polimerasa de *T.thermophilus*

3.6. Métodos de fisiología molecular

Generación de mutantes

Mutagénesis dirigida sobre DnrT

Ensayos de complementación de mutantes

Ensayos de competición de crecimiento

Inducibilidad de promotores

3.7. Ensayos químicos y enzimáticos

Purificación y análisis de quinonas respiratorias

Ensayo de actividad nitrato reductasa

Ensayos de respiración *in vitro*

Alquilación de grupos sulfhidrilos

3.8. Técnicas microscópicas

Generación de fusiones a sGFP

Microscopía confocal

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La respiración bacteriana	1
1.1.1. Organización de las CTE	2
1.1.2. Componentes generales de las cadenas de transporte electrónico	3
1.1.2.1. Componentes respiratorios reductores de quinonas	4
1.1.2.2. Quinonas	6
1.1.2.3. Componentes respiratorios oxidadores de quinonas	6
• Multiplicidad de reductasas terminales de oxígeno: ¿redundancia o versatilidad?	10
• Reductasas alternativas al oxígeno. Flexibilidad frente a cambios ambientales	10
1.2. La ruta desnitrificante	11
1.2.1. Reductasas de la vía de desnitrificación	13
• Nitrato reductasas	13
• Nitrito reductasas	14
• Óxido nítrico reductasa	15
• Óxido nitroso reductasa	15
1.3. Regulación general del metabolismo facultativo	16
1.3.1. La regulación ambiental: respuesta a señales integradas	16
1.3.2. Reguladores transcripcionales de procesos respiratorios	16
1.3.2.1. Sensores de oxígeno y potencial redox	17
• Sensores basados en cisteínas	17
• Sensores basados en centros Fe-S	17
• Sensores basados en grupos hemo	20
• Sensores basados en cofactores de flavina	21
• Sensores basados en nucleótidos de piridina	22
1.3.2.2. Reguladores que responden a óxidos de nitrógeno	23
• Regulación por nitrato y nitrito	23
• Regulación por NO	24
1.4. El Género <i>Thermus</i>	26
1.4.1. Características del género <i>Thermus</i>	26
1.4.2. Enzimas respiratorias de <i>Thermus</i>	28
1.4.3. Metabolismo facultativo de <i>Thermus</i> : Respiración anaeróbica de nitrato	29
1.4.3.1. El operón <i>nar</i>	29
1.4.3.2. El elemento genético transferible (NCE)	30

2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Materiales	35
3.2. Métodos microbiológicos	35
Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas	35
Crecimiento de <i>T. thermophilus</i> en distintas condiciones de oxigenación	35
Transformación bacteriana	36
Ensayo de interacciones entre proteínas mediante doble híbrido	37
3.3. Manipulación de ácidos nucleicos	37
Preparación de DNA.	37
Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)	38
Técnicas de clonaje de DNA	38
Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA	39
Marcaje isotópico del DNA	39
Paseo cromosómico e hibridación sobre réplica de placa	39
Southern-blot	40
Detección de mRNA	40
Ensayos de extensión del cebador	40
3.4. Manipulación de proteínas	41
Preparación de extractos para electroforesis	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida	41
Inmunodetección de proteínas (Western blot)	42
Cuantificación y determinación del tamaño de proteínas	42
Sobreexpresión y purificación de proteínas	42
Purificación y reconstitución de la RNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i>	43
Ensayos de sensibilidad a la tripsina	43
3.5. Ensayos de interacción DNA-proteínas	44
Ensayos de afinidad de unión entre DnrT y promotores en columna	44
Ensayo de protección frente a la DNasa I	44
Ensayo de protección frente a permanganato potásico	44
Ensayos de reclutamiento de la RNA polimerasa	45
Transcripción <i>in vitro</i> con RNA polimerasa de <i>T. thermophilus</i>	45

3.6. Métodos de fisiología molecular	46
Generación de mutantes	46
Mutagénesis dirigida sobre DnrT	47
Ensayos de complementación de mutantes	47
Ensayos de competición de crecimiento	48
Inducibilidad de promotores	48
3.7. Ensayos químicos y enzimáticos	49
Purificación y análisis de quinonas respiratorias	49
Ensayo de actividad nitrato reductasa	49
Ensayos de respiración <i>in vitro</i>	49
Alquilación de grupos sulfhidrilos	50
3.8. Técnicas microscópicas	50
Generación de fusiones a sGFP	50
Microscopía confocal	52
3.9. Métodos bioinformáticos	52
Análisis de secuencias	52
Modelado molecular de DnrT	53
4. RESULTADOS	55
Capítulo 1. El elemento NCE codifica un nuevo tipo de NADH deshidrogenasa asociada a la respiración anaeróbica de nitrato.	55
Identificación y caracterización del entorno genético del operón <i>nar</i>	55
Análisis de las proteínas codificadas por el agrupamiento <i>nrc</i>	56
Los cuatro genes <i>nrc</i> forman un operón	58
El nitrato y la anoxia son señales necesarias para la transcripción de <i>nrc</i>	58
Localización de las proteínas Nrc	60
Arquitectura del complejo Nrc	62
Transferencia de electrones desde Nrc a Nar	63
Temperatura y pH óptimos de Nrc	65
Las quinonas son mediadores en la transferencia electrónica entre Nrc y Nar	65
Determinación de quinonas	66
El papel del operón <i>nrc</i> en la respiración de nitrato	66

Capítulo 2. Regulación transcripcional de la respiración de nitrato en <i>T.thermophilus</i> NAR1	68
El elemento NCE codifica dos homólogos de reguladores transcripcionales	68
Importancia del operón <i>dnr</i> en la respiración de nitrato	70
DnrS y DnrT son necesarios para el crecimiento anaeróbico de <i>T. thermophilus</i>	71
Efecto de los reguladores DnrS y DnrT sobre la actividad de los promotores de <i>nar</i> , <i>nrc</i> y <i>dnr</i>	72
DnrS pierde estabilidad en presencia de oxígeno	74
DnrT se une a <i>Pnrc</i> , <i>Pnar</i> y <i>Pnqo</i>	75
DnrT es un activador transcripcional del operón <i>nrc</i>	77
DnrT reprime el promotor <i>Pnqo</i>	79
Relevancia de la única cisteína de la secuencia de DnrT	81
Capítulo 3. Importancia del elemento NCE en el control y actividad del aparato de desnitrificación de <i>T. thermophilus</i>	82
Desnitrificación en <i>Thermus thermophilus</i>	82
Papel de Nrc en la respiración anaeróbica de nitrito	84
El operón <i>nrc</i> se induce por nitrato, nitrito y NO en las cepas desnitrificantes	86
La transcripción de <i>nqo</i> es reprimida por nitrato, nitrito y NO en cepas desnitrificantes	86
Inducción del operón <i>dnr</i> en las cepas desnitrificantes completas	87
Los factores de transcripción DnrS y DnrT son necesarios para el crecimiento anaeróbico con nitrito en las cepas desnitrificantes	88
Los reguladores DnrS y DnrT son necesarios para el crecimiento anaeróbico con NO y N ₂ O	89
Capítulo 4. Nar sustituye al complejo bc₁ durante la desnitrificación	90
El operón codificante del complejo bc es reprimido durante la desnitrificación	90
La nitrato reductasa se induce por nitrito y NO	91
Relevancia de NarC en desnitrificación	92
Nar afecta al transporte de electrones desde Nrc a Nir y Nor	94
Relevancia de los dos grupos hemo de NarC durante la desnitrificación	94
Nar y Nrc interactúan a nivel de membrana	96
La cadena respiratoria anaeróbica se localiza en zonas discretas de la membrana de <i>T. thermophilus</i>	97

5. DISCUSIÓN	101
El elemento NCE codifica una cadena completa de respiración de nitrato	101
Estructura de Nrc	101
Implicación de Nrc como donador de electrones en desnitrificación	104
Implicación de Nar en el transporte de electrones durante la desnitrificación	105
Relevancia de NarC en desnitrificación	105
Nrc-Nar forman una cadena respiratoria en anaerobiosis	106
NCE controla el metabolismo desnitrificante en <i>T. thermophilus</i>	108
La proteína DnrS	108
DnrT como activador transcripcional	109
NCE controla la ruta de desnitrificación en <i>T. thermophilus</i>	113
DnrT como represor	114
El origen de NCE	115
6. CONCLUSIONES	117
7. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO I	
ANEXO II	

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Comparación de las secuencias de Nrc	57
Tabla 2. Inhibición de la actividad NDH	66
Tabla 3. Caracterización de la capacidad de crecimiento anaeróbico y la presencia de genes implicados en distintas cepas de <i>Thermus thermophilus</i>	82
Tabla 4. Papel de Nrc-NDH como donador de electrones en desnitrificación	85
Tabla 5. Papel de NarC en la transferencia electrónica hacia las reductasas terminales de desnitrificación	92
Tabla 6. Respiración <i>in vitro</i> en cepas desnitrificantes	94
Tabla 7. Papel de los grupos hemos de <i>narC</i>	96

Figuras de Introducción.

Figura 1. Tipos de NADH deshidrogenasas (NDHs)	4
Figura 2. Cadenas respiratorias en <i>E. coli</i>	6
Figura 3. Esquema general del ciclo del nitrógeno	12
Figura 4. Aparato desnitrificante de <i>Paracoccus pantotrophus</i>	12
Figura 5. Regulación a través de centros Fe-S	18
Figura 6. Regulación a través de grupos hemo	20
Figura 7. Circuitos regulatorios de activación controlados por distintos tipo de factores transcripcionales	25
Figura 8. Esquema de la cadena de respiración aeróbica en <i>Thermus thermophilus</i>	28
Figura 9. El Elemento NCE	30

Figuras de Materiales y Métodos.

Figura 10. Plásmidos para la expresión de proteínas de fusión con sGFP	51
Figura 11. sGFP es termoestable <i>in vivo</i>	52

Figuras de Resultados.

Figura 12. Organización génica del elemento NCE	55
Figura 13. Los genes <i>nrc</i> se cotranscriben	58
Figura 14. El agrupamiento <i>nrc</i>	59
Figura 15. Inducción del operón <i>nrc</i>	60
Figura 16. Localización de NrcD en los mutantes <i>nrc::kat</i>	61
Figura 17. Interacción entre los componentes del operón <i>nrc</i>	62
Figura 18. Reducción de nitrato acoplada a la oxidación de NADH	64
Figura 19. Valoración de la actividad NDH	65
Figura 20. Los mutantes <i>nrc</i> no son competentes para crecimiento anaeróbico	67
Figura 21. El operón <i>dnr</i>	68
Figura 22. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de DnrT	69
Figura 23. Esencialidad del operón <i>dnr</i> para la expresión de los complejos respiratorios Nar y Nrc	70
Figura 24. Papel funcional de DnrS y DnrT	72
Figura 25. Valoración de la actividad transcripcional de los operones <i>nar</i> , <i>nrc</i> y <i>dnr</i> .	73
Figura 26. Sensibilidad de DnrT y DnrS a oxígeno	75
Figura 27. DnrT es un dímero	75
Figura 28. DnrT inicia la transcripción desde <i>Pnrc</i>	76
Figura 29. Activación del promotor <i>Pnrc</i> por DnrT (I)	77

Figura 30. Activación del promotor <i>Pnrc</i> por DnrT (II)	78
Figura 31. DnrT reprime el operón <i>nqo</i>	79
Figura 32. Relevancia de la única cisteína de DnrT	81
Figura 33. Desnitrificación en <i>Thermus thermophilus</i>	83
Figura 34. Papel fisiológico de Nrc-NDH en desnitrificación	84
Figura 35. Expresión de los operones <i>nrc</i> y <i>nqo</i> por óxidos de nitrógeno	86
Figura 36. Inducción del operón <i>dnr</i> por óxidos de nitrógeno	87
Figura 37. Expresión de DnrT, DnrS y NrcD en cepas desnitrificantes	87
Figura 38. Los genes del operón <i>dnr</i> son necesarios para la respiración de nitrito	88
Figura 39. Implicación de NCE en el crecimiento anaeróbico con NO y N ₂ O	89
Figura 40. El promotor <i>Pfbc</i> se reprime en desnitrificación	90
Figura 41. La nitrato reductasa se induce por óxidos de nitrógeno en <i>T. thermophilus</i> PRQ	91
Figura 42. NarC es necesario para el anclaje a membrana y activación de Nar en las cepas desnitrificantes de <i>T. thermophilus</i>	92
Figura 43. Papel fisiológico de NarC en desnitrificación	93
Figura 44. Efecto de las complementaciones de grupos hemo c independientes en mutantes PRQ16 <i>narC::kat</i>	95
Figura 45. Nrc-NDH interacciona con la nitrato reductasa para formar un supra-complejo respiratorio en membrana	97
Figura 46. Localización <i>in vivo</i> de las proteínas de fusión en <i>T. thermophilus</i> NAR1	98
 Figuras de Discusión.	
Figura 47. Modelo general del “respirasoma anaeróbico” de <i>Thermus thermophilus</i>	102
Figura 48. Modelado estructural de DnrT y su interacción con la thRNAP	110
Figura 49. Modelo general de interacción DnrT-thRNAP en complejo de promotor abierto	111
Figura 50. Esquema general de la regulación del metabolismo respiratorio en cepas desnitrificantes de <i>T. thermophilus</i>	116

ABREVIATURAS

[dl-dC]: ácido poli-(desoxinosínico-desoxicidillico)

Aa: aminoácidos

Amp^r: resistente a ampicilina

ATP: adenosina-5'- trifosfato

Ble^r: resistente a bleomicina

BSA: albúmina de suero bovino

BTDTA: bromuro de tetradecil-trimetil amonio

C: citosina

Cm^r: resistente a cloranfenicol

col.: colaboradores

D.O₅₅₀: densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm

Diuron: 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-Dimetilurea

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa1: Desoxirribonucleasa 1

dNTP: desoxirribonucleotido trifosfato

DTNB (reactivo de Ellman): 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen diamino tetra-acético

FAD: dinucleótido de adenina y flavina

GSNO: S-Nitrosoglutatión

HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-piperacín-1-etano-sulfónico

Hyg^r: resistente a higromicina

His: histidina

HQNO: 2-N-heptil-4-hidroxyquinolina-N-óxido

HTH: dominio hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*)

IPTG: isopropil b-D-tiogalactósido

Kan^r: resistente a kanamicina

kat: gen codificante de la kanamicil adenil transferasa termoestable

kDa: kilodalton

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

MGD: Cofactor molibdo bis-(molibdopterín guanina dinucleótido)

MOPS: ácido 4-morfolino propano sulfónico

mRNA: RNA mensajero

NADH: dinucleótido de adenina y nicotinamida

Nar: nitrato reductasa

Ni-NTA: matriz de níquel

Nir: nitrato reductasa

Nor: óxido nítrico reductasa

Nos: óxido nítrico reductasa

orf: marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PTIO: 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolín-1-oxil-3-óxido

RBS: secuencia Shine-Dalgarno, sitio de unión al ribosoma

RNA: ácido ribonucleico

RNAP: RNA polimerasa

RNasa: Ribonucleasa

Rotenona: 2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahidro-2-isopropenil-8,9-dimetoxicromen

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato sódico

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- [dl-dC]: ácido poli-(desoxiinosínico-desoxicitidílico)
- Aa: aminoácidos
- Amp^r: resistente a ampicilina
- ATP: adenosina-5'- trifosfato
- Ble^r: resistente a bleomicina
- BSA: albúmina de suero bovino
- BTDTA: bromuro de tetradecil-trimetil amonio
- C: citosina
- Cm^r: resistente a cloranfenicol
- col.: colaboradores
- D.O₅₅₀: densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm
- Diuron: 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-Dimetilurea
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNasa1: Desoxirribonucleasa 1
- dNTP: desoxiribonucleotido trifosfato
- DTNB (reactivo de Ellman): 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato
- DTT: ditiotreitól
- EDTA: ácido etilen diamino tetra-acético
- FAD: dinucleótido de adenina y flavina
- GSNO: S-Nitrosoglutatión
- HEPES: ácido 4-(2-hidroxietyl)-piperacín-1-etano-sulfónico
- Hyg^r: resistente a higromicina
- His: histidina
- HQNO: 2-N-helptil-4-hidroxyquinolina-N-oxido
- HTH: dominio hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*)
- IPTG: isopropil b-D-tiogalactósido
- Kan^r: resistente a kanamicina
- kat*: gen codificante de la kanamicil adenil transferasa termoestable
- kDa: kilodalton
- LB: Medio de cultivo Luria Bertani
- MGD: Cofactor molibdo bis-(molibdopterín guanina dinucleótido)
- MOPS: ácido 4-morfolino propano sulfónico
- mRNA: RNA mensajero
- NADH: dinucleótido de adenina y nicotinamida
- Nar: nitrato reductasa
- Ni-NTA: matriz de níquel
- Nir: nitrito reductasa
- Nor: óxido nítrico reductasa

Nos: óxido nitroso reductasa

orf: marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PTIO: 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-óxido

RBS: secuencia Shine-Dalgarno, sitio de unión al ribosoma

RNA: ácido ribonucleico

RNAP: RNA polimerasa

RNasa: Ribonucleasa

Rotenona: 2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahidro-2-isopropenil-8,9-dimetoxicromeno[3,4-b]furo[2,3-h]cromen-6-ona

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SNP: nitroprusiato sódico

T: timina

TB: medio rico de cultivo para *Thermus*

Tris: Tri-(hidroximetil)-aminometano

tRNA: RNA transferente

u.D.O₅₅₀: unidades de D.O₅₅₀

Xgal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

ABSTRACT

The genus *Thermus* was initially composed by strictly aerobic bacteria, but recently, the ability to grow by anaerobic respiration has been described for different isolates of the genus. NAR1 was described in 1997 as a facultative *T. thermophilus* strain, able to grow through nitrate respiration, a metabolic property that could be horizontally transferred by conjugation inside *Thermus* community. This ability was conferred by a membrane-bound nitrate reductase encoded by the *narCGHJIKT* operon inside the so-called NCE (Nitrate Conjugative Element). The analysis of additional genes and functions related to NCE are the main objectives of this Thesis.

In the first chapter of the Thesis we show that the NCE contains an operon (*nrcDEFN*) which codes for a new type of NADH dehydrogenase, named Nrc, specific for nitrate respiration. The Nrc was shown to be a membrane-bound heterotetramer expressed simultaneously with the Nitrate reductase, forming a nitrate-dedicated complete respiratory chain through specific protein interactions. Electron transfer between Nrc and Nar is mediated by menaquinone-8, and the reaction is sensitive to inhibitors such as Rotenone or Diuron.

The second chapter is dedicated to regulation. In this, it is shown that proteins DnrS and DnrT, encoded by an operon (*dnrST*) located between those of Nrc and Nar within the NCE, are positive inducers of Nrc, Nar and also of their own expression. *In vivo* and *in vitro* data demonstrate a central role for DnrT as a signal-insensitive transcriptional activator of the *Pnar*, *Pnrc* and *Pdnr* promoters, whereas DnrS is shown to be an oxygen sensitive activator for *Pdnr* and *Pnar*. We also show that DnrT represses the expression of the aerobic respiratory complex I (Nqo or NDH-I), thus acting as the switching mechanism that controls the transition from aerobic to anaerobic metabolism in this bacterium.

The third chapter describes the presence of the NCE in denitrifying strains of *T. thermophilus*, and demonstrates its role in further steps of the denitrification pathway. Actually, it is shown that DnrT and DnrS are required for the expression of the nitrite (Nir), nitric oxide (Nor) and nitrous oxide (Nos) reductases together with Nrc, which constitutes the main electron donor also for these enzymes of the denitrification pathway.

Finally, the last chapter is devoted to analyze the role of the NarC component of the Nar, in electron transference to the Nir, Nor and Nos. We found that the bc_1 complex that in other bacteria is very relevant in denitrification, is repressed in *T. thermophilus* by nitrate, nitrite and NO under anaerobic conditions and also find evidences to support that its role as electron transporter is replaced by the unusual cytochrome C (NarC) component of Nar. This view is further supported by the existence of interactions between NrcE and NarI, thus reinforcing the idea of a Nrc-Nar respiratory supracomplex expressed by NCE, whose role goes further than the nitrate respiration itself, being involved also in the whole denitrification pathway, which expression in this extreme thermophile it also under the control of the NCE through the DnrS and DnrT factors.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La respiración bacteriana El proceso respiratorio implica la transferencia electrónica desde donadores de bajo potencial redox (electrogenerativos) hasta aceptores terminales de electrones (electroreceptivos). La energía liberada durante este proceso es empleada para translocar protones a través de la membrana generando un gradiente electroquímico convertible en ATP...

1.1.1. Organización de las CTE La descripción de la dependencia estructural y las asociaciones intermoleculares entre las proteínas de las cadenas transportadoras de electrones (CTE) es un gran reto para la investigación porque existe un amplio rango de geometrías y accesibilidades de acoplamiento. El primer protocolo para la purificación de los complejos de la fosforilación oxidativa se desarrolló hace unos años y se asumía que los componentes de la CTE debían estar asociados en la membrana en orden secuencial...

1.1.2. Componentes generales de las cadenas de transporte proteínas sulfonéricas, quinonas y citocromos. Las electrones pasan a través de estos transportadores hasta la respiración anaeróbica. La eficiencia y el rendimiento final del proceso varían mediante el control del tráfico de electrones a la ubiquinona, conserva la energía translocando protones al espacio periplásmico...

1.2. La ruta desnitrificante 1925, Quastel demostró que el nitrato podía sustituir al oxígeno en una bacteria no desnitrificante como E. coli, permitiendo crecer anaeróbicamente a costa de un sustrato no fermentable como el lactato (Quastel y col., 1925). Poco tiempo después Slickland y colaboradores (Slickland, 1931) definieron a la desnitrificación como un sistema respiratorio distinto de los aeróbicos que empleaba como miembros por entonces no identificados de la familia de la nitratasa...

1.2.1. Reductasas de la vía de desnitrificación Nitrito reductasas. Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias que se nombran según su localización: la nitrito reductasa unida a membrana (Nar) y la nitrito reductasa periplásmica (Nap). Ambas catalizan la misma reacción de reducción del nitrito a nitrógeno (González y col., 2000). Nitrito reductasa unida a membrana (Nar) Esta enzima se compone de tres subunidades...

1.2.2. Reductasas de la vía de desnitrificación Nitrito reductasas. Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias que se nombran según su localización: la nitrito reductasa unida a membrana (Nar) y la nitrito reductasa periplásmica (Nap). Ambas catalizan la misma reacción de reducción del nitrito a nitrógeno (González y col., 2000). Nitrito reductasa unida a membrana (Nar) Esta enzima se compone de tres subunidades...

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La respiración bacteriana

El proceso respiratorio implica la transferencia electrónica desde donadores de bajo potencial redox (electronegativos) hasta aceptores terminales de electrones (electropositivos). La energía liberada durante este proceso es empleada para translocar protones a través de la membrana generando un gradiente electroquímico convertible en ATP, a través de fosforilación oxidativa (Babcock y Wikstrom, 1992; Hosler y col., 2006; Richardson, 2000).

Después de millones de años de evolución, existe una enorme diversidad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos que pueden actuar como donadores de electrones a las cadenas respiratorias. Los microorganismos denominados litótrofos (“comedores de piedras”) emplean compuestos inorgánicos tales como Fe(II), formas reducidas de azufre, de nitrógeno o el mismo H₂, llevando a cabo partes muy importantes de los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Brierley, 1978; Croal y col., 2004; Edwards y col., 2000; Fowler y col., 1999). Por regla general, la litotrofia suele ir acompañada de la capacidad de fijación del CO₂ (quimiolitoautotrofia), a través de alguna de las rutas existentes (Ciclo de Calvin, TCA reverso, ciclo del hidroxipropionato, acetogénesis...). En muchos casos estas actividades litotróficas van acompañadas de la solubilización de metales, por lo que muchos de estos microorganismos también suelen presentar resistencias a metales tóxicos (Hg (II), U(VI), Mn(IV), As(V) y Ag(II)) (Lloyd, 2003).

También por regla general, la mayor parte de los litótrofos son organismos aerobios al requerir la utilización de un aceptor de electrones muy electropositivo para obtener rentabilidad energética del proceso. No obstante, aquellos sustratos inorgánicos de potencial redox suficientemente electronegativo podrán ser oxidados anaeróbicamente con aceptores terminales de electrones tales como el nitrato o el Fe (III). Finalmente es importante indicar que ciertos compuestos inorgánicos pueden ser empleados tanto como donadores como de aceptores de electrones en procesos respiratorios llevados a cabo por distintos microorganismos (S⁰, nitrito...) (Nealson y col., 2002; Rawlings, 2002).

Los organismos quimioorganotróficos emplean compuestos orgánicos como donadores de electrones a las cadenas respiratorias, bien de forma directa (glicerol, succinato...) o, con más frecuencia, a través de cofactores transportadores de electrones como el NADH procedente de reacciones catabólicas de azúcares y otras fuentes de carbono reducidas.

Para los quimioorganótrofos, la respiración es sustancialmente más eficiente que la fermentación, permitiendo un crecimiento más rápido y mejores rendimientos de biomasa por mol del sustrato metabolizado, pero es un proceso considerablemente más complicado dado que se precisa de centros metálicos y cofactores estructuralmente complejos integrados en las cadenas de transporte electrónicos (CTE).

La aparición de la fotosíntesis oxigénica (hace alrededor de 2000 millones de años) y el posterior surgimiento de una atmósfera rica en oxígeno, fue esencial para el desarrollo de la

respiración aeróbica. Sin embargo, se ha propuesto que “la primera respiración” de oxígeno emergió mucho antes, hace aproximadamente 3000 millones de años a costa de las bajas concentraciones de oxígeno previas a la primera fotosíntesis oxigénica (Kasting, 1993). De hecho, resulta interesante que varios miembros tanto de Arquea (Volkl y col., 1993) como de Bacteria (Huber, 1992) puedan crecer aeróbicamente en presencia de presiones parciales muy bajas de oxígeno (0.3–0.5%). Estos valores están próximos a los propuestos para la atmósfera temprana (Towe, 1994), lo que habría permitido a LUCA (Last Universal Common Ancestor) desarrollar la capacidad respiratoria aeróbica antes de la aparición de los primeros organismos fotosintéticos (cianobacterias). Por todo esto, se ha sugerido también que la primera oxidasa debió de ser de alta afinidad por el oxígeno. Posteriormente, las citocromo oxidasas de baja afinidad (caa3) debieron evolucionar como consecuencia del aumento de las concentraciones de oxígeno en muchos ambientes, siendo actualmente las principales responsables de la respiración aeróbica (Castresana y col., 1994; Castresana y Moreira, 1999).

1.1.1. Organización de las CTE

La descripción de la dependencia estructural y las asociaciones intermoleculares entre las proteínas de las cadenas transportadoras de electrones (CTE) es un gran reto para la investigación porque existe un amplísimo rango de geometrías y accesibilidades de acoplamiento.

El primer protocolo para la purificación de los complejos de la fosforilación oxidativa se desarrolló hace unos 40 años y se asumía que los componentes de la CTE debían estar asociados en la membrana en orden secuencial rígido para su eficiente la oxidación-reducción (Hatefi, 1985). Esta visión de un **modelo sólido**, que sólo ha podido ser apoyado por algunos análisis cinéticos (Rich, 1984), fue cambiando gradualmente hacia un **modelo líquido** que presumía la existencia de complejos libres independientes que difundiesen lateralmente (Capaldi y col., 1982). A pesar de que se aislaron supercomplejos I-III (Y. Hatefi, J.S. Rieske, *Methods Enzymol.* 10 (1967); L.R. Fowler, Y. Hatefi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5 (1961); L.R. Fowler, *J. Biol. Chem.* 238 (1963); C.I. Ragan, C. Heron, *Biochem. J.* 174 (1978)), complejos II-III (Tisdale y col., 1963) y complejos III-c-IV en determinadas bacterias (Berry y Trumpower, 1985; Iwasaki y col., 1995; Sone y col., 1987) el modelo líquido se impuso. Algunas de las razones que sostenían que no era necesaria la existencia de asociación física entre complejos respiratorios para conseguir un flujo electrónico eficiente eran que las actividades de los complejos se conservaban tras la purificación, y que la asociación de los complejos no se pudo observar nunca ni por microscopía electrónica ni por experimentos de fusiones a liposomas (Capaldi y col., 1982).

Sin embargo, estudios más recientes recogen la existencia de “supercomplejos” en las cadenas respiratorias de mitocondria y bacteria (Dudkina y col., 2004; Schagger y Pfeiffer, 2000; Schagger, 2002). Análisis enzimáticos de Bruel y colaboradores (Bruel y col., 1996), sugirieron una interacción directa entre los complejos II y III. Posteriormente Boumans y colaboradores (Boumans y col., 1998) postularon mediante valoración con inhibidores en *S. cerevisiae*, una interacción física

entre los complejos II-III-IV así como una asociación fuerte con el citocromo c y las quinonas, algo que no parece ocurrir en las membranas mitocondriales bovinas. Entre las bacterias, existen ejemplos extremos de esta asociación, así en *P. denitrificans* el citocromo c_{552} se encuentra unido fuertemente a los supercomplejos, demostrándose además que la asociación de los complejos I y III estabiliza la estructura general de la CTE (Berry y Trumpower, 1985; Stroth y col., 2004).

La organización de las CTE en supercomplejos o “respirasomas” posibilita la optimización de su actividad catalítica mediante el denominado “efecto túnel” (Moser y col., 1992; Page y col., 1999; Schagger, 2002). Éste dirige a los intermediarios hacia enzimas subsiguientes, evitando la competición con otras de su entorno. Una de las ventajas principales de esta canalización del sustrato es la utilización de elementos localizados (quinonas, citocromo c...), permitiendo el flujo electrónico incluso a bajos potenciales de reducción de sustrato (Christopher C. Moser 2006).

En este sentido es de destacar también que un pequeño número de moléculas de agua organizadas en la interfase entre los cofactores que actúan como donador y aceptor de dos proteínas de la CTE, puede potenciar el flujo electrónico entre ellas. La hipótesis más aceptada actualmente defiende al agua como un potente mediador del efecto túnel en los supercomplejos respiratorios, siempre y cuando ocupe un espacio estéricamente reducido entre los cofactores redox (Lin y col., 2005; van Amsterdam y col., 2002). De este modo se mantienen elevadas fuerzas de organización que favorecen el acoplamiento entre los complejos.

1.1.2. Componentes generales de las cadenas de transporte electrónico

Las CTE bacterianas están compuestas por un número variado de constituyentes tales como flavoproteínas, proteínas sulfoférricas, quinonas y citocromos. Los electrones pasan a través de estos transportadores hasta el oxígeno durante la respiración aeróbica, o bien hasta otros aceptores alternativos cuando el oxígeno no esté disponible (respiración anaeróbica). La eficiencia y el rendimiento final del proceso varían mediante el control del tráfico de electrones a través de las ramas respiratorias en respuesta a las condiciones de crecimiento. Algunos autores han demostrado en bacterias como *E. coli* que la velocidad de crecimiento está directamente relacionada con la elección del par NADH deshidrogenasa/reductasa terminal empleado. (Archer y Elliott, 1995; Calhoun y Gennis, 1993; Neijssel y Teixeira de Mattos, 1994).

Organización génica y topológica de los componentes respiratorios

Generalmente, los genes de las enzimas respiratorias se organizan en operones (*cyoABCDE*, *narGHJI*, *napFDAGHBC*, *nrfABCDEFGF*) que muestran una cierta variabilidad en su composición entre distintos organismos (Richardson, 2000; Uden y Bongaerts, 1997). Algunos de estos operones codifican enzimas de una gran complejidad como la NADH deshidrogenasa tipo I (NDH-I), una enzima de 13-14 subunidades (codificada por el operón *nuoA-N*, de las enzimas más complejas de *E.coli*). Por otra parte, la variabilidad de grupos prostéticos en las enzimas

respiratorias es alta pudiendo contener uno o varios cofactores de Mo, Ni, FAD, FMN, centros de FeS, PQQ (quinona de pirroloquinolina), hemos b, c, d, o, etc.

Para simplificar su descripción, hemos clasificado los componentes principales de las cadenas respiratorias en tres grupos según su papel funcional: **reductores de quinonas, quinonas y oxidadores de quinonas.**

1.1.2.1. Componentes respiratorios reductores de quinonas

NADH deshidrogenadas (NDH)

Las NDH son los principales donadores de electrones de la cadena respiratoria en organismos quimioorganótrofos, transfiriendo los electrones desde el NADH a las quinonas. En la mayor parte de las bacterias se han identificado dos tipos de NADH deshidrogenasas, denominadas NDH de tipo I y NDH de tipo II (figura 1).

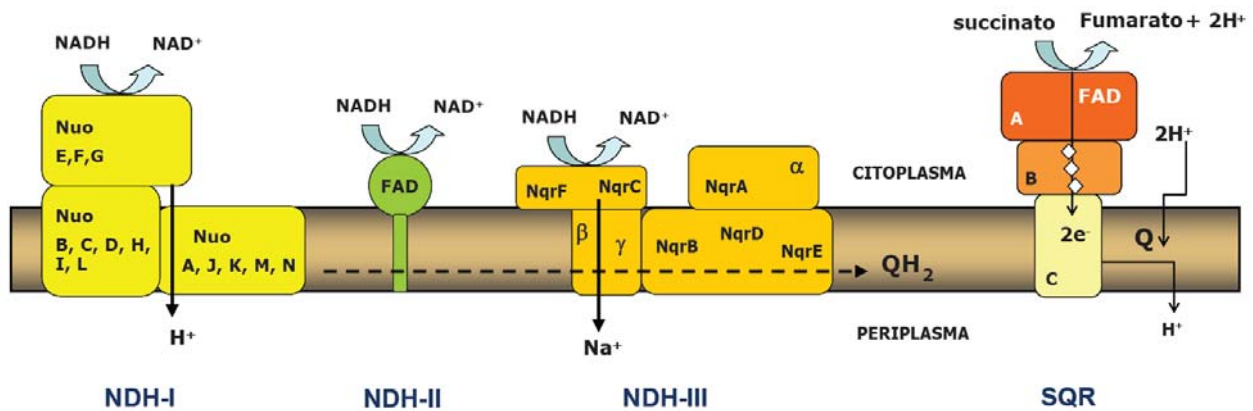


Figura 1. Tipos de NADH deshidrogenasas (NDHs). NDH tipo I o NADH ubiquinona oxidorreductasa (Nuo), gran complejo multimérico translocador de protones homólogo al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial; NDH tipo II o Ndh, deshidrogenasa responsable de la oxidación de NADH en las membranas respiratorias aeróbicas de la mayor parte de los microorganismos; NADH quinona oxidorreductasa translocante de iones sodio (Nqr), deshidrogenasa principal en bacterias marinas del género *Vibrio*; Succinato:quinona oxidorreductasa (SQR), complejo II de la cadena respiratoria aeróbica donde la subunidad B guarda homología con NrcF.

La **NDH tipo I (NDH I)** es un enorme complejo integral de membrana compuesto por 13-14 unidades (Friedrich y Scheide, 2000; Ohnishi, 1998; Yagi y col., 1998) que constituye el precursor evolutivo de la que aparece en la mitocondria de los mamíferos (Grigorieff, 1998; Walker, 1992; Weiss y Friedrich, 1991; Weiss y col., 1991), aunque ésta está compuesta por más de 40 subunidades (superior al contenido aminoacídico del ribosoma procarionótico). Cuando este complejo transfiere los electrones a la ubiquinona, conserva la energía translocando protones al espacio periplásmico y contribuyendo al gradiente electroquímico. En el caso de *E. coli* esta NDH de tipo I es el principal donador de electrones a las CTE durante el crecimiento anaeróbico con nitrato.

Por el contrario, las **NDH tipo II (NDH II ó Ndh)** son enzimas solubles compuestas por una única subunidad, que no transloca protones, y por tanto no contribuye a la conservación de la energía, durante la reducción de las quinonas (Melo y col., 2004). Este tipo de NDH son las mayoritarias durante el crecimiento aeróbico de *E. coli* con fuentes ricas en energía.

NqrA-F o Na⁺-NQR es un tercer tipo de NDH (**NDH-III**) que ha sido estudiada en diferentes bacterias del género *Vibrio* tales como *V. alginolyticus* (Tokuda y Unemoto, 1982, 1984), *V. harveyi* (Bogachev y col., 2001; Bogachev y col., 2002), y *V. cholerae* (Barquera y col., 2002; Duffy y Barquera, 2006). Sin embargo, recientemente también se han descrito homólogos en patógenos como *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, etc. (Bertsova y Bogachev, 2004; Steuber, 2001; Zhou y col., 1999).

La actividad NADH: quinona oxidoreductasa de estas enzimas heterohexaméricas es estimulada por Na⁺ y acopla la transferencia electrónica a la translocación de Na⁺, pero no de H⁺ (Fadeeva y col., 2007; Tokuda y Unemoto, 1982, 1984; Zhou y col., 1999).

El potencial transmembrana de Na⁺ juega un papel relevante en el metabolismo de muchas bacterias, como a nivel de rotación flagelar, transporte de sustratos y síntesis de ATP (Skulachev, 1989).

Succinato deshidrogenasa

La succinato deshidrogenasa (SDH), es conocida también como complejo respiratorio II por analogía con su homólogo mitocondrial. Cataliza la transferencia electrónica desde el succinato a la ubiquinona y forma parte del ciclo metabólico de los ácidos tricarbónicos. Sin embargo, la SDH no es una enzima que acople la transferencia electrónica a la translocación de protones (Ackrell, 2000; Lancaster, 2001, 2002; Lancaster y Simon, 2002; Schafer y col., 2002). Es un multímero de membrana que consta, en *E. coli* y *B. subtilis*, de 2 subunidades localizadas en el lado citosólico de la membrana encargadas de la oxidación del succinato: SdhA (une FAD covalentemente), y la sulfoferroproteína SdhB. Su anclaje depende de un citocromo b transmembrana encargado de reducir las quinonas respiratorias (figura 1). Para *E. coli* (Cecchini y col., 2002), son dos las proteínas de membrana (SdhCD) que coordinan hemo-b (b₅₅₆), mientras que en *B. subtilis* (Hederstedt, 2002; Rothery y Weiner, 1998) un solo polipéptido (SdhC) se asocia a dos hemo-b (b₅₅₈).

Otras deshidrogenasas. Existe una gran variedad de deshidrogenasas que pueden contribuir en distintas proporciones según las circunstancias a reducción de las quinonas de las CTE (Richardson, 2000; Uden y Bongaerts, 1997). Las más relevantes para *E. coli* se esquematizan en la figura 2.

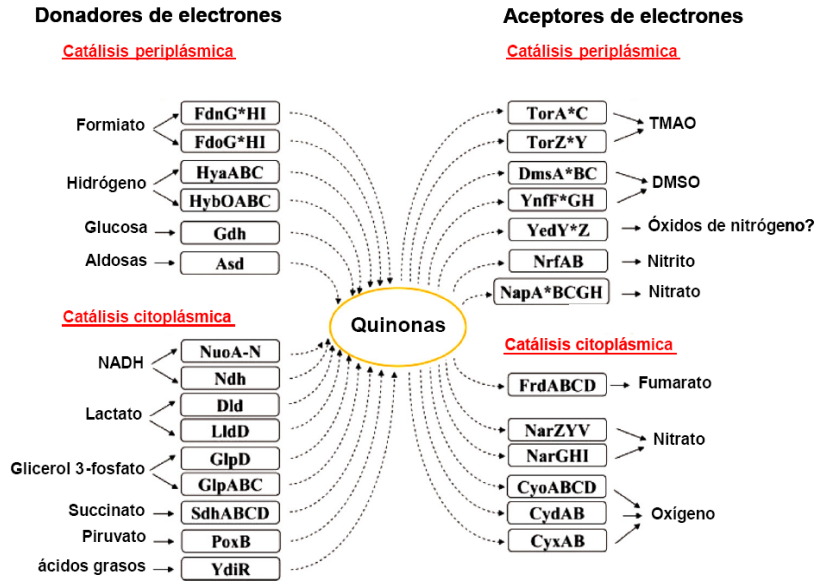


Figura 2. Cadenas respiratorias en *E. coli*. Esquema de donadores y aceptores de electrones que pueden ser usados para generar cadenas respiratorias de transporte electrónico. Igualmente se enumeran las enzimas implicadas en el metabolismo de estos compuestos mediante las siglas estandarizadas para los productos génicos (Sargent, 2007).

1.1.2.2. Quinonas

Las quinonas son derivados de la ciclohexanodiona solubles en membrana y que constituyen componentes fundamentales de las CTE donde contribuyen de manera muy eficiente a la generación de gradiente electroquímico (Mitchell, 1975a, b; Osyczka y col., 2005). Muchos microorganismos como *E.coli* sintetizan hasta 3 tipos de quinonas: la ubiquinona (UQ) y las naftoquinonas menaquinona y dimetilmenaquinona (MK y DMK) (Soballe y Poole, 1999).

El potencial redox de las quinonas, próximo a 0, les permite funcionar como donadores o como aceptores de electrones en la cadena respiratoria. Habitualmente, no existe especificidad de quinona para las deshidrogenasas, aunque existan algunas excepciones, como la transferencia electrónica restrictiva desde la SDH a la UQ o la flexibilidad de la nitrato reductasa para emplear bien UQ o MK (Meganathan, 1996; Uden y Bongaerts, 1997). Por el contrario, las oxidasas terminales siempre reciben electrones del ubiquinol, el cuál sin embargo es demasiado electropositivo para donarlos a las reductasas anaeróbicas. Es por esto por lo que las respiraciones anaeróbicas suelen emplear la mayor electronegatividad de las naftoquinonas (Uden y Bongaerts, 1997; Wissenbach y col., 1990; Wissenbach y col., 1992).

1.1.2.3. Componentes respiratorios oxidadores de quinonas

En general, los constituyentes que oxidan las quinonas respiratorias suelen ser mayoritariamente citocromos. Éstos son hemoproteínas que exhiben distintas propiedades espectroscópicas en función del tipo de grupo hemo que coordinan y de las interacciones en su

entorno proteico (Gilles-Gonzalez y col., 1994; Munro y Lindsay, 1996; Trumpower y Gennis, 1994; Vasudevan y col., 1991).

El hemo tipo-c casi siempre está ligado covalentemente mediante enlace tioester a cisteínas de la apoproteína, por el contrario los citocromos tipo-a, -b, -d y -o tienen su cofactor unido no covalentemente.

El complejo bc₁ bacteriano o también llamado ubiquinol:citocromo oxidoreductasa es análogo al complejo III de las membranas respiratorias mitocondriales. Es un transportador redox central en muchos sistemas respiratorios (y también fotosintéticos), oxidando las quinonas y reduciendo en la mayoría de los casos citocromos c (Berry y col., 2000; Trumpower, 1990; Trumpower y Gennis, 1994).

Aunque *E. coli* carece de complejo bc₁, éstos han sido descritos tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, donde están codificadas por uno o dos operones (nombrados como *fbc*, *pet*, o *qcr*). Se dispone desde hace años de datos estructurales de alta resolución de su estructura en mitocondria (Yu y col., 1998; Yu y col., 1995) así como en *T. thermophilus* (Hunsicker-Wang y col., 2003). El complejo bc₁ clásico es un heteromultímero de membrana compuesto por tres subunidades con 4 centros redox (Hunte y col., 2000; Xia y col., 1997): La proteína Rieske porta un centro [2Fe-2S] unido a cisteínas e histidinas muy conservadas. El citocromo b es una proteína integral de membrana con dos grupos hemo-b unidos no covalentemente a histidinas también conservadas y finalmente el citocromo c₁ contiene un grupo hemo-c unido covalentemente y localizado del lado periplásmico de la membrana. En otras bacterias como *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, el citocromo b está dividido en las subunidades QcrB y QcrC (Sone y col., 1996; Yu y col., 1995), siendo esta última más parecida a pequeños citocromos tales como el c₅₅₀ que a c₁. Existen incluso casos como en *Bradyrhizobium japonicum* (Thony-Meyer y col., 1989; Thony-Meyer y col., 1991) en los que las tres subunidades están fusionadas en un único polipéptido que posteriormente sufre procesamiento para dar la estructura clásica de complejo bc₁.

Por otro lado los denominados complejos bf₆ de cianobacterias (Darrouzet y col., 2004; Kurisu y col., 2003) son en realidad complejos bc₁ que difieren en dos puntos: la subunidad de membrana (citocromo b) está dividida en dos polipéptidos o subunidades (a y b) y que los citocromos f por comparación aminoacídica en realidad son más parecidos a citocromos tipo-c que a tipo-c₁.

Citocromos c

Los citocromos tipo-c son proteínas de transferencia electrónica que se localizan en el lado periplásmico de la membrana respiratoria. El grupo hemo se une covalentemente a la proteína vía enlaces tioester a cisteínas conservadas del motivo CXXCH, donde la histidina sirve como ligando axial del hierro hémico. Los citocromos c actúan generalmente como puente entre el complejo bc₁ y

las reductasas terminales, pudiendo encontrarse en forma soluble periplásmica (citocromos c clase I) o bien unidos a la membrana por una extensión hidrofóbica (Pettigrew, 1987).

Los citocromos c solubles son habitualmente pequeños polipéptidos (8-14 kDa) de los que conoce una amplia variedad procedentes de diversas bacterias y cuyas estructuras y funciones han sido revisadas ampliamente (Lund y DeMoss, 1976; Meyer, 1996; Pettigrew, 1987).

Los citocromos c unidos a membrana han sido descritos en numerosas especies. El citocromo c_y de *Rhodobacter capsulatus* (Jenney y Daldal, 1993; Jenney y col., 1996) sirve como donador de electrones tanto en el centro fotosintético de reacción o para el complejo bc_1 ; CycM de *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans* y *Rhizobium leguminosarum* transfieren electrones desde el complejo bc_1 hasta la citocromo oxidasa aa_3 (Baker y col., 1998; Bott y col., 1991; Turba y col., 1995; Wu y col., 1996). Otros como el citocromo c_{550} de *B. subtilis* y el CycG de *Rhodobacter sphaeroides* (Flory y Donohue, 1995) pertenecen a este tipo de citocromos c pero aún se desconoce su función celular.

Reductasas terminales de oxígeno (“oxidadas terminales”)

Citocromo c oxidasas

Las oxidasas terminales que aceptan electrones del citocromo c y realizan reacciones de reducción del oxígeno acopladas a la translocación de protones se denominan citocromo c oxidasas (García-Horsman y col., 1994; Saraste y col., 1991). Todas ellas pertenecen a la familia de oxidasas de hemo y cobre y se organizan generalmente en operones *ctaCBGE* (*P. denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*) o *coxBA* (*B. japonicum*). Los tipos y combinaciones de grupo hemo varían entre enzimas.

Muchas bacterias contienen un tipo de citocromo c oxidasa homologa a la caa_3 mitocondrial (Saraste, 1990). Este tipo ha sido muy bien caracterizado en *Paracoccus denitrificans*, y su estructura tridimensional ha sido resuelta recientemente (Iwata y col., 1995). Este enzima contiene 4 subunidades de las cuales 2 portan los cofactores hemo y cobre. La subunidad I (SUI) es una proteína integral de membrana que une dos hemos-a, uno de los cuales (alto spin) está asociado a un centro bimetálico de Fe-Cu_B, también conocido como centro binuclear, que es donde tiene lugar la reducción del oxígeno. La subunidad II (SUII) dispone de un dominio globular hacia el periplasma que liga un centro bimetálico con Cu_A y probablemente posibilite la unión del citocromo c. La subunidad III (SUIII) es una proteína hidrofóbica de función desconocida, pero que aporta anclaje a membrana. La cuarta subunidad (SUIV) fue descubierta al cristalizar el complejo, y se trata de una única hélice transmembrana de función desconocida que está en contacto con el resto de las subunidades.

Este tipo de citocromo c oxidasa está ampliamente distribuida entre bacterias aunque existen algunas variaciones estructurales como en el caso de *Thermus thermophilus* (Buse y col., 1989; Mather y col., 1993). Para esta bacteria termófila la subunidad SUIII está unida a SUI, y el

citocromo c donador aparece íntimamente acomplejado con el sitio aceptor de electrones Cu_A (SUII) generando, una citocromo oxidasa de tipo caa_3 .

En los rizobios (*Sinorhizobium meliloti* y *B. japonicum*) este tipo de citocromo c oxidasa está codificada por el operón *fixNOQP* o *ccoNOQP* (Saraste, 1994; Saraste y Castresana, 1994), que en lugar de las clásicas subunidades SUII y SUIII contiene citocromos tipo-c, y SUI es una citocromo tipo- bb_3 translocante de protones necesaria para satisfacer la demanda energética de la fijación del nitrógeno atmosférico asociada al ambiente microaerófilo del nódulo radicular (Kahn, 1993; Preisig y col., 1993).

Quinol oxidasas

Se trata se una ruta alternativa para los electrones a la via del complejo bc_1 . Las quinol oxidasas aceptan electrones directamente de las quinonas y reducen el oxígeno molecular. En este caso se pierde la capacidad translocadora de protones del complejo bc_1 y por tanto esta via es menos efectiva en producción energética.

Las quinol oxidasas presentan distintos tipos de citocromos y pueden ser agrupadas en oxidasas de hemo y cobre y en citocromo d oxidasas (Gennis y Ferguson-Miller, 1996; Georgiou y col., 1987). Ambos tipos de oxidasas están presentes en *E. coli* (carece de citocromo c oxidasas). La principal diferencia entre las citocromo c oxidasas y las quinol oxidasas de hemo y cobre es la ausencia del centro Cu_A en la SUII de las últimas y que al interaccionar directamente con la quinona carecen de sitio de unión a citocromo c.

Los genes que codifican la quinol oxidasa bo_3 están organizados en *E. coli* en el operón *cyoABCDE* al igual que en muchas otras bacterias (Minghetti y col., 1992). Estas oxidasas operan alta concentración de oxígeno (tipo- bo_3) y sus subunidades guardan relación con aquellas de la citocromo oxidasa aa_3 .

Otra quinol oxidasa completamente diferente ha sido observada en *E. coli* cuando esta bacteria crece en microaerobiosis: la oxidasa de alta afinidad tipo-bd (Green y col., 1988). Este complejo es un heterodímero codificado por el operon *cydAB* que también ha sido identificada en *Azotobacter vinelandii* (Kelly y col., 1990; Moshiri y col., 1991) probablemente con función protectora de la enzima nitrogenasa. Ambas subunidades son proteínas transmembrana; CydA es un citocromo b_{558} localizado probablemente en el sitio donde tiene lugar la oxidación de la quinona, mientras que CydB comparte con CydA el hemo d y otro hemo b de alto spin (b_{595}) formando un centro bimetálico para la reducción del oxígeno.

En condiciones microaerófilas, *E. coli* sintetiza una tercera quinol oxidasa del tipo-bc codificada por el operón *cyxAB* aunque su función fisiológica no está clara (Dassa y col., 1991; Sturr y col., 1996).

Multiplicidad de reductasas terminales de oxígeno: ¿redundancia o versatilidad?

Salvo excepciones, la flexibilidad de la respiración mitocondrial es bastante pobre por ser la citocromo oxidasa aa₃ la única enzima capaz de realizar la reducción del oxígeno. Sin embargo, las CTE de bacterias y arqueas son altamente adaptables a los cambios ambientales siendo poco frecuentes las rutas simples, lineales, que implican un bajo número de deshidrogenasas, quinonas y oxidasas. La existencia aparente de rutas redundantes hacia un mismo aceptor de electrones se justifica en base a diferencias sutiles en las afinidades por el oxígeno o por el aceptor de electrones alternativo, su velocidad recambio, capacidad para translocar de protones, modo de regulación y sensibilidad a inhibidores (Calhoun y col., 1993; Kitts y Ludwig, 1994; Poole y Hill, 1997; Poole y Cook, 2000).

En la mayor parte de las bacterias existen al menos dos reductasas terminales de oxígeno, una de baja afinidad y alto recambio que se emplea en condiciones de alta presión parcial de oxígeno, y otra de alta afinidad y menor recambio, que se emplea en condiciones de baja aireación (Poole y col., 1994). Así, *E.coli* se adapta a variaciones a la presión parcial de oxígeno alternando dos reductasas terminales de oxígeno: la citocromo bo' oxidasa, oxidasa principal en condiciones aeróbicas (Poole y col., 1994; Puustinen y col., 1991; Puustinen y Wikstrom, 1991), y la citocromo bd oxidasa, que predomina en microaerofilia (Poole y col., 1994). Posteriormente se describió un segundo tipo de citocromo bd oxidasa (bd-II) codificado por el operón *cyxAB* (*cbdAB*), que a pesar de inducirse en anaerobiosis o por entrada en fase estacionaria (Atlung y col., 1997; Brondsted y Atlung, 1996; Lasa y col., 1992), el mutante en las tres oxidasas (*cyo*, *cydAB* y *cyxA*) es más sensible a oxígeno que el mutante doble *cyxA*⁺.

En *Pseudomonas aeruginosa* las quinonas pueden ser oxidadas por una quinol oxidasa tipo-bo₃ (*cyo* en *E. coli*), por la quinol oxidasa insensible a cianuro (CIO) (equivalente a *cyd* en *E. coli*) o por el complejo bc₁ que a su vez transfiere electrones al citocromo c. Este citocromo c puede ser oxidado posteriormente o bien por la citocromo oxidasa aa₃ o bien por otros 2 tipos de oxidasas cbb₃ relacionadas (cbb₃-1 y cbb₃-2) (Comolli y Donohue, 2002, 2004; Cooper y col., 2003). Por tanto, este organismo dispone de hasta 5 oxidasas terminales para la reducción de oxígeno en función de las circunstancias ambientales.

En patógenos intracelulares se ha sugerido (Bermudez y Petrofsky, 1997; Cole y col., 1998; Ishaque, 1992) también que la citocromo bd oxidasa es necesaria para la virulencia intracelular bacteriana, posiblemente por efectos indirectos relacionados con la adaptabilidad de éstas bacterias a los ambientes microaerófilos del interior celular (Way y col., 1999).

Reductasas alternativas al oxígeno. Flexibilidad frente a cambios ambientales

La habilidad de los procariontes para colonizar multitud de nichos ecológicos se debe en gran medida a su flexibilidad metabólica, no solo a nivel de fuentes de carbono y nitrógeno, sino también, a nivel de aceptores de electrones durante los procesos respiratorios. Tal como se esquematiza en la figura 2 para *E. coli*, existe una amplia diversidad de sistemas de

oxidorreducción que emplean aceptores finales de electrones alternativos al oxígeno molecular (Richardson, 2000; Sargent, 2007). Estas reductasas son la base de las respiraciones anaeróbicas, habiéndose descrito respiraciones anaeróbicas en distintos miembros de Archaea y Bacteria de azufre, hierro, arsénico, selenio y otros metales, sulfóxidos y sulfonatos, compuestos de nitrógeno, compuestos orgánicos, derivados halogenados, hidrógeno, etc. (Richardson, 2000).

Por su interés en este trabajo, desde este punto nos centraremos en el proceso anaeróbico de la desnitrificación.

1.2. La ruta desnitrificante

La reducción de nitrato fue descubierta pronto en la historia de la Microbiología, a la que siguió la desnitrificación con el cambio de siglo. Entorno a 1925, Quastel demostró que el nitrato podía sustituir al oxígeno en una bacteria no desnitrificante como *E. coli*, permitiéndole crecer anaeróbicamente a costa de un sustrato no fermentable como el lactato (Quastel y col., 1925).

Poco tiempo después Stickland y colaboradores (Stickland, 1931), definieron a la nitrato reductasa como un enzima respiratorio distinto de los aeróbicos que interaccionaba con otros miembros por entonces no identificados de la cadena de transporte electrónico. Después de la segunda guerra mundial, Pollock incluía el término "nitrataasa" en sus estudios sobre adaptación enzimática (Pollock, 1946) y se demostró la capacidad represora del oxígeno en la formación y actividad de la nitrato reductasa (Pichinoty, 1961).

Continuó el tiempo de los primeros estudios propiamente bioquímicos en los que Egami, Sato, y colaboradores fueron pioneros (Sato, 1956). Observaron que el citocromo b era un componente de la enzima y que diversos compuestos tales como el formato, NADH, lactato, y glicerol 3 fosfato actuaban como donadores de electrones para la reducción del nitrato en *E. coli*. Igualmente, realizaron la primera purificación del complejo enzimático, determinaron su naturaleza particulada, y describieron la existencia de los centros Fe-S. Estos estudios fueron potenciados hasta la actualidad con el desarrollo y aplicación de las herramientas genéticas.

Comenzaron entonces a tomar importancia de forma paralela los estudios de desnitrificación a partir de trabajos de Kluyver y Verhoeven (Kluyver, 1959; Verhoeven, 1956a; Verhoeven, 1956b) que definieron este proceso como "la verdadera reducción desasimilativa del nitrato", lo cual fue tema de controversia para el grupo de Egami a cerca de la respiración entérica de nitrato (Takahashi, 1957; Taniguchi, 1956). Para obtener más información se puede consultar la revisión (Stewart, 1988).

Hoy en día se conoce la desnitrificación como un conjunto de respiraciones anaerobias que constituye una de las ramas principales del ciclo del nitrógeno (figura 3), reduciendo el nitrato para dar lugar a nitrógeno gaseoso (Zumft, 1997). Durante este proceso se genera un gradiente de protones que es utilizado para la obtención de energía por el microorganismo (Berks y col., 1995a) y es llevado a cabo en cuatro pasos esquematizados en la figura 3, catalizados por distintas óxido-

reductasas: nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). Estas enzimas están muy extendidas entre los distintos grupos filogenéticos de Bacteria y Archaea, por lo que su estudio puede ser importante también a nivel evolutivo (Richardson, 2000). Para una información detallada se pueden consultar las amplias revisiones de Berks, Zumft y Baker (Baker y col., 1998; Berks y col., 1995a; Zumft, 1997).

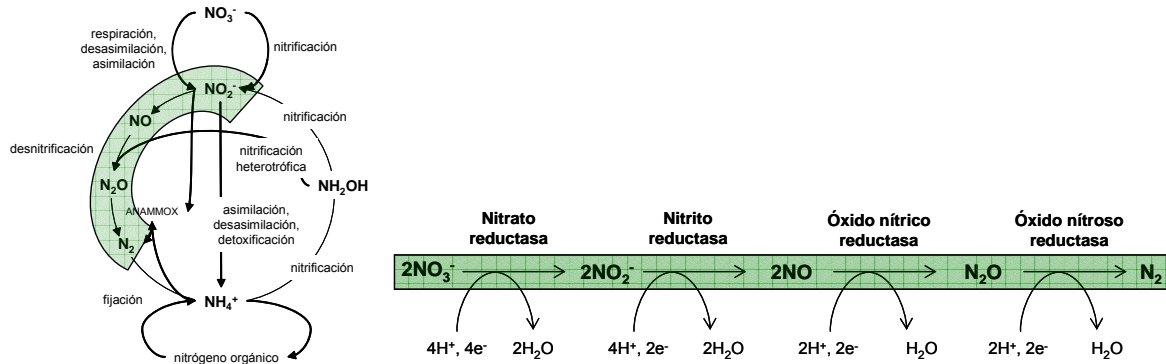


Figura 3. Esquema general del ciclo del nitrógeno. Ruta de desnitrificación mostrando detalle de las reductasas implicadas en cada etapa (Berks y col., 1995a).

La figura 4 aporta un esquema aproximado de todos los sistemas de transporte de electrones que intervienen en la desnitrificación, en el microorganismo modelo *Paracoccus pantotrophus* (Baker y col., 1998).

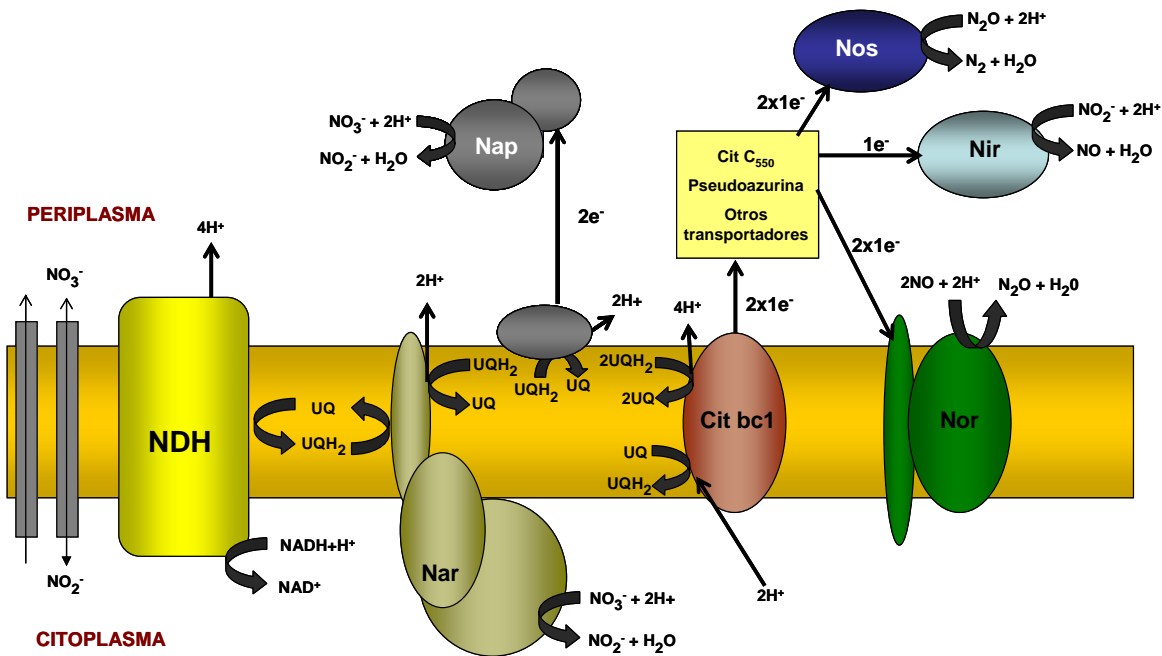


Figura 4. Aparato desnitrificante de *Paracoccus pantotrophus*. Organización topológica y rutas de transferencia electrónica desde el NADH hasta dinitrógeno (Berks y col., 1995a).

1.2.1. Reductasas de la vía de desnitrificación

Nitrato reductasas.

Existen dos tipos de nitrato reductasas respiratorias que se nombran según su localización: la nitrato reductasa unida a membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap). Ambas catalizan la misma reacción de reducción del nitrato a nitrito (Gonzalez y col., 2006).

Nitrato reductasa unida a membrana (Nar)

Ésta enzima se compone de tres subunidades:

- La subunidad α o NarG, (Blasco y col., 1989) que contiene el cofactor molibdo bis-(molibdopterin guanina dinucleótido) o Mo-bisMGD (Rajagopalan y Johnson, 1992) es la responsable de la reducción de nitrato. Además del Mo-bisMGD, contiene un centro ferrosulfurado [4Fe-4S] no detectable por EPR (“Electron Paramagnetic Resonante”) (Bertero y col., 2003; Magalon y col., 1998a).

- La subunidad β o NarH, contiene un grupo [3Fe-4S] y tres grupos [4Fe-4S], ordenados en la estructura de acuerdo con su potencial redox de tal forma que permiten la transferencia de electrones a través de la proteína (Augier y col., 1993a; Augier y col., 1993b).

- La subunidad γ o NarI, es un citocromo con dos grupos hemo b. Posee una estructura de 5 hélices transmembrana que coordinan un hemo b cercano a la zona periplásmica y otro cercano a la citoplásmica (Berks y col., 1995b; Magalon y col., 1997), permitiendo el transporte de electrones desde el sitio de oxidación de los quinoles en la parte periplásmica a la parte citoplásmica (Magalon y col., 1998b). NarI constituye la parte unida a membrana, y además de oxidar las quinonas y transportar los electrones, ancla a NarH y NarG que se encuentran en el lado citoplasmático de dicha membrana. Gracias a esta arquitectura, durante la oxidación del quinol se produce la liberación de dos protones al espacio periplásmico y el transporte de electrones hacia NarH, hasta llegar a NarG donde se produce la reducción del nitrato a nitrito con el consiguiente consumo de protones en el citoplasma (Rothery y col., 2001).

Muchas enterobacterias pueden expresar dos nitrato reductasas de membrana, denominadas nitrato reductasa A (NRA) (operón *narGHJI*) y nitrato reductasa Z (NRZ) (operón *narZYWV*) en el caso de *E. coli*. NRA es la principal responsable del crecimiento anaerobio con nitrato, mientras que NRZ, aparentemente surgida por duplicación de la primera (Blasco y col., 1990; Bonnefoy y Demoss, 1994), se induce al final de la fase estacionaria o bajo condiciones de estrés (Chang y col., 1999). De hecho, en *Salmonella* la enzima equivalente a NRZ se induce durante la infección intracelular (Spector y col., 1999). Se han hecho estudios de intercambio de subunidades entre NRA y NRZ, observándose que es posible formar enzimas heterólogas funcionales (Blasco y col., 1992).

Actualmente se ha resuelto la estructura de la nitrato reductasa A de *E. coli* con una resolución de 1.9 Å. En ella se ha podido determinar que la zona más importante de interacción de NarG con las otras dos subunidades se sitúa en su N-terminal, que se une por puentes de hidrógeno al C-terminal de NarI y ambas, a NarH. También resulta notorio el alineamiento de los centros redox de la enzima, capaces de conducir los electrones desde el grupo hemo b de Nar I en la cara externa de la membrana citoplásmica al cofactor de molibdeno de NarG. Las tres subunidades de la nitrato reductasa se encuentran codificadas en un operón que responde a nitrato y anoxia. Además de estos tres genes, el operón contiene un cuarto gen que codifica una proteína (NarJ o subunidad δ), que no aparece en el complejo final, pero que funciona como una chaperona específica necesaria para la inserción del cofactor Mo-bisMGD así como del centro sulfoférrico (FSO) (Lanciano y col., 2007; Vergnes, 2006) en NarG y, por tanto, para la maduración de la enzima, aunque no se encuentra físicamente asociada a ella (Blasco y col., 1998; Dubourdieu y DeMoss, 1992; Liu y DeMoss, 1997; Palmer y col., 1996).

Nitrato reductasa periplásmica (Nap)

Se ha descrito este tipo de nitrato reductasa periplásmica en gran diversidad de Proteobacterias. En *E. coli* contiene dos subunidades, NapA que es la molibdo proteína, y NapB, un citocromo c di-hemo que dirige los electrones hacia el centro activo en NapA. Estas proteínas están codificadas en un agrupamiento que contiene genes codificantes de otro citocromo tipo c tetra-hemo periplásmico anclado a membrana (NapC), que actuaría de puente entre las quinonas de membrana y el centro activo (Cartron y col., 2002), y de una chaperona que promueve la maduración de NapA (NapD).

La función de las Nap es variable entre microorganismos (Castillo y col., 1996; Sears y col., 2000). Nap no contribuye al gradiente de protones, y es considerada en *E. coli* como una reductasa de adaptación a ambientes pobres en nitrato y de mantenimiento del balance redox periplásmico (Brondijk y col., 2004), más que una reductasa terminal (Potter y col., 2000). No obstante, en *Pseudomonas sp. G-179* y *B. japonicum* se ha descrito que Nap actúa como primer paso en la desnitrificación (Bedzyk y col., 1999; Robles y col., 2006).

Nitrito reductasas

Estas enzimas catalizan el paso de nitrito a óxido nítrico, existiendo dos tipos de nitrito reductasas en microorganismos desnitrificantes (aunque nunca coexisten las dos en un mismo microorganismo).

- **La nitrito reductasa cd.** La proteína se denomina NirS en *Pseudomonas* y es un homodímero periplásmico, en el que cada monómero posee un hemo c y un hemo d. El agrupamiento que codifica esta proteína posee también genes que codifican proteínas de

transporte electrónico y de biosíntesis del hemo d. Estudios estructurales han determinado que el hemo c actúa transfiriendo los electrones al d que es el sitio catalítico (Fulop y col., 1993; Silvestrini y col., 1989).

- **La nitrito reductasa asociada a cobre** (CuNIR) cataliza la misma reacción que la anterior y está también localizada en el periplasma y asociada a conservación de energía. Es un homotrímero en el que cada monómero posee dos centros cúpricos: uno asociado al transporte de electrones y otro situado en el centro activo (Ye y col., 1993).

En Enterobacterias (microorganismos no desnitrificantes), se encuentra un tercer tipo de nitrito reductasa respiratoria periplásmica asociada a citocromo c (NrfA en *E. coli*) que cataliza principalmente el paso de nitrito a amonio, pero que también es capaz de catalizar el paso de hidroxilamina a amonio y de óxido nítrico a óxido nitroso. Para más información sobre estas enzimas se puede consultar la revisión (Brittain y col., 1992).

Óxido nítrico reductasa (Nor)

El óxido nítrico (NO) es un potente inhibidor de muchas funciones celulares, entre las que se incluyen las respiraciones catalizadas por citocromo y quinol oxidasas. No obstante, los microorganismos desnitrificantes poseen una NO reductasa muy eficiente que cataliza su paso a óxido nitroso evitando su acumulación por encima de unos 2 nM. De hecho, en *P. aeruginosa* la reducción de nitrito a NO parece que no está acoplada a la translocación de protones (Berks y cols., 1995a; Zumft, 1997 y 2005).

La Nor de *Pseudomonas* está formada por una subunidad de 17 kDa que contiene un hemo c (NorC), y otra de 53 kDa con un grupo hemo b (NorB) organizadas en el operón *norCB*. Parece que la estructura de Nor sería similar a la de la familia de oxidasas de hemo-cobre, en especial al citocromo *cbb₃*, pero en la que el hierro se situaría en el lugar del cobre. Según predicciones de secuencia, la óxido nítrico reductasa es una enzima de membrana con ambos grupos hemo orientados hacia el periplasma (Berks y col., 1995a; Zumft, 1997, 2005).

Óxido nitroso reductasa (Nos)

En todos los casos investigados, la Nos es un homodímero periplásmico soluble con cuatro átomos de Cu^{2+} por subunidad. Se ha visto que existe una similitud significativa entre Nos y las citocromo c oxidasas, posiblemente debido a semejanzas en la disposición de los átomos de cobre, que son los cofactores que permiten la catálisis de la reacción (Berks y col., 1995a; Zumft, 1997). La Nos de *P. stutzeri* se encuentra codificada por el gen *nosZ*, cercano físicamente al operón *nosDFY* que codifica proteínas involucradas en la unión y transporte del cobre catalítico al periplasma, y de *nosR*, un activador de la expresión *nosZ*. En otra zona del genoma se encontró el

gen *nosA* que parece codificar una proteína de membrana externa que establece un poro con selectividad para el cobre, pero actualmente no se sabe con certeza si éste gen está relacionado funcionalmente con los anteriores (Berks y col., 1995a; Zumft, 1997).

1.3. Regulación general del metabolismo facultativo

1.3.1. La regulación ambiental: respuesta a señales integradas

En las bacterias facultativas, los aceptores electrónicos son generalmente usados en un orden jerárquico para obtener un crecimiento óptimo. Así, el oxígeno reprime en *E. coli* todas las respiraciones anaeróbicas y las fermentaciones, mientras que el nitrato es el aceptor preferido para las respiraciones anaeróbicas y, a su vez, reprime otras rutas respiratorias alternativas (Korner y col., 2003; Uden y Bongaerts, 1997). Esta jerarquía se establece mediante la regulación transcripcional de la reductasas terminales correspondientes. Por regla general, el uso preferente de los aceptores electrónicos más electropositivos se relaciona con mayores rendimientos energéticos en el proceso respiratorio, aunque existen excepciones como *Wolinella succinogenes* que siendo capaz de crecer anaeróticamente con nitrato, nitrito, fumarato, DMSO y polisulfuro, emplea este último como aceptor de electrones preferente, pese a ser el más electronegativo y el que menos ATP rinde (Krafft y col., 1992; Uden y Bongaerts, 1997).

Por el contrario, la expresión de las deshidrogenasas primarias no se ajusta siempre al patrón de mayor energía de conservación, a pesar de ser generalmente reguladas también por la presencia del aceptor de electrones (Richardson, 2000; Spiro y Guest, 1990). Así, en *E. coli* la expresión de Nuo, la NDH I traslocadora de protones es reprimida en aerobiosis y estimulada por nitrato o fumarato, mientras que Ndh, la NDH II no traslocadora de protones, es fundamentalmente expresada en condiciones aeróbicas y reprimida en anaerobiosis (Green y Guest, 1994; Gunsalus, 1992; Iuchi y Lin, 1993; Spiro y col., 1989). Este hecho indica que el uso de deshidrogenasas primarias no está vinculado a una mayor relación de H^+/e^- o a una mayor conservación de la energía, sino que otras necesidades tales como altos flujos metabólicos, elevadas velocidades de crecimiento, o la rapidez en la regeneración de NAD^+ podrían ser más importantes que la eficiencia energética en el metabolismo aeróbico. El sistema es muy complejo, y no completamente comprendido aún ni tan siquiera en los microorganismos “modelo”, debido a que la regulación también afecta a genes codificantes de transportadores de electrones, chaperonas, sistemas de síntesis y procesamiento de cofactores, etc. (Zumft, 1997).

1.3.2. Reguladores transcripcionales de procesos respiratorios

Por regla general, los procesos respiratorios se regulan mediante el ajuste de la respuesta transcripcional a reguladores que responden al oxígeno o al potencial de reducción, con otros que

responden a la presencia de potenciales aceptores de electrones alternativos. A continuación se describen los más relevantes en relación con esta tesis.

1.3.2.1. Sensores de oxígeno y potencial redox

Sensores basados en cisteínas

La cisteína puede detectar cambios redox mediante el grupo tiol (-SH) de su cadena lateral. Este grupo tiene múltiples estados reversibles de oxidación, tales como disulfuro (R-S-S-R'), ácido sulfónico (R-SOH), y S-nitrosotiol (R-SNO). Sin embargo, no todas las cisteínas son igual de reactivas, pues el entorno aminoacídico determina sustancialmente su reactividad al afectar el estado de ionización del tiol y su accesibilidad. Además de esta importancia como detectores directos del ambiente redox celular, los residuos de cisteínas son empleados como ligandos para coordinar centros sulfoférricos que forman parte de muchos sensores redox bacterianos importantes (Green y Paget, 2004). A continuación se describen algunos de los ejemplos de proteínas sensoras más relevantes:

ArcB —sensor del estado redox de las quinonas. ArcA-ArcB (“*Aerobic Respiratory Control*”) es un sistema de dos componentes que regula gran parte de metabolismo aerobio en *E.coli*. ArcA es el factor de respuesta activo en transcripción regulado por ArcB, una histidin-quinasa asociada a membrana (Drapal y Sawers, 1995; Iuchi y col., 1990; Iuchi y Weiner, 1996; Sawers, 1999). ArcB no detecta los niveles de oxígeno directamente, sino que son las quinonas de membrana en estado reducido las que activan el sistema Arc a través de la formación de puentes tioesteres intermoleculares (Georgellis y col., 2001). Por tanto, el sistema Arc responde realmente al equilibrio entre quinonas reducidas y oxidadas, siendo por ello activado habitualmente a presiones intermedias de oxígeno, mientras que FNR (ver más abajo) necesita mucha menor presión de oxígeno para su activación (Cotter y col., 1997; Tseng y col., 1996). Cuando ArcB se activa fosforila a ArcA que, de esta manera, se une a regiones promotoras en una secuencia rica en A + T, (T/A)GTTAATTA(T/A) (Lynch y Lin, 1996), regulando la transcripción de las mismas.

Flp de *Lactobacillus casei* es otro caso interesante. Fue el primer miembro de la familia CRP de reguladores (Irvine y Guest, 1993) identificado como homólogo de FNR, pero carente de dos de las 4 cisteínas esenciales para coordinar [4Fe-4S]. Actúa como sensor redox a través de la formación reversible de un puente disulfuro intramolecular (Gostick y col., 1998).

Sensores basados en centros Fe-S

Las proteínas con centros Fe-S han sido ampliamente estudiadas como componentes fundamentales en las reacciones de transferencia de electrones, pero hoy también parece claro que existen representantes de estas clases de proteínas que presentan papeles importantes como

reguladores transcripcionales y post-transcripcionales en respuesta a cambios redox. Los ejemplos mejor estudiados son las proteínas FNR y los sensores de estrés oxidativo SoxR y aconitasa de *E. coli* (figura 5).

Fnr — un sensor ambiental de oxígeno. En *E. coli*, FNR es un regulador transcripcional de la familia de CRP (Korner y col., 2003) capaz de regular unos 297 genes contenidos en aproximadamente 184 operones (Kang y col., 2005; Salmon y col., 2003) entre los que se encuentran la mayoría de los genes regulados por O₂ y nitrato. FNR, actúa de sensor-regulador de anoxia, activándose cuando los potenciales redox de la célula (< 400 mV) indican la necesidad de expresar enzimas del metabolismo anaerobio (Uden y col., 1990; Uden y Schirawski, 1997). Contiene cuatro cisteínas (3 de ellas esenciales) ausentes en CRP (Spiro, 1994; Trageser y Uden, 1989), implicadas en la formación de un centro [4Fe4S] en condiciones de anoxia, permitiendo su dimerización. El dímero de FNR ([4Fe4S]) es la forma activa capaz de unirse a repeticiones invertidas TTGAT-(N)₄-ATCAA, muy similares a las secuencias de unión de CRP (TGTGA-N₆-TCACA). Éstas secuencias consenso de unión se encuentran próximas a los promotores que regula, facilitando habitualmente la unión de la RNA polimerasa, aunque existen casos en los que la unión de la proteína FNR resulta en una represión de la expresión del gen (Bell y col., 1990; Eiglmeier y col., 1989; Jayaraman y col., 1988; Spiro y Guest, 1987, 1990; Walker y DeMoss, 1991). Por lo general, la zona de unión para la regulación positiva suele estar en la posición -41.5 con respecto al origen de la transcripción, mientras que ocupa zonas anteriores para regulación negativa (-50.5 como es el caso de la *ndh*). En algunos casos, las uniones de moléculas adicionales a otro sitios atípicos guardan relación con el sutil afinado de matices en la expresión génica de genes particulares (*ndh*: -94.5, *fdn*: -97.5).

En presencia de O₂, la inactivación de FNR se produce en dos pasos: una primera oxidación que genera un centro [2Fe2S] y la posterior destrucción de éste (apoproteína) si se prolonga la presencia de O₂ (Green y Paget, 2004; Uden y Schirawski, 1997), siendo ambos pasos reversibles (figura 5B).

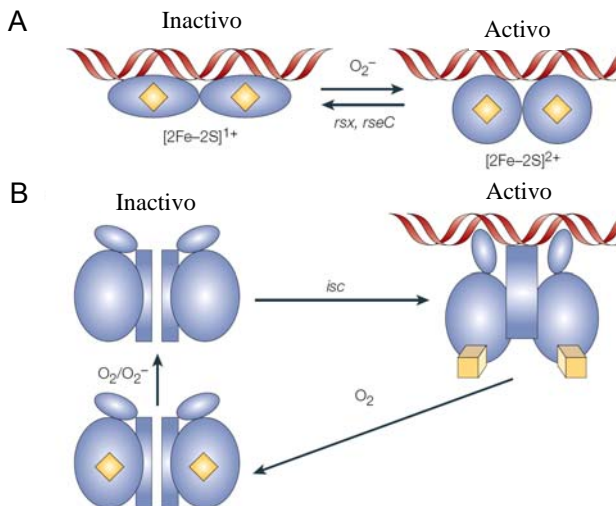


Figura 5. Regulación a través de centros Fe-S. A) SoxRS. SoxR se mantiene unido al promotor de *soxS* en condiciones aeróbicas y la transcripción es activada cuando los centros Fe-S son expuestos a condiciones oxidantes. **B)** Fnr. Durante aerobiosis Fnr es una apoproteína monomérica incapaz de unirse a promotores diana. Las proteínas de ensamblaje de centros Fe-S promueven la formación del dímero activo. La exposición prolongada a oxígeno regenera la apo-Fnr (Green y Paget, 2004).

La incorporación del centro sulfoférrico en las proteínas forma parte de un proceso complejo que precisa de la síntesis coordinada de fuentes de Fe y S, esqueletos proteicos para el ensamblaje y chaperonas moleculares. Un contribuyente importante para este fin es la ruta regulada por **IscR** (Schwartz y col., 2000; Schwartz y col., 2001). En *E. coli*, la proteína IscR tiene un centro [2Fe–2S] y retro-regula la resíntesis y/o reparación de los centros sulfoférricos dañados. Algunos ejemplos de homólogos al FNR de *E. coli* son, FnrA de *P. stutzeri* (Cuypers y Zumft, 1993), ANR de *P. aeruginosa* y FnrP en *Paracoccus denitrificans* (Otten y col., 2001; Van Spanning y col., 1997). Existe una variante de FNR en *Bacillus subtilis* (Cruz Ramos y col., 1995) y *Bacillus licheniformis* cuyo centro [4Fe–4S] está coordinado por cisteínas localizadas en el dominio C-terminal del regulador está descrito (Klinger y col., 1998). Además en *Bacillus subtilis*, la expresión del homólogo de FNR no es constitutiva como en *E. coli* sino que es inducida a través del sistema de dos componentes ResD-ResE (Geng y col., 2007a; Geng y col., 2007b).

SoxR. Otro regulador que basa su mecanismo de regulación en su centro Fe-S es el sensor de estrés por óxido nítrico e ión superóxido, **SoxR**. El sistema SoxRS de *E. coli* estimula la producción de ~45 proteínas en respuesta a la exposición a superóxidos (Nunoshiba y col., 1993; Nunoshiba y col., 1995; Pomposiello y Demple, 2001).

La proteína SoxR en *E. coli* es un homodímero que contiene un centro [2Fe–2S] por subunidad (Hidalgo y Demple, 1994; Koo y col., 2003; Wu y col., 1995). Durante crecimiento aeróbico, se encuentra en forma reducida ([2Fe–2S]⁺) y se une al promotor de *soxS* (su única diana conocida), pero no es capaz de iniciar su activación transcripcional hasta que los cultivos de *E. coli* generan superóxido y los centros Fe-S son oxidados a un estado [2Fe–2S]²⁺ (figura 5A). La activación mediada por óxido nítrico ocurre a través de la nitrosilación directa de los centros Fe-S, modificación normalmente inactivante de proteínas ferrosulfuradas (Ding y Demple, 2000).

Aconitasas. Las aconitasas son proteínas sulfoférricas que catalizan la interconversión de citrato e isocitrato en los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato. Por ello, tienen un papel importante en el metabolismo central de muchos organismos.

En condiciones de abundancia de hierro, las aconitasas presentan centros [4Fe–4S] y funcionan como catalizadores, pero durante privación de hierro o exposición celular a estrés oxidativo, los centros Fe-S se desensamblan y se pierde la actividad catalítica. Como resultado se forman estructuras apoproteicas que se unen a mRNAs específicos incrementando la estabilidad del transcrito o inhibiendo la traducción (Beinert y Kiley, 1996; Tang y col., 2002; Tang y col., 2004).

E. coli posee dos aconitasas (AcnA y AcnB) con papeles fisiológicos distintos (Bradbury y col., 1996; Cunningham y col., 1997; Williams y col., 2002) cuya inactivación provoca sensibilidad a peróxido de hidrógeno y a metil viológeno (generador de superóxido) indicando que la aconitasa

regula la expresión de un variado conjunto de genes entre los que se encuentra la superóxido dismutasa de manganeso (*sodA*).

Sensores basados en grupos hemo

El uso de sensores basados en grupos hemo que detectan gases como el oxígeno, óxido nítrico y monóxido de carbono es un mecanismo molecular ampliamente extendido en la naturaleza. Los grupos hemo se unen generalmente a dominios PAS (*Period circadian protein*, *Ah receptor nuclear translocator protein*, *Single-minded protein*) aunque pueden también enmarcarse en otros tipos de plegamiento proteico (HemAT...) (Taylor y Zhulin, 1999; Zhulin y col., 1997). Habitualmente, el estado del grupo hemo está acoplado a un dominio transmisor, el cual traduce la señal (*input*) en un efecto oportuno (*output*). Los ejemplos mejor conocidos en bacterias son FixL de *Rhizobium meliloti*, Dos de *E. coli* y HemAT de *B. subtilis* (figura 6).

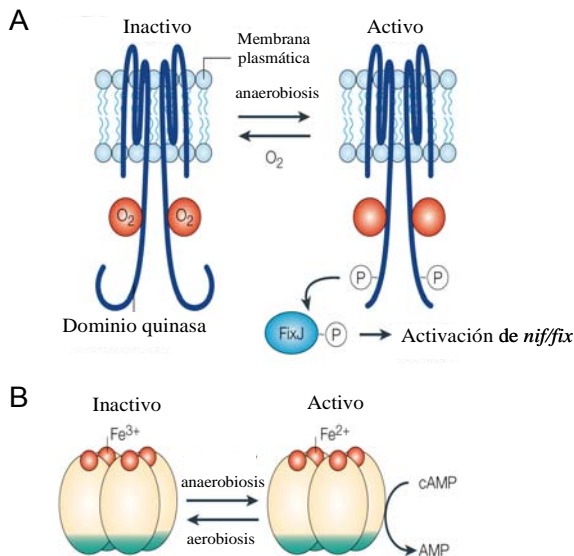


Figura 6. Regulación a través de grupos hemo. A) FixL. La proteína FixL de membrana detecta el oxígeno a través de sus grupos hemo, inactivando su dominio quinasa. En anaerobiosis la actividad quinasa inicia la activación del proceso de fijación del nitrógeno a través de FixJ fosforilada. **B)** La proteína Dos detecta también el oxígeno a través del hierro hémico apagando la actividad fosfodiesterasa de su dominio C-terminal (Green y Paget, 2004).

FixL — un regulador de la fijación de nitrógeno. La capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico permite a las bacterias diazotróficas colonizar ambientes en los que el nitrógeno es limitante a costa de un gasto energético elevado (Fischer, 1994). Dado que la enzima nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, la expresión de los genes de fijación está finamente controlada para asegurar su activación sólo cuando las condiciones lo exijan. Un componente del mecanismo regulatorio de detección de O₂ de *Sinorhizobium meliloti* es el sistema de dos componentes FixLJ (figura 6A). El sensor FixL tiene un dominio N-terminal de anclaje a membrana, un dominio sensor central tipo PAS que coordina un grupo hemo y un dominio C-terminal transmisor de la señal. Bajo condiciones en las que el oxígeno es limitante, se desencadena una cascada de fosforilación que enciende el sistema de fijación de nitrógeno compuesto por *nif* y *fix* (a través de NifA y FixK). Cuando por el contrario, el oxígeno se une al grupo hemo de FixL, la

autofosforilación es bloqueada y FixJ se desfosforila, asegurando que la nitrogenasa no sea producida cuando el oxígeno está presente (Gilles-Gonzalez y col., 1995; Gong y col., 1998).

Dos — un sensor redox y de oxígeno. La proteína Dos (*Direct Oxygen Sensor*) de *E. coli* (Delgado-Nixon y col., 2000) es un tetrámero en el cual cada subunidad tiene dos dominios PAS (A y B) ligados a una fosfodiesterasa C-terminal que hidroliza G/AMPc a G/AMPC, desencadenando respuestas intracelulares de relevancia fisiológica en *E. coli*. Tanto la unión del oxígeno por el hierro hémico al PAS-B como la oxidación del hemo *per se* desencadenan los cambios conformacionales necesarios para apagar la actividad fosfodiesterasa transmisora de señal (figura 6B) (Park y col., 2004; Sasakura y col., 2004; Yoshimura y col., 2003).

HemAT — un sensor de oxígeno implicado en quimiotaxis. La proteína HemAT de *Bacillus subtilis* detecta la presencia del oxígeno y modula la actividad de proteínas que controlan la rotación de los flagelos (Hou y col., 2001), permitiéndolo al organismo su orientación en gradientes de oxígeno (aerotaxis). Al igual que sucede en el caso de FixL, el hemo de HemAT es también empleado como sensor de oxígeno, aunque a diferencia de FixL y de Dos, es coordinado por un plegamiento típico de globina en lugar de por un dominio PAS (Zhang y Phillips, 2003). La unión del oxígeno como ligando potencia la simetría de su estructura homodimérica y activa el dominio histidina quinasa que iniciará la orientación de la bacteria hacia concentraciones más favorables de oxígeno.

Sensores basados en cofactores de flavina

Los cofactores de flavina FAD y FMN (mononucleótido de flavina) son coenzimas versátiles que realizan transferencias de uno y dos electrones. Estos coenzimas pueden existir en tres estados: completamente oxidado (p.e., FAD), parcialmente oxidado como un radical de semiquinona (p.e., FADH•), y completamente reducidos (p.e., FADH₂). En los últimos años se han descrito muchos sensores, cada uno de los cuales transmite la señal redox a proteínas efectoras específicas.

NifL — un regulador de la fijación de nitrógeno. Los miembros diazotróficos de las γ -proteobacterias activan la expresión de *nif* a través de una señal combinada del factor sigma 54 y el activador NifA, el cuál es inhibido por el sensor ambiental NifL bajo condiciones oxidantes (Martinez-Argudo, I., 2004). El sistema NifAL está bien estudiado en *Klebsiella pneumoniae*, que fija nitrógeno en anaerobiosis (Schmitz y col., 1996), y en *Azotobacter vinelandii*, bacteria aerobia estricta (Hill y col., 1996). De forma similar al papel de FixLJ en *S. meliloti*, el sistema NifAL asegura la no producción de la nitrogenasa durante aerobiosis en *K. pneumoniae* o cuando la respiración es insuficiente como para consumir el exceso de oxígeno en *A. vinelandii*. NifL percibe el estado redox usando el FAD unido a través de uno de los dos dominios PAS existentes en su

estructura. La oxidación del FAD estimula reversiblemente la actividad inhibidora de NifL sobre NifA, bloqueando la expresión de la nitrogenasa (Macheroux y col., 1998). La oxidación de NifL es muy rápida en contacto con el aire, indicando que el oxígeno es más que probable que sea el oxidante responsable, mientras que las quinonas serían el reductor fisiológico que previene estainhibición de NifL (Grabbe y col., 2001; Grabbe y Schmitz, 2003).

Aer — un sensor redox implicado en aerotaxis. Aer regula la motilidad de *E. coli* en gradientes de oxígeno (aerotaxis), potenciales redox y ciertos nutrientes (Edwards y col., 2006). La región C-terminal de Aer está muy relacionada con motivos señalizadores de quimiorreceptores, tales como Tsr, mientras que el N-terminal contiene un dominio PAS que une FAD no covalentemente (Bibikov y col., 1997; Bibikov y col., 2000; Repik y col., 2000). Por analogía con NifL, es presumible que un cambio en el estado redox del FAD genere un cambio conformacional transmitido al dominio C-terminal de señalización. Todo esto generaría una cascada de fosforilación a través de CheA y CheY, que trascendería en el encendido del motor flagelar (Rebbapragada, 1999).

Se sugiere actualmente que al igual que para NifL en *K. pneumoniae*, Aer intercambia su estado redox con el pool de quinonas de la membrana. En condiciones en las que escaseen tanto los donadores de electrones (por ejemplo, NADH o FADH₂) o los aceptores (por ejemplo, el oxígeno) el FAD estará completamente oxidado o reducido respectivamente transmitiendo la señal de indicadores repelentes, mientras que a máxima velocidad de respiración, el FAD en estado de semiquinona transmitirá la señal de atrayente. Por tanto, al contrario que HemAT, que responde directamente a oxígeno, la respuesta aerotáctica mediada por Aer se debe más a cambios en la composición de la cadena de transporte electrónico resultado de la disponibilidad de oxígeno que el oxígeno *per se* (Amin y col., 2006; Rebbapragada y col., 1997; Taylor y col., 2001; Taylor, 2004).

Sensores basados en nucleótidos de piridina

Los nucleótidos de piridina, NAD(H) y NADP(H), ocupan puntos centrales en el metabolismo redox. El papel fundamental del NAD(H) es ser lanzadera electrónica de la oxidación de los sustratos hacia la cadena de transporte electrónico, mientras que el NADP(H) está implicado en la biosíntesis y en las rutas de reparación para las que se necesita de energía en forma de poder reductor. Si consideramos la importancia de mantener el balance redox de estos cofactores, parecerá sorprendente que algunos sensores redox basados en estos cofactores hayan sido descritos tan solo recientemente.

Rex — un sensor del estado redox del NAD(H). El elevado recambio del NAD(H) implica que una menor disponibilidad del oxígeno, o la inhibición de la respiración por otras causas, da lugar a un aumento rápido en el balance redox NADH/NAD⁺ (de Graef, M. R., 1999). Recientemente, ha sido descrito en *Streptomyces coelicolor* (Brekasis y Paget, 2003) con el nombre de Rex el primer sensor de estado redox celular de NADH/NAD⁺. Rex es un represor que se une corriente abajo del

sitio de iniciación de la transcripción de *cydA*, concretamente en el operador ROP (“operador de Rex”), perdiendo afinidad cuando aumentan los niveles de NADH. En realidad, Rex no detecta el NADH *per se*, sino más bien su balance redox contribuyendo a una rápida inducción del operón de la citocromo oxidasa bd (*cydABCD*) en microaerofilia. Los homólogos de Rex están ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen anaeróbios estrictos como los clostridios (Gyan y col., 2006).

Otro portador de un cofactor de piridina es **CbbR**, un regulador de la familia LysR que activa la expresión de las enzimas del ciclo de Calvin en la bacteria quimioautotrófica *Xanthobacter flavus*. El NADPH estimula la unión del CbbR al DNA permitiendo a la célula detectar si hay suficiente poder reductor disponible para la fijación de carbono cuando las reacciones biosintéticas no permiten sobreponerse a la pérdida de fuente de carbono (van Keulen y col., 1998).

1.3.2.2. Reguladores que responden a óxidos de nitrógeno

Regulación por nitrato y nitrito

Sistemas NarX/L y NarP/Q. Además de la anoxia, la presencia de los sustratos de las reductasas terminales específicas es necesaria para que los operones codificantes de éstas se induzcan. En *E. coli*, la inducción por nitrato y nitrito se produce gracias a un sistema de dos componentes, en el que un sensor (NarX) detecta su presencia en el medio a través de un dominio periplásmico de 18 residuos conocido como *Pbox*, (Chiang y col., 1992), provocando un cambio conformacional y su autofosforilación que le capacitan para fosforilar reversiblemente un factor de transcripción (NarL) (Stewart, 1993). Éste se une al DNA en unas secuencias denominadas cajas-NarL (heptámero invertido cuya secuencia consenso para una mitad es: TAC(C/T)N(A/C)T) (Tyson y col., 1993) que generalmente asumen distribuciones en tandem espaciadas regularmente en el promotor. Para el operón *nar* existen 8 secuencias en tandem organizadas en dos grupos centradas en posiciones -200 y -80 que permiten que se active la transcripción, siempre que también esté unido el dímero de FNR. Por el contrario, en otros operones como *frd* y *pfl*, la unión de NarL entorno a la posición +1 impide la unión de la RNA polimerasa y evita su transcripción.

Normalmente solo se encuentra una pareja de genes *narXL* por microorganismo, sin embargo, en *E. coli* aparece también el sistema parálogo *narPQ*. De este modo, el balance global de los estímulos externos se traducirá en un patrón de expresión génica apropiado para los intereses energéticos y adaptativos de organismo (Stewart, 1993).

Otros factores que contribuyen a la integración de las señales de óxidos de nitrógeno con las variaciones en la velocidad o la fase de crecimiento son IHF (*integration host factor*), H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*), Fis (*factor of inversion stimulation*) y StpA (*supresor of td phenotype*). Cuando la regulación es negativa, estos factores son capaces de ocluir el promotor, pero habitualmente, inducen torsiones o plegamientos en el DNA que facilitan la interacción entre

los reguladores transcripcionales y la RNAP. En algunos promotores largos como es el caso de *nar*, IHF se une promoviendo la formación de una estructura en loop que consigue acercar las regiones reguladoras distales al sitio de iniciación de la transcripción (Schroder y col., 1993; Zhang y DeMoss, 1996).

NarR, regulación por nitrato en el grupo DNR. El sistema NarX/L no ha sido encontrado en *Paracoccus*, el cual dispone de otro sistema de detección diferente (Wood y col., 2001). El regulador NarR de *P. pantotrophus* pertenece al grupo Dnr pero no responde ni a compuestos que generan NO ni a compuestos que secuestran este gas.

Para activar la expresión génica, NarR requiere nitrato y/o nitrito, lo que sugiere la existencia de alguna clase de mecanismo desconocido de detección de nitrato (o nitrito) por esta proteína. El promotor de *narR* es a su vez autoregurable y se reprime en condiciones anaeróbicas, posiblemente a través de la acción de FnrP (Wood y col., 2001).

Regulación por NO

Regulación dependiente de Dnr/Nnr

Los reguladores de los grupos Dnr y Nnr forman parte de la familia de reguladores transcripcionales CRP-FNR pero carecen de las cisteínas implicadas en la coordinación de un centro [4Fe-4S] (Korner y col., 2003). Es por esto por lo que el mecanismo de activación post-traduccional por NO es alternativo a la oxidación de centros sulfoférricos (como en FNR) o la nitrosilación directa (como en SoxR). Sea como fuere, este mecanismo debe estar muy extendido en la naturaleza, ya que los factores del tipo Dnr/Nnr regulan la expresión coordinada en anaerobiosis de las principales enzimas del aparato de desnitrificación en muchas Proteobacterias (Arai y col., 1991, 1994, 1995; de Boer y col., 1994; Tosques y col., 1996; Van Spanning y col., 1995), en especial las reductasas de nitrito y óxido nítrico, pudiendo mostrarse funcionales incluso en expresiones heterólogas (Nnr de *P. denitrificans* en *E. coli*).

• **Dnr** fue descubierto al investigar la expresión del sistema de desnitrificación, por esto que su nombre deriva de “*dissimilatory nitrate respiration regulator*”. Los genes que codificaron los primeros factores Dnr descubiertos fueron descifrados en *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides* y *P. stutzeri* (Hartig y Zumft, 1999; Vollack y col., 1999). En todos los casos, su análisis genético funcional mostró su esencialidad en el control transcripcional de las reductasas de nitrito (*nir*) y NO (*norCB*). Los factores Dnr conservan los residuos aminoácidos E-SR en su dominio de reconocimiento del DNA, salvo contadas excepciones en *Ralstonia solanacearum* y *Synechocystis sp.* (A-SR) y en *M. magnetotacticum* (E-SSR). Sus sitios de unión a DNA guardan un alto grado de identidad con párale de Fnr, aunque suelen estar centrados entorno a las posiciones -340,5 y -343,5 con respecto al inicio de la transcripción (Korner y col., 2003; Spiro, 1994).

En *Pseudomonas stutzeri*, existen al menos tres reguladores de este grupo (DnrD, DnrS y DnrE) implicados en la respuesta frente a los cambios en los niveles de NO (figura 7). De estos, DnrD, codificado en el operón *dnrNODP*, responde básicamente a NO induciendo los operones *nirSTB*, *norCB* y el gen *nosZ*. Dado que la expresión constitutiva de *dnrD* en *P. stutzeri* es insuficiente para activar los promotores que responden a Dnr, se deduce la existencia en la proteína de un sensor de NO de naturaleza desconocida (Vollack y col., 1999; Vollack y Zumft, 2001; Zumft, 1997).

En *P. aeruginosa* la inducción del aparato desnitrificante se inicia desde ANR (*anaerobic regulation of arginine deaminase and nitrate reduction*) (Sawers, 1991; Zimmermann y col., 1991), un regulador de la clase FNR que induce la expresión de DNR, el cual activa los promotores de *nirS*, *norCB* y *nosR* en presencia de óxidos de nitrógeno (Arai y col., 1997). El sistema de regulación parece ser diferente en *P. stutzeri* y *P. denitrificans*, en donde los genes de desnitrificación se expresan pese a tener mutados los homólogos de ANR, sugiriendo independencia entre los análogos de DNR (*dnrD* y *nnr*) y ANR (*fnrA* y *fnrP*) (figura 7) (Vollack y col., 1999).

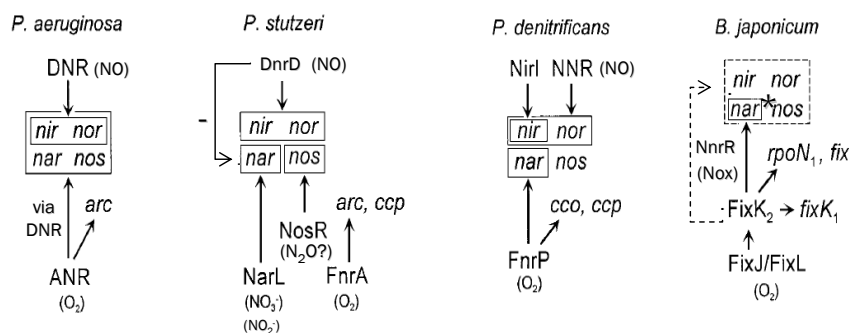


Figura 7. Circuitos regulatorios de activación controlada por distintos tipos de factores transcripcionales. Las flechas señalan activaciones de genes individuales u operones. DNR, DnrD y NNR son reguladores relacionados funcional y estructuralmente mientras que ANR, FnrA y FnrP no guardan relación funcional en las bacterias en las que actúan. Se cree que FixK2 controla directamente la respiración de nitrato mientras que en cascada a través de NnrR el resto del aparato desnitrificante en *Bradyrhizobium japonicum*, comparable a la acción de ANR/DNR. Acrónimos: *arc*, catabolismo de arginina; *cco*, citocromo cbb3; *ccp*, citocromo c peroxidasa. (*nar** en *B. japonicum* es en realidad *nap*) (Zumft, 1997).

- **NnrR** pertenece al grupo de reguladores Nnr de la familia Crp, caracterizados todos ellos por portar la sustitución H/E en la secuencia E-SR de sus motivos de unión a DNA. Al contrario que Fnr, las proteínas Nnr no muestran patrones consenso de sus cisteínas, pues varios miembros del grupo tan solo presentan una o ninguna (*Alcaligenes faecalis* y *Pseudomonas sp.* G-179) (Bedzyk y col., 1999), aunque en ocasiones su mutación afecte notablemente a la actividad (Nnr de *P. denitrificans*) (Hutchings y col., 2000; Van Spanning y col., 1995; Van Spanning y col., 1997).

NnrR, es el primer regulador identificado del grupo, y su nombre deriva de su papel estimulador de la respiración de nitrito en respuesta a NO en *Rhodobacter Sphaeroides* (Tosques y col., 1996; Tosques y col., 1997). El gen *nnrR* de *Sinorhizobium meliloti* reside en el plásmido pSymA de 1.35-Mb, el cual incluye genes para la fijación del nitrógeno y la formación de nódulos

radiculares (Galibert y col., 2001). En *Bradyrhizobium japonicum* NnrR controla el aparato desnitrificante (Mesa y col., 2003) al ser activado por el sistema FixJ/L (figura 7).

Regulación no dependiente de Dnr/Nnr

- **NorR** pertenece a la familia EBP (*Enhancer Binding Protein*) de reguladores, y su descubrimiento como activador de *norAB* en *Ralstonia eutropha* mostró que la expresión de reductasas respiratorias de NO no siempre dependía de factores tipo NnrR/DNR (Pohlmann y col., 2000). En respuesta a NO, NorR activa la transcripción de la flavohemoglobina Fhp en *P. aeruginosa* (Arai y col., 2005) mientras que en *E. coli* induce los genes *norVW* (flavorubredoxina que reduce NO a N₂O con gasto de NADH) (Mukhopadhyay y col., 2004).

NorR dispone de un dominio C-terminal de unión a DNA dependiente de sigma-54 y de un dominio N-terminal GAF (*cyclic GMP-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterases, adenylyl cyclase* y *FhIA*) (Aravind y Ponting, 1997; Martinez y col., 2002). Esto llevó a especular que NorR era un sensor con grupo hemo (Gardner, 2005), hasta que recientemente se ha comprobado que es activado por la formación de un derivado mononitrosilado en una molécula de hierro no hémico localizada en el motivo GAF (D'Autreaux y col., 2005), por lo que NorR actúa como sensor de NO *per se* (Rodionov y col., 2005; Tucker y col., 2006).

- **NsrR**, es un miembro de la familia Rrf2 de represores transcripcionales sensibles a nitrito. Los datos experimentales muestran que este regulador desreprime la expresión de NirK en respuesta a nitrito y NO en *Nitrosomonas europaea* (Beaumont y col., 2004), un hecho confirmado recientemente también en *Rhodobacter capsulatus*, *Escherichia coli* y *Neisseria gonorrhoeae* (Bodenmiller y Spiro, 2006; Pino y col., 2006; Rock y col., 2007). En *Bacillus subtilis*, el sistema de dos componentes ResDE, esencial para respiración aeróbica y anaeróbica (Ye y col., 2000), se induce completamente por nitrito o NO y concentraciones limitantes de oxígeno. Parece ser que NsrR (formalmente YhdE) es responsable de la activación NO-dependiente del regulón ResDE, posiblemente a través de la coordinación de un centro Fe-S en su estructura (Nakano y col., 2006). Esta proteína también podría jugar un papel importante en la respuesta a estrés medioambiental en patógenos, reaccionando frente a especies reactivas de nitrógeno (RNS) generadas como mecanismo de defensa del huésped o como productos de su propio metabolismo.

1.4. El Género *Thermus*

1.4.1. Características del género *Thermus*

El género *Thermus*, descrito por Brock y Freeze en 1969 (Brock y Freeze, 1969), está constituido por bacterias termófilas, aisladas de fuente termales neutras o ligeramente básicas de diferentes puntos del mundo, como Japón, Islandia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, etc. (Hudson

y col., 1989). Los diferentes aislados tienen temperaturas óptimas de crecimiento de 62-75°C, empleando un metabolismo quimiorganotrófico. Este género, está compuesto por formas bacilares que tiñen Gram negativo, inmóviles, que tienden a formar filamentos en cultivos jóvenes, y suelen mostrar coloración amarillo-anaranjada por la acumulación de carotenos. Utilizan como fuentes de carbono y energía, maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, galactosa, acetato, etc.; y como fuente de nitrógeno, glutamato, prolina, amonio, etc. No requieren vitaminas, aunque necesitan algunos oligoelementos como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} (Brock, 1978a; Brock, 1978b).

Tradicionalmente se ha descrito el género *Thermus* como aerobio, aunque recientemente se ha observado la existencia de cepas con capacidad para respirar en anoxia. En nuestro laboratorio se constató la capacidad de una cepa de *T. thermophilus* (recientemente renombrada como NAR1) para crecer anaeróticamente utilizando nitrato como aceptor final de electrones (Ramírez-Arcos y col., 1998a). También, existen descripciones de aislados capaces de crecer con otros aceptores de electrones inorgánicos como Fe(III), Mn(IV), S^0 , Cr(VI), U(VI), Co(III) (Balkwill y col., 2004; Kieft y col., 1999; Moller y van Heerden, 2006) y arsenato (Gihring y Banfield, 2001).

Según estudios comparativos del RNA ribosómico 16S, el género *Thermus* está estrechamente relacionado con el género *Deinococcus*, formando el orden Deinococales (Hensel y col., 1989; Omelchenko y col., 2005; Weisburg y col., 1989). Tras *Thermotoga* y *Aquifex*, este grupo constituiría una de las ramas más antiguas en la evolución de las bacterias (Woese, 1987), aunque existen interpretaciones alternativas, basadas tanto en el análisis de la ultraestructura de las envolturas celulares como en la presencia de inserciones y deleciones distintivas, que proponen a este género como un intermedio evolutivo entre bacterias Gram positivas (“monodermas”) y Gram negativas (“didermas”) (Gupta, 2000). No obstante, la primera interpretación continúa siendo la más aceptada.

Algunas cepas de *Thermus thermophilus*, poseen una serie de características que han facilitado su estudio, manipulación genética y aplicación biotecnológica. Por un lado presentan gran facilidad de crecimiento en medios ricos y minerales, así como formación de colonias individuales en medios sólidos. Por otro lado, poseen competencia natural (Friedrich y col., 2001; Friedrich y col., 2002; Koyama y col., 1986), lo que ha facilitado el desarrollo de herramientas genéticas inexistentes para otros termófilos (Blas-Galindo y col., 2007; DeGrado y col., 1998; Moreno y col., 2003). Además, actualmente, se encuentra secuenciado el genoma completo de la cepa HB-8 (Masui) y HB27 de *T. thermophilus* (Henne y col., 2004), lo que aporta más información sobre la fisiología y potenciales utilidades de este microorganismo.

1.4.2. Enzimas respiratorias de *Thermus*

De entre la información aportada por la secuencia del genoma de *T. thermophilus* HB27 conviene destacar, por su relación con este trabajo, la referente al metabolismo aerobio (figura 8). En este microorganismo la cadena respiratoria se inicia en una NADH-deshidrogenasa de tipo I (Nqo1-14) formada por 14 subunidades (Sazanov y Hinchliffe, 2006; Yagi, 1993; Yagi y col., 1993; Yano y col., 1997) homólogas a las 13 de *E. coli* (NuoAN) cuya estructura parcial a baja resolución ha sido recientemente publicada (Hinchliffe y Sazanov, 2005; Sazanov y Hinchliffe, 2006). Aunque también dispone de una succinato deshidrogenasa, esta enzima realizaría la mayor aportación de electrones a la CTE durante el crecimiento aeróbico. Sin embargo, también ha aparecido en la secuencia del genoma una formiato deshidrogenasa similar a la enzima anaeróbica de *E. coli*, que, a través de transportadores intermediarios, podría dirigir los electrones bien hacia las citocromo oxidasas terminales, o bien hacia potenciales aceptores anaeróbicos como una posible polisulfuro reductasa codificada en el genoma (Henne y col., 2004). Conviene recordar que la cepa secuenciada ha sido, y sigue siendo, considerada como aerobia estricta.

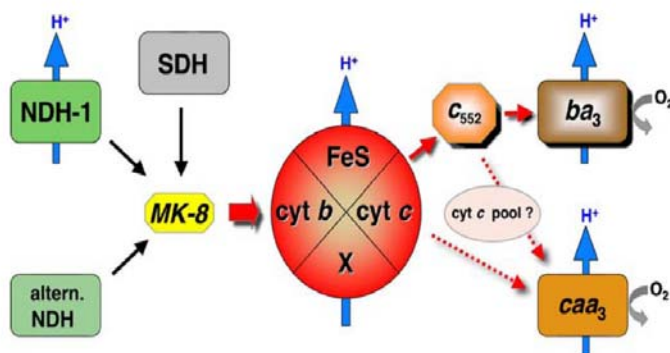


Figura 8. Esquema de la cadena de respiración aeróbica en *Thermus thermophilus*. Destaca el papel central que ocupa el complejo bc1 (en rojo) y sus posibles interacciones con otros componentes redox conocidos. NDH-I, NADH:quinona oxidoreductasa; SDH, succinato:quinona oxidoreductasa; MK-8, menaquinona-8. Las figuras sombreadas son componentes cuya estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos X, las flechas azules indican puntos que presumiblemente o con evidencias experimentales contribuyen a la generación de energía, las flechas discontinuas marcan rutas hipotéticas (Mooser y col., 2006)

Como en la mayoría de las bacterias de respiración aerobia, en *Thermus* se han encontrado genes codificantes de dos citocromo oxidasas alternativas (Henne y col., 2004). La presencia de la citocromo oxidasa caa_3 fue establecida por Fee y cols en 1980, redeterminando una composición de dos subunidades análoga a la citocromo oxidasa aa_3 mitocondrial. Esto fue confirmado por Mather y cols. (1993), quienes mostraron además que posee un hemo tipo c covalentemente unido a la subunidad II (Hellwig y col., 2002). Por su parte, la citocromo oxidasa ba_3 es también heterodimérica, y contiene una molécula de hemo b y otra de hemo a, junto con dos iones cobre. Se expresa sobre todo a baja presión parcial de oxígeno (Hunsicker-Wang y col., 2005; Keightley y col., 1995; Soulimane y col., 1997; Soulimane y col., 2000; Zimmermann y col., 1988). Posteriormente, se ha visto que las características especiales de esta oxidasa la hacen pertenecer a un subgrupo único de las oxidasas hemo-cobre (*cluster soxABCD*), junto con la de *Bacillus stearothermophilus* y las oxidasas de arqueas (Sakamoto y col., 1997). Actualmente se dispone de información funcional y estructural derivada de su cristalización (Nicholls y Soulimane,

2004; Soulimane y col., 2000). Curiosamente, ambas oxidasas pueden catalizar también la reducción del óxido nítrico a nitroso bajo condiciones de anaerobiosis. Esto ha llevado a sugerir una filogenia común entre la respiración aerobia y la desnitrificación bacteriana (Giuffrè y col., 1999).

El citocromo periplásmico c_{552} ha sido descrito como el principal citocromo involucrado en el transporte de electrones a las oxidasas terminal. Éste fue caracterizado por primera vez por Hon-Nami y Oshima (Hon-Nami y Oshima, 1977) y posteriormente por Lorence y cols. (Lorence y col., 1981), estableciéndose que era el donador natural de electrones de la citocromo oxidasa ba_3 (Soulimane y col., 1997); actualmente continúa su estudio mediante expresión en un hospedador mesófilo (Fee y col., 2000; Keightley y col., 1998). Por otra parte, el genoma de *T. Thermophilus* codifica otros citocromos c homólogos a éste que podrían estar implicados en rutas de transporte de electrones a oxidasas terminales, ya sean de respiración aerobia o hacia la posible sulfuro reductasa (Henne y col., 2004) (figura 8).

Más arriba en la ruta de transporte de electrones se situaría el complejo bc_1 (figura 8). En el genoma de *T. thermophilus* se ha encontrado un sistema similar a menaquinol:citocromo c óxido-reductasas de otros microorganismos, que consiste en un citocromo b, la sulfoferroproteína Rieske y citocromos c (Henne y col., 2004) recientemente revisado (Mooser y col., 2006).

A su vez, el complejo bc_1 recibiría los electrones del conjunto de quinonas presentes en la membrana. (Collins y col., 1980; Fee y col., 1986) identificaron la menaquinona MK-8 como la principal quinona de membrana, y establecieron la ausencia de ubiquinona. Esto les llevó a concluir que la cadena respiratoria se parecía más a la de microorganismos Gram positivos que a la de Gram negativos (figura 8).

1.4.3. Metabolismo facultativo de *Thermus*: Respiración anaeróbica de nitrato

1.4.3.1. El operón *nar*

El operón de la nitrato reductasa respiratoria de *Thermus thermophilus* NAR1 es el más largo de cuantos se conocen, comprendiendo los genes *narCGHJIKT* (figura 9). Nar G, H, I y J son homólogos de las cuatro proteínas habitualmente codificadas en otros operones de nitrato reductasas, aunque NarJ posee una similitud menor con sus homólogos mesófilos siendo bastante menor que la mayoría de las proteínas NarJ descritas, (Ramírez-Arcos y col., 1998a). No obstante, el elemento más característico de esta enzima respiratoria termófila es sin duda NarC, producto del primer gen transcrito del operón *nar* y cuarta subunidad de este nuevo tipo de nitrato reductasa. Que resulta ser heterotetramérica en vez de heterotrimérica (Zafra y col., 2002; Zafra y col., 2005). NarC es un citocromo tipo c bihemo de localización periplásmica, pero anclado a la membrana, cuya funcionalidad se ha relacionado a fecha de hoy con el anclaje a la membrana y la maduración de la nitrato reductasa. En concreto, se ha propuesto un modelo de síntesis en el que NarC y NarI

interaccionarían en la membrana para hacer a NarI competente en la unión del complejo NarGHJ inactivo, siendo necesaria esta asociación para la activación de la enzima, tras lo cual, NarJ se liberaría del complejo (Zafra y col., 2002; Zafra y col., 2005).

Formando parte del operón *nar* de *T. thermophilus* también encontramos un par de genes que codifican transportadores de nitrato/nitrito (*narK* y *narT*), constituyendo otro rasgo específico de este microorganismo. Las proteínas codificadas por los genes *narK* y *narT* son 30% idénticas entre sí. No obstante NarK se agrupa con transportadores de nitrato, mientras que NarT lo hace con exportadores de nitrito. Por estudios con mutantes sencillos y dobles en estos transportadores, se ha establecido que ambos pueden transportar tanto nitrato como nitrito (antitransportadores de nitrato/nitrito). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, podría ser que NarK actuara preferentemente como simportador H^+ /nitrato y NarT como antiportador H^+ /nitrito (Ramírez-Arcos y col., 2000).

El operón *nar* de *T. thermophilus* es inducible por anoxia y nitrato, al igual que el resto de los operones *nar* descritos. Por experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, sabemos que una deleción en el promotor *Pnar* que mantiene las 330 pb anteriores al inicio de la transcripción, no es funcional. Esto demuestra la existencia de regiones reguladoras alejadas del inicio de transcripción y necesarias para la expresión. Sin embargo, un fragmento de 720 pb desde el posible inicio de la transcripción es totalmente funcional, como demostraron (Moreno y col., 2003; Vazquez-Tello y col., 2002). En todo caso, estos datos parecen indicar que *Pnar* de *Thermus* posee una complejidad similar a la de los promotores *nar* mesófilos.

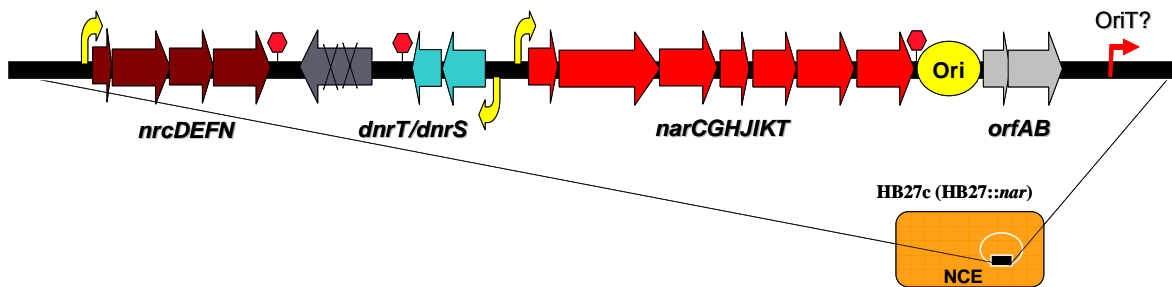


Figura 9. El Elemento NCE. Esquema de la organización genética de los operones codificados por el NCE.

1.4.3.2. El elemento genético transferible (NCE)

La capacidad de crecimiento anaeróbico con nitrato podía transferirse por conjugación desde la cepa NAR1 (previamente identificada como HB8) a otra cepa aerobia estricta del mismo microorganismo (*T. thermophilus* HB27), permitiendo al exconjugante (*T. thermophilus* HB27::*nar*) crecer bajo condiciones de anaerobiosis con nitrato (Ramírez-Arcos y col., 1998b) (figura 9). Esta transferencia implicaba un fragmento de DNA de al menos 30 kbp al que se denomina NCE (Nitrate

respiration conjugative element). Su transferencia puede movilizar también otros marcadores cromosómicos de una manera dependiente de tiempo y que no se bloquea por la presencia de DNasa en el medio de crecimiento. Esto hizo proponer que el mecanismo de transferencia era similar al empleado por las cepas Hfr (“*High frequency of recombination*”) de *E. coli*, y que el origen de transferencia (*oriT*) se situaba dentro del elemento transferible, por debajo de la terminación del último gen del operón *nar* (Ramírez-Arcos y col., 1998b). Por tanto, pruebas aportadas por estos autores llevan a la conclusión de que el operón *nar* de *T. thermophilus* se encuentra en un plásmido conjugativo integrado en el cromosoma; de hecho, se identificó un origen de replicación autónomo (*oriV*) que se superpone al último gen del agrupamiento *nar* (Ramírez-Arcos y col., 1998b).

Estudios posteriores que serán presentados en este trabajo han revelado que la transferencia por conjugación del NCE no se limita a la nitrato reductasa terminal, sino que incluye además el operón *nrc* codificante de un nuevo tipo de NADH-deshidrogenasa (Cava y col., 2004) (figura 9). A esto se suman dos elementos reguladores codificados en el regulón *dnrST* necesarios para sustituir la cadena respiratoria aeróbica por la anaeróbica reductora de nitrato en *T. thermophilus* NAR1 (Cava y Berenguer, 2006; Cava y col., 2007).

Todos estos datos hacen suponer que el conjunto de los operones *nrc*, *nar* y *dnr* forman parte de una “isla metabólica” implicada en la respiración anaeróbica de este termófilo que se puede transferir horizontalmente (Cava y Berenguer, 2006).

2. OBJETIVOS

Las bases moleculares de la termofilia explican que un extenso y variado número de microorganismos, en su mayoría bacterias y arqueas, sean capaces de crecer y colonizar ambientes hostiles para otros por sus elevadas temperaturas. Las características que posibilitan la adaptación a las altas temperaturas son de naturaleza variada, debiéndose en general a la termoestabilidad de sus proteínas, de menor tamaño y mayor rigidez estructural.

La mayor parte de los organismos termófilos extremos son anaeróbicos facultativos u obligados dada la baja solubilidad del oxígeno a altas temperaturas. *Thermus thermophilus* es una bacteria facultativa inicialmente descrita como aeróbica obligada, que debe su adaptación a ambientes anóxicos a la utilización alternativa de óxidos de nitrógeno como aceptores finales de electrones. Sin embargo, probablemente el mayor atractivo de este sistema reside en su localización en un elemento genético movilizable, convirtiendo a esta versatilidad metabólica en un atributo generoso mediante transferencia horizontal.

Para conocer los mecanismos mediante los cuales *Thermus thermophilus* es capaz de detectar y adaptarse frente a cambios ambientales externos, hemos propuesto como principales objetivos de este trabajo:

1. Caracterizar el contenido génico codificado por el elemento NCE en las regiones flanqueantes del operón *nar*.
2. Estudiar la posible relación de los genes codificados en este entorno genético con la cadena de respiración anaeróbica hacia el nitrato.
3. Estudiar los elementos responsables de la regulación del metabolismo facultativo en *Thermus thermophilus* codificados por el NCE.
4. Estudiar la distribución del elemento NCE en diversas estirpes de *T. thermophilus* con capacidad desnitrificante total o parcial, y su grado de intervención en el metabolismo facultativo de las mismas.
5. Estudiar el posible papel fisiológico de la nitrato reductasa en los siguientes pasos de la ruta de desnitrificación, en particular atendiendo a la presencia de un citocromo C dihemo (NarC) y su posible participación en la transferencia electrónica hacia las reductasas terminales de la ruta.
6. Analizar la posible interacción entre complejos respiratorios implicados en desnitrificación mediante sistemas de doble híbrido bacteriano y nuevas herramientas termoestables de localización de proteínas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS 3.1. Materiales Todos los materiales empleados en este trabajo se describen en el Anexo I: las cepas bacterianas empleadas u obtenidas se describen en la tabla 1; los plásmidos utilizados y los constructos se describen respectivamente en las tablas 2 y 3; los oligonucleótidos empleados se describen en las tablas 4 y 5; y los tapones y antisueros empleados se describen respectivamente en las tablas 6 y 7.3.2. Métodos microbiológicos 3.2.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas *T. thermophilus* fue crecida a 65-70°C, en medio rico TB hecho con agua mineral (Fontijnaba, Zaragoza) (Fernandez-Herrero y col., 1989). En medios sólidos se añadió 1% (p/v) de agar y las placas se incubaron, a la misma temperatura se en caso de animales humanos, en un medio de agar preparado en el laboratorio de cultivo de células (Anerocult[®] C mini, Merck). En los experimentos de selección se añadió kanamicina (30 µg/ml), bleomicina (15 µg/ml) u hygromicina (60 µg/ml). El medio mínimo utilizado fue el descrito por Degryse, (Degryse y col., 1978) añadiendo además la mezcla de micronutrientes indicada por Tanaka (Tanaka y col., 1991). *E. coli* creció a 37°C con agitación en medio rico LB (Lennox, 1955), o en placa añadiendo 1.5% (p/v) de agar al mismo medio. Cuando fue necesario se incluyeron los antibióticos: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), bleomicina (3 µg/ml) u hygromicina (100 µg/ml). Para seleccionar recombinantes por actividad β -galactosidasa se usó el suero X-Gal (Roche) en la fase de cultivo y el medio de cultivo de la bacteria se realizó a 70°C en ausencia de plásmidos, bien en forma de sedimento obtenido por centrifugación por el caso de *T. thermophilus* o bien empleando glicerol 40% (concentración final) como crioprotector para *E. coli*. El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la D₆₀₀ en un espectrofotómetro Hitachi U-2000. Crecimiento de *T. thermophilus* en distintas condiciones de oxigenación El crecimiento en aerobiosis se produjo en matraces rellenos con medio de cultivo hasta 1/5 de su capacidad, sometidos a 150 rpm de agitación. La inducción de la nitrato reductasa, así como del resto de las enzimas de respiración anaeróbica, se logró mediante cultivos estáticos a 60-70°C (matraz a 1/3 de su capacidad) o bien en tubos de tapon a rosca. El crecimiento se inició en medio aerobio cuando el cultivo se encuentra aproximadamente a 0.5 unidades de OD₆₀₀ se detiene la aireación y se añade el óxido de nitrógeno apropiado (nitrato 0.05 mM (Merck), 5 mM (Sigma), nitrosulato sódico 0.1 mM (SNP, Sigma)). En estas condiciones el oxígeno es consumido rápidamente permitiendo a la bacteria la utilización de aceptores finales de electrones alternativos. Si no se especifica lo contrario, la inducción microaerofílica se llevó a cabo durante cuatro horas. Los cultivos en anaerobiosis se consiguieron creciendo las células en estático, en tubos de cristal de 10 ml con tapon a rosca, rellenos con unos 8 ml de medio de cultivo suplementado con 40 mM de nitrato potásico y 5 mM de nitrato potásico, y cubiertos con aceite de vainilla (Panrace) después de la inoculación. Para la detección de óxidos de nitrógeno gaseosos durante la desnitrificación se incorporaron cámaras Durham en el interior de los tubos. Los crecimientos anaerobios de cepas desnitrificantes parciales (PD) o completas (CD) empleando óxidos de nitrógeno se llevó a cabo en botellas de 25 ml de capacidad rellenas con 15 ml de medio de cultivo TB diluido a la mitad (TB_{1/2}) y cerradas herméticamente a las que se les sustituyó el oxígeno del espacio vacío por el óxido de nitrógeno adecuado (NO y N₂O al 5% en N₂, Airliquid). Las botellas inoculadas fueron incubadas durante 3 a 6 días a 70 °C antes de tomar muestras para los conteos de viabilidad. **Transformación bacteriana.** La competencia en *E. coli* fue inducida mediante el método de Inoue (Inoue y col., 1990). Las transformaciones se realizaron siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1985). En algunos casos, las células competentes de la cepa INV⁻ F fueron adquiridas a Invitrogen y se transformaron siguiendo las instrucciones de esta casa comercial. Las células de *T. thermophilus* fueron transformadas por competencia natural (Koyama y col., 1986), añadiendo 0.1-5 µg de DNA a 0.5 ml de cultivo en fase exponencial (aprox. 0.5 u.d.O₆₀₀) en medio de crecimiento TB preparado con agua mineral Fontijnaba. Tras la transformación, las células fueron incubadas a su temperatura de crecimiento el tiempo necesario para la expresión de los genes de resistencia al antibiótico correspondiente, una hora para la ampicilina y 2 horas para la kanamicina en *E. coli*, y 4 horas para expresar la resistencia frente a cualquier antibiótico en *Thermus*. La selección fue llevada a cabo en placas con los antibióticos adecuados. Excepcionalmente, las células de *T. thermophilus* fueron electrotransformadas. Para ello dejamos crecer los cultivos hasta 0.5 u.d.O₆₀₀, los lavamos por centrifugación dos veces en glicerol 10% (Merck) en H₂O MilliQ y resuspendimos las células en 1/100 del volumen inicial en esa misma solución. 10 µl de estas células fueron incubadas con el DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente las sometimos a un campo eléctrico de 12,500 Volt/cm (Equibio, Easylet Plus D200); 250 V, 201 25 µs, en cubitos de 0.2 cm de grosor, 5 ms). Ensayo de interacciones entre proteínas mediante doble híbrido Los ensayos de doble híbrido bacteriano descritos en este trabajo son fruto de una colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Gerard Giordano, trabajo que fue supervisado por el Dr. Francis Blasco en el CNRS de Marsella (Cava y col., 2004; Zafra, 2004; Zafra y col., 2005). Para ello empleamos un sistema bacteriano basado en la reconstitución funcional de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (K. Karimova y col., 1998; Karimova y col., 2000a, b; Karimova y col., 2002). Las proteínas a ensayar se fusionan al dominio T25 de la mencionada enzima (Cya) como región C-terminal en el plásmido pT25 (Km^r) o pKT25 (Km^r), las proteínas de interés se fusionan al dominio T18 de la mencionada enzima en el estudio de interacción y las proteínas que se ensayan con la región N-terminal en el plásmido pT18. Dada la posibilidad de que alguna de las fusiones comprometa los dominios implicados en la interacción, cada gen es clonado siempre en todos los vectores para generar fusiones en los extremos N- y C-terminal (anexo I, tabla 3). Para el estudio de la interacción entre proteínas de membrana (Karimova y col., 2005), se emplean los vectores pT18 y pKNT25, los cuales expresan proteínas de fusión sin bloquear el péptido señal. Las parejas de plásmidos se introducen en la cepa de *E. coli* BTH101 (cya) y se realiza el ensayo tal y como aconseja el proveedor (Hybridgen S. A., Paris, (Karimova y col., 2002)). Finalmente se mide la actividad β -galactosidasa de la glutamato deshidrogenasa (Gdh) de *T. thermophilus* NAR1 (resultados de ultracentrifugación analítica sin publicar). Se usó también, el control positivo descrito para estos ensayos con los plásmidos pT18zip y pT25zip (Karimova y col., 2000a, b), y como controles negativos expresiones entre cada derivado con el gen de estudio (X-T18, T25-Y, Y-T25) y los derivados zip (Zip-T18, T25-Zip) (anexo I, tabla 3). 3.3. Manipulación de ácidos nucleicos Preparación de DNA El DNA plasmídico de *E. coli* se obtuvo desde cultivos saturados y se usó indistintamente, el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989) o bien kits basados en la unión del DNA a una columna de sílice (Wizard Plus SV Minipreps de Promega), en este último caso se siguieron las instrucciones del fabricante. Para la preparación de DNA plasmídico en grandes cantidades se usó el kit "midiprep" de Qiagen siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El DNA total de *Thermus* fue aislado a partir de 1.5 ml de cultivo en saturación, siguiendo el protocolo básico descrito por Marmur (Marmur, 1961; tabla 6). Para purificar fragmentos a partir de estos genes se usó el kit PCR-Prep de Promega según las instrucciones del fabricante. En los casos en los que el fragmento de DNA era demasiado pequeño para utilizar este método, empleamos las columnas Millipore Ultrafree-DA, basadas en la tamiación física de la agarosa Posteriormente, el DNA disuelto en TAE 1X que se obtiene, fue precipitado y resuspendido en un volumen apropiado de agua. Marcaje isotópico del DNA El DNA producto de PCR u obtenido por digestión a partir de plásmidos fue marcado isotópicamente con ³²P siguiendo los protocolos descritos en los manuales de laboratorio (Sambrook y cols., 1989; Ausubel y cols., 1994). Para la incorporación homogénea de [³²P]-dGTP (3,000 Ci/mmol, Amersham) empleamos una mezcla de hexanucleótidos degenerados (Pharmacia, LKB) como iniciadores y el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche). Alternativamente, empleamos la Polinucleótido kinas (PNK, New England Biolabs) para marcar los extremos 5' con [³²P]-dATP (p6-000000) (Amersham) como desoxinucleótido radioactivo. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando minicolumnas de sephadex G-50 (Sambrook y cols., 1989). Paso cromosómico e hibridación sobre placa de plásmidos Los extremos del operón nar se caracterizaron mediante la técnica de paseo cromosómico empleando una genoteca de *T. thermophilus* NAR1 construida en pUC119 (Fernandez-Herrero y col., 1995b). Para ello, usamos una sonda de la región conocida de la PCR anterior a las bases de partida de los clones de PCR anteriores. A continuación se transfirió el DNA en un filtro de nylon (Schleicher & Schülke) y se utilizó un tampón de transferencia de 2 ml durante 4 horas. Los clones Biotrich) varias placas de LB con un número de colonias (2,500-5,000) que representaran approx. 5-10 veces el tamaño del genoma de *T. thermophilus* (1.81 Mbp), que fueron procesadas e hibridadas con las sondas anteriores, tal y como describe Sambrook (Sambrook y col., 1989). Los clones positivos de la hibridación fueron comprobados por restricción múltiple y secuenciación, sirviendo nuevamente como moldes para aislar una nueva sonda y así continuar el paseo cromosómico. **Southern blot.** El DNA fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas al cada caso, sometido a electroforesis en gel de agarosa, y tratado como se describe en (Sambrook) para transferir los fragmentos de DNA a un filtro de nylon (Schleicher & Schülke), se fijaron a la membrana (Gene Linker) BioLabs, se preincubó con el tampón de transferencia de 2 ml durante 4 horas en una saturación 1 hora a 65°C, SSC 6X, SDS 0.5%, DNA de espermato humano 100 µg/ml (Sigma) y a la hibridación con la sonda marcada en un volumen de 10 ml de la solución anterior. La sonda no unida fue eliminada mediante tres lavados sucesivos de 10 minutos a 65°C en SSC 2X, SDS 0.1%. En los casos en los que deseásemos rehidratar la membrana, la señal radiactiva anterior previa fue eliminada mediante ebullición en SDS 0.1% durante, al menos, 15 minutos. **Detección de mRNA** El RNA de *T. thermophilus* fue extraído empleando el "Tri-reagent-Is" kit[®] (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) y la presencia de mRNA específicos fue detectada por Northern blot o mediante RT-PCR semicuantiitativa. Para Northern blot, el RNA fue separado en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído (Sambrook y col., 1989) al 1% y posteriormente transferido por capilaridad a una membrana de nylon marcada positivamente (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech). El mRNA se detectó por hibridación con oligonucleótidos marcados con [³²P]-dUTP utilizando el preparado comercial "Gene Images 3'-oligo-labeling PCR" e ECL ambos de Amersham Pharmacia Biotech. Para la RT-PCR semicuantiitativa se emplearon una pareja adecuada de oligonucleótidos (anexo I, tabla 4A) y el kit Ready-To-Go[®] (Amersham Biosciences). Ensayos de extensión del cebador La identificación del origen de transcripción se realizó mediante ensayos de extensión del cebador, empleando oligonucleótidos que hibridaban a una distancia de 100 a 150 bp del inicio marcados con [³²P]-dATP en 5'. La retrotranscripción del mensajero se realizó bien con la enzima AMV (Promega) o bien mediante el kit Retrotools (Biotools B&M) siguiendo en ambos casos las indicaciones del fabricante. En algunos casos se utilizó un cebador de extensión de 5' con un nucleótido radiactivo, para ello se usó un tampón de extensión de 2 ml durante 4 horas guardando el producto a 4°C en ausencia de luz. Estas muestras fueron analizadas en un gel de acrilamida 6% con urea 8 M corrido durante toda la noche. Como patrón de tamaño se utilizó el perfil de bandas de una reacción de secuenciación de la zona en cuestión con el mismo oligonucleótido (Ausubel y col., 1994).3.4. Manipulación de proteínas Preparación de extractos de *Thermophilus*. Para la obtención de proteínas totales, las células fueron concentradas y lavadas en tampón TS por centrifugación suave, y resuspendidas en tampón de ruptura de Laemmli 1X. Tras hervirlas durante 10 minutos y eliminar los restos insolubles de la envoltura celular, las proteínas solubilizadas fueron separadas en geles SDS-PAGE para su análisis. Para separar las fracciones soluble e insoluble de ambos microorganismos se procedió a recoger y lavar las células con agua antes, pero éstas fueron resuspendidas en un volumen variable entre 300 µl y 1 ml de tampón TS conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (Completo Mini de Roche, una pastilla por cada 10 ml de tampón). La ruptura de las células se llevó a cabo por sonicación (2 pulsos de 30 segundos-3 minutos en un aparato LABSONIC U. B. Braun, potencia: máxima; intensidad: alta; frecuencia de ciclo: 0.7 s). Las células no rotas fueron eliminadas por centrifugación a baja velocidad (2,000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 3 minutos, 4°C), y las fracciones soluble e insoluble fueron separadas mediante dos ciclos de centrifugación a alta velocidad (14,000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 45 minutos a 4°C). La fracción insoluble fue resuspendida en un volumen igual a la fracción soluble del tampón usado. Para el análisis por SDS-PAGE hervimos las muestras en tampón de Laemmli 1X retirando los fragmentos insolubles por centrifugación en algunos casos. En los que la gran cantidad de material celular o la poca cantidad de tratamiento más suave, antes de ser sometidas a sonicación, se separaron las fracciones soluble e insoluble de células rotas por abrasión con alúmina (Sigma). En estos casos, mezclas similares iguales de masa celular húmeda y de alúmina, rompiendo las células a 4 °C con mortero manual de porcelana, añadiendo las cantidades mínimas necesarias de tampón TS con inhibidor de proteasas. Una vez eliminada la alúmina y las células no rotas por centrifugación doble (5,000 x g 3 minutos, 4°C, se procedió a separar las fracciones solubles y particuladas por centrifugación como en el caso anterior. **Electroforesis en geles de poliacrilamida.** La separación electorforética de proteínas se realizó mediante geles de SDS-poliacrilamida (PAGE) con acrilamida 29.1 en la parte del concentrador y 37.1 en el separador (Laemmli y Favre, 1973). En algunos casos empleamos geles de poliacrilamida comerciales NuPAGE (Invitrogen) con gradiente del 4 al 20% de acrilamida. Como marcadores de tamaño se emplearon mezclas estándar de Biorad. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie (0.25% Brilliant Blue-R de Sigma Aldrich en 45% metanol, 10% acético). Cuando las proteínas iban a ser transferidas a membranas, se utilizaron marcadores pretenidos. **Inmunodetección de proteínas (Western blot).** Las proteínas resueltas por PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF ("Immobilon-[®]P", Millipore) según protocolos estándar. La transferencia en semisecco fue efectuada en un aparato Novablot 217-250 (LKB), o bien, Trans-blot TDS solvent dry transfer kit (Biorad), durante 1h a 2 mA/cm² en presencia de tampón de transferencia. Posteriormente las membranas fueron saturadas con leche desnatada 3% en tampón TBS-Tween (Sigma) durante 20 minutos e incubadas con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tween 1/5,000 dilución, al menos, 45 minutos. Tras 3 nuevos lavados las señales de reconocimiento por los anticuerpos fueron detectadas con el sistema ECL ("Enhancer Chemi Luminescence", Western blotting analysis system, Amersham International). Los anticuerpos primarios contra NrcD, DnrB y DnrT fueron obtenidos por inmunización con las correspondientes proteínas sobreexpresadas en *E. coli* BL21(DE3) desde los vectores pET22b y pET28b. Las proteínas fueron purificadas parcialmente, corridas en un gel de SDS-PAGE al 10% y enviadas a la empresa Charles River Laboratories (Chalonne, France) para la inmunización de conejos. Ya en nuestro laboratorio, los antisueros fueron incubados durante dos horas con células de *E. coli* BL21(DE3), eliminando las células por centrifugación, y el suero así limpiado fue precipitado tres veces con NH₄SO₄ 70% (Merck) y dializado toda la noche contra NaCl 0.85% pH 8 (ajustado con NaOH) a 4°C. Los antisueros fueron almacenados congelados a -20°C en partes alcuotas. **Cuantificación y determinación del tamaño de proteínas** La concentración de proteína en los extractos fue determinada mediante el método del bicinoninato sólido (BCA) (Pierce, Rockford, IL), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para la determinación del grado de oligomerización de DnrT se emplearon las resinas superdex G-75 y G-200 (Pharmacia Fine Chemicals) empaquetadas con tampón HEPES 20 mM pH 6.8, NaCl 150 mM, glicero 10%, DTT 1 mM. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 10 l conteniendo 0.3 pmol de promotor etiquetado como molde (Pnar, PTTar, Prrc, y Prrr) y 50 µg de proteína (Pnar, PTTar, Prrc, y Prrr) e incubada durante 1 min a 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 3 µl de EDTA 0.2 M, 6 µl de SDS 5%. La incubación se llevó a cabo a 65°C durante 20 min y posteriormente en hielo por 10 minutos más. Tras precipitar con etanol absoluto frío empleando 1 µl de tRNA (Sigma), las muestras fueron evaporadas en una centrifuga de vacío (speed-vac) y finalmente resuspendidas en tampón de carga 1X para RNA. Las muestras radiactivas fueron electrólisis y cargadas en un gel de secuencia al 6% (39:1) con urea 8 M. Ensayo de protección frente a permanganato potásico La reacción se llevó a cabo en 15 µl con tampón HEPES 8 mM pH 7.5, MgCl₂ 6 mM, BSA 100 µg/ml conteniendo el promotor Prrr descrito en el apartado anterior en un volumen final de 10 µl, el resto de la mezcla de reacción a 130 µg/ml de BSA, 50 µg/ml de tRNA y 50 µg/ml de tRNA de 180 µg de tRNA (0.4 pmol) de RNA polimerasa (core u holenzima). La mezcla se incubó por 10 minutos más a 50°C permitiendo así a formación del complejo binario. El KMnO₄ se utilizó como agente químico para mapear zonas donde el DNA está desapareado (i.e. burbuja de transcripción) porque aunque los residuos de timidina son potencialmente modificables (oxidables) al añadir 3 µl de permanganato potásico 5 mM (Sigma) recién preparado, tienen sensibilidad preferente a nucleótidos presentes en cadena simple. Tras 30 s a 50°C la reacción fue detenida con 12 µl de tampón parador (acetato amónico 0.6 M (Merck), DTT 0.1 mM (Sigma), DNA de tiempo de temera 0.1 mg/ml (Sigma) y se precipitó con 90 µl etanol absoluto frío (Merck). El corte de las TS modificadas por el KMnO₄ es promovido por la incubación con 90 µl de piperidina al 10% (Sigma) durante 30 minutos a 90°C y posterior análisis en geles de secuencia de salmón (Sigma) como control inespecífico. La purificación contenía approx. 50% de moléculas calcitamicamente activas (Laptonk y Sorukhov, 2003; Vassilyeva y col., 2002). La reconstitución de la holenzima se realizó mediante combinación de 0.5 mg de rRNAPc con 0.15 mg de factor recombinante [³²S]-Gla o [³⁵S]-Gla (de *T. thermophilus* (relación molar 1:1.4) en 1ml de tampón MOPS 50 mM pH 6.7, KCl 40 mM, DTT 1 mM) tal y como describe (Nishiyama y col., 1999; Vassilyeva y col., 2002). Ensayos de sensibilidad a la tripsina Los cultivos de la cepa silvestre NAR1 portando los plásmidos pMUR50nR o pWURdnT fueron crecidos a 70°C en medio TB sin nitrato en condiciones aeróbicas (en 1/5 de la capacidad del matraz y 180 rpm de agitación) hasta alcanzar 0.5 u.d.O₆₀₀ o bien sin agitación durante toda la noche para limitar la difusión del oxígeno. A continuación se centrifugaron las células y se fraccionaron por sonicación (Braun Labsonic; pulsos de 0.7 s durante 1 minuto a la máxima potencia) en tampón TS 1X, antes de su

contiene	etuvio
hivierende	is por
Western I	l-NTA
(Qiagen)	95
incubado	y se
discontin	hiente
incubó la	alo se
de centel	ador

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Todos los materiales empleados en este trabajo se describen en el Anexo I: las cepas bacterianas empleadas u obtenidas se describen en la tabla 1; los plásmidos utilizados y los construidos se describen respectivamente en las tablas 2 y 3; los oligonucleótidos empleados se describen en las tablas 4 y 5; y los tampones y antisueros empleados se describen respectivamente en las tablas 6 y 7.

3.2. Métodos microbiológicos

Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

T. thermophilus fue crecido a 65-70°C, en medio rico TB hecho con de agua mineral (Fontjaraba, Zaragoza) (Fernandez-Herrero y col., 1995a). En medios sólidos se añadió 1.5 % (p/v) de agar y las placas se incubaron, a esa misma temperatura en una cámara húmeda. En los casos en los que se precisó de ambiente anóxico se añadió generador de CO₂ (Anaerocult^R C mini, Merck). En los experimentos de selección se añadió kanamicina (30 µg/ml), bleomicina (15 µg/ml) y/o higromicina (50 µg/ml).

El medio mínimo utilizado fue el descrito por Degryse, (Degryse y col., 1978) añadiendo además la mezcla de micronutrientes indicada por Tanaka (Tanaka y col., 1981).

E. coli creció a 37°C con agitación en medio rico LB (Lennox, 1955), o en placa añadiendo 1.5 % (p/v) de agar al mismo medio. Cuando fue necesario se incluyeron los antibióticos: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), bleomicina (3 µg/ml) y/o higromicina (100 µg/ml). Para seleccionar recombinantes por actividad α -galactosidasa se añadió X-Gal (Roche) en la placa de selección, a una concentración final de 40 µg/ml.

La conservación de las estirpes se realizó a -70°C (en ausencia de plásmidos), bien en forma de sedimento celular seco para el caso de *T. thermophilus* o bien empleando glicerol 40% (concentración final) como crioprotector para *E. coli*.

El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la D.O₅₅₀ en un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

Crecimiento de T. thermophilus en distintas condiciones de oxigenación

El crecimiento en aerobiosis se produjo en matraces rellenos con medio de cultivo hasta 1/5 de su capacidad, sometidos a 150 rpm de agitación. La inducción de la nitrato reductasa, así como del resto de las enzimas de respiración anaeróbica, se logró mediante cultivos estáticos a 60-70°C (matraz a 1/3 de su capacidad) o bien en tubos de tapón a rosca. El crecimiento es iniciado en aerobiosis, y cuando el cultivo se encuentra aproximadamente a 0.5 unidades de D.O₅₅₀, se detiene la aireación y se añade el óxido de nitrógeno apropiado (nitrato 40 mM (Merck), nitrito 5

mM (Sigma), nitroprusiato sódico 0.1 mM (SNP, Sigma)). En estas condiciones el oxígeno es consumido rápidamente permitiendo a la bacteria la utilización de aceptores finales de electrones alternativos. Si no se especifica lo contrario, la inducción microaerofílica se llevó a cabo durante cuatro horas.

Los cultivos en anaerobiosis se consiguieron creciendo las células en estático, en tubos de cristal de 10 ml con tapón a rosca, rellenos con unos 8 ml de medio de cultivo suplementado con 40 mM de nitrato potásico o 5 mM de nitrito potásico, y cubiertos con aceite de vaselina (Panreac) después de la inoculación. Para la detección de óxidos de nitrógeno gaseosos durante la desnitrificación se incorporarán campanas Durham en el interior de los tubos.

Los crecimientos anaeróbicos de cepas desnitrificantes parciales (PD) o completas (CD) empleando óxidos de nitrógeno se llevó a cabo en botellas de 25 ml de capacidad rellenas con 15 ml de medio de cultivo TB diluido a la mitad (TB ½) y cerradas herméticamente a las que se les sustituyó el oxígeno del espacio vacío por el óxido de nitrógeno adecuado (NO y N₂O al 99% en N₂, Airliquid). Las botellas inoculadas fueron incubadas durante 3 a 6 días a 70 °C antes de tomar muestras para los conteos de viabilidad.

Transformación bacteriana

La competencia en *E. coli* fue inducida mediante el método de Inoue (Inoue y col., 1990). Las transformaciones se realizaron siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1985). En algunos casos, las células competentes de la cepa INV α F⁺ fueron adquiridas a Invitrogen y se transformaron siguiendo las instrucciones de esta casa comercial.

Las células de *T. thermophilus* fueron transformadas por competencia natural (Koyama y col., 1986), añadiendo 0.1-5 μ g de DNA a 0.5 ml de cultivo en fase exponencial (aprox. 0.5 u.D.O₅₅₀) en medio de crecimiento TB preparado con agua mineral Fontjaraba. Tras la transformación, las células fueron incubadas a su temperatura de crecimiento el tiempo necesario para la expresión de los genes de resistencia al antibiótico correspondiente, una hora para la ampicilina y 2 horas para la kanamicina en *E. coli*, y 4 horas para expresar la resistencia frente a cualquier antibiótico en *Thermus*. La selección fue llevada a cabo en placas con los antibióticos adecuados.

Excepcionalmente, las células de *T. thermophilus* fueron electrotransformadas. Para ello dejamos crecer los cultivos hasta 0.5 u.D.O₅₅₀, los lavamos por centrifugación dos veces en glicerol 10% (Merck) en H₂O MiliQ y resuspendimos las células en 1/100 del volumen inicial en esa misma solución. 100 μ l de estas células fueron incubadas con el DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente las sometimos a un campo eléctrico de 12,500 V/cm (Equibio, Easyject Plus D2000; 2500 V, 201 y 25 μ F, en cubetas de 0.2 cm de grosor, 5 ms).

Ensayo de interacciones entre proteínas mediante doble híbrido

Los ensayos de doble híbrido bacteriano descritos en este trabajo son fruto de una colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Gerard Giordano, trabajo que fue supervisado por el Dr. Francis Blasco en el CNRS de Marsella (Cava y col., 2004; Zafra, 2004; Zafra y col., 2005).

Para ello empleamos un sistema bacteriano basado en la reconstitución funcional de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (Karimova y col., 1998; Karimova y col., 2000a, b; Karimova y col., 2002). Las proteínas a ensayar se fusionan al dominio T25 de la mencionada enzima (Cya) como región C-terminal en el plásmido pT25 (Cm^r) o pKT25 (Kan^r) o bien como región N-terminal en el plásmido pKNT25 (Kan^r). El segundo dominio de esta enzima (T18) se fusiona con la segunda proteína a ensayar que queda en su región N-terminal, en el plásmido pT18. Dada la posibilidad de que alguna de las fusiones comprometa los dominios implicados en la interacción, cada gen es clonado siempre en todos los vectores para generar fusiones en los extremos N- y C-terminal (anexo I, tabla 3). Para el estudio de la interacción entre proteínas de membrana (Karimova y col., 2005), se emplean los vectores pT18 y pKNT25, los cuales expresan proteínas de fusión sin bloquear el péptido señal. Las parejas de plásmidos se introducen en la cepa de *E. coli* BTH101 (*cya*⁻) y se realiza el ensayo tal y como aconseja el proveedor (Hybrigenics S. A., Paris, (Karimova y col., 2002)). Finalmente se mide la actividad β -galactosidasa de los extractos (a 28°C) tal y como describe Miller (Miller, 1992).

Para validar la fiabilidad de este doble híbrido mesófilo en el estudio de interacciones entre proteínas termofilas se ensayó la formación del homotrímero de la glutamato deshidrogenasa (Gdh) de *T. thermophilus* NAR1 (resultados de ultracentrifugación analítica sin publicar). Se usó también, el control positivo descrito para estos ensayos con los plásmidos pT18zip y pT25zip (Karimova y col., 2000a, b), y como controles negativos coexpresiones entre cada derivado con el gen de estudio (X-T18, T25-Y, Y-T25) y los derivados zip (Zip-T18, T25-Zip) (anexo I, tabla 3).

3.3. Manipulación de ácidos nucleicos

Preparación de DNA

El DNA plasmídico de *E. coli* se obtuvo desde cultivos saturados y se usó indistintamente, el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989) o bien kits basados en la unión del DNA a una columna de sílice (Wizard Plus SV Minipreps de Promega), en este último caso se siguieron las instrucciones del fabricante. Para la preparación de DNA plasmídico en grandes cantidades se usó el kit "midiprep" de Qiagen siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

El DNA total de *Thermus* fue aislado a partir de 1.5 ml de cultivo en saturación, siguiendo el protocolo básico descrito por Marmur (Marmur, 1961). Las células recogidas por centrifugación fueron lavadas (Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM) y resuspendidas en 50 μ l del tampón TES (Anexo I, tabla 6), al que se añadió 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 sarkosil al 0.5% (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 a 3 mg/ml (Sigma) durante 30 minutos. Por último, las preparaciones fueron congeladas y descongeladas varias veces con fuerte agitación antes de ser 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) o 0.7 volúmenes de isopropanol (Merck) y acetato amónico pH 5 hasta una concentración final de 100 mM, y resuspendido en 20 µl de agua milli-Q. Mediante este protocolo se obtienen habitualmente fragmentos de DNA de un tamaño medio de 25 kpb, apropiados para el análisis por Southern-blot o para ser utilizados como molde en ensayos de PCR.

Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)

En general se utilizaron la DNA polimerasa de *T. aquaticus* (*Taq*, Perkin Elmer), o la de *T. thermophilus* (*Tth*, Biotools B&M), y sólo para amplificaciones en las que era requerida alta fidelidad y procesividad se empleó la DNA polimerasa de *P. furiosus* (*Pfu*, Biotools B&M), siguiendo las indicaciones de la casa comercial y añadiendo 10% DMSO, 2.5 mM de MgCl₂ (a no ser que se especifique lo contrario).

En determinados casos en los que procesividad de la polimerasa no garantizaba la amplificación del molde (PCR largas y RT-PCR de alto G+C), añadimos proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) de *T. thermophilus* a la mezcla de reacción, con variaciones de entre 1-10 ng/reacción en dependencia del tamaño del DNA amplificado (Perales y col., 2003). El molde utilizado fue DNA purificado, o bien 5 µl de cultivo de *E. coli* crecido hasta 0.2 u.D.O₅₅₀ a la premezcla de PCR, para la comprobación de clonajes. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y colaboradores (Ausubel y col., 1994). Se han utilizado distintos termocicladores (Perkin Elmer Cetus 9600, MinicyclerTM MJ Research PTC 15 o Bio-Rad iCycler).

Técnicas de clonaje de DNA

La digestión del DNA fue llevada a cabo siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial (New England Biolabs, Roche y MBI Fermentas). Para generar fragmentos de DNA con extremos romos a partir de extremos protuberantes 5', se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche) durante 15 minutos a 30°C, en presencia de 0.25 mM de una mezcla igualada de dNTPs. En el caso de extremos 3' protuberantes, se usaron las mismas condiciones pero en ausencia de dNTPs.

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo con DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs). Se utilizaron las condiciones recomendadas por la casa comercial. Los productos de PCR obtenidos por amplificación con *Taq* o *Tth* polimerasa se subclonaron en el vector PCR 2.1 (Invitrogen) o en pGEM-T easy (Promega) siguiendo las recomendaciones de la

casa comercial. Si fueron amplificados con la polimerasa *Pfu*, la ligación se efectuó en pBluescript (Stratagene) digerido previamente con *EcoRV*.

Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó rutinariamente en geles de agarosa 1% (p/v) (Sigma, Low EEO), preparados y corridos en tampón TAE 1X (anexo I, tabla 6). Para purificar fragmentos a partir de estos geles se usó el kit PCR-Prep de Promega según las instrucciones del fabricante. En los casos en los que el fragmento de DNA era demasiado pequeño para utilizar este método, empleamos las columnas Millipore Ultrafree-DA, basadas en la tamización física de la agarosa. Posteriormente, el DNA disuelto en TAE 1X que se obtiene, fue precipitado y resuspendido en un volumen apropiado de agua.

Marcaje isotópico del DNA

El DNA producto de PCR u obtenido por digestión a partir de plásmidos fue marcado isotópicamente con ^{32}P siguiendo los protocolos descritos en los manuales de laboratorio (Sambrook y cols., 1989; Ausubel y cols., 1994).

Para la incorporación homogénea de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ($>3,000\text{ Ci/mmol}$, Amersham) empleamos una mezcla de hexanucleótidos degenerados (PharmaciaLKB) como iniciadores y el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche). Alternativamente, empleamos la Polinucleótido kinasa (PNK, New England Biolabs) para marcar los extremos 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ($>6,000\text{ Ci/mmol}$) (Amersham) como desoxinucleótido radioactivo. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando minicolumnas de sephadex G-50 (Sambrook y cols., 1989).

Paseo cromosómico e hibridación sobre réplica de placa

Los extremos del operón *nar* se caracterizaron mediante la técnica de paseo cromosómico empleando una genoteca de *T. thermophilus* NAR1 construída en pUC119 (Fernandez-Herrero y col., 1995b). Para ello, usamos una sonda de la región conocida de los extremos del operón *nar* obtenida por PCR y marcada radiactivamente como se ha detallado en el apartado anterior. A continuación se transferían a filtros de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) varias placas de LB con un número de colonias (2,500-5,000) que representaran aprox. 5-10 veces el tamaño del genoma de *T. thermophilus* (1.81 Mpb), que fueron procesadas e hibridadas con las sondas anteriores, tal y como describe Sambrook (Sambrook y col., 1989). Los clones positivos de la hibridación fueron comprobados por restricción múltiple y secuenciación, sirviendo nuevamente como moldes para aislar una nueva sonda y así continuar el paseo cromosómico.

Southern-blot

El DNA fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas al cada caso, sometido a electroforesis en gel de agarosa, y tratado como se describe en (Sambrook) para transferir por capilaridad los fragmentos separados a filtros de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Tras fijar el DNA por radiación ultravioleta (Gene Linker, BioRad), se procedió a la saturación (1 hora a 65°C en Denhardt 5X, SSC 6X, SDS 0.2%, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml (Sigma) y a la hibridación con la sonda adecuada a 55°C durante 16 horas en los 10 ml de la solución anterior. La sonda no unida fue eliminada mediante tres lavados sucesivos de 10 minutos a 65°C en SSC 2X, SDS 0.1%.

En los casos en que deseábamos rehibridar la membrana, la señal radiactiva anterior previa fue eliminada mediante ebullición en SDS 0.1% durante, al menos, 15 minutos.

Detección de mRNA

El RNA de *T. thermophilus* fue extraído empleando el “Tri-reagent-Is kit” (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) y la presencia de mRNA específicos fue detectada por Northern blot o mediante RT-PCR semicuantitativa. Para Northern blot, el RNA fue separado en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído (Sambrook y col., 1989) al 1% y posteriormente transferido por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). El mRNA se detectó con oligonucleótidos marcados con fluoresceína-11-dUTP utilizando el preparado comercial “Gene Images 3'-oligolabeling module” y ECL ambos de Amersham Pharmacia Biotech.

Para la RT-PCR semicuantitativa se emplearon una pareja adecuada de oligonucleótidos (anexo I, tabla 4A) y el kit Ready-To-Go™ (Amersham Biosciences).

Ensayos de extensión del cebador

La identificación del origen de transcripción se realizó mediante ensayos de extensión del cebador, empleando oligonucleótidos que hibridaban a una distancia de 100 a 150 pb del inicio marcados con [γ ³²P]-dATP en 5'. La retrotranscripción del mensajero se realizó bien con la enzima AMV (Promega) o bien mediante el kit Retrotools (Biotools B&M) siguiendo en ambos casos las indicaciones de los fabricantes. Tras la extensión, incubamos cada muestra con 0.5 µl de RNasa A (libre de DNasa) preparada a una concentración de 2 mg/ml durante 1 hora a 37°C, guardando el producto a 4°C en ausencia de luz. Estas muestras fueron analizadas en un gel de acrilamida 6% con urea 8 M corrido durante toda la noche. Como patrón de tamaño se utilizó el perfil de bandas de una reacción de secuenciación de la zona en cuestión con el mismo oligonucleótido (Ausubel y col., 1994).

3.4. Manipulación de proteínas

Preparación de extractos para electroforesis

Para la obtención de proteínas totales, las células fueron concentradas y lavadas en tampón TS por centrifugación suave, y resuspendidas en tampón de ruptura de Laemmli 1X. Tras hervirlas durante 10 minutos y eliminar los restos insolubles de la envoltura celular, las proteínas solubilizadas fueron separadas en geles de SDS-PAGE para su análisis.

Para separar las fracciones soluble e insoluble de ambos microorganismos, se procedió a recoger y lavar las células como antes, pero éstas fueron resuspendidas en un volumen variable entre 300 μ l y 1 ml de tampón TS conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini de Roche, una pastilla por cada 10 ml de tampón). La ruptura de las células se llevó a cabo por sonicación (2 pulsos de 30 segundos–1minuto en un aparato LABSONIC U ,B. Braun, potencia: máxima; intensidad: alta; frecuencia de ciclo: 0.7 s). Las células no rotas fueron eliminadas por centrifugación a baja velocidad (2,000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 3 minutos, 4°C). , y las fracciones soluble e insoluble fueron separadas mediante dos ciclos de centrifugación a alta velocidad (14,000 rpm, Hettich Zentrifugen Mikro, 45 minutos, 4°C). La fracción insoluble fue resuspendida en un volumen igual a la fracción soluble del tampón usado. Para el análisis por SDS-PAGE hervimos las muestras en tampón de Laemmli 1X, retirando los fragmentos insolubles de la fracción particulada por centrifugación.

En algunos casos en los que la gran cantidad de masa celular, o la necesidad de un tratamiento más suave, así lo aconsejaban, se separaron las fracciones soluble e insoluble de células rotas por abrasión con alúmina (Sigma). En estos casos, mezclamos cantidades iguales de masa celular húmeda y de alúmina, rompiendo las células a 4 °C con mortero manual de porcelana, añadiendo las cantidades mínimas necesarias de tampón TS con inhibidor de proteasas. Una vez eliminada la alúmina y las células no rotas por centrifugación doble (5.000 x g 3 minutos, 4°C, se procedió a separar las fracciones solubles y particuladas por centrifugación como en el caso anterior.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación electroforética de proteínas se realizó mediante geles de SDS-poliacrilamida (PAGE) discontinuos: 4% de acrilamida:bisacrilamida 29:1 en la parte del concentrador y 8-15% de acrilamida:bisacrilamida 37.5:1 en el separador (Laemmli y Favre, 1973). En algunos casos empleamos geles de poliacrilamida comerciales NuPAGE (Invitrogen) con gradiente del 4 al 20% de acrilamida. Como marcadores de tamaño se emplearon mezclas estandar de Biorad. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie (0.25% Brilliant Blue-R de Sigma Aldrich en 45% metanol, 10% acético). Cuando las proteínas iban a ser transferidas a membranas, se utilizaron marcadores preteñidos.

Inmunodetección de proteínas (Western blot)

Las proteínas resueltas por PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF ("Immobilón-P", Millipore) según protocolos estandar. La transferencia en semiseco fue efectuada en un aparato Novablot 2117-250 (LKB), o bien, Trans-blot SD semi-dry transfer cell (Biorad), durante 1h a 2 mA/cm² en presencia de tampón de transferencia. Posteriormente las membranas fueron saturadas con leche desnatada 3% en tampón TBS-Tween (Sigma) durante 20 minutos e incubadas con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tween 1/5,000 (si no se especifica lo contrario) durante, al menos, 1 hora. Tras 3 lavados de entre 5 y 10 minutos en TBS-Tween, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario diluido en TBS-Tween 1/5,000 durante, al menos, 45 minutos. Tras 3 nuevos lavados las señales de reconocimiento por los anticuerpos fueron detectadas con el sistema ECL ("Enhancer Chemi Luminiscence", Western blotting analysis system, Amersham Internacional).

Los anticuerpos primarios contra NrcD, DnrS y DnrT fueron obtenidos por inmunización con las correspondientes proteínas sobreexpresadas en *E. coli* BL21(DE3) desde los vectores pET22b y pET28b. Las proteínas fueron purificadas parcialmente, corridas en un gel de SDS-PAGE al 10% y enviadas a la empresa Charles River Laboratories (Chalarnone, France) para la inmunización de conejos. Ya en nuestro laboratorio, los antisueros fueron incubados durante dos horas con células de *E. coli* BL21(DE3), eliminando las células por centrifugación, y el suero así limpiado fue precipitado tres veces con NH₄SO₄ 70% (Merck) y dializado toda la noche contra NaCl 0.85% pH 8 (ajustado con NaOH) a 4°C. Los antisueros fueron almacenados congelados a -20°C en partes alícuotas.

Cuantificación y determinación del tamaño de proteínas

La concentración de proteína en los extractos fue determinada mediante el método del bicinconinato sódico (BCA) (Pierce. Rockford, IL), siguiéndose las recomendaciones de la casa comercial.

Para la determinación del grado de oligomerización de DnrT se emplearon las resinas superdex G-75 y G-200 (Pharmacia Fine Chemicals) empaquetadas con tampón HEPES 20 mM pH 6.96, NaCl 150 mM, glicerol 10%, EDTA 1 mM, DTT 2 mM en columnas semipreparativas de 1.5X90 cm (Pharmacia Fine Chemicals). Como marcadores para la recta patrón de ajuste empleamos: BSA (67 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa) y Citocromo C (12.4 kDa). V:0.4 ml/min (Sigma).

Sobreexpresión y purificación de proteínas

La expresión de los genes clonados en vectores de la serie pET (Novagen) fue llevada a cabo en *E. coli* BL21(DE3) crecida en medio LB con 0.1% de glucosa y con los antibióticos adecuados para la selección plasmídica (ampicilina o kanamicina). Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial (aprox. 0.5 u.D.O₅₅₀) se añadió IPTG (0.1-1 mM) para forzar la expresión

dependiente de *Plac* de la RNA polimerasa del fago T7, necesaria para la expresión de los genes clonados en estos vectores, manteniéndose el cultivo en las mismas condiciones durante un mínimo de 4 horas.

Para la purificación de proteínas con etiquetas de polihistidinas, se partió de los extractos solubles de *E. coli* BL21(DE3) en tampón TS 1X (a no ser que se especifique lo contrario) que contenían la proteína sobreexpresada. Esta fracción fue incubada con la resina de afinidad de Ni-NTA-agarosa (Qiagen), previamente equilibrada con el mismo tampón según las indicaciones de la casa comercial. La proteína fue eluida en columna o en líquido por competición con concentraciones crecientes de imidazol (Merck) o EDTA (Merck).

Purificación y reconstitución de la RNA polimerasa de Thermus thermophilus

El core de la RNAP de *T. thermophilus* HB8 fue purificada tal y como se describe en (Vassilyeva y col., 2002), con un rendimiento de aprox. 8 mg de proteína (>95% pura) por 100 g de sedimento celular húmedo. Mediante ensayos de transcripción *in vitro* se determinó que la purificación contenía aprox. un 80% de moléculas catalíticamente activas (Laptenko y Borukhov, 2003; Vassilyeva y col., 2002).

La reconstitución de la holoenzima se realizó mediante combinación de 0.5 mg de thRNAPc con 0.15 mg del factor recombinante σ^{70} (SigA) o σ^E (SigE) de *T. thermophilus* (relación molar 1:1.4) en 1ml de tampón MOPS 50 mM pH 6.7, KCl 40 mM, DTT 1 mM) tal y como describe (Nishiyama y col., 1999; Vassilyeva y col., 2002).

Ensayos de sensibilidad a la tripsina

Los cultivos de la cepa silvestre NAR1 portando los plásmidos pWURdnrS o pWURdnrT fueron crecidos a 70°C en medio TB sin nitrato en condiciones aeróbicas (en 1/5 de la capacidad del matraz y 180 rpm de agitación) hasta alcanzar 0.5 u.D.O₅₅₀, o bien sin agitación durante toda la noche para limitar la difusión del oxígeno. A continuación se centrifugaron las células y se fraccionaron por sonicación (Braun Labsonic; pulsos de 0.7 s durante 1 minuto a la máxima potencia) en tampón TS 1X, antes de su separación en fracciones soluble y particulada por ultracentrifugación a 4°C y 150,000 x g durante 15 minutos (Beckman TL-100 ultracentrifuge).

La sensibilidad a la tripsina fue ensayada en 80 μ l de fracción celular soluble conteniendo 2 mg/ml de proteína. A continuación se añadió a las muestras, 2 μ l de tripsina (5 mg/ml en HCl 1 mM (Merck)) y se incubaron a temperatura ambiente durante los tiempos indicados. La digestión se detuvo hirviendo las muestras en tampón de Laemmli (Sambrook y col., 1989), y finalmente las proteínas fueron separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE (Sambrook y col., 1989). DnrS y DnrT fueron identificadas por Western blot con sus antisueros específicos.

3.5. Ensayos de interacción DNA-proteínas

Ensayos de afinidad de unión entre DnrT y promotores en columna

Se unió 1 µg de 6His-DnrT (38.4 pmol) a 10 µl de agarosa Ni-NTA (Qiagen). El tampón empleado fue (HEPES 20 mM pH 6.9, NaCl 50 mM, glicerol 10%, BSA 0.1 mg/ml, β-mercaptoetanol 5 mM). Se añadieron 4 ng (0.03 pmol) de promotor *Pnrc* marcado aleatoriamente con α³²P-dATP y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón y comprobar que la fuerza iónica no bastaba para deshacer la unión específica de *Pnrc* por DnrT (³²P-*Pnrc*-DnrT), se añadió un gradiente discontinuo de cantidades crecientes (0, 0.3, 3, 15 pmol) de *Pnrc* (234 bp), *Pnar* (209 bp), *Pnqo* (451 bp) y *T7A1* (270 bp) para competir con el promotor *Pnrc* radiactivo por el dominio de unión a DNA de DnrT. En paralelo se incubó la proteína DnrT SR/AL al mismo tipo de resina Ni-NTA para confirmar la implicación del dominio hélice-girohélice de DnrT en la unión al promotor. La radiactividad unida a la columna fue medida mediante contador de centelleo y los datos numéricos representados gráficamente.

Ensayo de protección frente a la DNasa I

El oligonucleótido (FP *Pnrc*rev) fue marcado en su extremo 5' con γ-ATP (Amersham Biosciences) empleando la actividad de la Polinucleótido quinasa tal y como indica el proveedor (New England Biolabs), y a continuación fue utilizado para amplificar el promotor *Pnrc* (³²P-*Pnrc*) junto con el cebador FP *Pnrc*dir. Los ensayos de protección de *Pnrc* frente a la DNasa I se llevaron a cabo siguiendo el protocolo general detallado por (Ausubel y col., 1994), usando 20 µl de tampón de reacción para la DNasa I (HEPES 8 mM (Sigma) pH 7.5, MgCl₂ 6 mM, BSA 100 µg/ml (ultrapura para *in vitro*, Roche)) conteniendo 1 µg (7 pmol) de molde marcado (³²P-*Pnrc*) (15,000 cpm/reacción) e incluyendo 2 µg de DNA competidor [dl-dC] (Sigma).

Se incubaron las muestras durante 5 minutos a 50°C en presencia de distintas cantidades (5, 10, 50 pmol) de DnrT o de su mutante SR/AL (no mostrado). La reacción comenzó añadiendo 2 µl de DNasa I (New England Biolabs) diluída 1/50 en tampón 1X e incubada durante 1 min at 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 3 µl de EDTA 0.2 M, 6 µl de SDS 5%. La incubación se llevó a cabo a 65°C durante 20 min y posteriormente en hielo por 10 minutos más. Trás precipitar con etanol absoluto frío empleando 1 µg de tRNA (Sigma), las muestras fueron evaporadas en una centrífuga de vacío (speed-vac) y finalmente resuspendidas en tampón de carga 1X para RNA. Las muestras radiactivas fueron equilibradas y cargadas en un gel de secuencia al 6% (39:1) con urea 8 M.

Ensayo de protección frente a permanganato potásico

La reacción se llevó a cabo en 15 µl con tampón HEPES 8 mM pH 7.5, MgCl₂ 6 mM, BSA 100 µg/ml) conteniendo el promotor ³²P-*Pnrc* descrito en el apartado anterior, que servirá de molde (40 ng, 0.3 pmol). Se incubó a 50°C durante 10 min en presencia de 130 ng (5 pmol) de DnrT o de

su mutante SR/AL y/o de 180 ng (0.4 pmol) de RNA polimerasa (core u holoenzima). La mezcla se incubó por 10 minutos más a 50°C permitiendo así a formación del complejo binario. El KMnO_4 se utilizó como agente químico para mapear zonas donde el DNA está desapareado (p.e. burbuja de transcripción) porque aunque los residuos de timidina son potencialmente modificables (oxidables) al añadir 3 μl de permanganato potásico 5 mM (Sigma) recién preparado, tienen sensibilidad preferente aquellos presentes en cadena simple. Tras 30 s a 50°C la reacción fué detenida con 12 μl de tampón parada (acetato amónico 0.6 M (Merck), DTT 0.1 M (Sigma), DNA de timo de ternera 0.1 mg/ml (Sigma)) y se precipitó con 90 ml etanol absoluto frío (Merck). El corte de las Ts modificadas por el KMnO_4 es promovido por la incubación con 90 μl de piperidina al 10% (Sigma) durante 30 minutos a 90°C y posterior análisis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% (39:1) con urea 8M. Los carriles de C y C+T usados como marcadores fueron preparados por métodos estandarizados descritos en (Ausubel y col., 1994).

Ensayos de reclutamiento de la RNA polimerasa

Los experimentos de reclutamiento de la RNA polimerasa fueron realizados en tampón HEPES 20 mM pH 6.9, NaCl 50 mM, glicerol 10 mM, BSA 0.1 mg/ml (ultrapura, Roche), β -mercaptoetanol 5 mM, MgCl_2 8 mM. El promotor *Pnrc* fue modificado por biotilación en su extremo 5' (cebador *Pnrcdir* avidin) y posteriormente unido a una resina activada con streptavidina (ImmunoPure Immobilized Streptavidin Gel, Pierce) previamente equilibrada en el mismo tampón.

Para cada reacción, se incubaron 0.2 μg de *Pnrc*/resina a 25°C con 1 μg of DnrT o con la misma cantidad de su mutante en SR/AL, en presencia de 2 μg de DNA de esperma de salmón (Sigma) como competidor inespecífico. A continuación, se añadieron 2 μg de RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* HB8 (core u holoenzima con SigA). Se usaron muestras de *Pnrc*-resina sin DnrT como control negativo. Después de 15 min a 50°C en un volumen final de 20 μl , y tras 3 lavados consecutivos con 300 μl del tampón de ensayo, la proteína unida a la columna fue eluída suplementando el tampón con 1% de SDS y posteriormente analizada en geles desnaturizantes en gradiente 4%-20% comerciales (NuPAGE Bis-Tris gradient gel, Invitrogen) teñidos con azul de Coomassie (Brilliant Blue-R, Sigma).

Transcripción in vitro con RNA polimerasa de T.thermophilus

Para reacciones de transcripción *in vitro*, DnrT fué purificado con columna G-50 QuickSpin column (Roche) pre-equilibrada con tampón de transcripción (TB) MOPS 50 mM, pH. 6.5, KCl 40 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 0.1 mM. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 10 μl conteniendo 0.3 pmoles del promotor elegido como molde (*Pnar*, *PT7A1*, *Pnrc*, *Pnqo*), 1.75 pmoles de holoenzima portando bien la subunidad SigA o SigE y 5 pmoles of DnrT (silvestre o mutante SR/AL). La premezcla de reacción se precalentó a 60°C por 4 minutos y el ensayo fue iniciado al añadir la mezcla de NTPs a concentraciones finales de: GTP 0.8 mM, ATP 0.8 mM, CTP 0.1 mM,

UTP 0.2 mM (Roche) incluyendo 0.25 μ l/10 μ l de reacción de [α - 32 P]-CTP (Amersham) en presencia de 0.1 μ l/10 μ l de reacción de RNasin[®] Plus (Promega). Las reacciones fueron detenidas con un tampón compuesto de formamida desionizada al 90% (Pierce), 50 mM EDTA, azul de bromofenol (Merck), y verde xilencianol (Merck) y posteriormente cargadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes 16%-23% con 8 M de urea.

El tamaño y la localización respecto al origen de traducción de las regiones promotoras incluidas es estos ensayos fueron: de -207 a +28 para *Pnrc* (235 bp), de -784 a +6 (790 bp) y de -211 a +1 (212 bp) para *Pnar*, y de -448 a +3 para *Pnqo* (451 bp). El promotor *PT7A1* de 270 bp fue empleado como control en varios ensayos (Nudler y col., 1997).

3.6. Métodos de fisiología molecular

Generación de mutantes

Los mutantes de inserción *nrc::kat* y *dnrS::kat* fueron obtenidos mediante transformación de *T. thermophilus* NAR1 con DNA plasmídico (pUP2nrcNkat, pUP1BdnrSkat) lineal portando el gen en cuestión, interrumpido por el cassette *kat* en la posición que se indica en el anexo I (tabla 3). En todos los casos, los mutantes fueron confirmados por Southern blot, PCR e inmunodetección con anticuerpos específicos (anti-DnrS).

El plásmido pK18 es un derivado del pUC18, usado como vector integrativo o suicida en *Thermus*, seleccionable a través del *kat*, y que puede generar mutantes de inserción (Cava y col., 2004; Cava y col., 2007), de delección (Laptenko y col., 2006) o sustituciones alélicas portando cambios puntuales (Cava y col., 2007). Los mutantes de inactivación de *dnrT* fueron aislados mediante inserción del plásmido pK18 Δ NtCt-dnrT por recombinación, el cual porta un fragmento central de *dnrT* (posiciones +101 a +548) obtenido por PCR con los cebadores dnrTEcoRI y dnrTBamHI (anexo I, tabla 4A). Esta construcción se empleó directamente para transformar células de *T. thermophilus* NAR1 por competencia natural. Las colonias resistentes a kanamicina transcurridas 48 horas, generan dos copias inactivas de *dnrT*: una carente del extremo N-terminal y la otra del C-terminal y fueron comprobadas mediante PCR y Western blot.

El plásmido suicida pKUPRBS β gal se utilizó con el doble propósito de mutar el gen *nrcN* y al tiempo generar una fusión transcripcional *nrc::bgaA* para medir la inducibilidad del operón *nrc* cuantificando actividad beta galactosidasa. Este plásmido incluye el gen *nrcF* y las posiciones +1 a +492 de la secuencia codificante de *nrcN* seguida del gen reportero *bgaA*, una beta galactosidasa termoestable procedente de *Thermus* sp. T2 (Moreno y col., 2003), precedida por la secuencia Shine-Dalgarno del gen *slpA* de *T. thermophilus* NAR1 (Faraldo y col., 1992).

La generación de mutantes *nrcE::kat*, *nrcN::kat*, *dnrT::kat*, y *dnrS::kat* en las cepas desnitrificantes PRQ-16 y PRQ-25 se llevó a cabo mediante transformación con DNA cromosómico procedente de los respectivos mutantes en la cepa NAR1. Las mutaciones fueron confirmadas mediante PCR e inmunodetecciones con antisueros de reconocimiento de DnrT, DnrS y NrcD.

Mutagénesis dirigida sobre DnrT

Para la obtención de mutantes puntuales en DnrT se introdujeron los cambios en la secuencia nucleotídica con oligonucleótidos internos mediante dos PCR consecutivas. En la primera, se empleó un cebador (interno) que incluye en su secuencia la sustitución que se pretendía incorporar (Anexo I, tabla 4A). El producto de esta primera amplificación fue usado como cebador (*megaprimer*) junto con el oligonucleótido del otro extremo del gen para amplificar la totalidad de la secuencia codificante en una segunda reacción de PCR. Esta secuencia mutada (precedida por una secuencia Shine-Dalgarno apropiada) pudo ser a continuación sobreexpresada en sistema pET/*E. coli* BL21(DE3); o en pWUR o pMH184/ *T. thermophilus*, o bien utilizada para generar una sustitución alélica del gen silvestre.

Para este último propósito el gen mutado sin las 150 pb de su extremo 5', fue clonado en el vector suicida pK18 y empleado para transformar y seleccionar por resistencia a kanamicina en la cepa NAR1. De esta forma el gen mutado desplaza al alelo silvestre de su operón y por tanto solo la copia mutante es expresada. Para el caso particular de los mutantes *dnrT* S185A/R186L, *dnrT* C/A y *dnrT* C/S, se clonó en pK18 un fragmento desde la posición +101 hasta el codon stop final de la secuencia codificante (Δ N*dnrT* SR/AL, Δ N*dnrT* C/A y Δ N*dnrT* C/S). Los mutantes fueron comprobados por PCR.

Ensayos de complementación de mutantes

Los vectores pWUR*dnrT*, pWUR*dnrS* y pWUR*nrcN*, que derivan del plásmido pWUR112/77-1 cedido por el Dr. Stan Brouns (Wageningen University, The Netherlands), así como los vectores pMH*nrcC*, pMH*nrcCH1* y pMH*nrcCH2*, que derivan del vector pMH184, son plásmidos bifuncionales para *E. coli* y *T. thermophilus* (anexo I, tabla 3). El uso de estos vectores en mutantes resistentes a kanamicina es posible debido a que confieren resistencia termoestable a bleomicina (*shble*) (Brouns y col., 2005) o a higromicina B (*hph5*) (Nakamura y col., 2005).

Para los ensayos de complementación de mutantes, los genes correspondientes fueron amplificados por PCR y clonados en los vectores pET22b o pET28b (NdeI/EcoRI) para finalmente extraer el inserto génico (XbaI/EcoRI) precedido por la secuencia Shine-Dalgarno GGAGG procedente del vector pET, y clonarlo en el plásmido pWUR112/77-1. Esto permite la expresión constitutiva del gen por transcripción procedente del promotor *PslpA* que controla al gen de resistencia a bleomicina. Las construcciones para los ensayos de complementación del mutante *nrcC::kat* se realizaron sustituyendo el marcador *bgaA* en el vector pMKPnqobgaA (NdeI/HindIII) por el gen *nrcC* (o sus mutantes H1 y H2). A continuación el fragmento PnqorbsnrcC (o PnqorbsnrcCH1, PnqorbsnrcCH2) es transferido (XbaI/HindIII) al vector pMH184 cuyo marcador de resistencia a la higromicina B hace posible la selección de las estirpes complementadas. A diferencia de los derivados de pWUR, en estos vectores, la expresión del gen se realizará

aprovechando la secuencia Shine-Dalgarno contenida en el extremo 3' del promotor *Pnqo* que controla la transcripción.

La complementación positiva fue comprobada combinando ensayos de crecimiento anaeróbico, inmunodetección con antisueros específicos y recuperación de la actividad NR y/o NDH.

Ensayos de competición de crecimiento

Los ensayos de competición en cultivos mixtos pudieron ser cuantificados empleando mutantes espontáneos resistentes a Cloranfenicol de una de las dos cepas incluidas en el ensayo: la cepa mutante de inserción *gen::kat* a estudiar, y la cepa *gdh::kat*, empleada como silvestre para evitar desviaciones experimentales debidas a la resistencia a kanamicina (anexo I, tabla 1). Después de cuantificar el número de bacterias por mililitro de cultivos individuales, se inició la competición añadiendo igual número de ambas en cultivo mixto con kanamicina, que fue posteriormente incubado en las condiciones y durante el tiempo que se especifique en el ensayo. Tras la incubación, extendimos diluciones seriadas de los cultivos mixtos en placas con kanamicina (medio permisivo para ambas cepas) y con kanamicina y cloranfenicol (medio restrictivo que sólo selecciona una de las cepas). Para cuantificar errores debidos a la resistencia espontánea a cloranfenicol, este experimento se realizó por duplicado empleando en cada caso una de las dos cepas (silvestre o mutante) como portadora de la resistencia a cloranfenicol (anexo I, tabla 1).

Inducibilidad de promotores

Los vectores bifuncionales para *E. coli-Thermus* spp. pMK184 (Cava y col., 2007), pWUR112/77-1 (Brouns y col., 2005), y pMH184 (Cava y col., 2007) son derivados del pMK18 (de Grado y col., 1999) con resistencias termoestables frente a kanamicina, bleomicina e higromicina B (Nakamura y col., 2005), respectivamente. Los plásmidos pMHnarbgaA, pMHnrcbgaA, pMHdnrbgaA, pMHnqobgaA y pMHfbcbgaA son derivados del vector pMH184 en el cual se expresa el gen reportero *bgaA* (Moreno y col., 2003) bajo el control de las regiones promotoras de los operones *nar*, *nrc*, *dnr*, *nqo* y *fbc*, respectivamente (anexo I, tabla 3). Los tamaños de los promotores incluidos en estos plásmidos con respecto al origen de traducción del primer gen son: de -784 a +6 (*nar*), de -249 a +3 (*dnr*), de -343 a +315 (*nrc*), de -448 a +3 (*nqo*) y de -358 a +3 (*fbc*). En todas las construcciones, el gen *bgaA* estaba precedido por la secuencia Shine-Dalgarno (GGAGG).

La cuantificación transcripcional de los operones *nar*, *nrc*, *dnr*, *nqo* y *fbc* fue ensayada en cultivos de las cepas silvestres, sus mutantes y en ambas complementadas con derivados pWUR transformados con los plásmidos derivados del pMH184 antes mencionados.

Para la expresión en aerobiosis, las células fueron crecidas durante 8 horas hasta fase exponencial ($D.O_{550}$ entre 0.3 y 0.6) en agitación (150 rpm), en un volumen de cultivo de 1/10 con

respecto a la capacidad del matraz para permitir una oxigenación óptima. Para inducciones anaeróbicas, el cultivo en fase exponencial fue transferido a tubos de cristal con tapón a rosca e incubados sin agitación de 4 a 16 horas en presencia del óxido de nitrógeno apropiado para cada experimento. La temperatura para estos ensayos fue de 70°C salvo en las expresiones constitutivas para las complementaciones, reduciendo ésta a 60°C para limitar la posible toxicidad generada por la sobreexpresión de proteínas reguladoras.

Los ensayos de actividad beta galactosidasa fueron realizados con extractos solubles de experimentos realizados por triplicado, empleando el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitrofenil- β ,D-galactopiranosido, Sigma) a 70°C. Las actividades fueron expresadas en unidades arbitrarias tal y como describe Miller (Miller, 1992).

3.7. Ensayos químicos y enzimáticos

Purificación y análisis de quinonas respiratorias

La extracción y análisis de las quinonas totales de membranas, procedentes de cultivos crecidos aeróbicamente o anaeróbicamente con nitrato, fue encargada al instituto alemán DSMZ (German Resource Centre for Biological Material).

Ensayo de actividad nitrato reductasa.

La actividad nitrato reductasa fue medida tras 5 minutos de incubación a 80°C con metil viológeno reducido (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium reducido) (Sigma) como donador de electrones y nitrato potásico como aceptor final de los mismos (Ramírez-Arcos y col., 1998a). Una unidad de actividad nitrato reductasa se define como la cantidad de enzima que puede producir 1nmol de nitrito/min y mg de proteína.

La concentración de nitrito fue determinada mediante método colorimétrico con N-(1-naftil) etilendiamina 0.02% (Sigma) y con sulfanilamida 1% en HCl 2.5 N (Sigma) (Snell y Snell, 1949).

Ensayos de respiración in vitro

Células crecidas aeróbicamente o inducidas de 4 a 16 horas en anaerobiosis, fueron centrifugadas y permeabilizadas con BTDTA (bromuro de tetradecil-trimetil amonio, Sigma)(Cava y col., 2004) en tampón Tris 50 mM pH 8, DTT 0.2 mM, previamente desgasificado mediante flujo de N₂ (Airliquid). Alícuotas de estas células permeabilizadas o bien de proteínas de la fracción de membrana obtenida mediante sonicación (10 μ g), fueron ensayadas directamente en su capacidad para catalizar la oxidación del NADH (Sigma) como donador electrónico en presencia de nitrato, nitrito o S-Nitrosoglutatión (GSNO, Sigma). Para confirmar la especificidad de la reducción del óxido nítrico se utilizó el agente secuestrante PTIO 0.2 mM (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-óxido, Sigma). El ensayo fue puesto a punto empleando tres tampones que abarcaban el rango de pH entre 5 y 11: tampón fosfato 50 mM pH 5-7, Tris-HCl 50 mM pH 7-9 y tampón Glicina

125 mM pH 9-11, resultando una actividad NDH óptima a 75°C y pH 9.5-10 con tampón glicina 125 mM.

La mezcla de reacción de pH óptimo se compone por tanto de tampón glicina 125 mM pH 10, NADH 1.5 mM y nitrato potásico (20 mM), nitrito (5 mM) o NO (GSNO 1 mM). La reacción se llevó a cabo a 80°C durante 15 minutos, después de los cuales fue detenida con 75 µl de NaOH 1M y 75 µl de ZnSO₄ 25% a temperatura ambiente. Los tubos se agitaron y centrifugaron durante 5 minutos a 15,000 rpm para sedimentar el precipitado proteico.

Para medir la actividad nitrato reductasa de estos ensayos se cuantificó la cantidad de nitrito producida a partir del nitrato de la mezcla de reacción (Snell y Snell, 1949). La actividad nitrito reductasa se estimó a partir de la cantidad de nitrito consumida (nmoles) por mg de proteína y minuto, empleando NADH como donador de electrones. La actividad NDH se cuantificó midiendo la pérdida de absorbancia a 340 nm durante la oxidación del NADH a NAD⁺ y transformándola en nmoles de NADH consumidos por mg de proteína y minuto.

Para los estudios de sensibilidad de la actividad NDH (Nqo o Nrc) frente a inhibidores específicos se emplearon varias concentraciones finales de Rotenona ((2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahidro-2-isopropenil-8,9-dimetoxicromeno[3,4-b]furo[2,3-h]cromen-6-ona), Diuron (3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-Dimetilurea), o HQNO (2-N-helptil-4-hidroxyquinolina-N-oxido) (todos procedentes de Sigma) en los ensayos de respiración *in vitro*.

Alquilación de grupos sulfhidrilos

La inactivación irreversible de la única cisteína presente en la proteína DnrT (posición 151) se realizó mediante alquilación con yodoacetamida (Janssen Chimica). Para ello se incubó la proteína purificada en oscuridad y durante 2 horas a temperatura ambiente con un exceso 10X del agente alquilante (0.2 M) sobre la concentración final de la proteína. Dada la aparente accesibilidad de esta cisteína, no se añadió ningún tipo de agente desnaturizante suave a la mezcla de reacción. Finalmente la reacción fue detenida mediante elución del DnrT en columnas de sephadex G50 (Micro Spin G-50 columns, Amersham) equilibradas con el mismo tampón empleado para transcripción *in vitro* (sin DTT). La eficiencia de la reacción fue valorada con respecto a una recta patrón de cisteína (Sigma), mediante reacción con el reactivo de Ellman (DTNB, Pierce) (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato)) registrada a DO₄₁₂ nm tal y como se describe en Ellman (Ellman, 1959).

3.8. Técnicas microscópicas

Generación de fusiones a sGFP

Los plásmidos pMHPnqosGFP, pMHPnarsGFP, pMKPnqosGFP, y pMKPnarsGFP (anexo I, tabla 3) son derivados de los vectores pMH184 o pMK184 (Cava y col., 2007) que permiten la expresión de fusiones a sGFP (Pedelacq y col., 2006) como dominio C-terminal (X-sGFP) (figura 10A).

Estos vectores presentan orígenes de replicación y genes de resistencia para *E. coli* y *T. thermophilus*. El gen *sgfp* codifica en su extremo 5' un brazo espaciador flexible compuesto por la secuencia SGGGG precedida por un sitio de multiclonaje y secuencias promotoras para el control de la expresión tanto en *E. coli* como en *Thermus*: *Pnqo* (451 pb) o *Pnar* (790 pb) para *T. thermophilus* y *Plac* o *PT7* para *E. coli* (figura 10A).

La figura 10B y C muestra mediante inmunodetección con antisueros específicos (anexo I, tabla 7), las condiciones experimentales para la inducción y represión de los promotores señalados en *E. coli* y *T. thermophilus*. Las secuencias codificantes de la subunidad pequeña de la chaperonina GroES (clave de acceso TTC1713), y del citocromo NarC de la nitrato reductasa (Zafra y col., 2002) fueron amplificadas por PCR y clonadas utilizando los sitios de restricción *BcuI* y *ClaI*. El plásmido pMHPnqoeGFP fue construido reemplazando el gen *sgfp* por el *egfp* que codifica la variante denominada *enhanced GFP*, generada por Cormack (Cormack y col., 1996).

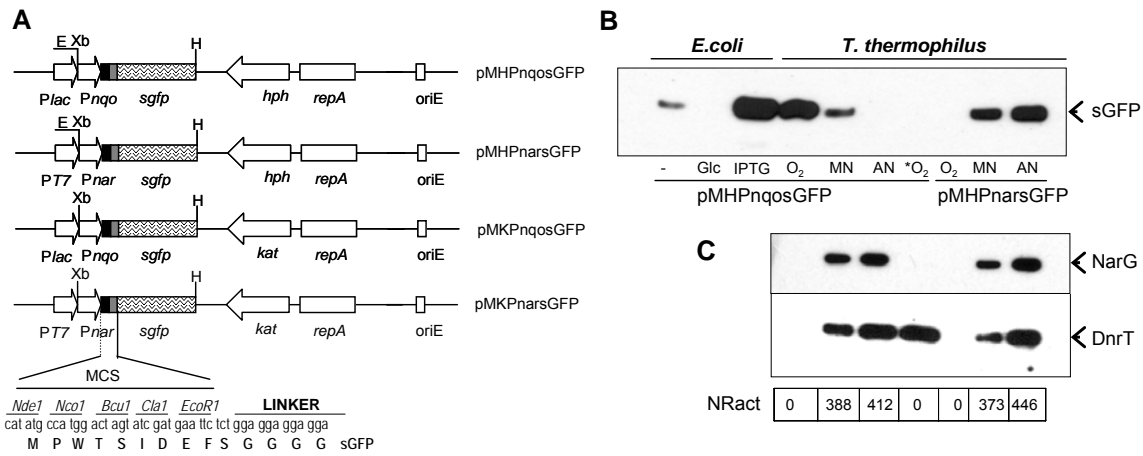


Figura 10. Plásmidos para la expresión de proteínas de fusión con sGFP. A) Esquema de los vectores para la expresión de proteínas de expresión con sGFP en *T. thermophilus*. Se indican los sitios de restricción y los genes de selección *hph* y *kat* junto con los orígenes de replicación para *Thermus* spp (*repA*) y para *E. coli* (*oriE*). La transcripción está controlada en *E. coli* por los promotores *PT7* y *Plac* y por *Pnqo*, *Pnar* en *T. thermophilus*. Sitios de restricción HindIII (H), EcoRI (E) y XbaI (Xb). **B)** Inmunodetección por Western blot de sGFP expresada desde pMHPnqosGFP y pMHPnarsGFP en cultivos de *E. coli* en LB (-), en LB con glucosa (Glc) o +IPTG (IPTG), y cultivos de *T. thermophilus* NAR1 crecidos aeróbicamente en TB (O₂, *O₂) o en TB suplementado con nitrato en condiciones microaerófilicas (MN) o anaeróbicas (AN). *O₂ corresponde a cultivo aeróbico transformado con el plásmido (pWURdnrT) que expresa constitutivamente DnrT. **C)** Western blot para detectar DnrT y NarG en los mismos cultivos de *T. thermophilus* cultivos del panel C. Se indica también la actividad nitrato reductasa (NRact) en nmol nitrato/ mg por min.

La figura 11 contrasta la termoestabilidad de sGFP frente a la forma eGFP en imágenes de microscopía confocal con idéntico tratamiento informático.

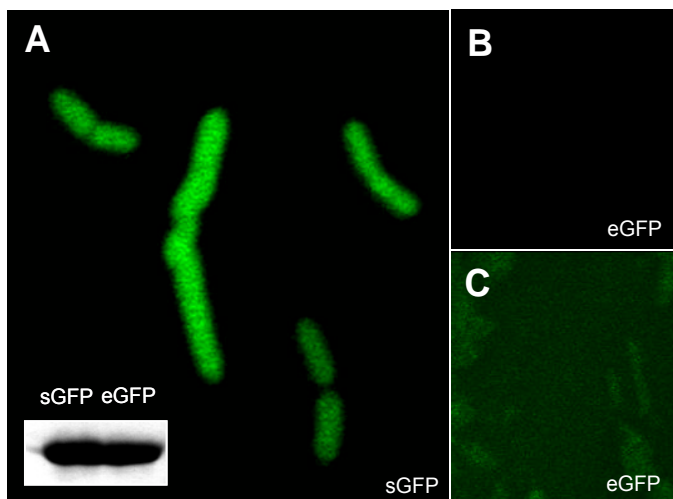


Figura 11. sGFP es termoestable *in vivo*. La figura muestra imágenes de microscopía confocal de fluorescencia detectadas en cultivos exponenciales de *T. thermophilus* transformados con la construcción pMHPnqosGFP (**A**) o con pMHPnqoeGFP (**B**, **C**) crecidos aeróbicamente a 70 °C y tratado con formaldehído a la misma temperatura, para fijar las estructuras celulares. La imagen del panel **B** corresponde a las mismas condiciones de microscopía que en el panel **A**, mientras que la imagen en el panel **C** corresponde al mismo campo visual forzando las opciones de sensibilidad del procesado de imagen. El recuadro confirma por inmunodetección que tanto la sGFP como la eGFP se expresan a niveles similares en ambos casos.

Microscopía confocal

Las células con los plásmidos de expresión de las fusiones a sGFP fueron crecidas bajo las condiciones apropiadas para cada experimento y se aplicaron directamente sobre postobjetos de cristal con una fina película de agarosa 1% en PBS 1X.

Los cultivos fueron tratados cuando fue necesario con paraformaldehído (0.5% (v/v) concentración final) a 70°C, para evitar cambios conformacionales durante el enfriamiento de las muestras.

La microscopía de fluorescencia fue realizada empleando un microscopio confocal Zeiss META 510. Las secciones-Z se obtuvieron con lentes Zeiss 63X 1.4NA y parámetros apropiados para cumplir los criterios Nyquist para el tratamiento de imágenes. Las imágenes fueron sometidas a deconvolución lineal utilizando el programa Huygens System 2.2 (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, The Netherlands). Los programas Adobe photoshop e Image J (Wayne Rasband, NIH, USA) fueron empleados para el diseño final de las imágenes.

3.9. Métodos bioinformáticos

Análisis de secuencias

Para el ensamblado, comparación y traducción de secuencias se empleó el programa “Gene Jockey II” para Macintosh y el paquete DNASTar para PC. La búsqueda de proteínas homólogas (programa BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) y los alineamientos de secuencia (programa CLUSTALW) se realizaron mediante a través del servidor ExpASY (<http://au.expasy.org/>). Para la predicción de estructura se emplearon los programas PROSITE (Hofmann y col., 1999), MAXOM (Sander y Schneider, 1991), PHD (Rost, 1996) y TMHMM1.0 (Sonnhammer y col., 1998) del mismo servidor.

Para los diseños alineados de secuencia nucleotídica y aminoacídica mostrados en el anexo II se empleó el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>).

La búsqueda de secuencias de *Thermus thermophilus* se realizó bien directamente en los servidores <http://www.tigr.org/> para HB8 y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=genome> para HB27 o bien indirectamente a través del servidor canadiense BacMap (<http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/>) que dispone de una amplia base de datos de genomas secuenciados.

Los árboles filogenéticos se realizaron desde la dirección http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html.

Modelado molecular de DnrT

El modelado de DnrT así como la elaboración del acoplamiento estructural con la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* ha sido realizado en colaboración con el Dr. Paulino Gómez-Puertas (Servicio de Bioinformática del CBMSO-UAM).

Las proteínas homólogas de DnrT obtenidas mediante Blast (Altschul y col., 1990) fueron alineadas empleando los algoritmos de ClustalW (Thompson y col., 1994) y T-COFFEE (Notredame y col., 2000). El modelo estructural de DnrT fue realizado empleando como base la estructura del complejo CRP-DNA (PDB entry 1O3R; (Chen y col., 2001)) utilizando el servidor SWISS-MODEL (Schwede y col., 2003) y su calidad fue valorada a través del procedimiento WHAT-CHECK (Hoofst y col., 1996) del programa WHAT IF (Vriend, 1990). El modelo fue posteriormente refinado mediante 3 pasos de 50 ciclos empleando el programa DeepView (Guex y Peitsch, 1997). El modelado de interacción entre el dominio C-terminal de α -thRNAP y el motivo AR2 de DnrT fue realizado utilizando el método de acoplamiento incorporado por el programa Hex (Ritchie y Kemp, 2000), indicando como punto de partida la estructura del complejo entre el dominio C-terminal de α -ecoRNAP y CRP (PDB entry 1LB2; (Benoff y col., 2002)). El modelado de interacciones entre DnrT-sigma A fue realizado por el mismo método empleando la estructura deducida del modelo de DnrT y de la thRNAPh, que incluye la posición del factor σ^A en el complejo (PDB 1SMY; (Artsimovitch y col., 2004)).

Para minimizar la movilidad translacional y rotacional, la posición inicial determinada para este posible complejo se estableció mediante la generación de 5×10^3 soluciones diferentes de acoplamiento para este complejo utilizando el algoritmo de baja resolución GRAMM (Vakser, 1995) y finalmente seleccionando aquella solución que minimizaba la distancia media entre el motivo AR3 de DnrT y su sitio de unión en σ^A , tal y como se describe en (D'Autreaux y col., 2005).

4. RESULTADOS. Capítulo 2. Regulación transcripcional de la respiración de nitrato en *T. thermophilus* NAR1

Elemento NCE reveló la presencia de dos fases abiertas de lectura que fueron designados como *dnrS* y *dnrT* (inicialmente denominadas *regA* y *regB*, en (Cava y Berenguer, 2006)) y que se localizaban en la zona comprendida entre los operones *nar* y *nrc* (figura 21A). Estas secuencias están depositadas en GenBank. Ambas forman una única unidad transcripcional divergente respecto a los operones previamente mencionados, siendo además indudable por señales de nitrato y anoxia, tal y como quedaba patente al observar su cotranscripción en ensayos de RT-PCR (figura 21B) tomando como referencia el transcritos de RNA total procedente de células inducidas durante 4 horas con nitrato en condiciones de anoxia. La figura 21C muestra los motivos identificados en DnrT y DnrS. El gen *dnrS* codifica una proteína de 466 aminoácidos y 52.6 kDa que contiene un dominio GAF (los dominios tipo GAF deben su nombre a ser descritos inicialmente en *cGMP*-fosfodiesterasas en vertebrados, en *Adenylato* ciclasas de cianobacterias y en *Ehna*, activador transcripcional de lasas bacterianas de ácido fórmico, entre las posiciones 1 y 163, y un dominio ETAD (*Bacterial transcriptional activator domain*) cerca de su extremo C-terminal (posiciones 365-466). Los dominios GAF están implicados en detección de señales tales como oxígeno u óxidos de nitrógeno en una amplia variedad de organismos. En *T. thermophilus*, el ETAD son hallados en reguladores transcripcionales bacterianos, lo que sugiere un posible implicación de DnrS como sensor y activador transcripcional. Figura 21. El operón *dnr*. A) Esquema del operón *dnr* y su posición relativa con respecto a los operones *nrc* y *nar* del elemento NCE. Las líneas punteadas indican el papel que desempeñan DnrS y DnrT como activadores transcripcionales sobre los promotores indicados. B) Ensayo de RT-PCR sobre RNA total procedente de células inducidas con nitrato y anoxia durante 4 horas. Los oligonucleótidos empleados son (1) *regA*NDnrT, (2) *o27-77*, (3) *dnrTstop* y (4) *o27-81*; y su posición aproximada de hibridación es indicada en el panel A. C) Esquema de los dominios identificados en las secuencias aminoácidas de DnrT y DnrS. Los detalles se comentan en el texto. Por otra parte, DnrT y DnrS son los factores de activación de los operones *nrc* y *nar* respectivamente. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 22. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

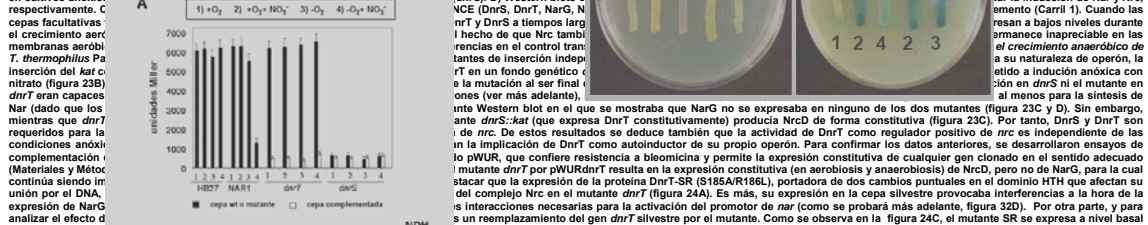


Figura 23. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 24. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 25. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 26. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 27. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 28. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

Figura 29. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos. Sección A de la figura 21. Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la proteína de unión a nitrato (NarG) en el elemento NCE. El elemento NCE está formado por el operón *nrc* y el operón *nar*. Las líneas punteadas indican los motivos de unión de DnrT y DnrS a las secuencias aminoácidas marcadas con asteriscos.

4. RESULTADOS

Capítulo 1. El elemento NCE codifica un nuevo tipo de NADH deshidrogenasa asociada a la respiración anaeróbica de nitrato

Identificación y caracterización del entorno genético del operón nar

La identificación de las secuencias codificantes correspondientes al entorno genético del operón *nar* se llevaron a cabo mediante la técnica de “paseo cromosómico” empleando sondas (Materiales y Métodos) correspondientes a los extremos hasta entonces conocidos del elemento de respiración de nitrato (NCE, *N*itrate *C*onjugative *E*lement). Se hizo hibridar estas sondas contra réplica de colonias resultado de la transformación con una genoteca del genoma de *Thermus thermophilus* NAR1 (anteriormente denominada como HB8) construida en pUC119. Como fruto del paseo cromosómico se aislaron sucesivamente los clones pUP1B, pUP2B y pUP3B correspondientes a la región 5' del operón *nar*, y los clones pDOWN1 y pDOWN2 relativos al extremo 3' de la misma. Un esquema general de los clones secuenciados y de la organización de las fases abiertas de lectura identificadas en los extremos del elemento NCE se muestra en la figura 12A.

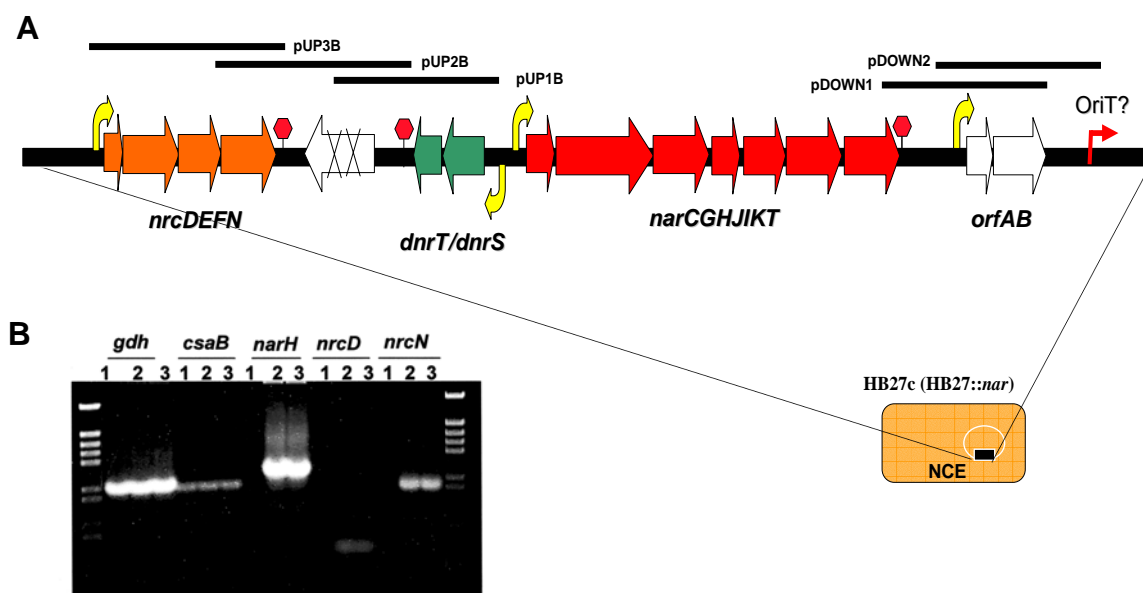


Figura 12. Organización génica del elemento NCE. A) Esquema general. Las flechas muestran las distintas fases abiertas de lectura halladas en la secuencia del elemento NCE, en color aquellas caracterizadas total o parcialmente en este trabajo. Las barras negras indican los derivados de pUC119 aislados de la genoteca de *T. thermophilus* NAR1 mediante paseo cromosómico. **B)** El agrupamiento *nrc* se transfiere por conjugación. Usando cantidades idénticas de DNA de las cepas HB27(1), HB27::*nar* (2) y NAR1 (3) se amplificaron los genes indicados en la figura. Nótese la ausencia de amplificación de los agrupamientos génicos *nar* (*narH*) y *nrc* (*nrcD* y *nrcN*) procedente del DNA de la cepa aerobia estricta HB27. Los tamaños de los marcadores corresponden a 4.37, 2.9, 2.5, 2.2, 1.93, 1.33, 1.15, 0.76 y 0.61 kpb.

La información codificada en la región 5' del operón *nar* muestra la presencia de fases abiertas de lectura dispuestas en dos agrupamientos génicos, uno siguiendo el mismo sentido de la transcripción del operón *nar* y el otro codificado sobre la cadena complementaria. El primero, situado a 4.6 kpb de *narC*, consta de 4 genes donde tres de ellos (*nrcDFN*) codifican proteínas homólogas a transportadores de electrones (Tabla1). Debido a esta homología con componentes de cadenas respiratorias y su proximidad física con el operón *nar*, este agrupamiento génico fue denominado *nrcDEFN* (*n*itrate *r*espiration *c*hain). El segundo agrupamiento (*dnrST*) codifica homólogos de reguladores transcripcionales (ver figura 21, Capítulo 2). Entre ambos se localiza un pseudogen con fases de lectura discontinuas homólogas a transportadores de Fe_2^+ (FEOB).

La zona posterior a los genes estructurales de la nitrato reductasa de *Thermus thermophilus* muestra varias fases abiertas de lectura en el mismo sentido de la transcripción del agrupamiento *nar*, dos de ellas a las que hemos denominado provisionalmente *orfA* y *orfB*, presentan un alto grado de identidad con genes sin función definida presentes en β -Proteobacterias y que se agrupan con genes implicados en el metabolismo respiratorio y/o asimilativo del nitrógeno.

La pertenencia del agrupamiento *nrc* al elemento transferible por conjugación se demostró mediante PCR sobre DNA total de las cepas NAR1, HB27c, y HB27. Como se muestra en la figura 12B, al igual que sucede para los genes pertenecientes al operón *nar*, los genes *nrcD* y *nrcN* son identificados en la cepas facultativas (NAR1, HB27c) pero no en su parental aeróbico (HB27), en el que sí se detectan los genes *csaB* y *gdh* usados como control.

La comparación de las secuencias *nrc* (número de acceso AJ585200) con el genoma actualmente disponible de la cepa HB27 (números de acceso AE017221 y AE017222) confirmaba que estos genes no estaban presentes en dicha cepa aeróbica estricta y por tanto eran específicos de la cepa aeróbica facultativa NAR1.

Análisis de las proteínas codificadas por el agrupamiento nrc

Las cuatro fases abiertas de lectura codificadas por el agrupamiento *nrc* eran precedidas por sus respectivas secuencias Shine-Dalgarno (GGA(G/A)(G/A)) localizadas entre las posiciones 11 y 9 con respecto a sus codones ATG de iniciación (anexo II). Con la excepción de NrcN, la distancia entre el codon stop de un gen y el ATG de iniciación del siguiente son bastante cortas, incluso solapantes en una base en el caso de *nrcE-nrcF*. Sin embargo, en *nrcN* esta distancia es aparentemente mayor. No obstante, la presencia de un GTG en fase precedido de una posible secuencia Shine-Dalgarno cerca del final de NrcF podría indicar que éste sería el sitio real de inicio traduccional de la proteína.

No se encuentran homólogos de NrcE en la base de datos, al contrario que sucede con NrcD, NrcF y NrcN que están claramente relacionadas con proteínas implicadas transporte electrónico y oxidación de NADH (tabla1). El análisis filogenético sitúa las proteínas Nrc en la raíz

de los árboles filogenéticos (anexo II). La información derivada de dichos árboles filogenéticos se comenta en el capítulo de discusión. A continuación se describen someramente los aspectos más representativos de las secuencias de las cuatro proteínas codificadas aparentemente por el operón *nrcDEFN*.

Proteína	aa ¹	Homólogo	Valor-E ³	Identidad ³
NrcD	87	Ferredoxina (P03942) de <i>Thermus thermophilus</i>	1e-37	65/75 (86%)
NrcE	362	nd ⁴	-	-
NrcF	232	subunidad sulfoférica (B) de la SDH de varios organismos	1e-70	128/217 (58%)
NrcN	395	NADH deshidrogenasa de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	6e-75	176/406 (43%)

Tabla 1. Comparación de las secuencias de Nrc. 1. número de aminoácidos de la proteína. 2. Sólo se indican las de mayor similitud. 3. Sólo los valores más altos se indican. 4. Sin homólogos en base de datos.

NrcD— codifica una proteína de 87 aminoácidos de tamaño (9,917 Da) altamente similar (86% de identidad) a una ferredoxina soluble de *T. thermophilus* (FdTt, de 79 aminoácidos, número de acceso P03942), cuya estructura tridimensional es conocida (Macedo-Ribeiro y col., 2001). El alineamiento de secuencias de ambas proteínas revela una conservación muy extensa, incluyendo los residuos de cisteína que coordinan los centros sulfoféricos [3Fe-4S] y [4Fe-4S] de FdTt. La principal diferencia entre ambas es la presencia de 10 aminoácidos en su secuencia carboxílica terminal que está ausente en FdTt.

NrcF— es una proteína de 26,223 Da similar en secuencia a la subunidad B sulfoférica de succinato-quinona oxidoreductasas (SQRs) y quinol-fumarato reductasas. Los residuos de cisteína que participan en la coordinación de los centros [2Fe-2S], [4Fe-4S], y [3Fe-4S] de la subunidad B de ambas enzimas están conservados en NrcF, así como el residuo de aspártico en posición 61, que está implicado en la coordinación del centro [2Fe-2S] de la subunidad B de las SQRs.

NrcN— es homóloga a NDH (NADH deshidrogenasa) tipo II (EC 1.6.99.3) de diferentes orígenes. Las proteínas de esta familia suelen ser homodímeros con un motivo oxidoreductasa de unión de nucleótidos de piridina consistente en un pequeño dominio de unión a NADH dentro de uno mayor de unión a FAD. Tal y como resulta frecuente para otras proteínas termófilas, NrcN (395 aminoácidos) es menor que sus equivalentes mesófilos (de 430 a 465 aminoácidos).

NrcE— El gen *nrcE* codifica una proteína de 362 aminoácidos (40,388 Da) sin homólogos en las bases de datos de proteínas. Las predicciones informáticas sugieren la presencia de 7 hélices transmembrana, con un pequeño extremo N-terminal hacia el periplasma y un gran dominio C-terminal de 110 aminoácidos que asoma al citoplasma y que contiene cuatro cisteínas que podrían coordinar un centro redox. Poco acorde para una proteína termófila, la quinta cisteína está presente en la secuencia de la primera hélice transmembrana. Por tanto, NrcE es el único componente codificado en este agrupamiento para el que se predice un carácter insoluble integral de membrana.

Los cuatro genes *nrc* forman un operón

La proximidad entre el codón iniciador de una fase abierta de lectura y el triplete que señala el stop del anterior sugería la posible cotranscripción de los 4 genes del agrupamiento *nrc* en un solo RNAm.

Mediante las técnicas de Northern blot y RT-PCR pudimos, en primer término, observar la síntesis de un RNA mensajero de aproximadamente 3.2 kb, el cual coincidía con la extensión de las cuatro fases abiertas de lectura presentes en el agrupamiento *nrc* (figura 13A). Dicho mensajero solo era detectable en extracciones de RNA total procedentes de cultivos previamente inducidos con nitrato y anoxia, y nunca en cultivos aeróbicos. Las pruebas de RT-PCR (figura 13B) con oligonucleótidos que hibridaban sobre los genes *nrcF/nrcN* y sobre *nrcD/nrcN* ilustradas en la figura 14 confirmaron estos resultados. Por el contrario, ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos que hibridaban corriente arriba de *nrcD* o corriente abajo de *nrcN* no dieron lugar a amplificación (no mostrado). Por tanto, quedaba demostrado que estos cuatro genes forman un operón inducible por nitrato en condiciones de anoxia.

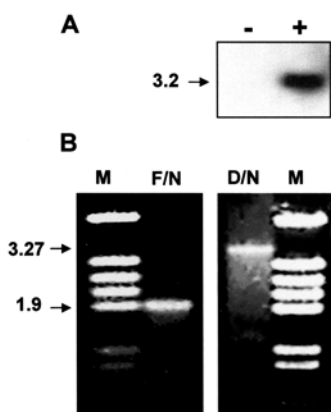


Figura 13. Los genes *nrc* se cotranscriben. **A)** Se muestra un Northern blot de RNA total aislado de cultivos de *T. thermophilus* NAR1 crecidos aeróbicamente (-) o inducido con nitrato y anoxia (+) e hibridado *nrcN* con el oligonucleótido o27-85 marcado en 5' con ^{32}P - γ ATP. Se indica el tamaño aproximado del transcrito. **B)** RT-PCR de RNA total de cultivos inducidos con nitrato y anoxia de la cepa facultativa NAR1. Oligonucleótidos empleados: F/N (orfN.rev y orfF.dir); D/N (orfN.rev y ferred.nde1). Se indica el tamaño de los cDNAs en kpb.

El nitrato y la anoxia son señales necesarias para la transcripción de *nrc*.

Para valorar si el nitrato o la anoxia eran capaces de inducir la expresión del operón *nrc* por separado y cuantificar los niveles de inducción, desarrollamos un nuevo vector suicida (pKUPRBS β gal) que porta como testigo el gen *bgaA* precedido por su propia secuencia Shine-Dalgarno. Este gen codifica una beta galactosidasa termófila (Moreno y col., 2003). Como diana para la integración por recombinación usamos un fragmento del gen *nrcN*, generando una fusión con el extremo 5' de *bgaA*. La inserción en el cromosoma de esta construcción se seleccionó a través de la resistencia termoestable a la kanamicina que confiere el gen *kat* localizado en el plásmido suicida pK18 (Materiales y Métodos; anexo I, tabla 3). En la cepa mutante obtenida, *nrcN::bgaA*, el gen reportero se localiza en la posición 483 de *nrcN* (figura 14), dando lugar a la fusión transcripcional *nrcDEFN::bgaA*.

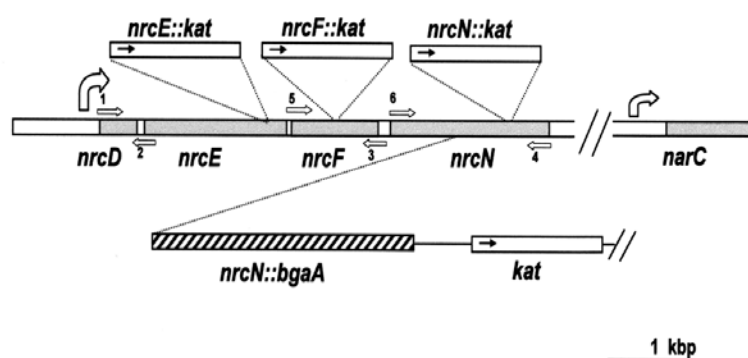


Figura 14. El agrupamiento *nrc*. Representación del agrupamiento genético *nrc* mostrando los lugares de inserción del cassette de resistencia a kanamicina (*kat*) y la beta galactosidasa (*bgaA*) en los mutantes en *nrcE*, *nrcF* y *nrcN*. Las fechas indican las posiciones de hibridación de los oligonucleótidos empleados para PCR y RT-PCR. Los promotores de los agrupamientos *nrc* y *nar* se indican con flechas curvas.

Tal y como muestra la figura 15A, la presencia de oxígeno reprime la expresión del gen testigo en el mutante *nrcN::bgaA* (cultivos aeróbicos), mientras que en condiciones anóxicas es necesaria la inclusión de nitrato en el medio de cultivo para detectar actividad beta galactosidasa. El efecto inductor del nitrato no era mimetizado ni por el fumarato (F) ni por el nitrito (Ni). El uso de una combinación de nitrato y fumarato o de nitrato y nitrito no mejoraba los niveles de actividad beta galactosidasa que conseguía el nitrato por sí solo (no mostrado). De igual manera, la inducción generada por el nitrato en ausencia de oxígeno no se veía afectada por la presencia de glucosa o succinato (datos no mostrados). Consecuentemente, inferimos que la transcripción del operón *nrc* es estrictamente dependiente de una señal dual compuesta por anoxia y nitrato, pero que no depende de la fuente de carbono. Por tanto, concluimos con esto un papel específico en la respiración de nitrato para las proteínas que codifica el operón *nrc*.

Dada la ausencia de otro marcador de selección, para estudiar la simultaneidad de la expresión génica de los operones *nrc* y *nar*, se clonaron ambas regiones promotoras controlando nuevamente la expresión de *bgaA*, pero ahora en vectores replicativos en *Thermus* derivados de pMKE1 (Moreno y col., 2003). Esto aportaba datos fisiológicos sobre la relación celular que guardan los productos de expresión de ambos operones cuando *T. thermophilus* respira nitrato. En la figura 15 se observa cualitativamente en placa (X-gal) o cuantitativamente (ONPG) el resultado comparativo de la expresión *in vivo* de ambos operones para las mismas condiciones de ensayo de la figura 4A. Como se puede deducir de la figura, los operones *nar* y *nrc* se expresan bajo las mismas señales (anoxia y nitrato) y a niveles transcripcionales similares. Por otra parte, y al contrario de lo que se mostrará en el capítulo 3 con otras cepas de la misma especie, el nitrito no actúa como señal inductora para la transcripción de los promotores de *nrc* y *nar* en la cepa NAR1. (figura 15C).

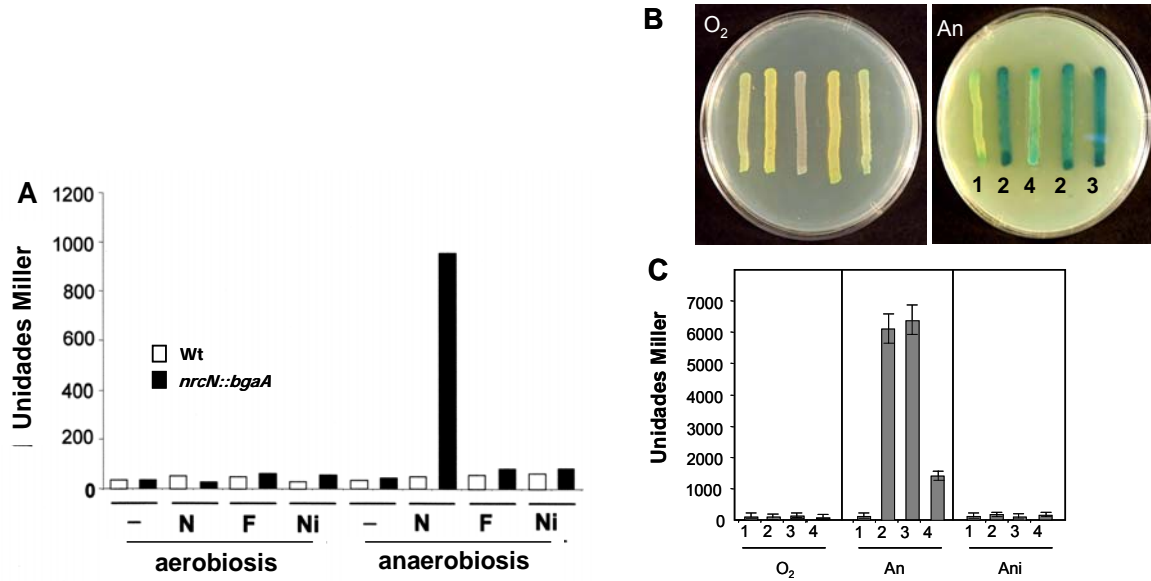


Figura 15. Inducción del operón *nrc*. **A)** Actividad β -galactosidasa de cultivos de *T. thermophilus* NAR1 (columnas blancas) y NAR1 *nrcN::bgaA* (columnas negras) crecidos aeróbicamente ó anaeróbicamente con 40 mM de nitrato (N), o 40 mM de fumarato (F) o 20 mM de nitrito (Ni). La actividad (expresada en unidades Miller) fue medida después de 14 horas de incubación a 70°C. **B)** Observación cualitativa de actividad β -galactosidasa en placas de medio TB con Xgal suplementado con nitrato 40 mM incubadas en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. **C)** Representación de la actividad β -galactosidasa en cultivos aeróbicos (O₂) o anaeróbicos con nitrato 40 mM (An) o con nitrito 5 mM (Ani). Los cultivos aeróbicos se tomaron en fase exponencial y los anaeróbicos se indujeron durante 7 horas desde D.O₅₅₀: 0.5. Numeración: 1) NAR1; 2) NAR1 pMKPnrcbgaA; 3) NAR1 pMKPnarbgaA; 4) NAR1 *nrcN::bgaA*.

Localización de las proteínas *Nrc*

Como se ha comentado, las predicciones informáticas sugirieron una localización citoplásmica para los productos traduccionales de todos los genes excepto para *NrcE*. Para estudiar la localización y funcionalidad *in vivo* de cada uno de los productos génicos del operón *nrc*, se obtuvo primero un antisuero frente a *NrcD* tras su sobreproducción en *E. coli* (Materiales y Métodos). En segundo lugar, aislamos mutantes de inserción en los genes *nrcE*, *nrcF*, *nrcN* en los que manteníamos el sentido de la transcripción de *nrc* al insertar el cassette de resistencia a kanamicina para asegurar la expresión de los genes localizados corriente abajo del punto de inserción (figura 14). En estos mutantes determinamos la distribución de *NrcD* mediante Western blot, así como de la capacidad para oxidar NADH (como referencia de la presencia de *NrcN*) entre las fracciones soluble y particulada.

La inmunodetección de *NrcD* reveló desde el principio una menor movilidad electroforética (aprox. 30 kDa) que la predicha para su masa molecular teórica (10 kDa), independientemente de que se expresara en *T. thermophilus* o en *E. coli* (figura 16). No se detectó la presencia de *NrcD* en la cepa aeróbica estricta (HB27, dato no mostrado), por lo que la especificidad del antisuero para *NrcD* quedaba garantizada.

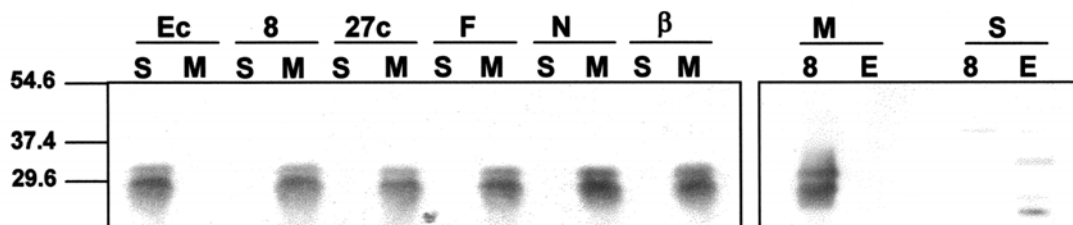


Figura 16. Localización de NrcD en los mutantes *nrc::kat*. Western-blot con antisueros específicos para NrcD en las fracciones soluble (S) y particulada (M) de cultivos inducidos con nitrato y anoxia de las cepas de *Thermus thermophilus* NAR1 (NAR1), HB27::*nar* (27c), NAR1 *nrcF::kat* (F), NAR1 *nrcN::kat* (N), NAR1 *nrcN::bgaA* (b) y NAR1 *nrcE::kat* (E). Igualmente se muestran las fracciones soluble y particulada de extractos de *E. coli* BL21DE3 sobreexpresando NrcD. La movilidad electroforética de los marcadores se indica en kDa.

Tal y como muestra la figura 16, NrcD fue sobreproducida como proteína soluble en *E. coli* (Ec), siguiendo las predicciones de los programas informáticos. Más aún, permanecía soluble después de 30 minutos de incubación a 70°C (no mostrado), por lo que su termoestabilidad quedaba convenientemente contrastada. Por el contrario, NrcD aparecía asociada a la fracción particulada en cultivos de *T. thermophilus* inducidos con nitrato y anoxia (carriles M). Se deducía pues la existencia de una interacción de NrcD con un componente de membrana. Como la localización de NrcD no se veía afectada en los mutantes *nrcF::kat* y *nrcN::kat*, ni NrcF, ni NrcN podían ser responsables de la mencionada asociación de NrcD con la membrana. Sin embargo, NrcD desaparecía de la fracción de membrana en el mutante *nrcE::kat* y sólo señales muy débiles de NrcD eran detectadas en la fracción soluble. Por tanto, concluimos que NrcE ancla NrcD a la membrana, y que su solubilización en un fondo genético *nrcE::kat* desestabiliza su conformación y provoca su rápida degradación proteolítica.

Los ensayos de actividad oxidasa de NADH (ver a continuación) aportaron pistas acerca de la localización de NrcF y NrcN. Fracciones de membrana de cultivos inducidos en anoxia y presencia de nitrato en el medio mostraban una significativa actividad oxidativa de NADH en presencia de nitrato en el tampón empleado. En ausencia de nitrato, la oxidación de NADH por dichas membranas inducidas era insignificante (como se describe en la figura 18). Por el contrario, la presencia de nitrato no afectaba a la oxidación de NADH por las fracciones de membrana de células crecidas aeróbicamente (datos no mostrados).

Ensayos en paralelo revelaron una baja oxidación de NADH en las fracciones solubles de los cultivos inducidos por nitrato y anoxia (aproximadamente 1/10 de la actividad observada en la fracción de membrana). Ésta no era dependiente de nitrato, y los niveles desaparecían completamente en los mutantes *nrcN::kat* y *nrcN::bgaA*. Por el contrario, se podía apreciar un incremento de actividad en los mutantes *nrcE::kat* y *nrcF::kat* tres veces superior a los valores de la fracción soluble de la cepa silvestre, de manera proporcional a una pérdida de actividad en sus fracciones de membrana.

Por tanto, concluimos que 1) NrcN es la subunidad catalítica responsable de dicha actividad NDH; 2) NrcN está unida a la membrana a través de NrcE y NrcF; y 3) NrcN puede ser un donador de electrones permisivo o promíscuo tras su solubilización.

Arquitectura del complejo Nrc

Para comprobar de qué modo interactúan las distintas subunidades de Nrc, se recurrió a un sistema de doble híbrido bacteriano. Los primeros ensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. F. Blasco en el CNRS de Marsella, donde ya habían puesto a punto esta técnica para detectar interacciones entre distintos componentes de la vía de síntesis del cofactor Mo-bisMGD en *E. coli* (Magalon y col., 2002). Este ensayo se basa en la reconstitución funcional de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* a partir de sus dos dominios con capacidad de plegamiento independiente y su posterior detección mediante cuantificación de la actividad β -galactosidasa (Karimova y col., 1998; Karimova y col., 2000b).

Se fusionaron las secuencias génicas completas del operón *nrc*, así como el dominio carboxilo terminal de naturaleza soluble de NrcE (c-NrcE) a los plásmidos pT18 y pT25. Las proteínas se expresaron como dominios C-terminal fusionadas al dominio T25 y como dominio N-terminal fusionado al T18 de la adenilato ciclasa. Como controles positivos de interacción entre proteínas de *Thermus* expresadas en *E. coli*, se usaron la glutamato deshidrogenasa (Gdh) (enzima homooligomérica) y NarG y NarJ cuya interacción fue previamente descrita en la tesis doctoral de O. Zafra (2004) (Zafra, 2004).

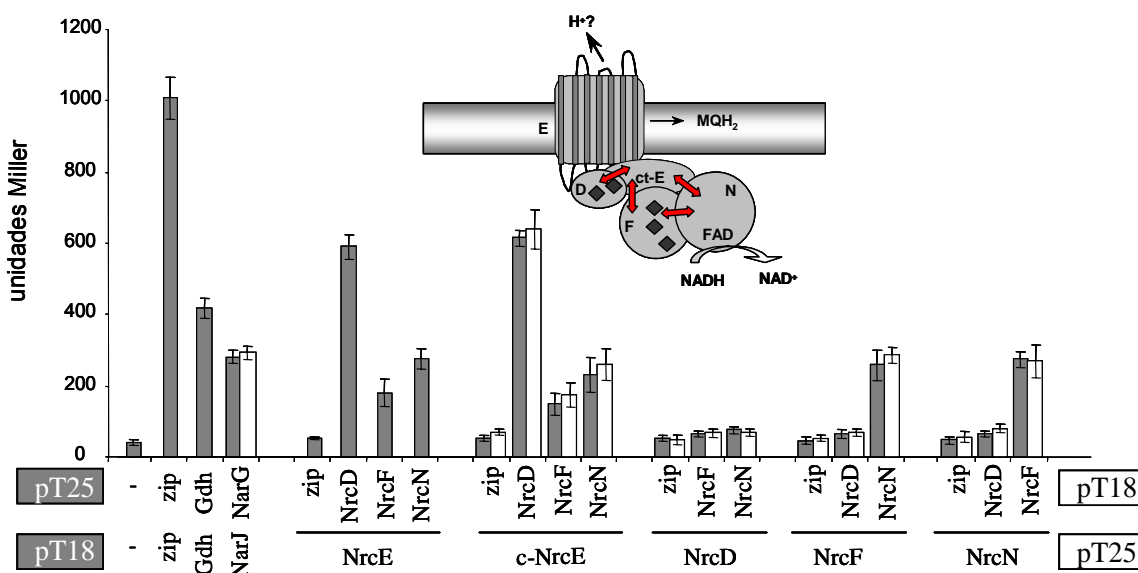


Figura 17. Interacción entre los componentes del operón *nrc*. Ensayo de doble híbrido bacteriano entre los componentes del operón *nrc*. Cada componente de Nrc, incluido el dominio C-terminal de NrcE (c-NrcE), fueron expresados en *E. coli* BTH101 como proteínas fusionadas a los dominios T18 y T25 de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* mediante derivados de los vectores pT18 y pT25. Las columnas grises y blancas corresponden a genes clonados en los plásmidos indicados con los mismos colores de fondo. Los ensayos son validados mediante controles negativos (-/-) y positivos (zip/zip, Gdh/Gdh y NarJ/NarG) que se acompañan en la gráfica. Los datos graficados (unidades Miller) corresponden a valores medios de 6 mediciones en dos experimentos independientes. Junto al gráfico se muestra un esquema de las interacciones observadas mediante flechas de doble punta entre las subunidades implicadas.

La figura 17 muestra los resultados de seis medidas independientes de actividad β -galactosidasa en células co-transformadas con parejas de plásmidos derivados de pT18 y pT25. Todos los genes fueron clonados en ambos plásmidos para evitar efectos artificiales debidos a la posición de la proteína en la fusión, con excepción de *nrcE* que permanece únicamente como dominio N-terminal de la fusión (NrcE-T18) para no bloquear su péptido señal de translocación. Los controles negativos (<100 unidades), se realizaron para cada una de las fusiones Nrc con un dominio de cremallera de leucina (Zip). Por otra parte, se eligieron tres tipos de control positivo: Las fusiones de cremallera de leucina a los fragmentos T18 y T25 que rendían aproximadamente 1000 unidades, y los pares de proteínas termófilas anteriormente mencionados (NarG/J= 280 unidades y Gdh/Gdh= 400 unidades). Detectamos interacción entre NrcE y NrcD (600 unidades), y señales positivas más débiles entre NrcE/F (200 unidades), y entre NrcE/N (300 unidades), similares a las que daba el control positivo NarG/J (figura 17). No se observaron interacciones entre NrcD/F ó NrcD/N (100 unidades). Estos resultados de interacción eran independientes de que las proteínas se expresaran como dominios N- o C- terminales en las fusiones (con excepción de NrcE).

Como NrcE parecía interactuar con las otras proteínas Nrc, decidimos probar si tales interacciones eran debidas a su dominio C-terminal (aminoácidos del 264-362), que por predicción informática parece encarar el citoplasma. Para ello, el dominio C-terminal de NrcE (c-NrcE) se clonó en los plásmidos pT18 y pT25. Los datos para c-NrcE fueron casi idénticos a aquellos obtenidos para la proteína completa, indicando que muy probablemente la interacción del resto de las subunidades Nrc con NrcE sea a través de este dominio citosólico. Todos estos datos y los de localización en *Thermus* aprotados en el apartado anterior muestran que las cuatro proteínas codificadas por el operón *nrc* interactúan entre sí formando un complejo heterotetramérico asociado a la membrana. A modo de resumen, la figura 17 aporta un esquema de las interacciones detectadas entre las subunidades del complejo Nrc.

Transferencia de electrones desde Nrc a Nar

Para valorar si el complejo Nrc estaba directamente implicado en la transferencia electrónica desde el NADH hasta la nitrato reductasa, se realizaron ensayos *in vitro* de respiración de nitrato con fracciones de membrana de cultivos de la cepa silvestre y de los mutantes *nrc::kat* inducidos por nitrato en condiciones de anoxia durante 7 horas. Sobre alícuotas de estas membranas se estudió la capacidad de oxidación de NADH en presencia de nitrato, midiendo también el nitrito producido como resultado de la reducción de éste. Para valorar la actividad NR en el ensayo empleamos metil viológeno reducido como donador artificial de electrones (Materiales y Métodos).

Como muestra la figura 18A, el NADH es un donador eficiente de electrones hacia la nitrato reductasa respiratoria (296 ± 36 nmoles de nitrito/min-mg de proteína). En los mutantes *nrcE::kat*, *nrcN::kat*, y *nrcN::bgaA* la generación de nitrito descendió llamativamente. Por otra parte, la cepa

silvestre mostraba una eficiente oxidación de NADH en presencia de nitrato (353 ± 11 nmoles de NADH consumido/min-mg de proteína), acorde con la cantidad de nitrito producida, y muy baja en su ausencia, indicando la escasa presencia de otra reductasa terminal (citocromo oxidasa). Esta oxidación de NADH era prácticamente indetectable en los mutantes *nrc* salvo en *nrcF::kat*, en el cual disminuía en un factor de 10 con respecto al silvestre (figura 18B). Estos datos confirmaban que el complejo Nrc constituía una NDH respiratoria necesaria para la respiración de nitrato. Quedaba también claro a partir de estos resultados que existe una ruta, cuantitativamente menos importante, para hacer llegar los electrones hasta la nitrato reductasa de manera independiente de Nrc en las membranas de *T. thermophilus* NAR1 durante la respiración anaeróbica de nitrato (los mutantes *nrc* producen niveles bajos de nitrito).

De forma remarcable, las membranas purificadas a partir de cultivos con tiempos de inducción menores (2-4 horas) en cada uno de los mutantes *nrc* presentaban un mayor porcentaje de actividades NDH y nitrato reductasa residuales (datos no mostrados), evidenciando que esta ruta Nrc-independiente perdía relevancia durante el crecimiento anaeróbico con nitrato. Este hecho nos llevó a plantearnos la posible implicación de la NDH aeróbica (Nqo) como responsable de tal actividad residual. Para confirmarlo, realizamos ensayos de RT-PCR sobre RNA total de cultivos aeróbicos (figura 18C, 1 y 2) o incubados 7 horas en anaerobiosis con nitrato (figura 18C, 3 y 4), observándose que el operón *nqo* se reprime en paralelo a la inducción del operón *nrc*.

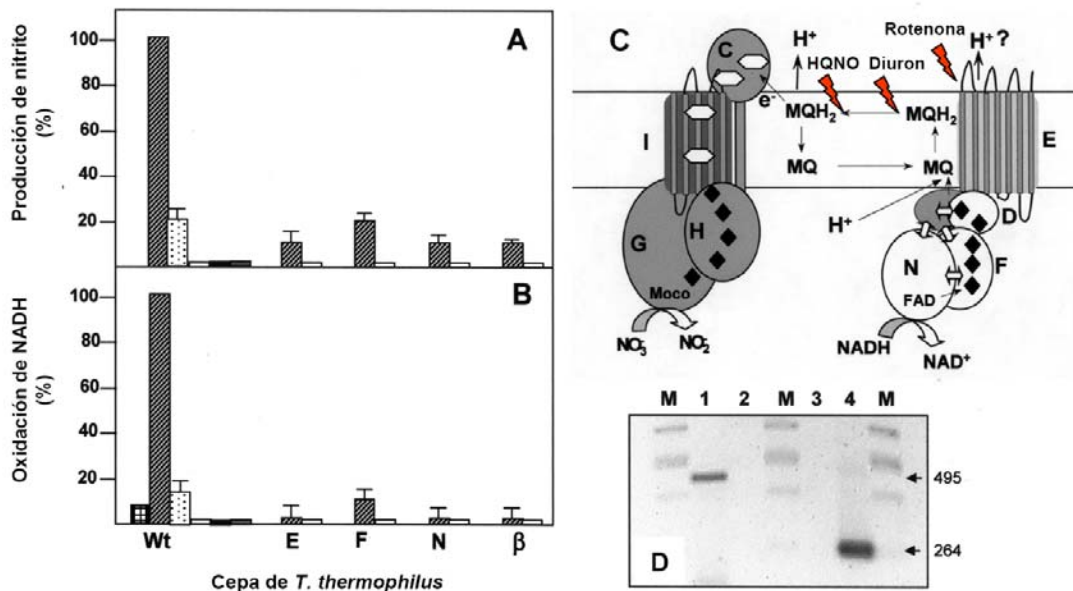


Figura 18. Reducción de nitrato acoplada a la oxidación de NADH. Cantidades idénticas (10 μ g de proteína) de fracciones de membrana procedentes de cultivos inducidos con nitrato y anoxia de la cepa silvestre NAR1 (Wt) y las mutantes *nrcE::kat* (E), *nrcF::kat* (F), *nrcN::kat* (N) y *nrcN::bgaA* fueron incubadas con NADH (1.5 mM) y nitrato (20 mM) en ausencia (columnas rayadas) o presencia de Rotenona a 0.2 mM (columnas punteadas), Rotenona a 2 mM (columnas blancas), Diuron a 0.2 mM (columnas negras) o HNQO a 0.2 mM (columnas grises). El porcentaje de nitrito producido y NADH oxidado con respecto al silvestre es representado en los paneles A y B respectivamente e ilustrado gráficamente en el esquema C. El panel D muestra un ensayo de RT-PCR con 20 ng de RNA total extraído de cultivos aeróbicos (1 y 2) o inducidos durante 7 horas con nitrato y anoxia (3 y 4). El transcrito de la subunidad 8 de la NDH-I (1 y 3) es detectado con los oligonucleótidos NQOEcoR1 y NQOBamH1. El transcrito de NrcD (2 y 4) es detectado con los oligonucleótidos ferred.nde1 y ferred.rev. Los tamaños de los productos de amplificación son mostrados en pb.

Temperatura y pH óptimos de Nrc

Como consecuencia de nuestra capacidad de ensayo de Nrc en membranas se procedió a valorar las condiciones de pH y temperatura óptimas para su actividad d. Para ello se efectuaron los ensayos de actividad nitrato reductasa descritos en Materiales y Métodos, variando separadamente los parámetros de pH (fosfato 50 mM, Tris-ClH 50 mM y tampón glicina 125 mM) y a continuación la temperatura. Como se puede deducir de la figura 19, se detectaron óptimos a 75°C y pH 9.5.

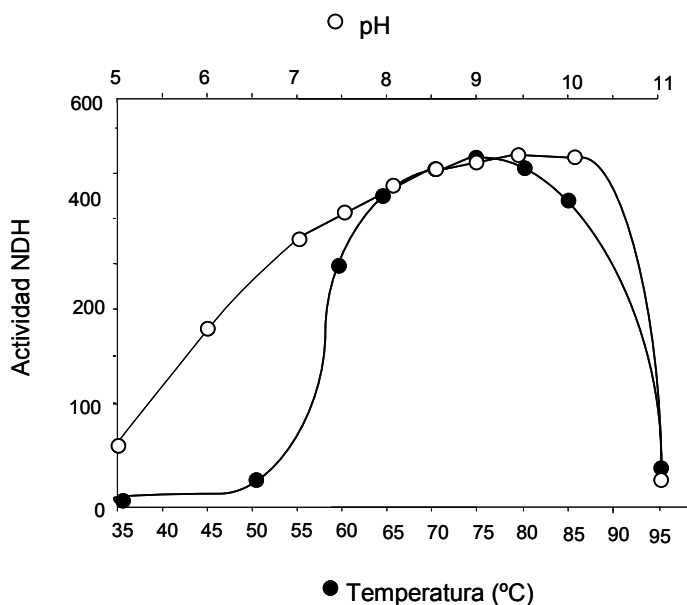


Figura 19. Valoración de la actividad NDH. Cuantificación de la actividad oxidasa de NADH de fracciones de membrana inducidas (10 mg) con 40 mM de nitrato en anaerobiosis a 70°C, durante 7 horas (nmoles de NADH consumido/min-mg) en función de la T^a y el pH. Los valores graficados corresponden a temperaturas de 37, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 95 (°C); y pHs: 5, 6.5, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 y 11. La composición del tampón de reacción para cada rango de pH se detalla en Materiales y Métodos.

Las quinonas son mediadores en la transferencia electrónica entre Nrc y Nar.

Para determinar el papel mediador de las quinonas en el ensayo de transferencia electrónica entre el NADH y el nitrato, empleamos diferentes concentraciones de inhibidores tales como Rotenona, Diuron y HQNO, que se compararon con las necesarias para inhibir la oxidación de NADH por fracciones de membrana de células crecidas aeróbicamente (con Nuo). Como se observa en la tabla 2, los compuestos Diuron y HQNO inhiben completamente la actividad NDH de membranas de cultivos aeróbicos y anaeróbicos a 0.2 μ M. En contraste, la actividad NDH de membranas aeróbicas (NDH-I) era inhibida completamente a 0.1 μ M de rotenona, mientras que las membranas inducidas por nitrato y anoxia (Nrc-NDH) mantenían un 50% de actividad. A 0.2 μ M de rotenona continuaba existiendo un 20% de actividad NDH en las “membranas anaeróbicas” mientras que a 2 μ M, tanto la NDH aeróbica como la de Nrc fueron inhibidas completamente. La reducción de nitrato no se vió afectada por tales inhibidores cuando se empleó metil viológeno como donador artificial de electrones.

Inhibidor	Rotenona					Diuron			HQNO		
	0	0.01	0.1	0.2	2	0.1	0.2	2	0.1	0.2	2
NAR1 O ₂	494 ± 27	482 ± 32	47 ± 6	18 ± 4	15 ± 3	256 ± 18	19 ± 3	15 ± 5	278 ± 22	21 ± 3	20 ± 2
NAR1 An	353 ± 11	327 ± 11	188 ± 15	76 ± 7	19 ± 4	192 ± 20	14 ± 4	7 ± 3	205 ± 14	15 ± 2	16 ± 2

Tabla 2. Inhibición de la actividad NDH. Efecto de inhibidores específicos de componentes respiratorios, a las concentraciones indicadas, sobre la actividad NADH oxidasa (nmoles de NADH consumido/mg·min de proteína) de fracciones de membrana (10 µg de proteína) procedentes de cultivos aeróbicos (O₂) o inducidos con nitrato y anoxia (An) de la cepa silvestre NAR1. Mezcla de reacción base: Tampón glicina 125 mM, pH10; NADH (1.5 mM) suplementados con nitrato (20 mM) para aquellos ensayos de membranas anaeróbicas.

Determinación de quinonas

Mediante el protocolo detallado en Materiales y Métodos se purificaron las quinonas respiratorias de las membranas de *T. thermophilus* procedentes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos crecidos en medio suplementado con 40 mM de nitrato potásico. La purificación de las quinonas tras cromatografía en TLC semipreparativa fue enviada al instituto [DSMZ \(German Resource Centre for Biological Material\)](#). Los resultados obtenidos mostraban a la menaquinona-8 como quinona respiratoria mayoritaria (MK8= 87%, MK7= 4% en aerobiosis y MK8= 88%, MK7+MK8= 12% en anaerobiosis. El porcentaje restante corresponde a MKs con tiempos de retención entre MK7 y MK8) en las membranas de *T. thermophilus* NAR1 tanto en aerobiosis como en anaerobiosis con nitrato (no mostrado).

El papel del operon *nrc* en la respiración de nitrato

Para analizar el papel que desempeña *nrc in vivo*, se estudió el crecimiento de los mutantes en *nrcE::kat*, *nrcF::kat*, y *nrcN::kat* bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Tal y como queda ilustrado en la figura 20B, tras 24 horas de incubación anaeróbica con nitrato todos los mutantes crecieron de forma similar a la cepa silvestre, lo cual implicaba que el agrupamiento *nrc* no era un requerimiento indispensable para el crecimiento en anaerobiosis. Sin embargo, cuando cada mutante fue co-cultivado junto con la cepa silvestre en experimentos de competición (figura 20B), este último desplazó a cada uno de los mutantes al cabo de 24 horas de crecimiento anaeróbico con nitrato (aprox. 15% de células mutantes permanecía en el cultivo). Esta tendencia era la consecuencia de una menor velocidad de crecimiento por parte de los mutantes en comparación con la cepa silvestre bajo tales condiciones de crecimiento anaeróbico (figura 20C). Por el contrario, en aerobiosis no se produjo tal desplazamiento, alcanzando tanto los mutantes como la cepa silvestre un número similar de viables (figura 20A). Con estos datos concluimos que el operón *nrc* confiere una ventaja selectiva específicamente durante el crecimiento anaeróbico con nitrato.

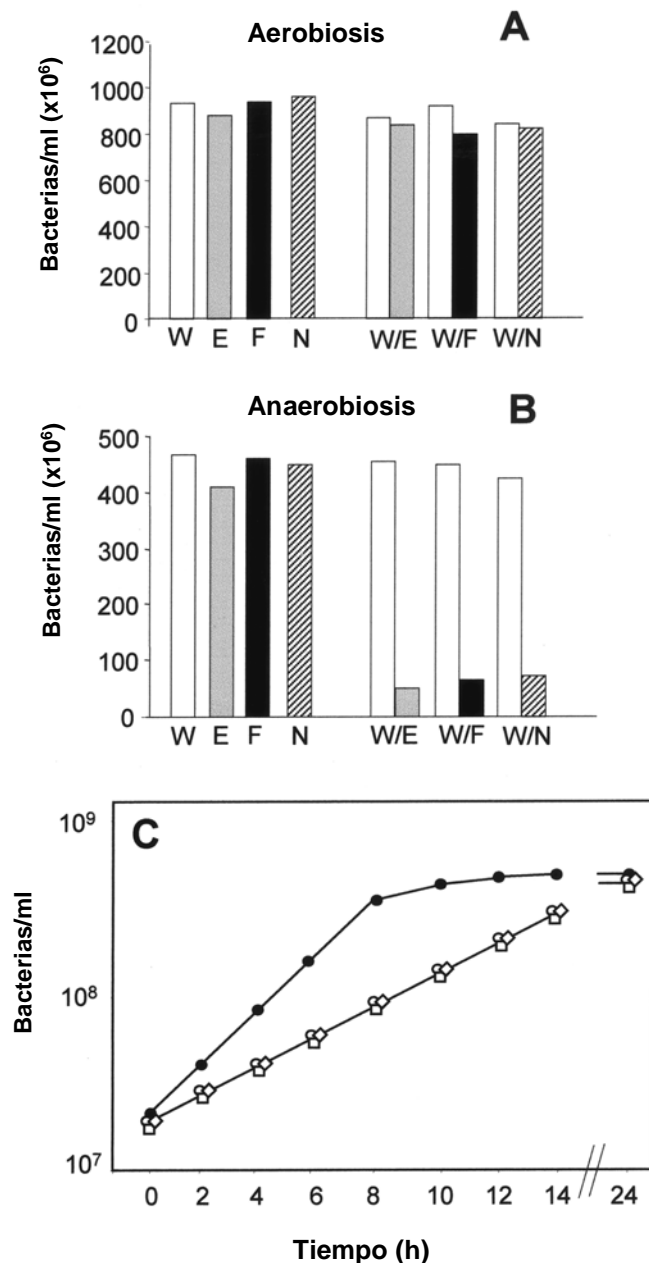


Figura 20. Los mutantes *nrc* no son competentes para crecimiento anaeróbico. Se inocularon números de células idénticos de *T. thermophilus* NAR1 *gdh::kat* (W) y/o NAR1 *nrcE::kat* (E), *nrcF::kat* (F) y *nrcN::kat* (N) en cultivos independientes (W, E, F, N) o mixtos (W/E, W/F, W/N) en medio TB con kanamicina. Los cultivos se incubaron a 70°C aeróbicamente durante 20 horas (A) o anaeróbicamente con 40 mM de nitrato durante 24 horas (B).

El recuento de cada cepa se dedujo observando la viabilidad en placas TB con kanamicina (ambas cepas crecen) en comparación con plaques restrictivos en TB con kanamicina y cloranfenicol (solo crece la cepa silvestre). El panel C muestra curvas de crecimiento anaeróbico de cultivos independientes de la cepa NAR1 (círculos negros) y cada uno de los mutantes *nrc* ensayados (símbolos blancos). Se muestra el tiempo en horas y los valores graficados corresponden a recuentos de viables en placa TB.

Capítulo 2. Regulación transcripcional de la respiración de nitrato en *T.thermophilus* NAR1

El elemento NCE codifica dos homólogos de reguladores transcripcionales

El análisis de la secuencia del elemento NCE reveló la presencia de dos fases abiertas de lectura que fueron designados como *dnrS* y *dnrT* (inicialmente denominadas *regA* y *regB*, en (Cava y Berenguer, 2006)) y que se localizaban en la zona comprendida entre los operones *nar* y *nrc* (figura 21A). Estas secuencias están depositadas con el código de acceso AM161043.

Ambos genes forman una única unidad transcripcional divergente respecto a los operones previamente mencionados, siendo además inducible por señales de nitrato y anoxia, tal y como quedaba patente al observar su cotranscripción en ensayos de RT-PCR (figura 21B) tomando como molde una extracción de RNA total procedente de células inducidas durante 4 horas con nitrato en condiciones de anoxia.

La figura 21C muestra los motivos identificados en DnrT y DnrS. El gen *dnrS* codifica una proteína de 466 aminoácidos y 52.6 kDa que contiene un dominio GAF (los dominios tipo GAF deben su nombre a ser descritos inicialmente en cGMP-fosfodiesterasas en vertebrados, en Adenilato ciclasas de cianobacterias y en FhlA, activador transcripcional de liasas bacterianas de ácido fórmico), entre las posiciones 1 y 163, y un dominio BTAD (*Bacterial transcriptional activator domain*) cerca de su extremo C-terminal (posiciones 365-466). Los dominios GAF están implicados en detección de señales tales como oxígeno u óxidos de nitrógeno en una amplia diversidad de proteínas, mientras que los dominios BTAD son habituales en reguladores transcripcionales bacterianos. Estos datos sugirieron la posible implicación de DnrS como sensor y activador transcripcional.

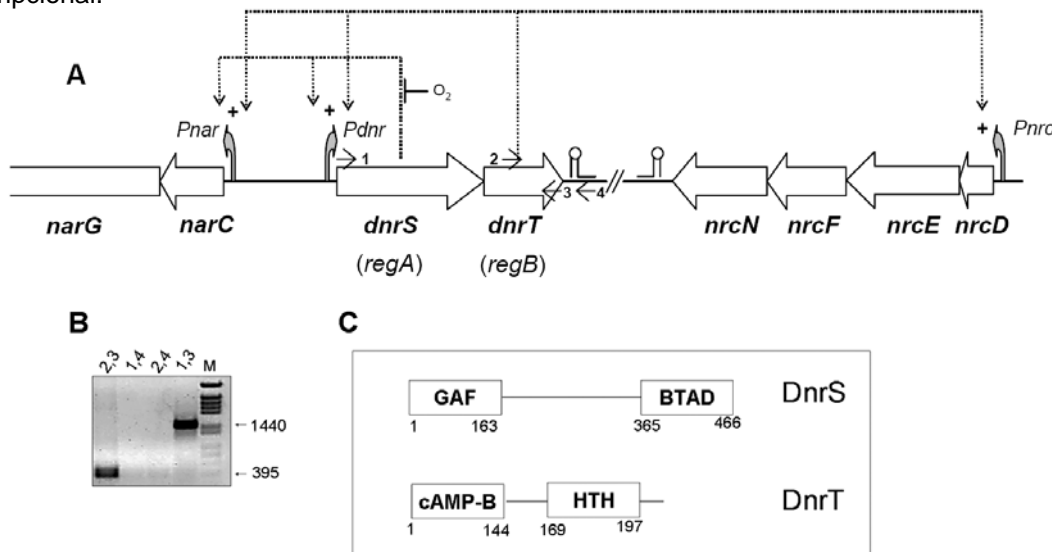


Figura 21. El operón *dnr*. **A)** Esquema del operón *dnr* y su posición relativa con respecto a los operones *nrc* y *nar* del elemento NCE. Las líneas punteadas indican el papel que desempeñan DnrS y DnrT como activadores transcripcionales sobre los promotores indicados (desarrollado en este capítulo). **B)** Ensayo de RT-PCR sobre RNA total procedente de células inducidas con nitrato y anoxia durante 4 horas. Los oligonucleótidos empleados son (1) regANde1, (2) o27-77, (3) *dnrT*stop y (4) o27-81; y su posición aproximada de hibridación es indicada en el panel A. **C)** Esquema de los dominios identificados en las secuencias aminoacídicas de DnrT y DnrS. Los detalles se comentan en el texto.

Por otra parte, DnrT codifica una proteína de 217 aminoácidos (24.8 kDa) que inicia su secuencia proteica leyendo un codon GUG. Las comparaciones de secuencia revelaron similitudes entre DnrT y miembros de la familia de reguladores transcripcionales CRP-FNR (figura 22).

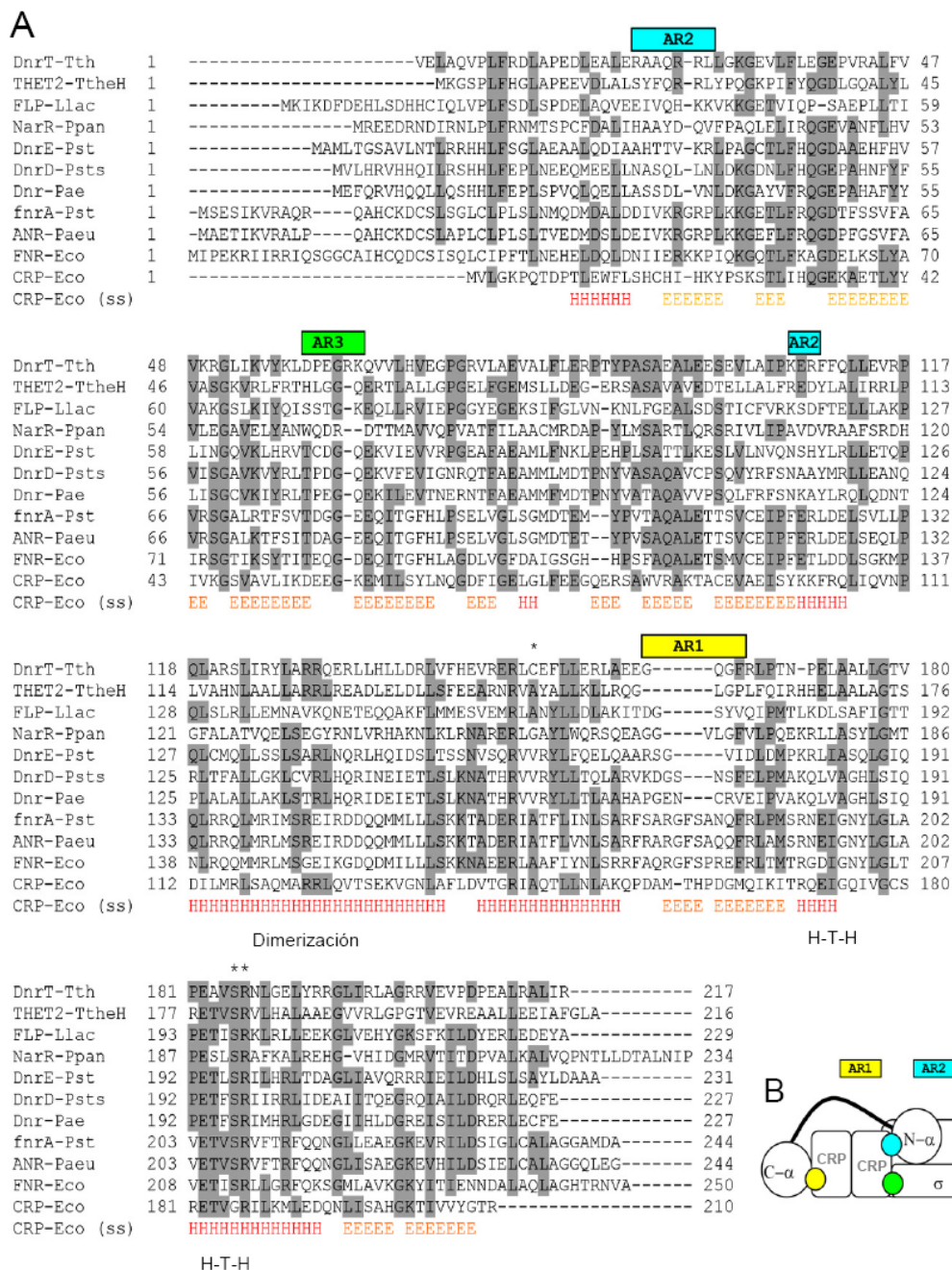


Figura 22. Análisis *in silico* de la secuencia de DnrT. A) Alineamiento de la secuencia de DnrT. Se compara la secuencia aminoacídica de DnrT con otros miembros de la familia CRP mediante el programa CLUSTALW. Los residuos idénticos son destacados en gris, y los residuos sustituidos por mutagénesis dirigida son marcados con asteriscos. Se indican tanto las estructuras secundarias (H, hélice alfa; E, lámina beta) como los motivos de interacción con la RNAP (AR1-3), como la hélice de dimerización y el motivo hélice-giro-hélice de unión a DNA de CRP de *E. coli* (CRP-Eco, PDB 1O3R). **B)** Esquema de la relación espacial de las regiones AR1-AR3 de CRP y las subunidades de la RNAP. Acceso de proteínas: THET2-TtheH (TTC1072) de *T. thermophilus* HB27; FLP-Llac (Q9S393) de *Lactococcus lactis*; NarR-Ppan (Q93PW2) de *Paracoccus pantotrophus*; DnrE-Pst (Q9X7J7), DnrD-Pst (Q9X7J4), y FnrAPst (P7200) de *Pseudomonas stutzerii*; Dnr-Pae (Q51441) y ANR-Pae (P23926) de *P. aeruginosa*; FNR-Ec (P0A9E6) y CRP-Eco (P0ACJ8) y de *E. coli*.

En concreto, el mayor grado de identidad lo mostraba con una proteína hipotética de *T. thermophilus* HB27 (TTC1072), seguido de miembros del subgrupo Dnr, la mayor parte de los cuales están implicados en regulación y transducción de señales desde el NO (DnrE, DnrD) o desde el nitrato (NarR) en Proteobacterias desnitrificantes.

El análisis de secuencia indica la presencia de un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cAMP-B) en la región N-terminal similar al de CRP, pero también revela la ausencia de las cuatro cisteínas necesarias para coordinar un centro sulfoférrico como el que tiene FNR, haciendo improbable un papel señalizador de oxígeno o de potencial redox. No obstante, DnrT presenta un dominio hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) C-terminal de unión a DNA característico de la familia CRP. En esta región aparecen aminoácidos muy conservados (E182, S185 y R186, marcados con * en la figura 22A) que en FNR participan en la interacción con el DNA (Korner y col., 2003). La figura 22 detalla una posible hélice de dimerización, el dominio HTH de unión a DNA, y las posibles regiones AR1, AR2 y AR3 de interacción con la RNA polimerasa para su activación transcripcional.

Importancia del operón *dnr* en la respiración de nitrato

Para estudiar el papel fisiológico desempeñado por las proteínas DnrT y DnrS en *T. thermophilus*, clonamos sus regiones codificantes, las sobreespresamos en *E. coli*, y generamos antisueros policlonales de conejo (Materiales y Métodos) con los que pudimos seguir su expresión mediante Western blot.

Tal y como se muestra en la figura 23A, señales específicas de los tamaños esperados para DnrS y DnrT fueron inmunodetectadas en la fracción soluble de las cepas facultativas NAR1 y HB27c incubadas durante cuatro horas bajo condiciones anóxicas con nitrato (condiciones An). Los Western blots paralelos con antisueros contra NarG y NrcD en fracciones de membrana, sirvieron

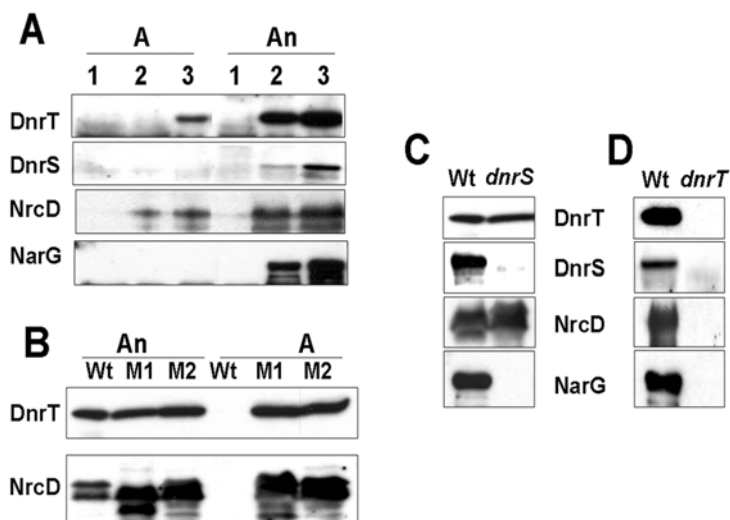


Figura 23. Esencialidad del operón *dnr* para la expresión de los complejos respiratorios Nar y Nrc.

A) Western blots con proteínas totales de *T. thermophilus* HB27 (1), HB27c (2) y NAR1 (3) de cultivos aeróbicos (A) o tras 4 horas de inducción con nitrato y anoxia (An), empleando antisueros específicos para el reconocimiento de DnrT, DnrS, NrcD y NarG. **B)** Western blots detectando DnrT y NrcD en cultivos de la cepa silvestre NAR1 (Wt) y en dos mutantes *dnrS::kat* independientes (M1 y M2) crecidos aeróbicamente (A) o tratados durante 4 horas con nitrato en anoxia (An). Destaca la expresión constitutiva de DnrT y NrcD en los mutantes *dnrS::kat*. **C)** Western blots para la detección de DnrT, DnrS, NrcD y NarG en cultivos anóxicos con nitrato en la cepa silvestre NAR1 (Wt) y el mutante *dnrS::kat* (*dnrS*). **D)** Western blots como en C pero para la cepa silvestre (Wt) y el mutante en *dnrT* (*dnrT*).

para validar la inducción de Nar y Nrc, respectivamente.

Como era de esperar, ninguna de estas proteínas codificadas por el NCE (DnrS, DnrT, NarG, NrcD) fue detectada en la cepa aerobia *T. thermophilus* HB27 carente de dicho elemento (Carril 1). Cuando las cepas facultativas fueron crecidas aeróbicamente, pudimos detectar niveles bajos de DnrT y DnrS a tiempos largos de exposición de los revelados (carriles 2 y 3). Por tanto, DnrS y DnrT se expresan a bajos niveles durante el crecimiento aeróbico y se inducen en respuesta a nitrato y anoxia. Es interesante el hecho de que Nrc también se detecta aeróbicamente a niveles basales mientras que el complejo Nar permanece inapreciable en las membranas aeróbicas de *Thermus thermophilus* NAR1, sugiriendo la existencia de diferencias en el control transcripcional de los correspondientes operones.

DnrS y DnrT son necesarios para el crecimiento anaeróbico de T. thermophilus

Para dilucidar el papel fisiológico de DnrS y DnrT se construyeron mutantes de inserción independientes, interrumpiendo su secuencia codificante con el cassette *kat*. Debido a su naturaleza de operón, la inserción del *kat* con la orientación apropiada provoca la expresión constitutiva de DnrT en un fondo genético *dnrS::kat* tanto si el cultivo bacteriano es crecido en aerobiosis como si es sometido a inducción anóxica con nitrato (figura 23B). Por el contrario, en *dnrT::kat*, no son de esperar efectos polares de la mutación al ser final de operón.

De los ensayos de crecimiento se dedujo que ni el mutante de inserción en *dnrS* ni el mutante en *dnrT* eran capaces de crecer anaeróbicamente con nitrato como aceptor final de electrones (ver más adelante), mostrando de manera inequívoca que la expresión de ambos genes es esencial al menos para la síntesis de Nar (dado que los mutantes *nrc* crecen anaeróbicamente). Esto fue confirmado mediante Western blot en el que se mostraba que NarG no se expresaba en ninguno de los dos mutantes (figura 23C y D). Sin embargo, mientras que *dnrT::kat* no era capaz de expresar NrcD, NarG e incluso DnrS, el mutante *dnrS::kat* (que expresa DnrT constitutivamente) producía NrcD de forma constitutiva (figura 23C). Por tanto, DnrS y DnrT son requeridos para la expresión del operón *nar*, pero sólo DnrT lo es para la activación de *nrc*. De estos resultados se deduce también que la actividad de DnrT como regulador positivo de *nrc* es independiente de las condiciones anóxicas o de la presencia de nitrato. Además, los resultados demuestran la implicación de DnrT como autoinductor de su propio operón.

Para confirmar los datos anteriores, se desarrollaron ensayos de complementación de los mutantes *dnr* empleando construcciones derivadas del plásmido pWUR, que confiere resistencia a bleomicina y permite la expresión constitutiva de cualquier gen clonado en el sentido adecuado (Materiales y Métodos). Tal y como se muestra en la figura 24A, la complementación del mutante *dnrT* por pWUR_{dnrT} resulta en la expresión constitutiva (en aerobiosis y anaerobiosis) de NrcD, pero no de NarG, para la cual continúa siendo imprescindible la ausencia de oxígeno (carriles An). Es interesante destacar que la expresión de la proteína DnrT-SR (S185A/R186L), portadora de dos cambios puntuales en el dominio HTH que afectan su unión por el DNA, no complementaba ni la

actividad nitrato reductasa ni la expresión del complejo Nrc en el mutante *dnrT* (figura 24A). Es más, su expresión en la cepa silvestre provocaba interferencias a la hora de la expresión de NarG, sugiriendo un efecto de competición con DnrT silvestre en posibles interacciones necesarias para la activación del promotor de *nar* (como se probará más adelante, figura 32D). Por otra parte, y para analizar el efecto de la mutación SR/AL en DnrT sobre su propia autoinducción, hicimos un reemplazamiento del gen *dnrT* silvestre por el mutante. Como se observa en la figura 24C, el mutante SR se expresa a nivel basal en condiciones de inducción, por lo que se confirma la necesidad de la unión a DNA para la inducción también del operón *dnr*. Obviamente, el mutante SR en monocopia no puede inducir NarG ni NrcD (figura 24C).

Por tanto, DnrT es confirmado como regulador positivo de la transcripción de los operones *nrc*, *nar* y *dnr* implicados directamente en la respiración anaeróbica de nitrato, con la peculiaridad de ser insensible a oxígeno y nitrato. Su actividad parece por tanto depender únicamente de un incremento en su concentración celular.

Por otro lado, la complementación de un mutante *dnrS::kat* no genera la inducción aeróbica de la nitrato reductasa, pese a la expresión constitutiva de ambos reguladores (figura 24B). Sin embargo, es importante destacar la existencia de una baja expresión de NarG y de la consiguiente actividad NR bajo condiciones anóxicas en ausencia de nitrato.

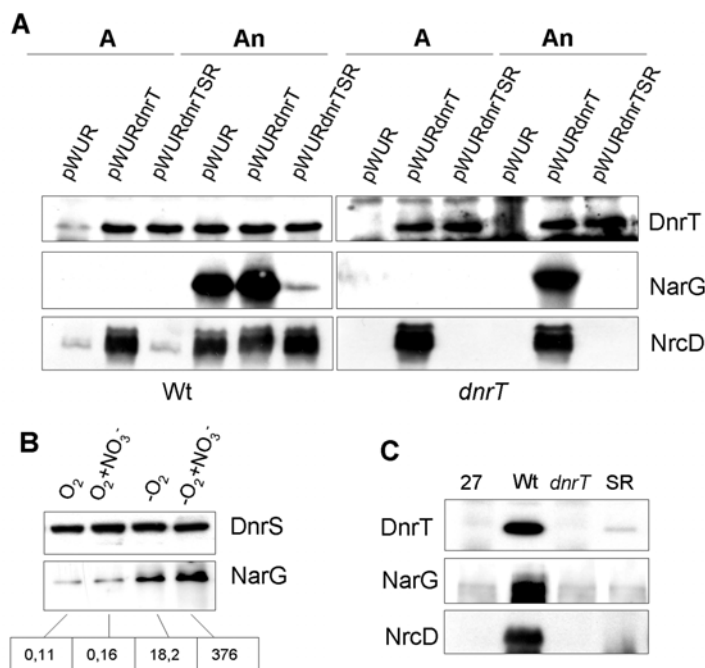


Figura 24. Papel funcional de DnrS y DnrT.

A) Western blots para la detección de DnrT, NarG y NrcD en cultivos aeróbicos (A) o inducidos con nitrato y anoxia (An) de las cepas NAR1 (Wt) y el mutante *dnrT::kat* (*dnrT*) transformados con el plásmido control pWUR o con construcciones derivadas portando el gen *dnrT* silvestre (pWUR*dnrT*) o el mutante SR/AL (pWUR*dnrT*TSR). **B)** Western blots detectando DnrS y NarG en cultivos aeróbicos (con o sin nitrato) y anaeróbicos (con o sin nitrato) de la cepa mutante *dnrS::kat* transformada con la construcción pWUR*dnrS*. Se muestran los datos de la actividad nitrato reductasa para cada caso en nmoles de nitrito producido/min-mg de proteína. **C)** Detección de DnrT, NarG y NrcD en cultivos anóxicos con nitrato de la cepa aeróbica obligada HB27 (27), el mutante NAR1 *dnrT* (*dnrT*) y un mutante *dnrT* en el cual el gen silvestre es sustituido por el alelo que codifica el mutante SR/AL (SR).

Efecto de los reguladores DnrS y DnrT sobre la actividad de los promotores de *nar*, *nrc* y *dnr*

Para cuantificar el efecto de DnrS y DnrT en la transcripción de los operones *nar*, *nrc* y *dnr*, se clonaron las regiones promotoras de dichos operones delante de un gen reportero termoestable (*bgaA*) en un nuevo vector de clonaje que confiere resistencia termoestable a higromicina B,

compatible con las resistencias a kanamicina y bleomicina (Materiales y Métodos). Estos derivados fueron introducidos en la cepa silvestre y en sus mutantes *dnrT::kat* y *dnrS::kat* junto con el plásmido control pWUR o derivados que expresan DnrT o DnrS. La actividad beta galactosidasa correspondiente a la expresión de cada uno de estos promotores fue medida bajo cuatro condiciones de crecimiento: Aerobiosis sin nitrato (1), aerobiosis con nitrato (2), anaerobiosis sin nitrato (3) y anaerobiosis con nitrato (4). Los resultados se muestran en la figura 25.

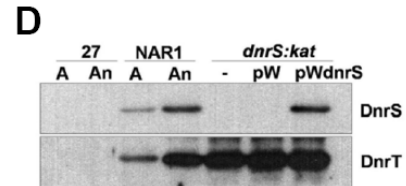
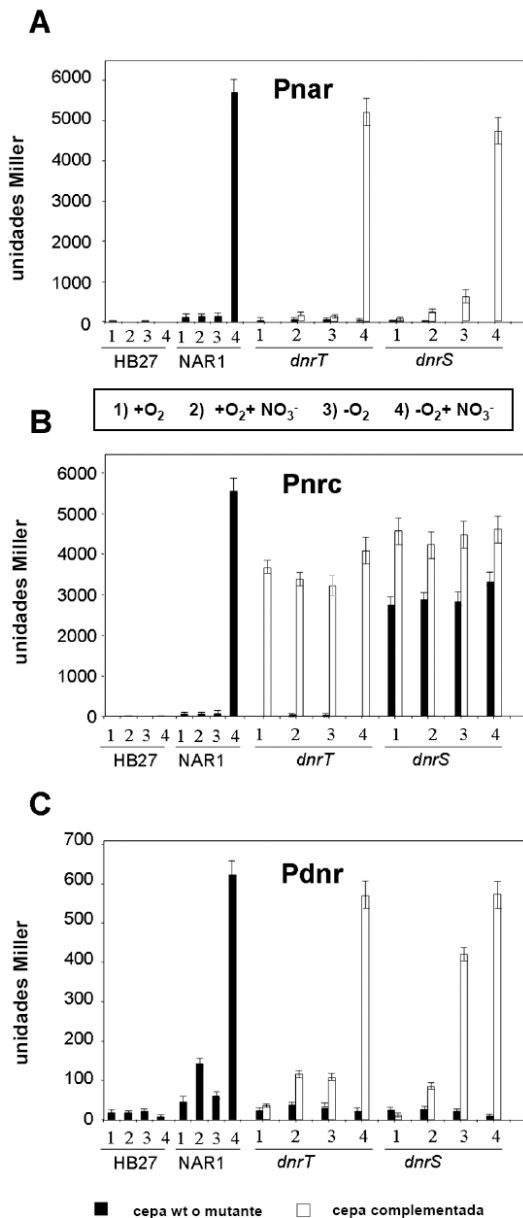


Figura 25. Valoración de la actividad transcripcional de los operones *nar*, *nrc* y *dnr*. En los gráficos se muestran resultados de actividad beta galactosidasa de las cepas indicadas portando los plásmidos de prueba de promotores: pMHnarbgaA (A), pMHnrcbgaA (B) o pMHdnrbgaA (C), transformadas con el vector control pWUR (columnas negras) o bien con los derivados pWURdnrS y pWURdnrT (columnas blancas) para la complementación de las mutaciones *dnrS* y *dnrT*, respectivamente. Los datos de actividad se muestran en unidades Miller y corresponden a 3 experimentos independientes en aerobiosis sin (1) o con nitrato (2) y en anaerobiosis sin (3) o con nitrato (4). **D**) Western blots detectando DnrS y DnrT en extractos de *T. thermophilus* NAR1 (NAR1) crecido aeróbicamente (A) o inducido con anoxia y nitrato durante 4 horas (An), y en su mutante *dnrS::kat* (-) o tras complementación con pWUR (pW) o pWURdnrS (pWdnrS). Se muestra como control negativo la cepa aeróbica estricta HB27 (27). Destaca que la expresión constitutiva de DnrT en el mutante en *dnrS* es independiente de la presencia de pWURdnrS.

En la cepa silvestre, los promotores *Pnar* (A) y *Pnrc* (B) son fuertes cuando están inducidos con nitrato y anoxia ($5-6 \times 10^3$ unidades) (A4, B4) mientras que el promotor *Pdnr* (C4) es mucho más débil ($5-6 \times 10^2$ unidades), tal y como cabría esperar de las características enzimáticas y

regulatorias de las proteínas que codifican sus operones respectivos. Igualmente, tal y como esperábamos, ninguno de estos promotores se inducía en la cepa aeróbica HB27.

Por otra parte, los mutantes *dnrT* era incapaces de activar la transcripción desde ninguno de estos promotores en ninguna de las condiciones de ensayo, complementándose la inducción mediante la expresión en *trans* de la proteína (pWURdnrT). Por tanto, estos datos refuerzan el papel de DnrT como activador transcripcional central en la expresión de los operones del NCE. También confirman la dependencia de *Pnrc* de DnrT, y el carácter insensible a oxígeno o nitrato de éste, pues la expresión constitutiva de DnrT desde el plásmido pWURdnrT o desde el cromosoma (en el mutante *dnrS::kat*) provoca la transcripción de *nrc* en todas las condiciones ensayadas.

Por otro lado, los datos muestran que DnrS es necesaria para la expresión desde *Pnar* y *Pdnr*. Sin embargo, la expresión simultánea de DnrS y DnrT en el mutante *dnrS::kat* portando pWURdnrS no garantiza la expresión de estos promotores durante el crecimiento aeróbico (A1-2 y C1-2). Se puede detectar una expresión muy baja de *nar* en condiciones anaeróbicas sin nitrato (A3) tal y como se observó en la figura 24B, siendo necesario el nitrato para alcanzar los niveles de expresión máxima (A4).

Por el contrario, el operon *dnr* puede ser transcrito en anoxia en ausencia de nitrato (C3) hasta alcanzar un 80% del nivel obtenido con nitrato (C4). Estos datos, junto con los mostrados en la figura 24B nos llevaron a concluir que DnrS es un factor de transcripción positivo sensible a oxígeno, y que actúa en colaboración con DnrT durante la expresión desde *Pnar* y *Pdnr*.

DnrS pierde estabilidad en presencia de oxígeno

Los resultados anteriores (figuras 24 y 25) muestran junto con la figura 26A, la alteración de la funcionalidad y estabilidad de DnrS en condiciones anaeróbicas, hecho que podría deberse al efecto del oxígeno *per se* sobre el propio DnrS, o bien que el propio estado redox celular pudiera ser directa o indirectamente el factor inactivante de DnrS.

Para comprobar esto, La proteína DnrS fue expresada de manera constitutiva en la cepa silvestre NAR1 desde el plásmido pWURdnrS en condiciones anóxicas (-) y aeróbicas (+). Posteriormente, los extractos solubles de estos cultivos fueron sometidos a tratamiento controlado con tripsina (Materiales y Métodos) y consiguiente análisis por Western blot (figura 26B). Como se puede apreciar, la proteína DnrS expresada en condiciones aeróbicas era más sensible a la digestión trípica que cuando el ambiente celular era por el contrario más reductor. Así, en tiempos de digestión de 1 minuto la proteína sintetizada aeróbicamente era degradada en su mayor parte, mientras que la sintetizada en ambiente anóxico no resultaba afectada por la proteasa. Los productos de degradación eran los mismos en ambas condiciones, indicando que la tripsina de manera específica ataca los sitios accesibles cuando DnrS pierde estabilidad, hecho que parece acentuarse en presencia de oxígeno.

DnrT, por su parte, confirmaba su insensibilidad a la presencia de oxígeno, mostrando una sensibilidad similar frente a tripsina para ambas condiciones de expresión (figura 26B).

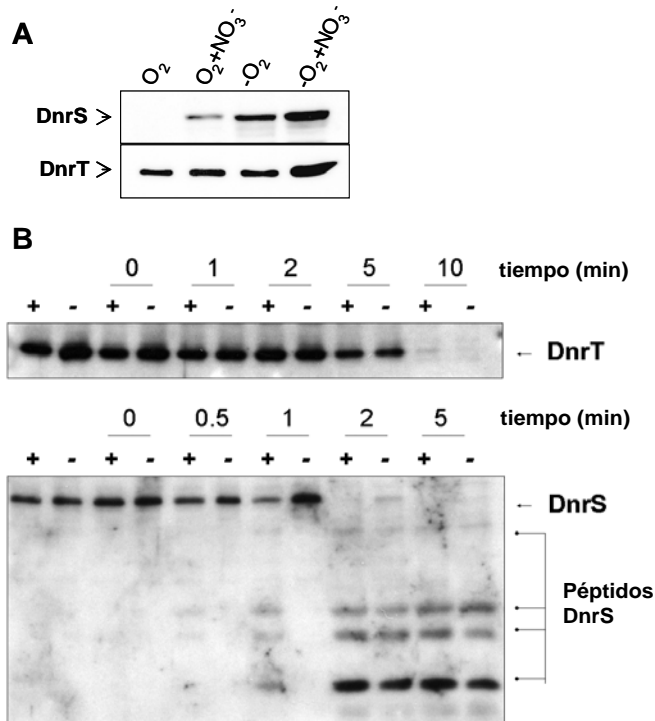


Figura 26. Sensibilidad de DnrT y DnrS a oxígeno. A) Inmunodetección de DnrS y DnrT en cultivos de *T. thermophilus* NAR1 sometidos a las condiciones indicadas. B) Las fracciones citosólicas de cultivos aeróbicos (+) y anaeróbicos (-) de la cepa NAR1 transformada con pWURdnrT o pWURdnrS fueron tratadas con tripsina (Materiales y Métodos) durante los tiempos que se indican, detectándose el resultado de la tripsinización para DnrT y DnrS mediante Western blot.

DnrT se une a *Pnrc*, *Pnar* y *Pnqo*

Para analizar la actividad *in vitro* de DnrT, éste fue expresado en *E. coli* y purificado mediante columnas de afinidad de Ni-NTA. Mediante cromatografía de exclusión molecular en sepharosa G-200, DnrT fue eluido de la columna con un tiempo de retención que se extrapolaba en las rectas con marcadores de patrones conocidos a tamaños de entre 45-50 kDa, coincidente aproximadamente con el doble de su masa teórica (figura 27). Estos datos indican que DnrT forma dímeros cuando se expresa heterológamente. La proteína mutada DnrT SR/AL fue purificada de la misma manera (dato no mostrado) para investigar el papel de su dominio HTH.

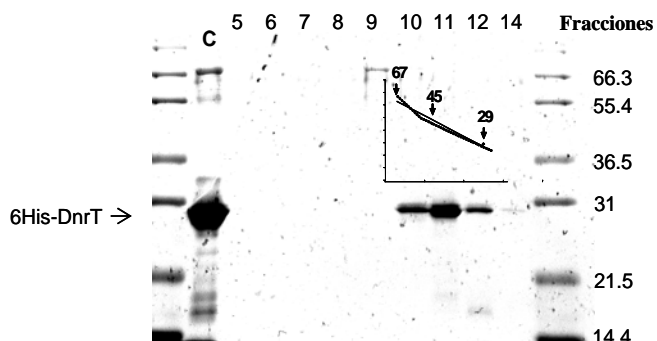


Figura 27. DnrT es un dímero. Composición en la que se muestra un gel de PAGE de la muestra control (C) tras la purificación de DnrT mediante cromatografía de afinidad en Ni-NTA agarosa, y las fracciones resultado de la cromatografía de exclusión molecular en sepharosa-200. La movilidad electroforética del marcador se indica en kDa. La gráfica superpuesta al PAGE representa el tamaño molecular (kDa) frente al volumen de retención, mostrando que la fracción principal corresponde a DnrT en estado dimérico.

Las proteínas DnrT silvestre y su mutante DnrT-SR/AL fueron analizadas para su capacidad de unir específicamente posibles DNA diana. Entre éstos, se seleccionó un fragmento

de 235 pb (ver anexo II) que contenía la posible región promotora del operón *nrc* porque, a diferencia de *Pnar*, la transcripción desde este promotor solo dependía de DnrT (figuras 23, 24 y 25).

Se obtuvieron pruebas adicionales de la interacción de DnrT con *Pnrc* mediante ensayo de protección frente a la Dnasa I (*Dnase I Footprinting*) realizado a temperaturas técnicamente lo más próximas posibles (50°C) a las fisiológicas para este organismo. Los resultados (figura 28A) muestran claramente dos regiones de *Pnrc* protegidas por DnrT centradas entorno a la posición -43 desde el punto de origen de la transcripción (CCTTCACCTTACTCC₋₄₃TTGACCCCGGTCAT). Por ello, dedujimos que DnrT se une a *Pnrc* en posiciones similares a aquellas descritas para miembros de la familia CRP en promotores de tipo II (Busby y Ebright, 1999; Lawson y col., 2004).

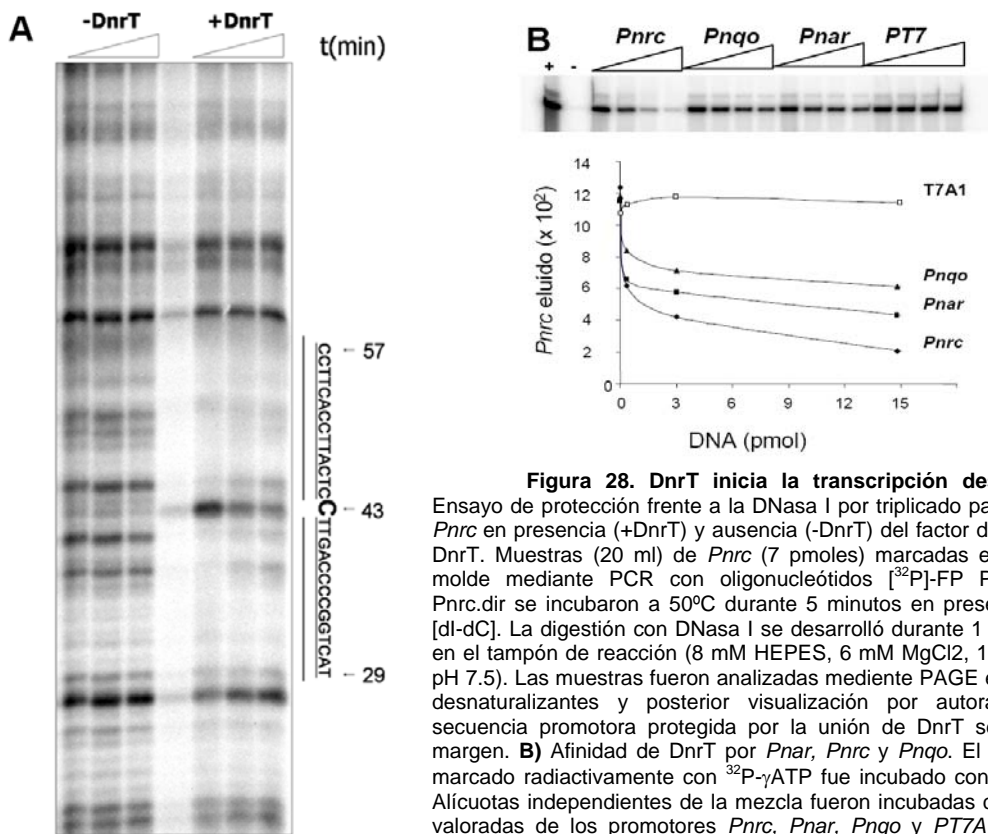


Figura 28. DnrT inicia la transcripción desde *Pnrc*. **A)** Ensayo de protección frente a la DNasa I por triplicado para el promotor *Pnrc* en presencia (+DnrT) y ausencia (-DnrT) del factor de transcripción DnrT. Muestras (20 ml) de *Pnrc* (7 pmoles) marcadas en una cadena molde mediante PCR con oligonucleótidos [³²P]-FP *Pnrc*.rev y FP *Pnrc*.dir se incubaron a 50°C durante 5 minutos en presencia de 2 mg [dl-dC]. La digestión con DNasa I se desarrolló durante 1 minuto a 50°C en el tampón de reacción (8 mM HEPES, 6 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, pH 7.5). Las muestras fueron analizadas mediante PAGE en condiciones desnaturizantes y posterior visualización por autoradiografía. La secuencia promotora protegida por la unión de DnrT se indica en el margen. **B)** Afinidad de DnrT por *Pnar*, *Pnrc* y *Pnqo*. El promotor *Pnrc* marcado radiactivamente con ³²P-γ-ATP fue incubado con DnrT-Ni-NTA. Alícuotas independientes de la mezcla fueron incubadas con cantidades valoradas de los promotores *Pnrc*, *Pnar*, *Pnqo* y *PT7A1* (control). La autoradiografía del análisis de las eluciones en PAGE desnaturizante muestra la relación de ³²P-*Pnrc* desplazada por cada promotor. La gráfica muestra cuantitativamente la representación de las mediciones isotópicas en unidades arbitrarias con respecto a la cantidad de DNA competidor.

Como DnrT es requerida para la expresión de *nar*, y el operón *nqo* se reprime en paralelo (figura 18D), probamos si DnrT era capaz de unir *Pnar* y *Pnqo* en experimentos de competición con *nrc*. Para ello, *Pnrc* marcado radiactivamente [³²P] fue unido a DnrT inmovilizada en resina de Ni-NTA, para ser incubado posteriormente con cantidades crecientes de DNA competidor frío (*Pnrc*,

Pnar y *Pnqo*). La cantidad de radiactividad remanente asociada a la resina (*Pnrc* marcado interaccionando con DnrT y no desplazado por DNA competidor) fue medida, de forma que se analizaron comparativamente las afinidades relativas de la proteína DnrT por los distintos promotores. Como se muestra en la figura 28B, el promotor *Pnrc* eluyó casi en su totalidad la sonda radiactiva ^{32}P -*Pnrc* (~84%), mientras que el promotor no relacionado *PT7A1* del bacteriófago T7 de *E. coli* (Nudler y col., 1997) no desplazó la radiactividad ligada a la resina. Sin embargo, *Pnar* y *Pnqo* fueron capaces de eluir parcialmente la sonda marcada. De esta forma, concluimos que DnrT se une *in vitro* a los tres promotores mencionados, aunque la afinidad que muestra por *Pnrc* sea superior que por *Pnar* y *Pnqo*.

DnrT es un activador transcripcional del operon *nrc*

Para confirmar el papel activador de DnrT sobre *Pnrc*, desarrollamos experimentos de reclutamiento de la RNA polimerasa. La figura 29A muestra el esquema experimental seguido, en el cual el promotor *Pnrc* marcado con biotina en su extremo 5' se unió a agarosa activada con estreptavidina (Materiales y Métodos), usándolo como cebo para capturar la RNA polimerasa (thRNAPh) en dependencia de la presencia o ausencia del factor DnrT. Para validar el ensayo se aportaron como controles la RNA polimerasa carente de factor σ^A (thRNAPc), y la proteína DnrT mutada en los residuos SR del dominio de unión a DNA (HTH).

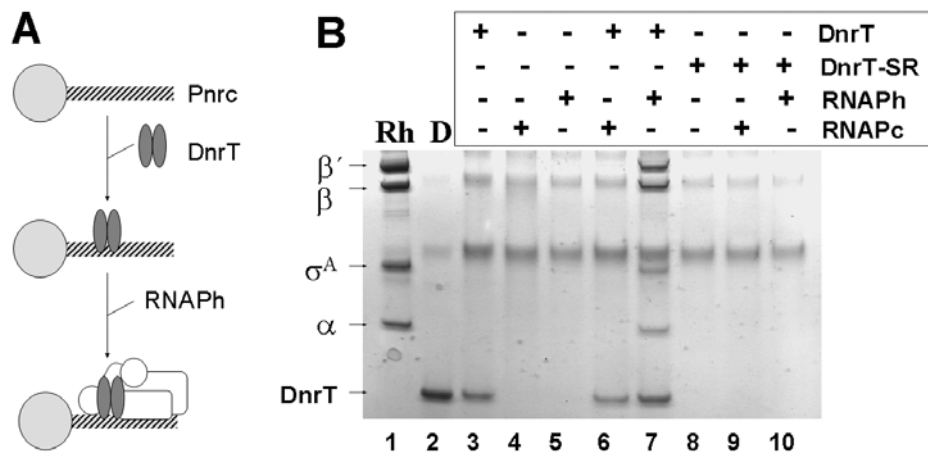


Figura 29. Activación del promotor *Pnrc* por DnrT (I). **A)** Esquema del experimento de reclutamiento de la RNA polimerasa. El promotor *Pnrc* biotinilado en 5' (barra rayada) se une a la resina de agarosa-estreptavidina (círculo gris). Posteriormente, el conjunto resina-*Pnrc* es incubado en presencia de DnrT o de su mutante SR/AL y finalmente se incubaba en presencia de la RNAP holoenzima o core. Las proteínas que tras el procesamiento descrito en Materiales y Métodos permanecen unidas a la resina son analizadas por PAGE. **B)** Resultados del experimento de reclutamiento de la RNA polimerasa. El promotor *Pnrc* unido a la resina de estreptavidina es incubado en presencia (+) o en ausencia (-) de DnrT (DnrT) o de su forma mutada (DnrT-SR), y de la holoenzima (RNAPh) o del core (RNAPc) de la RNAP de *T. thermophilus*. Las proteínas que permanecieron unidas a la resina fueron analizadas a través de PAGE en gradiente del 4-20% (*NuPAGE Bis-Tris gradient gel*) tal como se muestra en los carriles 3-10 (ver detalles en el texto). La RNAP (Rh,1) y DnrT (D,2) purificados son incluidos como marcadores en el gel, indicándose las posiciones de cada una de las subunidades. Las bandas comunes a todos los carriles corresponden a la presencia de BSA en la composición del tampón.

Como muestra la figura 29B, la proteína DnrT silvestre al unirse al promotor *Pnrc* recluta eficientemente la thRNAPh (carril 7) pero no así la thRNAPc (carril 6). Por otra parte, este ensayo ha servido para confirmar la trascendencia de los cambios SR/AL en el dominio de unión a DNA de DnrT, que resulta en una incapacidad de unión al promotor *Pnrc* y, consecuentemente, de reclutar la thRNAPh (carril 10). Debido a que el experimento se realizó con importantes concentraciones de DNA competidor (Materiales y Métodos) los datos de unión obtenidos son completamente específicos. Por todo ello, concluimos que DnrT se une a *Pnrc* específicamente a través del dominio HTH y recluta la thRNAPh de manera dependiente de su factor sigma-A.

El ensayo de protección del promotor frente permanganato potásico aportó aún más datos a la contribución de DnrT en la iniciación de la transcripción desde *Pnrc*. Tal y como se muestra en la figura 30A, la presencia de DnrT silvestre permitió la apertura de la burbuja de transcripción al detectar marcas de corte a la altura de dos timinas en posiciones -5 y +4.

Las pruebas definitivas se obtuvieron mediante ensayos de transcripción *in vitro* con la thRNAPh a temperaturas fisiológicas (60°C). Como se muestra en la figura 30B, la thRNAPh exhibe por sí misma un nivel de actividad transcripcional prácticamente inapreciable sobre *Pnrc*, mientras que la presencia de DnrT silvestre potencia la extensión del transcrito de forma eficiente.

Esta transcripción depende de sigma A, pues la thRNAPh acomplejada al factor σ^E fue incapaz de promover el inicio de la transcripción aún en presencia de DnrT. Por tanto, la transcripción desde *Pnrc* requiere sólo DnrT y la holoenzima thRNAPh con sigma A, y es, al igual que sucedía *in vivo*, insensible a oxígeno.

Por el contrario y de acuerdo con nuestros resultados *in vivo* anteriormente mencionados, los ensayos de transcripción *in vitro* de los promotores *Pnar* y *Pdnr* con DnrT y la RNAPh fueron negativos.

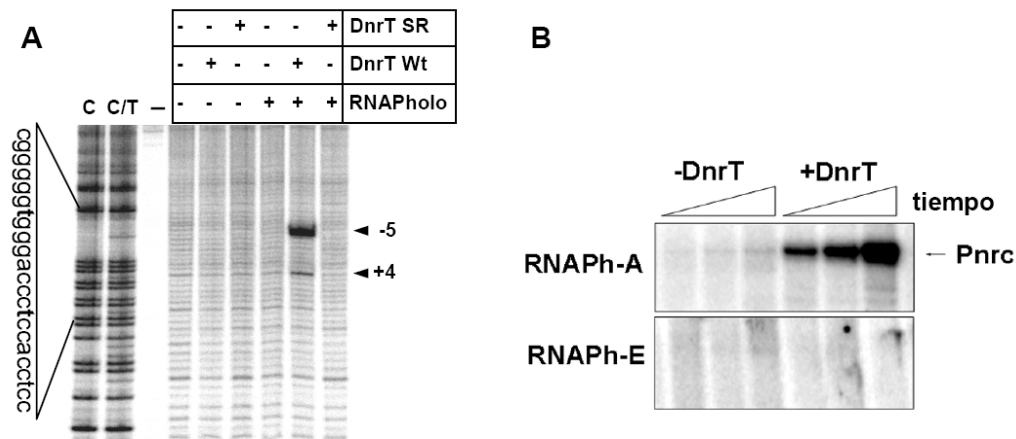


Figura 30. Activación del promotor *Pnrc* por DnrT (II). **A)** Ensayo de huella molecular (*Footprint*) de permanganato potásico sobre *Pnrc* en presencia (+) o ausencia (-) de DnrT, DnrT SR/AL y/o la holo-RNAP. Se muestran las posiciones correspondientes a las T susceptibles de modificación a causa de la formación de la burbuja de transcripción. Carriles de secuenciación (C, C/T). **B)** Ensayo de transcripción *in vitro* desde *Pnrc* con la thRNAPh portando el factor sigma A (thRNAPh-A) o con sigma E (thRNAPh-E), en presencia o ausencia de 5 pmoles de DnrT. Los tiempos de ensayo fueron 2, 5 y 15 minutos. El tamaño completo del transcrito corresponde a 47 bases.

DnrT reprime el promotor *Pnqo*

En el capítulo 1 observamos que la transcripción del operón *nqo* era reprimida durante el crecimiento anaeróbico con nitrato. Puesto que DnrT es un factor transcripcional cuya concentración aumenta durante este proceso, decidimos estudiar de diversas maneras si tenía también que ver con la represión de *nqo*. En primer lugar, usamos construcciones plasmídicas en las cuales el promotor *Pnqo* controlaba la expresión del gen testigo *bgaA* ensayándolo en las mismas cepas y condiciones empleadas en la figura 25.

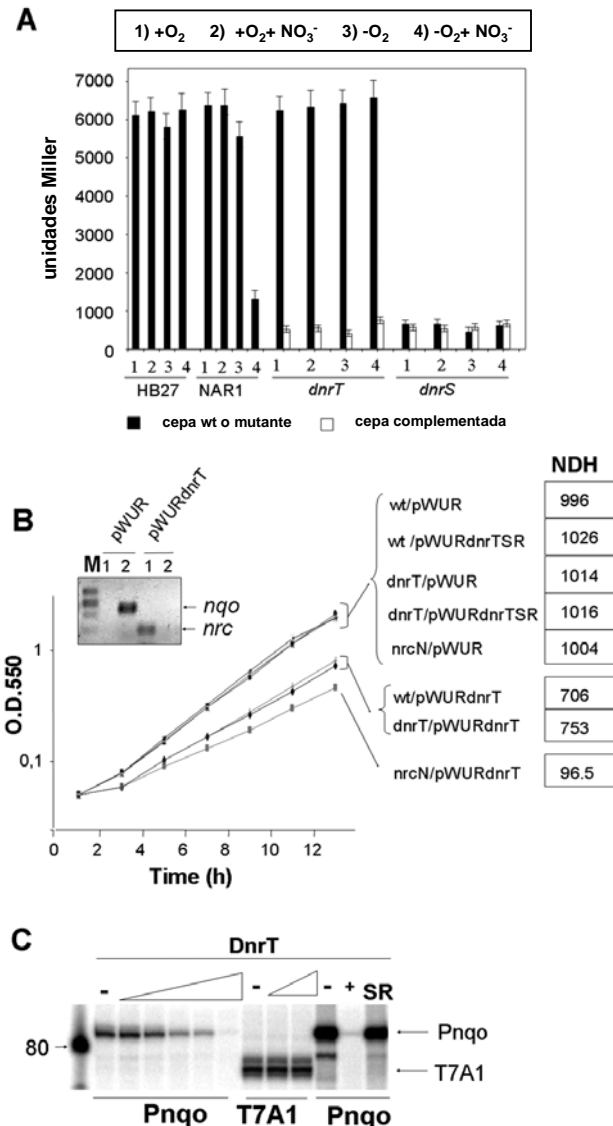


Figura 31. DnrT reprime el operón *nqo*.

A) La actividad transcripcional del promotor *Pnqo* fue medida para las cepas y condiciones indicadas, portando todas ellas la construcción pMHNqobgaA y cotransformadas (columnas blancas) o no (columnas negras) con los derivados de pWUR para la complementación de las mutaciones en los genes *dnr*. **B)** El recuadro muestra el resultado de un ensayo de RT-PCR semicuantitativa para detectar transcripción de los operones *nrc* (1) y *nqo* (2) en cultivos aeróbicos de NAR1 portando pWUR o pWURdnrT. Marcadores: 759, 611, 453 y 273 pb. El gráfico muestra curvas de crecimiento a 60°C de cultivos aeróbicos de NAR1 (wt) y los mutantes en *dnrT* y *nrcN* transformados, bien con pWUR, o con los derivados pWURdnrT o pWURdnrTSR. Se muestran los datos de actividad NDH de la fracción de membrana de los cultivos antes mencionados a las 8 horas de crecimiento (nmoles de NADH oxidado por minuto y mg de proteína). **C)** Transcripción *in vitro* desde el promotor *Pnqo* en presencia de la thRNAPh y concentraciones crecientes (0, 5, 10, 20, 40, 80 pmoles) de DnrT. En paralelo se muestran controles para la especificidad de DnrT (0, 40, 80 pmoles) empleando el promotor no relacionado T7A1. Igualmente se muestra la transcripción desde el *Pnqo* en ausencia (-) o en presencia de 80 pmoles de DnrT (+) o de DnrT-SR/AL (SR). La máxima extensión del transcrito desde *Pnqo* y *PTA1* corresponde a 90b y 50b respectivamente. Todas las reacciones se realizaron a 60°C durante 10 minutos.

Como se puede deducir de los resultados mostrados en la figura 31A el promotor *Pnqo* es activo de forma constitutiva en la cepa HB27, incluso tras una incubación en microaerofilia con nitrato (A4). Por el contrario, en la cepa facultativa NAR1 este promotor es reprimido en las mismas condiciones a un nivel de expresión equivalente a la quinta parte de la transcripción inicial en

aerobiosis. Lo más interesante del experimento es que en los mutantes *dnrT*, esta represión no se produce, mientras que la expresión constitutiva de DnrT (desde pWURDnrT o desde el cromosoma en los mutantes *dnrS::kat*) resultaba en una fuerte represión que descendía los niveles de actividad β -galactosidasa hasta una décima parte de los observados en aerobiosis. Por tanto, DnrT parecía ser responsable de la represión de *Pnqo*.

Como segunda aproximación, la transcripción de los operones *nqo* y *nrc* fue analizada mediante RT-PCR semi-cuantitativa de cultivos crecidos aeróbicamente (sin nitrato) portando el plásmido control pWUR (sin inserto), o bien expresando constitutivamente DnrT desde pWURdnrT. Los resultados mostrados en la figura 31B confirmaron la ausencia de transcrito de *nqo* y la inducción paralela de *nrc* en estas condiciones (figura 31A y B). De hecho, la expresión aeróbica de DnrT (pWURdnrT) redujo la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa portadora del plásmido sin inserto (pWUR) o de un plásmido que expresaba el mutante SR/AL (pWURdnrTSR). Por ello, concluimos que DnrT reprime el operón *nqo* en estas condiciones y reduce la eficiencia energética en la respiración aeróbica (figura 31B).

Para confirmar esta conclusión bioquímicamente, en la figura 31B se muestra la medición de actividad NADH oxidasa (NDH) en fracciones de membrana de cultivos crecidos durante ocho horas (exponenciales). Se puede observar como la cepa silvestre y la mutante *dnrT::kat* expresando DnrT generan un 25-30% menos actividad NDH (700-750 unidades) que aquellas que expresan la forma mutada en el dominio de unión a DNA o las que simplemente portan el vector sin inserto 1000 unidades (figura 31B). Como la actividad NDH detectada es aún muy superior de la que cabría esperar del nivel de represión observado en el panel A, sospechamos que la mayor parte de la actividad NDH podría ser debida al complejo Nrc que está siendo expresado bajo condiciones aeróbicas (recuadro de figura 31B). Para comprobarlo, incluimos el mutante *nrcN::kat* en el experimento. Cuando la actividad NDH fue medida en esta cepa se observó una décima parte (aprox. 100 unidades) del valor alcanzado por la cepa silvestre portando el plásmido control sin inserto. Por esto, concluimos que la actividad NDH de Nqo es reprimida a través de DnrT. Más aún, de estos resultados se deduce que el complejo Nrc es activo como NDH cuando es expresado durante el crecimiento aeróbico, siendo, eso sí, menos eficiente que Nqo.

Por último, realizamos ensayos de transcripción *in vitro* con la thRNAPh y DnrT sobre el promotor *Pnqo*. Tal y como se muestra en la figura 31C, el aumento de la cantidad de DnrT resultaba en una reducción progresiva de la transcripción desde *Pnqo* por la thRNAPh hasta su represión completa. Por el contrario, no se vió afectada la transcripción del *PT7A1*, ni siquiera a la mayor concentración de DnrT ensayada. Tal y como era de esperar, la transcripción desde el promotor *Pnqo* no era reprimida cuando se empleaba el mutante SR/AL, indicando que el efecto inhibitorio de DnrT, al igual que aquel que ejerce como activador sobre *Pnrc*, es estrictamente dependiente de su unión al promotor a través de su motivo HTH.

Relevancia de la única cisteína de la secuencia de DnrT

Para estudiar el papel de la única y atípica cisteína presente en DnrT, se procedió a la alquilación dirigida con iodoacetamida de su grupo sulfidilo reactivo. Esta modificación fue comprobada químicamente con el reactivo de Ellman o DTNB (no mostrado). Esta proteína DnrT modificada fue empleada posteriormente en ensayos de transcripción *in vitro*, mostrando una menor actividad como activador transcripcional sobre el promotor *Pnrc* (figura 32A).

Para confirmar que el efecto era específico del bloqueo de la cisteína, y no de un efecto colateral generado por agente el alquilante sobre el DnrT, se reemplazó la cisteína por serina y por alanina en dos mutantes dirigidos que se emplearon para efectuar la sustitución del alelo silvestre (Materiales y Métodos; anexo I, tabla 3). Mediante inmunodetección observamos cómo la mutación de la cisteína afecta notablemente a la inducción de DnrT, mientras que la Nrc-NDH es inducida a niveles algo inferiores a los mostrados por la cepa silvestre, algo posiblemente relacionado tanto con las menores concentraciones alcanzadas por las proteínas DnrT mutantes (figura 32B) como con la interacción que muestran DnrS y DnrT en presencia y ausencia del promotor *Pnar* (figura 32D). En este sentido, es importante destacar que la expresión constitutiva de las proteínas DnrT mutantes C/S o C/A permite la complementación de la actividad nitrato reductasa (Tabla 32C).

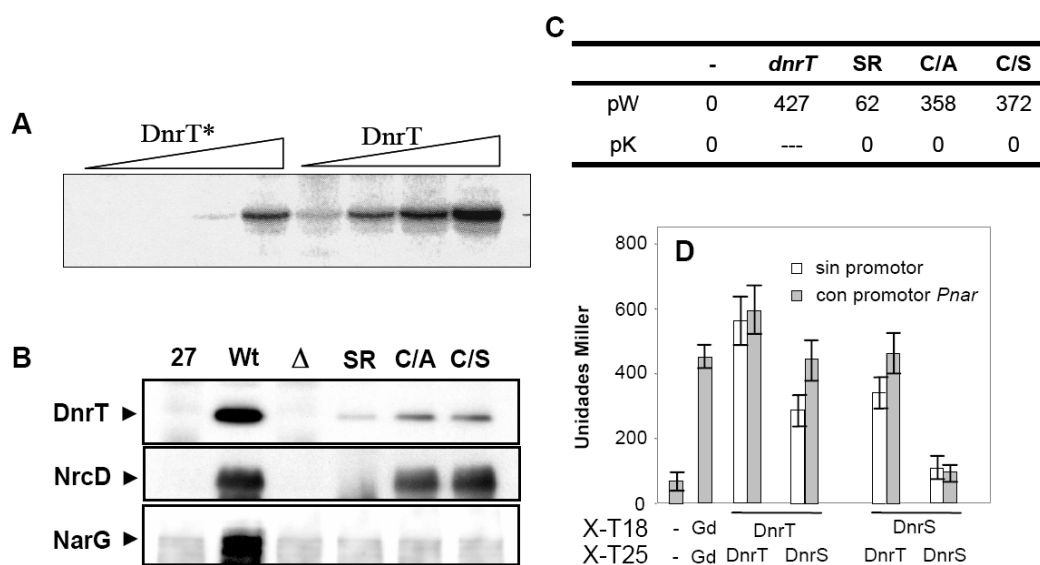


Figura 32. Relevancia de la única cisteína de DnrT. **A)** Ensayo de transcripción *in vitro* (10 minutos a 60°C) con *Pnrc* en presencia de distintas cantidades (0; 0,5; 1; 5 pmoles) de DnrT silvestre (DnrT) o DnrT modificado con I-acetamida (DnrT*). La señal corresponde a un transcrito de 47 b de extensión. **B)** Inmunodetección de DnrT y NrcD en las cepas HB27 (27), NAR1 (Wt), NAR1 mutante en *dnrT* sin complementar (Δ) y complementada en copia única con DnrT SR/AL (SR), DnrT C/A (C/A) y DnrT C/S (C/S) crecidas anaeróbicamente con 40 mM de nitrato potásico. **C)** Actividad nitrato reductasa de las cepas que portan las sustituciones alélicas descritas anteriormente (pK) y del mutante NAR1 *dnrT::kat* complementado con derivados de pWUR (pW) que expresan constitutivamente DnrT silvestre (*dnrT*) y sus derivados (SR, C/A, C/S). La actividad NR se expresa en nmoles de nitrito producido/ min-mg de proteína. **D)** Representación en unidades Miller de los resultados de actividad β-galactosidasa de ensayo de doble híbrido bacteriano en *E. coli* BTH101 basado en la reconstitución funcional de la adenilato ciclasa (Cya) de *Bordetella pertussis*. En la gráfica se muestran las fusiones coexpresadas en ausencia (columnas blancas) o en presencia del promotor *Pnar* (columnas grises). Para simplificar se representaron las combinaciones que resultaron positivas. Los datos corresponden a medias de 6 mediciones en 2 experimentos independientes.

Capítulo 3. Importancia del elemento NCE en el control y actividad del aparato de desnitrificación de *T. thermophilus*

Desnitrificación en *Thermus thermophilus*

La existencia de cepas de *T. thermophilus* potencialmente desnitrificantes había sido descrita (da Costa, 2001; Manaia, 1994) y confirmada en una Tesis anterior del laboratorio (Zafra, 2004). En este trabajo tratamos de confirmarlo y de determinar la presencia en estas cepas del elemento NCE completo y su posible relevancia en la desnitrificación. Para ello, comparamos el crecimiento en nitrato y en nitrito de las cepas reductoras de nitrato NAR1 y HB27c con otras potencialmente desnitrificantes cedidas por el Dr. M. da Costa, empleando en el ensayo la cepa aeróbica (HB27) como control.

	NAR1 ¹	HB27	HB27c	B	Fiji3A1	HN1-11	NR-17	PRQ-16	PRQ-25	VG7
Crecimiento-NO₃⁻	+++	-	++	+++	+++	-	++	++	++	++
Producción-NO₂⁻	+++	-	++	++	+++	-	+	++	++	++
Actividad Nar	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Crecimiento-NO₂⁻	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
promotor <i>Pnar</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>narC-narG</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>narG</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>narJ</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>narT</i>	+	-	+	+	+ ²	+	+ ²	+	+ ²	-
promotor <i>Pnrc</i>	+	-	+	+	-	-	+ ²	+	+	-
<i>nrcD</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>nrcF</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>nrcN</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>dnrT</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>dnrS</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>gdh</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>csaB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Caracterización de la capacidad de crecimiento anaeróbico y la presencia de genes implicados en distintas cepas de *Thermus thermophilus*. 1) Descrita inicialmente como HB8; 2) Mayor tamaño.

Tal y como se muestra en la tabla3, una de las cepas caracterizadas (HN1.11) fue incapaz de crecer anaeróbicamente con ninguno de estos aceptores de electrones, al igual que la cepa aeróbica control (HB27). Tampoco fue capaz de generar nitrito a partir de nitrato, ni se detectó actividad NR con metil-viológeno. Por tanto, la cepa HN1-11 como el control HB27, se comporta como aeróbica. Por el contrario, el resto de las estirpes ensayadas creció con nitrato, generaron distintas cantidades de nitrito detectable y mostraron actividad NR. Sin embargo, la capacidad

para crecer con nitrito fue detectada en solo tres cepas (PRQ-16, PRQ-25 y VG7). Dichas cepas acumulaban gas en Campanas Durham durante el crecimiento anaeróbico con ambos donadores (ver ejemplo en figura 33), por lo que fueron consideradas como desnitrificantes completas (CD). En contraposición, denominaremos desnitrificantes parciales (PD) a las cepas capaces de crecer anaeróbicamente con nitrato pero no con nitrito (NAR1, HB27c, B, Fiji3A1 y NR-17).

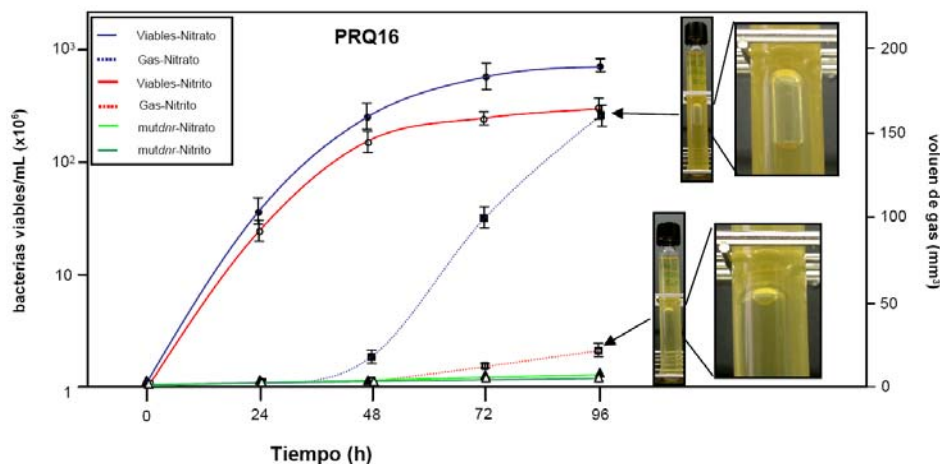


Figura 33. Desnitrificación en *Thermus thermophilus*. La figura ilustra el crecimiento anaeróbico de PRQ-16 y su mutante en *dnrT* en presencia de nitrato o nitrito, midiendo la viabilidad celular y la cantidad de gas acumulado en campanas Durham (fotografías) a lo largo del tiempo.

Con la intención de probar si el elemento NCE estaba también presente en las cepas PD y CD, se realizaron una serie de amplificaciones por PCR con cebadores específicos para detectar las principales secuencias génicas y promotoras de NCE (*nar*, *nrc* y *dnr*). Como controles se amplificaron las secuencias de dos genes de la estirpe secuenciada HB27 y que parecen altamente conservados, como son los codificantes de la glutamato dehidrogenasa (*gdh*), y el de una transferasa de piruvato a la polímeros externos que recubren la mureína de *Thermus* (*cell surface anchoring* (*csaB*))

Como se puede apreciar en la tabla 3, la amplificación de los genes del NCE fue positiva en la mayoría de las cepas CD y PD, excepto en el caso de Fiji3A1 y VG7. Resulta interesante que uno de los controles (*gdh*) no pudo ser amplificado tampoco en las cepas Fiji3A1 y VG7, sugiriendo que dichas estirpes están genéticamente menos relacionadas con HB27. De hecho, mediante comparación de las secuencias del RNA16S y de *gyrB* se conoce que las cepas Fiji3A1 y VG7 son las más distantes filogenéticamente con respecto a HB27 (M. de Costa, comunicación personal).

En conclusión, estos resultados muestran claramente que el NCE no es específico de la cepa en la que fue descrito, sino que se encuentra extendido entre diversas cepas PD y CD de *Thermus thermophilus*. De nuestros datos se deduce también la existencia de cepas (Fiji3A1 y VG7) que disponen de un sistema de respiración de nitrato poco relacionado con el de NCE.

A continuación se analiza el papel que desempeñan los genes del elemento NCE en la desnitrificación en las cepas *T. thermophilus* PRQ-16 y PRQ-25 en las que el NCE se encuentra bien conservado.

Papel de Nrc en la respiración anaeróbica de nitrito

Debido a su conservación en las cepas desnitrificantes PRQ-16 y PRQ-25 (Tabla3), nos preguntamos si Nrc podría actuar como donador de electrones también en pasos de desnitrificación posteriores a la reducción de nitrato.

Para dar contestación a esta pregunta transferimos las mutaciones *nrcE::kat* y *nrcN::kat* a las cepas PRQ-16 y PRQ-25 (Materiales y Métodos), y estudiamos la capacidad de los mutantes obtenidos para crecer anaeróticamente con nitrito. Los resultados fueron idénticos para ambas estirpes por lo que en la figura 34 sólo se muestran los datos de PRQ-16. Como se aprecia en la figura, la ausencia de Nrc se traduce en una disminución en la velocidad de crecimiento anaeróbico con nitrito similar al detectado con nitrato, que, a su vez, recuerda al descrito para la cepa NAR1 (figura 20). Por tanto, estos datos sugieren que Nrc podría ser el donador principal de electrones para la nitrito reductasa (Nir), y posiblemente, también para las reductasas de óxido nítrico (Nor) y óxido nitroso (Nos) en las cepas PRQ-16 y PRQ-25.

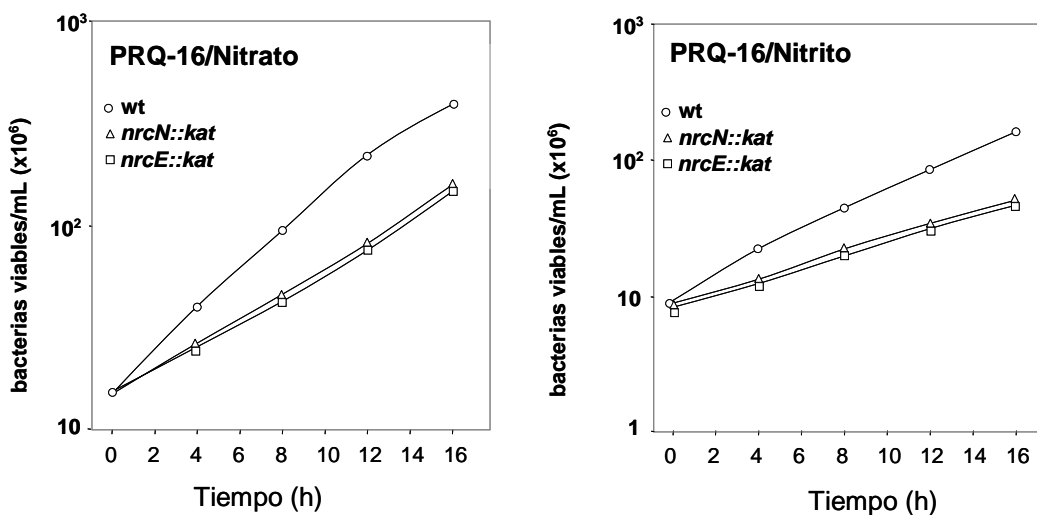


Figura 34. Papel fisiológico de Nrc-NDH en desnitrificación. Representación de curvas de crecimiento anaeróbico con nitrato (40 mM) y nitrito (5 mM) de las cepas desnitrificantes PRQ-16, PRQ-25 y los mutante *nrcN::kat* y *nrcE::kat* en ambos fondos genéticos. Para simplificar (dada la redundancia de los resultados en ambas cepas) solo se representan los datos de viabilidad correspondientes a la estirpe PRQ16.

Para analizar experimentalmente esta hipótesis, realizamos ensayos de actividad NDH con nitrato y con nitrito en células silvestres (PRQ-16 y PRQ-25) y sus mutantes *nrc* permeabilizadas tras haber sido inducidas por 16 horas en anaerobiosis con el aceptor electrónico correspondiente. Es importante mencionar que los ensayos con nitrito fueron negativos cuando se emplearon fracciones de membrana en lugar de células permeabilizadas (no mostrado), sugiriendo que al

menos la Nir tiene una naturaleza soluble en *T. thermophilus* al igual que ocurre en las Proteobacterias.

Los resultados con células permeabilizadas mostrados en la tabla 4 revelan que las cepas silvestres oxidan el NADH eficientemente con ambos aceptores, y que los valores de oxidación de NADH obtenidos son proporcionales a los valores de producción (reducción de nitrato) y consumo (reducción de nitrito) de nitrito detectados. De hecho, la cantidad de nitrito consumido era la mitad de la esperable si todos los electrones del NADH fueran destinados a su reducción (1xNADH oxidado/2xNO₂⁻ reducido), apoyando la idea que parte del NO producido por la Nir es empleado como aceptor final de electrones por la Nor.

Por el contrario, los mutantes *nrc* muestran una reducción dramática en la actividad NDH en comparación con la de las cepas silvestres (1/10), lo cuál es a su vez proporcional al descenso en la cantidad de nitrito producido por la Nar o consumido por la Nir. Por tanto, queda confirmado que Nrc actúa como donador de electrones principal para ambas enzimas.

La medición de la actividad Nor es algo más complicada, puesto que el NO es una gas de corta vida en estado libre (mucho más a 70 °C). Por ello, hicimos los ensayos de consumo de NADH en células permeabilizadas usando GSNO (S-Nitrosoglutatión) como generador de NO (SNP es demasiado tóxico al generar también cianuro) y controles con el agente PTIO (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-óxido), secuestrante de NO como control de la especificidad de la reacción. La tabla 4 muestra que en las cepas silvestres el NADH está siendo oxidado en presencia de GSNO, pero no cuando el PTIO es añadido a la mezcla de la reacción. Esta actividad es básicamente inapreciable en cualquiera de los mutantes *nrc*.

Por tanto, Nrc funciona como el donador principal de electrones hacia las reductasas finales Nar, Nir, Nor durante el proceso de desnitrificación en las cepas PRQ-16 y PRQ-25. Aunque no se pudo ensayar la oxidación de N₂O por razones técnicas, es probable que Nrc también done electrones a la reductasa final del proceso de desnitrificación (Nos).

	PRQ-16	PRQ-16- <i>nrcE</i>	PRQ 16- <i>nrcN</i>	PRQ-25	PRQ 25- <i>nrcE</i>	PRQ 25- <i>nrcN</i>
NDH con Nitrato ¹	416 ± 48	37 ± 5	31 ± 4	388 ± 38	34 ± 5	32 ± 4
Producción de Nitrito ¹	377 ± 21	25 ± 4	22 ± 4	355 ± 29	30 ± 5	26 ± 4
NDH con Nitrito ²	128 ± 14	15 ± 3	10 ± 2	139 ± 16	17 ± 3	12 ± 4
Consumo de Nitrito ²	136 ± 12	13 ± 3	8 ± 3	120 ± 10	12 ± 2	11 ± 4
NDH con NO (GSNO) ^{3,5}	46 ± 7	2 ± 3	2 ± 2	51 ± 12	4 ± 3	5 ± 3
NDH con NO (GSNO+PTIO) ⁴	5 ± 4	2 ± 3	2 ± 3	6 ± 2	4 ± 3	3 ± 4

Tabla 4. Papel de Nrc-NDH como donador de electrones en desnitrificación. Datos de oxidación de NADH y respiración de nitrato, nitrito y NO en células permeabilizadas de las estirpes PRQ-16 y PRQ-25 y sus mutantes *nrcE::kat* y *nrcN::kat*. Las actividades de oxidación de NADH (NDH) y la producción o consumo de nitrito se expresan en nmol/min y mg de proteína. 1) con 20 mM de nitrato y 1.5mM de NADH; 2) con 5 mM nitrito y 1.5 mM de NADH; 3) 1 mM GSNO; 4) 1 mM GSNO y 0.2 mM PTIO, al inicio de la reacción. 5) Células inducidas con 100 µM de SNP.

El operón *nrc* se induce por nitrato, nitrito y NO en las cepas desnitrificantes

Para que *Nrc* pueda ejercer la función de donador de electrones a las cuatro reductasas del proceso de desnitrificación debería ser inducible por óxidos de nitrógeno distintos al nitrato. Para poder estudiar esto seguimos la expresión del gen testigo *bgaA* desde el plásmido pMHnrcbgaA en cultivos de las cepas PRQ-16 y PRQ-25 y las cepas control HB27 (aeróbica), NAR1 (PD), sometidos a cuatro condiciones: aerobiosis (1), anaerobiosis con nitrato (2), anaerobiosis con nitrito (3), y anaerobiosis con SNP como liberador de NO (4) (figura 35A).

Como se esperaba, el operón *nrc* no se expresa bajo ninguna de las condiciones anteriores en la cepa HB27 debido a la ausencia del regulador DnrT (cepa NCE⁻). Por otro lado, en la cepa NAR1 esta inducción es dependiente únicamente de nitrato y sólo se aprecia un ligero incremento de la actividad con SNP. Sin embargo, en las cepas que realizan la desnitrificación completa (PRQ-16 y PRQ-25), tanto el nitrato como el nitrito y el SNP activan la expresión de la deshidrogenasa *Nrc* a niveles similares. Por tanto, las cepas desnitrificantes completas son estimuladas positivamente por nitrato, por nitrito y por NO para expresar *Nrc* durante la desnitrificación (figura 35A).

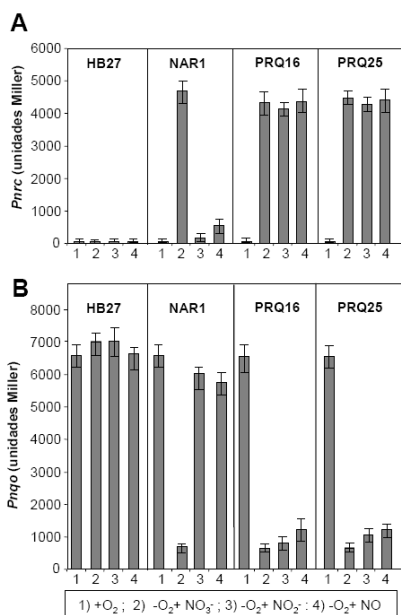


Figura 35. Expresión de los operones *nrc* y *nqo* por óxidos de nitrógeno. Representaciones de actividad β-galactosidasa (unidades Miller) de cultivos de las cepas indicadas de *T. thermophilus* portando el plásmido pMHnrcbgaA (A) o pMHnqobgaA (B) crecidos aerobímicamente (1) o anaerómicamente durante 16 horas con 20 mM de nitrato (2), 5 mM de nitrito (3) o 100 μM de SNP (4). Los datos representados corresponden a medias de 6 medidas en 2 experimentos independientes.

La transcripción de *nqo* es reprimida por nitrato, nitrito y NO en cepas desnitrificantes

En experimentos en paralelo, ensayamos la actividad del promotor *Pnqo* en el plásmido pMHPnqobgaA bajo las mismas cuatro condiciones descritas anteriormente. Tal y como se muestra en la figura 35B, este promotor se expresa a niveles similares en la cepa HB27 para todas las condiciones ensayadas, mientras que es reprimido en la cepa desnitrificante parcial NAR1 bajo condiciones de anoxia y nitrato pero no con nitrito o SNP. No obstante, el operón *nqo* resultaba reprimido no solo por nitrato, si no también por nitrito y NO en las cepas PRQ-16 y PRQ-25. La relación entre la inducción de *Nrc* y la represión de *Nqo* en presencia de nitrato, nitrito y NO,

apoyaría la existencia de una sustitución de NDHs que reforzaría el papel de Nrc como donador principal de electrones hacia todas las reductasas terminales del proceso de la desnitrificación.

Inducción del operón *dnr* en las cepas desnitrificantes completas

La transcripción del complejo *nrc* depende de los niveles que alcance el regulador DnrT en la cepa NAR1 (Capítulo 2). Para analizar la posible implicación de este factor en la regulación de la desnitrificación de las cepas PRQ-16 y PRQ-25, en primer lugar examinamos los efectos que ocasionaban el nitrito y NO en la expresión del operón *dnr*. Como se muestra en la figura 36, el promotor *Pdnr* (en *pMHdnrbgaA*) se induce en las cepas CD a niveles de 500-600 unidades con nitrato, nitrito, o NO (SNP). Por el contrario en la cepa NAR1, la actividad detectada con nitrito o NO carecía de relevancia (por debajo de las 200 unidades) en comparación con la obtenida con nitrato.

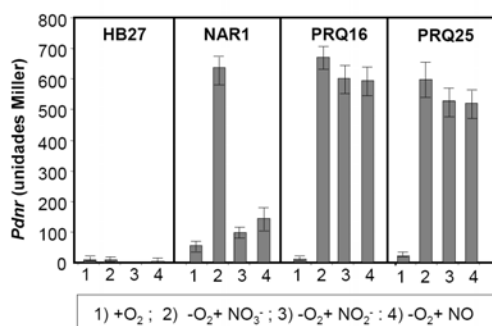


Figura 36. Inducción del operón *dnr* por óxidos de nitrógeno. Representaciones de actividad beta galactosidasa (unidades Miller) de cultivos de las cepas indicadas de *T. thermophilus* portando el plásmido *pMHdnrbgaA* crecidos aerobicamente (1) o anaeróbicamente durante 16 horas con 20mM de nitrato (2), 5 mM de nitrito (3) o 100 μ M de SNP (4). Los datos representados corresponden a medias de 6 medidas en 2 experimentos independientes.

Para confirmar estos resultados y aquellos de la anterior (figura 35), analizamos por Western blot la expresión de las proteínas NrcD, DnrT y DnrS en distintas cepas bajo las cuatro condiciones de inducción anteriormente mencionadas (figura 37).

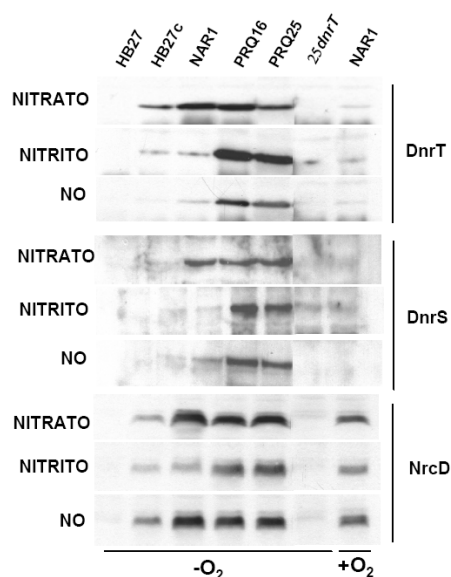


Figura 37. Expresión de DnrT, DnrS y NrcD en cepas desnitrificantes. Inmunodetección de las proteínas indicadas en extractos totales de proteínas de cultivos crecidos anaeróbicamente durante 16 horas con nitrato 40 mM, nitrito 5 mM y SNP 100 μ M (NO). El extracto de la cepa NAR1 es usado como control en los experimentos de Western blot. Se incluye la cepa PRQ-25 *dnrT::kat* (25*dnrT*) como control de responsabilidad del regulador en la inducción.

En el análisis se incluyeron como controles la cepa HB27c y el mutante en *dnrT* derivado de PRQ-25. Los resultados de la figura 37 confirman aquellos de las figuras 35 y 36, demostrando que los niveles de DnrT, DnrS, y NrcD aumentan siempre en presencia de nitrato, nitrito, y NO en las cepas CD (PRQ-16 y PRQ-25), mientras que para las cepas PD (NAR1 y HB27c) solo el nitrato actúa como inductor. Una última observación que se deduce de estos Western blots era que la expresión de los operones *dnr* y *nrc* en la cepa PRQ-25 depende de la presencia del regulador DnrT, tal y como se había descrito en la cepa NAR1 (Capítulo 2, Cava y cols 2007), justificando que el mecanismo que controla la expresión de los genes codificados en el elemento NCE también están conservados entre cepas CD de *T. thermophilus*.

Los factores de transcripción DnrS y DnrT son necesarios para el crecimiento anaeróbico con nitrito en las cepas desnitrificantes

Para estudiar el posible requerimiento de los reguladores del NCE para la expresión de la nitrito reductasa en las cepas CD, aislamos mutantes de PRQ-16 y PRQ-25 en los genes *dnrS* y *dnrT*, y ensayamos su capacidad para crecer anaeróticamente con nitrito, tomando como control la incapacidad ya demostrada para crecer con nitrato en ambiente anóxico. Tal y como se aprecia en la figura 38, ninguno de los mutantes *dnrS* o *dnrT* de ambas cepas fue capaz de crecer ni con nitrato ni con nitrito, pero estas capacidades anaeróbicas fueron restauradas cuando fueron complementados con los plásmidos pWURdnrS o pWURdnrT respectivamente. Teniendo en cuenta que la ausencia de crecimiento con nitrito en mutantes *dnrS* ocurre en presencia de DnrT (que expresa Ncr), concluimos que DnrS es necesario para la expresión de Nir. Por otra parte, la ausencia de crecimiento con nitrito en mutantes *dnrT* podría ser un efecto directo sobre la expresión de la *nir* o bien indirecto sobre *dnrS*.

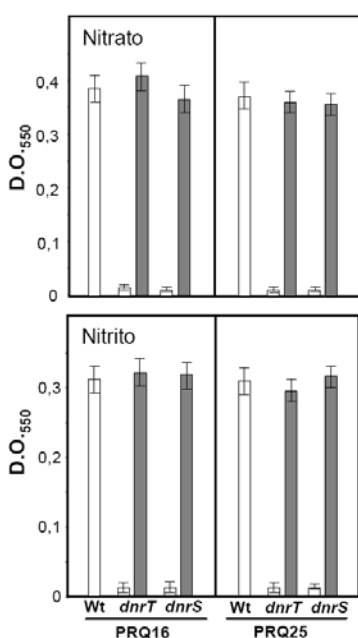


Figura 38. Los genes del operón *dnr* son necesarios para la respiración de nitrito. Crecimientos anaeróbicos de las cepas PRQ-16 y PRQ-25 y sus mutantes en *dnrT* y *dnrS* (columnas blancas) con los aceptores de electrones indicados. Las columnas negras muestran crecimientos de las cepas mutantes complementadas con los plásmidos pWURdnrS y pWURdnrT.

Los reguladores *DnrS* y *DnrT* son necesarios para el crecimiento anaeróbico con NO y N_2O

Para comprobar si *DnrT* y *DnrS* eran también requeridos para los pasos siguientes en la ruta desnitrificante, se realizaron ensayos de crecimiento anaeróbico con NO o N_2O en mutantes *dnrS* y *dnrT* de las cepas PRQ-16 y PRQ-25 (Materiales y Métodos). Tal y como se muestra en la figura 39, la ausencia de *DnrS* conlleva la pérdida de la capacidad de crecimiento anaeróbico tanto con NO como con N_2O en ambas cepas al cabo de 6 días de incubación. Para *DnrT* se obtuvo un fenómeno similar, aunque se detectó un crecimiento residual de hasta el 10% con NO y el 15 % con N_2O , para el mismo periodo de incubación. En ambos casos, se pudo recuperar el fenotipo silvestre al complementar las mutaciones con los plásmidos pWUR*dnrS* o pWUR*dnrT*, al igual que ocurría para el crecimiento en nitrato y nitrito (figura 38).

Por otro lado, los crecimientos de mutantes *nrcN* en ambas cepas (25-30% del silvestre con NO y N_2O) a tiempos inferiores (72 horas) descartó la posibilidad de que el crecimiento residual observado en los mutantes *dnrT* se debieran a la ausencia de *Nrc*. Aunque en este experimento fueron utilizados como controles, la disminución del crecimiento con NO y N_2O observada en los mutantes *nrcN* refuerzan el papel de la deshidrogenasa *Nrc* como principal sistema donador de electrones hacia la *Nor* y la *Nos*.

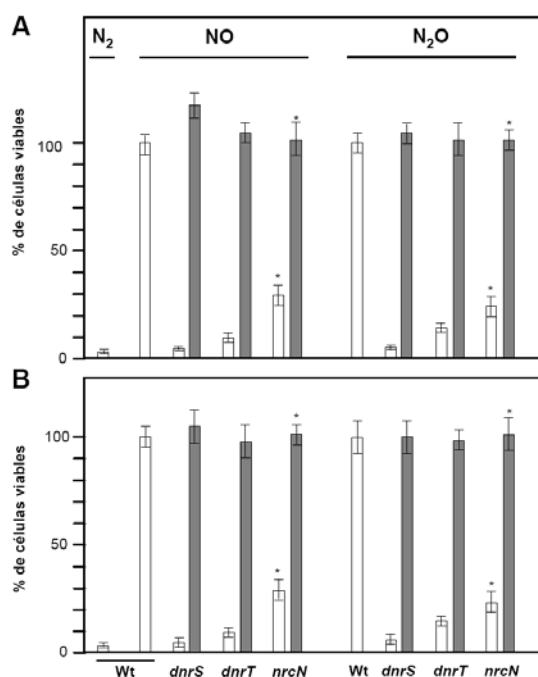


Figura 39. Implicación de NCE en el crecimiento anaeróbico con NO y N_2O . Crecimientos anaeróbicos de las cepas PRQ-16 (A) y PRQ-25 (B) y sus respectivos mutantes *dnrS*, *dnrT* y *nrcN*. Los ensayos se realizaron a 60°C tal y como se describe en Materiales y Métodos, con los óxidos de nitrógeno que se indican durante 3 (*) o 6 días. Las gráficas representan medias de viabilidad en placas TB $\frac{1}{2}$ incubadas en aerobiosis. Las columnas grises indican las cepas mutantes complementadas con el derivado correspondiente de pWUR para cada mutación.

En conclusión, todos estos datos apoyan la esencialidad de los factores de transcripción *DnrS* y *DnrT* no solo para la expresión de los complejos *Nar* y *Nrc* codificados en el elemento NCE, sino también para la expresión de la reductasas *Nir*, *Nor* y *Nos* del proceso de desnitrificación.

Capítulo 4. Nar sustituye al complejo bc₁ durante la desnitrificación

El operón codificante del complejo bc es reprimido durante la desnitrificación

En Proteobacterias como *Paracoccus pantotrophus* el citocromo bc₁ transfiere los electrones desde las quinonas hacia las reductasas Nir, Nor y Nos de la ruta de desnitrificación.

Thermus thermophilus HB27 codifica en su genoma un complejo bc₁ (operón *fbcCXFB*, (Mooser y col., 2005)). Para determinar el patrón de expresión del operón *fbc* en las cepas PRQ16 y PRQ25, clonamos su secuencia promotora controlando el gen *bgaA* (pMHPfbcbgaA, figura 40A). Incluimos como control en nuestros experimentos el plásmido pMHPnqobgaA (figura 40B). De esta forma crecimos las cepas HB27, NAR1 y las desnitrificantes PRQ16 y PRQ25 portando cada uno de estos plásmidos, y las sometimos a cuatro condiciones diferentes: aerobiosis (1), anaerobiosis con nitrato (2), con nitrito (3) y con SNP (4).

Como se observa en la figura, el operón *nqo* y el *fbc* mostraron un comportamiento casi idéntico. Ambos se expresaron en aerobiosis (1) en todas las cepas a niveles similares (6-7 x10³ unidades), mientras que se reprimieron en crecimiento anaeróbico con nitrato (2) en las PD y CD y con nitrito (3) y NO (4) en las CD.

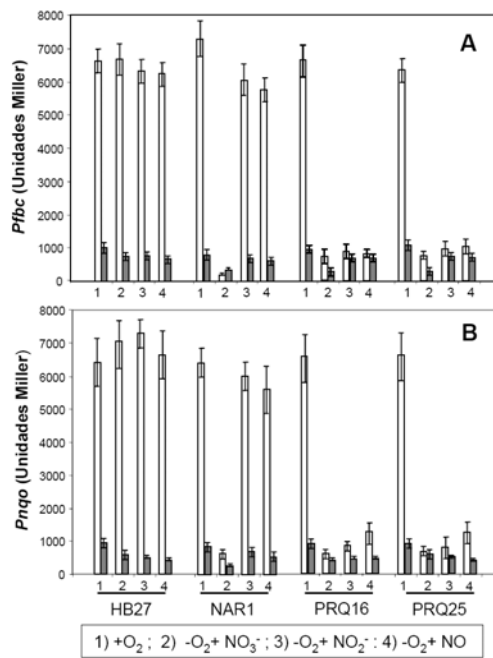


Figura 40. El promotor *Pfbc* se reprime en desnitrificación. Representación de actividades β-galactosidasa (unidades Miller) en cultivos de las cepas indicadas portando **A)** pMHPfbcbgaA y pWUR (columnas blancas) o pWURDnrT (columnas grises) o **B)** pMHPnqobgaA y pWUR (columnas blancas) o pWURDnrT (columnas grises).

Según estos datos las cepas CD de *Thermus thermophilus* dispondrían de una cadena de respiración aeróbica compuesta por Nqo (complejo I), FbcCNFB (complejo III o bc₁) y oxidasas terminales (ba₃ ó caa₃ en función de la presión parcial de oxígeno) que sería sustituida por Nrc como complejo I donador de electrones y las reductasas Nar, Nir, Nor y Nos como aceptores finales durante la desnitrificación. Sin embargo, en este esquema nos faltaría determinar quien sustituiría al complejo Fbc.

Con el fin de determinar si DnrT era también el elemento regulador responsable de la represión génica del operón *fbc*, al igual que habíamos visto anteriormente con *nqo* (figura 31), cotransformamos las cepas CD portadoras de los plásmidos pMHfbcggaA o pMHnqobggaA con el vector pWURdnrT. Como muestra la gráfica de la figura 40, los valores de actividad β -galactosidasa descendieron en este caso a niveles inferiores al 10% con respecto a la actividad máxima de referencia (silvestre en aerobiosis) en presencia de pWURdnrT, con independencia de las condiciones externas (1, 2, 3, 4) y la cepa utilizada. Por tanto, el promotor de *fbc* es muy probablemente objeto de la unión de DnrT, provocando su represión.

La nitrato reductasa se induce por nitrito y NO

La presencia de un citocromo c dihemo como cuarta subunidad de la Nar de *T. thermophilus* es un hecho único entre las Nar conocidas (Zafra y col., 2005), planteándonos su posible implicación como transportador de electrones en fases posteriores de la desnitrificación. Con el fin de estudiar esta posibilidad, ensayamos la expresión de la Nar en cepas PD (B, NAR, HB27c) CD (PRQ16 y PRQ25) en distintas condiciones. Tras 16 horas de inducción con nitrato, nitrito o SNP analizamos la actividad NR y la cantidad de NarG por Western blot. Las cepas aeróbicas HB27 y NAR1 *dnrT* fueron empleadas como controles negativos.

Como se puede apreciar mediante inmunodetección (figura 41A) o ensayos de actividad beta galactosidasa (figura 41B), los tres óxidos de nitrógeno estimulan la expresión de Nar en las cepas CD PRQ16 y PRQ25, mientras que sólo el nitrato lo hizo en las PD NAR1 y HB27c. Por otro lado la actividad NR corrobora lo observado por inmunodetección: tan sólo se detectó actividad NR en las cepas CD, mostrando valores similares para los tres inductores ensayados. Por el contrario, la única actividad significativa en las cepas PD se registró con nitrato aunque la actividad NR en la cepa B la fue algo más importante (32.9 nmoles de nitrito/mg.min, figura 41B) (figura 41C).

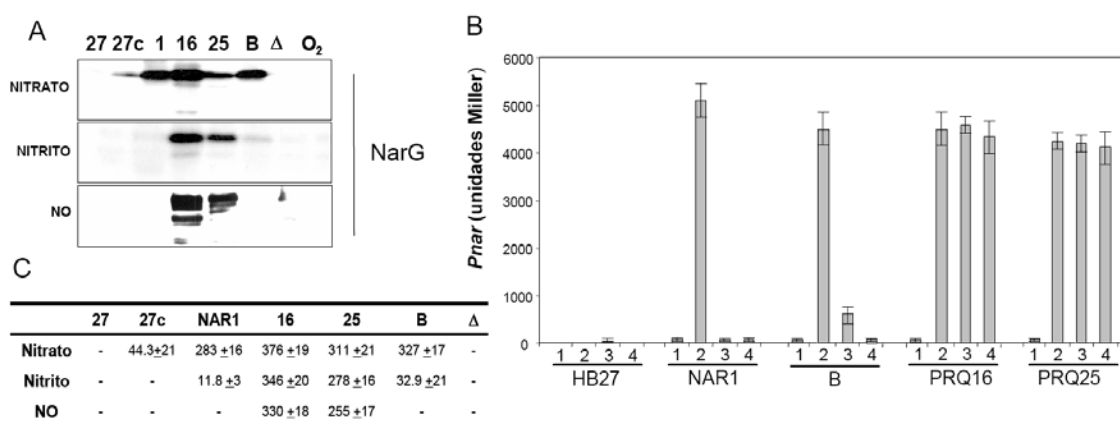


Figura 41. La nitrato reductasa se induce por óxidos de nitrógeno en *T. thermophilus* PRQ. **A)** Inmunodetección de NarG en cultivos anaeróbicos de las cepas indicadas (27: HB27, 27c: HB27c, 1: NAR1, 16: PRQ16, 25: PRQ25, B: cepa B, Δ : NAR1 *dnrT::kat*, O_2 : NAR1 en O_2 en presencia de diferentes aceptores de electrones (nitrato, nitrito, NO). **B)** Representación de actividades β -galactosidasa (unidades Miller) en cultivos de las cepas indicadas portando pMHnarbgaA en condiciones 1) $+O_2$; 2) $-O_2 + NO_3^-$; 3) $-O_2 + NO_2^-$; 4) $-O_2 + NO$ (SNP). **C)** Tabla indicando la actividad nitrato reductasa de cultivos inducidos anaerómicamente con los óxidos de nitrógeno indicados.

Para cuantificar el grado de expresión alcanzado por el operón *nar* en estas cepas con los tres inductores, utilizamos el vector reportero pMHPnarbgaA. Como se puede apreciar en la figura 41B, la inducción de la nitrato reductasa por nitrato superó las 4000 unidades Miller en las cepas PD y CD. Los mismos niveles de actividad beta galactosidasa se obtuvieron con nitrito y NO en las cepas CD PRQ16 y 25, pero no en la PD usada como control (NAR1). La cepa B mostró una inducción con nitrito del 10% de los valores alcanzados con nitrato, indicando que esta cepa tiene la capacidad para responder parcialmente ante este óxido de nitrógeno (figura 41B).

Relevancia de NarC en desnitrificación

Trás observar la inducción de la nitrato reductasa con cualquiera de los óxidos de nitrógeno que funcionan de aceptores de electrones en desnitrificación, estudiamos el papel funcional de ésta en las siguientes etapas del proceso. Para ello, tal como muestra la figura 42, transferimos las mutaciones en la subunidad NarC de la nitrato reductasa a las cepas CD y analizamos el efecto de la mutación en la desnitrificación.

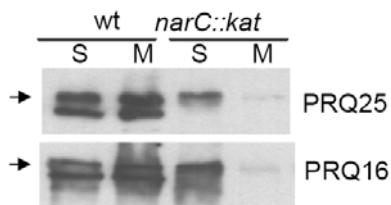


Figura 42. NarC es necesario para el anclaje a membrana y activación de Nar en las cepas desnitrificantes de *T. thermophilus*. Inmunodetección de NarG en fracción de membrana (M) y soluble (S) de cultivos de las cepas indicadas inducidos 4 horas con nitrato en condiciones anaeróbicas.

Tal y como esperábamos de los datos obtenidos con la cepa NAR1, la mutación en *narC* provoca la solubilización de NarG y la pérdida de actividad NR (figura 42, tabla5A). Por ello, el resultado final es que las cepas CD *narC::kat* no son capaces de crecer anaeróbicamente con nitrato (figura 43A).

	wt		<i>narC::kat</i>			
	S	M	S	M		
PRQ25	→	→	→	→		
PRQ16	→	→	→	→		

	NAR1	NAR1 <i>narC::kat</i>	PRQ-16	PRQ-16 <i>narC::kat</i>	PRQ-25	PRQ-25 <i>narC::kat</i>
	Nitrato	396±23	0	411±27	0	387±21
Nitrito	12.5±2	0	404±18	0	360±19	0
NO	16±3	0	377±12	0	381±22	0

	NAR1	NAR1 <i>narC::kat</i>	PRQ-16	PRQ-16 <i>narC::kat</i>	PRQ-25	PRQ-25 <i>narC::kat</i>
	20mM Nitrato	14	0	16	0	13
5mM Nitrito	5	5	0	0.5	0	0.7

Tabla 5. Papel de NarC en la transferencia electrónica hacia las reductasas terminales de desnitrificación. **A)** Actividad nitrato reductasa (nmoles de nitrito producido/min-mg de proteína) de las cepas indicadas inducidas anaeróbicamente con nitrato (40 mM), nitrito (5 mM) o NO (0.1 mM SNP). **B)** Valores de nitrito producido a partir de 20 mM de nitrato, y valores de nitrito (remanente) a partir de 5 mM de nitrito en el medio para cada una de las cepas indicadas en la tabla. Crecimientos realizados durante 48 horas a 70°C.

Por otra parte, las cepas CD *narC::kat* mostraron un crecimiento anaeróbico con nitrito disminuído, alcanzando rendimientos entorno al 55% de los observados en la cepa silvestre PRQ16 (figura 43A, los datos de PRQ25 son prácticamente idénticos y no se presentan). En estos cultivos, las cepas CD silvestres consumieron la totalidad del nitrito a las 48h, mientras que en los mutantes *narC::kat* aún se detectó cierta cantidad de nitrito remanente tras el mismo periodo (tabla5B). Estos datos indicaban una menor velocidad de utilización de nitrito en los mutantes *narC* de las cepas CD.

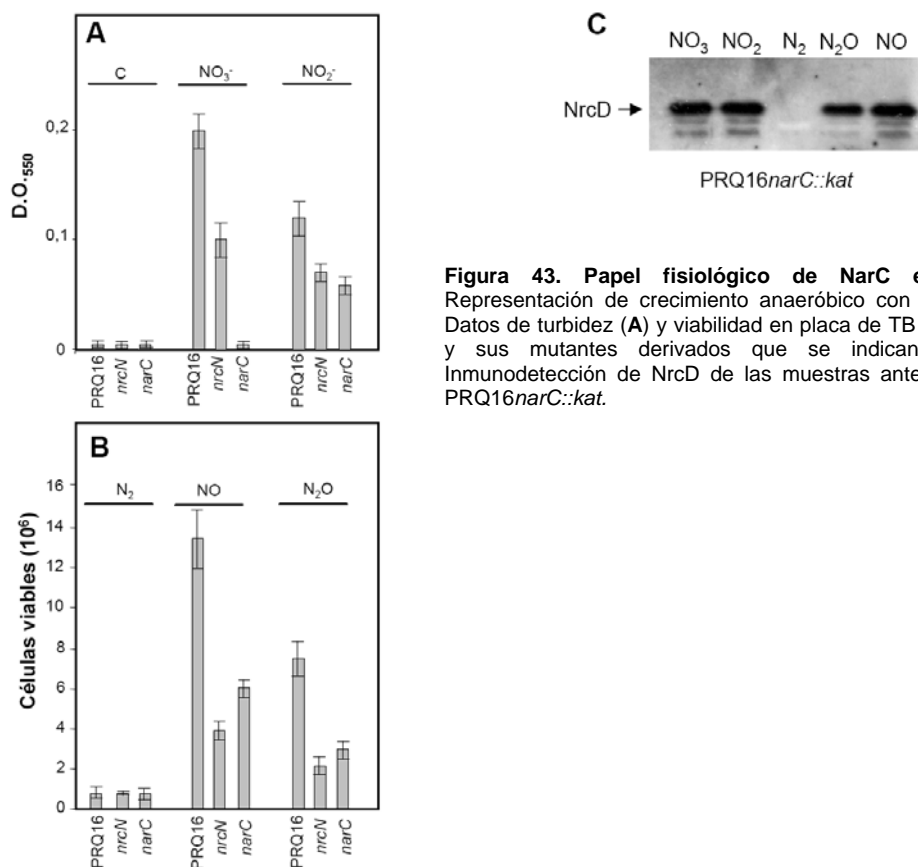


Figura 43. Papel fisiológico de NarC en desnitrificación. Representación de crecimiento anaeróbico con óxidos de nitrógeno. Datos de turbidez (A) y viabilidad en placa de TB ½ (B) para las cepas y sus mutantes derivados que se indican en la figura. C) Inmunodetección de NrcD de las muestras anteriores en el mutante PRQ16*narC::kat*.

Para examinar la relevancia de Nar en la utilización de NO y N₂O, realizamos ensayos de crecimiento anaeróbico en botellas tras desplazar el oxígeno existente por el gas inyectado como aceptor electrónico alternativo (NO, N₂O y N₂). La figura 43B muestra que la ausencia de NarC reduce aproximadamente al 50% el rendimiento celular con respecto a la estirpe silvestre tras 3 días de incubación con NO o con N₂O. Como controles de que el crecimiento era debido a la utilización de estos gases como aceptores de electrones por la Nir y la Nor, se empleó un cultivo con N₂ (figura 43B), así como cultivos de la cepa NAR1, en los que el recuento de microorganismos fue similar al del número introducido en el inóculo (no mostrado).

De estos resultados podemos deducir que la presencia de una Nar inactiva afecta al rendimiento de pasos posteriores de la ruta de desnitrificación de una forma directa o indirecta.

Dado que Nrc parece ser el donador principal de electrones en desnitrificación (capítulo 3), incluimos mutantes *nrcN* como controles adicionales en los ensayos de crecimiento. Como se ve en la figura 43B, los mutantes *nrcN* mostraron un crecimiento ligeramente superior al de los mutantes *narC* con NO y N₂O. Para descartar pues que el efecto de la mutación *narC::kat* en crecimiento fuera consecuencia indirecta de la disminución de Nrc, realizamos un ensayo de detección de NrcD por Western blot, comprobando que la cantidad de NrcD por célula era aproximadamente la misma tras la inducción con los cuatro óxidos de nitrógeno (figura 43C).

Nar afecta al transporte de electrones desde Nrc a Nir y Nor

Como se ha mostrado en ensayos anteriores (tabla6) de respiración *in vitro* con células permeabilizadas, los niveles de NADH oxidado por Nrc están siempre relacionados con la reductasa que intervenga en la reducción del óxido de nitrógeno incluido en el ensayo. Así, las cepas desnitrificantes silvestres PRQ16 y PRQ25 procedentes del ensayo de la figura 43 mostraron niveles de actividad NDH del orden de 400 unidades con nitrato, 200 unidades con nitrito y 55 unidades con GSNO (Tabla6). Por su parte, los mutantes *narC* sufrieron, además de la pérdida total de la actividad NDH con nitrato, una reducción de la actividad NDH con nitrito del 65%, y con NO del 75%. En todos los casos, la cepa NAR1 acompañó los experimentos como control positivo de actividad NDH con nitrato y negativo con el resto de aceptores de electrones (tabla6). Estos datos muestran que Nar es requerida para un eficiente transporte de electrones desde Nrc hasta la Nir y la Nor.

	NAR1		PRQ16		PRQ25	
	wt	<i>narC</i>	wt	<i>narC</i>	wt	<i>narC</i>
Nitrato	416 ± 48	7 ± 4	424 ± 33	11 ± 2	417 ± 46	9 ± 6
Nitrito	6 ± 3	3 ± 1	213 ± 31	94 ± 14	187 ± 19	83 ± 11
GSNO	2 ± 2	3 ± 2	51 ± 7	14 ± 4	60 ± 12	17 ± 5
GSNO+PTIO	-----	-----	7 ± 2	2 ± 1	6 ± 3	2 ± 2

Tabla 6. Respiración *in vitro* en cepas desnitrificantes. Consumo de NADH de las cepas indicadas crecidas en presencia de nitrato, nitrito o GSNO. Concentraciones: Nitrato) 20 mM; Nitrito) 5 mM; GSNO) 1 mM; PTIO) 0.2 mM.

Relevancia de los dos grupos hemo de NarC durante la desnitrificación.

Para estudiar si el efecto de la mutación *narC* sobre las etapas finales de la desnitrificación se debía no sólo a la inestabilidad estructural generada, fruto de participar de interacciones entre componentes respiratorios, sino también a su función de transportador electrónico hacia éstas, se generaron mutantes en los motivos de coordinación de los dos grupos hemo c que presenta (anexo II).

Para ello, se obtuvieron los mutantes dirigidos NarCH1, en el que el primer motivo de unión (C₃₀ASCHG) fue mutado a la secuencia AASAHG, y NarCH2, en el que el segundo motivo de unión (C₁₄₁QACHT) fue mutado a la secuencia AQAHT (Materiales y Métodos). Los genes correspondientes fueron clonados en los plásmidos de expresión constitutiva pMHnarCH1 y pMHnarCH2, usándose el plásmido pMHnarCWt como control del efecto de la expresión de la proteína NarC silvestre.

Como se observa en la figura 44, el mutante *narC* de PRQ16 transformado con el plásmido vacío pWUR, no crece en anaerobiosis con nitrato y lo hace muy despacio con nitrito, como era esperable por resultados anteriores. Cuando es complementado con el plásmido que expresa el gen silvestre, crece a niveles similares a los que alcanza la cepa silvestre con nitrato (panel A) y sólo ligeramente inferiores a éstos cuando crece con nitrito (panel B). Sin embargo, los mutantes NarCH1 y NarCH2 tienen distintos efectos. Así, pMHnarCH1 permite a la bacteria alcanzar un rendimiento celular con nitrato del 50% con respecto al silvestre, mientras que no produce mejoría en el crecimiento con nitrito (igual a *narC::kat* sin complementar (B)). Por otra parte, el mutante complementado con la proteína NarCH2 apenas consigue crecer con nitrato, y sin embargo recupera el crecimiento con nitrito a los mismos niveles que lo hace con la proteína NarC silvestre (figura 44B).

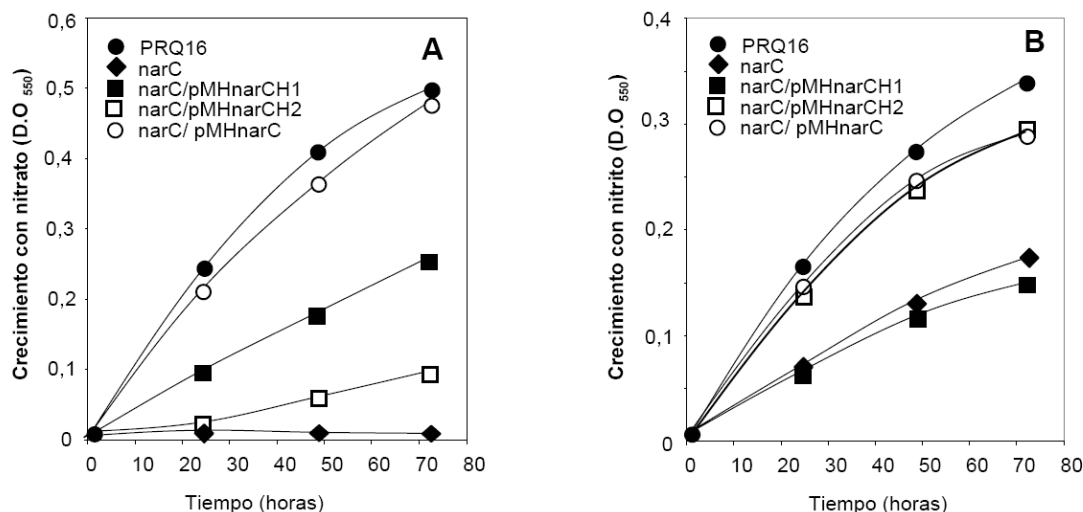


Figura 44. Efecto de las complementaciones de grupos hemo c independientes en mutantes PRQ16 *narC::kat*. A) curvas de crecimiento anaeróbico de la cepa desnitrificante silvestre (PRQ-16) y mutante PRQ-16*narC::kat* (*narC*) en presencia de nitrato (40 mM) B) curvas de crecimiento anaeróbico en presencia de nitrito (5 mM). Complementaciones con *narC* silvestre (pMHnarC), con mutación en hemo 1 (pMHnarCH1) y con mutación en hemo 2 (pMHnarCH2)

Para confirmar estas observaciones bioquímicamente, se ensayó la actividad nitrato reductasa, así como los niveles de nitrito generados y remanentes de cultivos anóxicos con nitrato o nitrito, respectivamente. La tabla 7 muestra que la proteína NarC silvestre produce una complementación total de la actividad NR, mientras que el mutante NarCH1 complementa parcialmente la actividad (10%), y el mutante NarCH2 prácticamente no complementa (<2%). Junto

a estos datos se incluyen también las observaciones de nitrito remanente tras 48 horas de crecimiento de cultivos con una concentración inicial de 5 mM, observando que los mutantes *narC* reducen parcialmente el nitrito, excepto que sean complementados con la proteína NarC silvestre, que les permite consumirlo completamente. Por el contrario, la proteína NarCH1 prácticamente no incrementa el consumo de nitrito de la cepa *narC*, mientras que NarCH2 permite el consumo del nitrito casi en su totalidad.

PRQ-16 wt		PRQ-16 <i>narC</i>			
Proteína expresada	-	-	NarC	NarCH1	NarCH2
Actividad NR	442 ± 30	4 ± 1	382 ± 20	42 ± 6	9 ± 1
Nitrito remanente	0	2.2	0	1,9	0.4

Tabla 7. Papel de los grupos hemo de *narC*. Actividad nitrato reductasa y consumo de nitrito en la cepa desnitrificante silvestre (PRQ-16), mutantes (*narC::kat*), total (NarC) o parcialmente (NarCH1, NarCH2) complementadas.

Estos datos indican que el grupo Hemo 1 es muy relevante en la transferencia electrónica hacia la Nir, mientras que el Hemo 2 es mucho menos importante para dicha transferencia, estando básicamente implicado en la llegada de los electrones hasta NarG.

Nar y Nrc interaccionan a nivel de membrana

La coexpresión de Nrc y Nar en todas las condiciones ensayadas, así como el efecto de las mutaciones en *narC* en la desnitrificación nos hicieron sospechar sobre la posible existencia de interacciones entre ambas enzimas. Para determinar si esto era así, y conocer el tipo de interacciones existente entre las subunidades de membrana (en un mismo complejo respiratorio o entre complejos) en la cadena de transporte electrónico, recurrimos nuevamente al doble híbrido bacteriano.

Se construyeron y ensayaron fusiones de las proteínas de membrana de Nar y Nrc (NarC, NarI y NrcE) con los dominios T18 y T25 de la adenilato ciclasa (Cya) de *Bordetella pertussis*. Empleamos para ello la nueva batería de vectores cedidos por la Dra. Gouzel Karimova del Instituto Pasteur que permiten ensayar la interacción entre proteínas de membrana o entre proteínas que deban ser translocadas a localizaciones celulares externas (Karimova y col., 2005).

Los resultados mostrados en la gráfica de la figura 45A muestran las actividades β -galactosidasa obtenidas con las distintas combinaciones de construcciones, y en la figura 45B se incorpora un esquema de las interacciones deducidas del panel A. Según nuestros datos, NarI interaccionaría con NarC (500 unidades) dentro del complejo Nar (Zafra y col., 2005) mientras que la subunidad NrcE interaccionaría con Nar I (800 unidades) y consigo misma (700 unidades Miller). No observamos sin embargo, interacción positiva entre NarC y NrcE por lo que la asociación

fisiológica entre complejos de la cadena respiratoria de anaerobiosis Nrc-Nar ocurriría únicamente a través de NrcE y NarI. Como control positivo se empleó el homooligómero Gdh (400 unidades) y en paralelo se llevaron a cabo las fusiones en el N-terminal de cada proteína de membrana, comprometiendo su ruta de tranlocación al bloquear el péptido señal (vectores pUT25 y pKT25). En todos los casos, las actividades derivadas de las interacciones en las que participaban estas fusiones no fueron significativas (aprox 100 unidades, no mostrado en la figura 45).

De estos datos concluimos que Nar y Nrc forman un complejo a través de la interacción entre las subunidades NrcE y NarI.

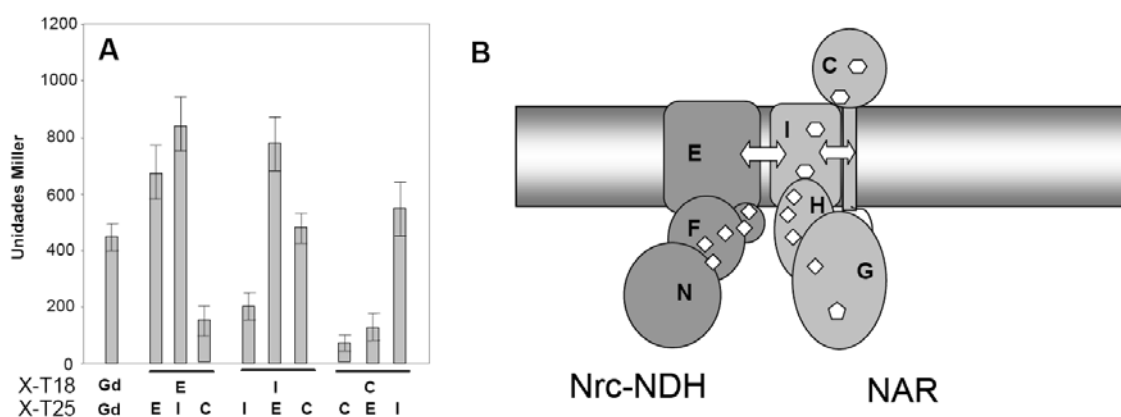


Figura 45. Nrc-NDH interacciona con la nitrato reductasa para formar un supra-complejo respiratorio en membrana. Ensayo de doble híbrido bacteriano en *E. coli* BTH101 basado en la reconstitución funcional de la adenilato ciclasa (Cya) de *Bordetella pertussis*. **A)** Representación en unidades Miller de los resultados de actividad β -galactosidasa de cultivos de BTH101 coexpresando las fusiones indicadas en la gráfica. Cada fusión fue cotransformada con los controles pertinentes y finalmente para simplificar y facilitar la comprensión sólo se representaron las combinaciones que resultaron positivas. Los datos corresponden a medias de 6 mediciones en 2 experimentos independientes. **B)** Esquema gráfico de la topología e interacciones entre las subunidades de membrana de los complejos de la respiración anaeróbica de *T. thermophilus*.

La cadena respiratoria anaeróbica se localiza en zonas discretas de la membrana de T. thermophilus

La localización de proteínas por fusiones a la GFP o *green fluorescent protein* de *Aequorea victoria* es hoy en día una de las herramientas más utilizadas en Biología Celular. Recientemente ha sido descrito un mutante múltiple denominado “superfolder GFP” (sGFP) capaz de plegar correctamente cuando se fusiona como C-terminal a proteínas que pliegan mal (Pedelacq y col., 2006). Nosotros hemos comprobado que este mutante es lo suficientemente termoestable como para dar lugar a formas fluorescentes a 70 °C (ver más adelante), y lo hemos utilizado aquí para localizar los complejos Nar-Nrc.

Para ello, diseñamos dos series de vectores bifuncionales *E. coli-Thermus* para la expresión constitutiva e inducible de fusiones con GFP desde los promotores *Pnqo* y *Pnar* (*Thermus*) o *Plac* y *PT7* (*E. coli*), y empleamos las resistencias termoestables a kanamicina o a higromicina para la selección de los plásmidos en ambos microorganismos (Materiales y Métodos). Se construyó la fusión de *narC-sGFP* para determinar su localización y organización celular en la

que la sGFP queda ligada al pequeño dominio C-terminal citosólico de NarC a través de una secuencia de unión flexible (SGGGG). Como control se construyó la fusión citosólica entre la subunidad pequeña de la chaperonina (GroE10) y la sGFP. En la Figura 46A se muestra un esquema del plásmido vacío y de las construcciones empleadas.

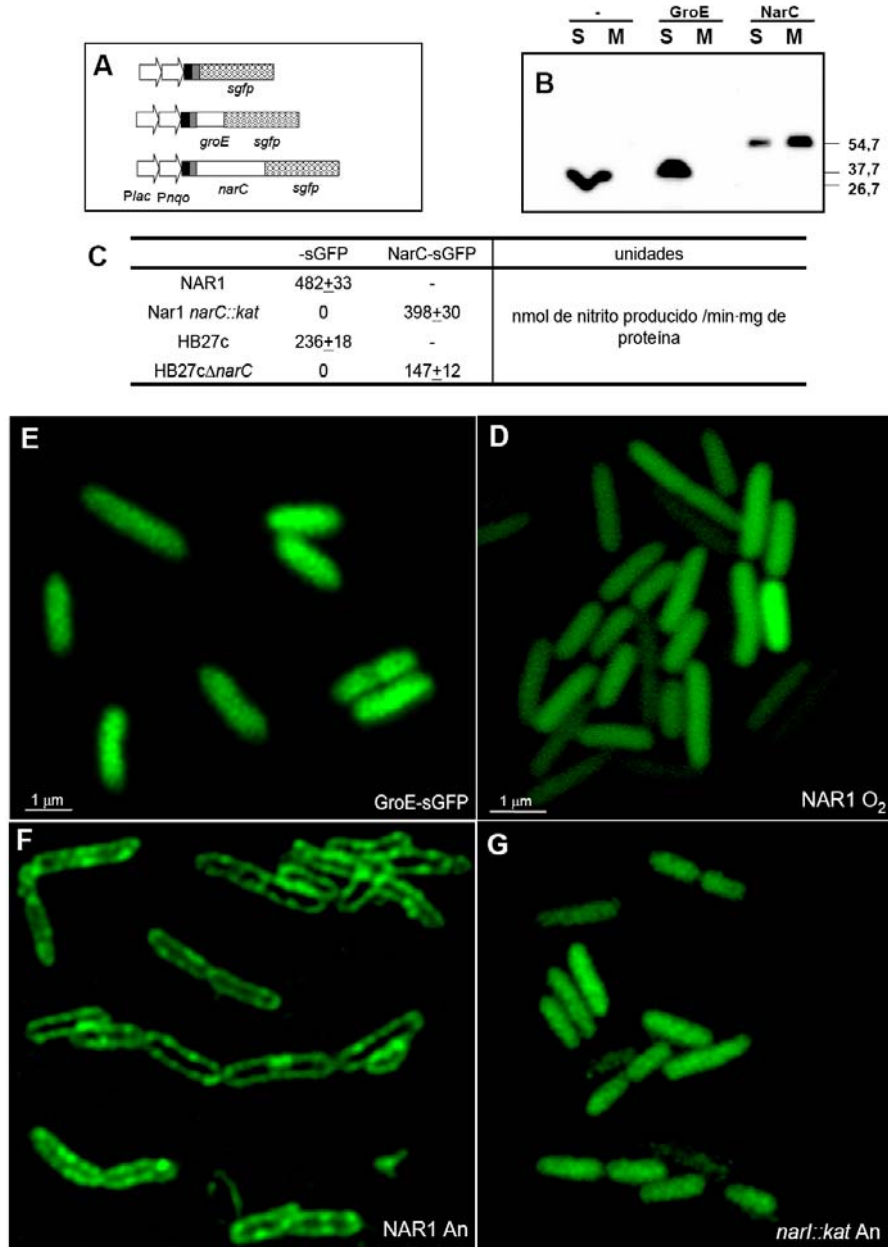


Figura 46. Localización *in vivo* de las proteínas de fusión en *Thermus thermophilus* NAR1: Los complejos respiratorios se disponen asociados en regiones discretas de la membrana. A) Esquema de fusiones entre proteínas de *T. thermophilus* (citoplásmica (*groE*), y de membrana (*narC*)) con sGFP. **B)** Western blot mostrando el tamaño de las fusiones (kDa) con sGFP y su distribución entre las fracciones soluble (S) o de membrana (M) tras su expresión en *T. thermophilus* con los plásmidos mostrados en el panel **A**. **C)** Tabla de valores de la actividad nitrato reductasa de las cepas silvestres facultativas y sus mutantes derivados en *narC* complementadas con las fusiones a sGFP.

Las imágenes **D**, **F**, **G** muestran la expresión de la fusión NarC-sGFP (pMHPnqonarCsGFP) en la cepa silvestre NAR1 (**D,F**) y en su mutante derivado NAR1 *narC::kat* (**G**) a 70°C en condiciones aeróbicas (**D**) o microaeróbicas en presencia de nitrato (**F**, **G**) tal y como se detalla con las abreviaturas O₂ y An respectivamente. El panel **E** muestra como control de la expresión de la fusión citosólica GroE-sGFP (pMHPnqogroEsGFP).

El tamaño de las fusiones fue comprobado mediante inmunodetección de sGFP, y mediante fraccionamiento comprobamos que tanto la sGFP (Materiales y Métodos) como la fusión GroES-sGFP aparecían en la fracción soluble, mientras que la mayor parte de la fusión NarC-sGFP localizaba en la fracción particulada (membrana) (figura 46B).

Para determinar si la fusión a sGFP interfería con la actividad de NarC realizamos ensayos de complementación de la actividad NR de mutantes *narC* de las cepas NAR1*narC::kat* y HB27cΔ*narC*, observándose en ambos casos una complementación muy eficiente (figura 46C). Por tanto, la proteína NarC es activa cuando se expresa en forma de fusión NarC-sGFP.

A continuación, observamos mediante microscopía confocal las células que expresaban sGFP o las fusiones derivadas. Como se muestra en Materiales y Métodos, la sGFP sólo, expresada a 70°C genera una señal uniforme dispersa por toda la célula, mostrando su funcionalidad *in vivo* a altas temperaturas y la ausencia de zonas preferenciales de acumulación. Un resultado similar se obtuvo con la fusión GroES-sGFP, control positivo de fusión citosólica (panel E). La termoactividad de la sGFP fue finalmente contrastada por comparación con la eGFP (*enhanced GFP*) (Cormack y col., 1996), la cual no generó emisión de fluorescencia detectable al ser expresada a la misma temperatura (Materiales y Métodos) que la anterior.

Por otro lado, la expresión de la fusión NarC-sGFP en la cepa NAR1 en condiciones aeróbicas dió lugar a una señal homogéneamente distribuída por toda la célula (panel D), mientras que en microaerofilia con nitrato la fluorescencia se concentró en la membrana plasmática, apareciendo regiones con alta concentración de marca (panel F). Estos datos sugieren que la fusión NarC-sGFP necesita de la expresión de algún componente del aparato de respiración anaerobia para su correcta localización. De hecho, cuando se repitió la expresión de la fusión en un mutante *narI::kat*, la fluorescencia no se concentró en la membrana, sino que apareció sorprendentemente dispersa en la célula (panel G), sugiriendo nuevamente la necesidad de interacciones específicas en Nar para la estabilización de NarC en membrana.

5. DISCUSIÓN

El elemento NCE codifica una cadena completa de respiración de nitrato

El genoma de *T. thermophilus* HB27 codifica una NDH respiratoria tetradecamérica o de tipo I que ha sido objeto de numerosos estudios bioquímicos y estructurales, sirviendo de modelo para este tipo de enzima en otras bacterias (Hinchliffe y Sazanov, 2005; Yano y col., 1997). Estas enzimas se encuentran fuertemente unidas a membrana y bombean protones durante la reducción de las quinonas. En otros microorganismos, aunque no en las cepas de *T. thermophilus* secuenciadas, existe una segunda NDH respiratoria de tipo-II, monomérica, que no bombea protones al reducir las quinonas, y que puede purificarse en forma soluble (Melo y col., 2004). En el capítulo 1 de esta tesis doctoral hemos descrito un nuevo tipo de NDH respiratoria que se expresa simultáneamente con la nitrato reductasa. La presencia de los correspondientes operones en un mismo elemento movilizable le otorga cierto carácter de “isla de respiración” transferible.

Estructura de Nrc

Los resultados mostrados en el capítulo 1 nos han llevado a proponer el modelo topológico y funcional para Nrc que se muestra en la figura 47. En este modelo, y aunque no haya sido posible producirla en *E. coli*, proponemos a NrcN como subunidad NDH catalítica debido, por un lado a su homología con secuencias de NDH monoméricas tipo-II, incluyendo la presencia en su secuencia de un dominio oxidorreductasa de unión de nucleótidos de piridina, y por otro, a la ausencia de actividad NDH en fracciones de membrana o citoplásmicas de mutantes nrcN sometidos a inducción anaeróbica.

Por otra parte, la naturaleza de NrcN como subunidad del complejo Nrc se dedujo del efecto de las mutaciones en *nrcF* y *nrcE*: En ambos casos disminuía la oxidación de NADH con nitrato por las fracciones de membrana, mientras que aumentaba una actividad NDH independiente de nitrato en la fracción soluble. Este dato, junto al carácter insoluble de NrcE, sugería que la unión de NrcN a NrcE tenía lugar a través de NrcF. Por otra parte, en ausencia de un modelo para la proteína, no disponemos de una explicación para la “promiscuidad” de aceptores (desconocidos) adquirida por NrcN al solubilizarse, pero es una propiedad de potencial utilidad biotecnológica en biotransformaciones.

Nuestros datos han servido para proponer a NrcE como punto de anclaje del resto de subunidades de NrcE a la membrana. Esto se basa tanto en la predicción de siete hélices transmembrana en su región N-terminal como en la solubilización de NrcD y de la actividad NDH (NrcN) en mutantes *nrcE::kat*. La implicación del dominio citosólico C-terminal de NrcE en la interacción con el resto de subunidades fue sugerida por el mencionado efecto solubilizador de NrcD y NrcN en mutantes de inserción próxima al extremo 3' del gen que, teóricamente generarían una proteína truncada de 310 aminoácidos carente del dominio C-terminal, pero con la mayor parte

de sus dominios transmembrana intactos. La confirmación de esta sospecha se obtuvo como resultado de ensayos de doble híbrido bacteriano que revelaron interacciones específicas entre el dominio C-terminal de NrcE y las subunidades NrcD, NrcF y NrcN (figura 17), siendo la primera (NrcE-NrcD) de especial intensidad de señal.

El componente que más dudas ofrece acerca de su localización es NrcF, carente de actividad y del que no disponemos de anticuerpos. Sin embargo, podemos inferir su naturaleza soluble del doble resultado de solubilización de NrcN en mutantes *nrcF::kat* y *nrcE::kat* y de la interacción NrcF-NrcN detectada por experimentos de doble híbrido.

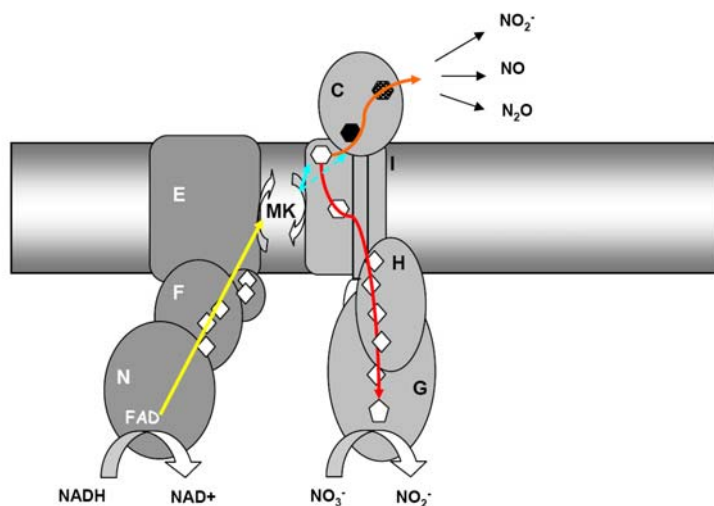


Figura 47. Modelo general del “respirasoma anaeróbico” de *Thermus thermophilus*. Hipótesis de la ruta de transferencia de electrones procedentes del NADH para la respiración anaeróbica de nitrato y oxidación de óxidos de nitrógeno en pasos subsiguientes del proceso de desnitrificación. Rombos: centros Fe-S, hexágonos blancos: grupos hemo c (H1, punteado), hexágonos blancos: hemos b, pentágono: cofactor de molibdeno (MoCo), MK: menaquinona-8. En amarillo, ruta de reducción anaeróbica de quinonas. Transferencia de electrones hasta el pool de menaquinona-8 procedente de la oxidación de poder reductor (NADH). En azul, ruta oxidativa de quinonas por el subcomplejo cb (NarC-NarI) a nivel del hemo b en la cara periplásmica de la membrana. En rojo, transferencia electrónica dirigida a la reducción de nitrato (respiración desasimilativa de nitrato). En naranja, transferencia electrónica destinada a la reducción de óxidos de nitrógeno de las etapas restantes de la desnitrificación (reductasas de nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso).

Estos datos sugieren por tanto que la enzima Nrc es una NDH heterotetramérica, completamente distinta de la NDH tipo-I (tetradecamérica) y tipo-II (monomérica) conocidas hasta entonces. Sin embargo, Nrc tiene ciertas similitudes, estructurales y de secuencia, con otra enzima respiratoria de gran importancia: la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (SQR). Así, el dominio catalítico de SQR es un complejo soluble constituido por la subunidad sulfoférrica B (homóloga a NrcF) y la subunidad catalítica A, una proteína de unos 600 aminoácidos que como NrcN presenta un motivo oxidoreductasa de unión de nucleótidos de piridina. En bacterias como *E. coli*, este complejo A-B se ancla a membrana a través de las subunidades C y D, mientras que en otras como *Bacillus subtilis*, y *Wollinella succinogenes* las subunidades C y D están fusionadas en un único polipéptido de 5 hélices transmembrana (Cecchini y col., 2002; Cecchini y col., 2003). En nuestro modelo, NrcE desempeñaría un papel similar al de esta subunidad C-D, mientras que NrcF

y NrcN formarían un complejo similar al A-B de la SQR. En este sentido, resulta interesante que los mutantes *nrcF::kat* se vean menos afectados en la transferencia de electrones desde el NADH hasta la Nar en fracciones de membrana que los mutantes *nrcE::kat* o *nrcN::kat* (figura 18), lo cual podría estar relacionado con una sustitución parcial de NrcF por la subunidad B de la SQR, con la que tiene un elevado grado de identidad de secuencia (65%) (Henne y col., 2004).

Dada la rápida degradación de la ferredoxina NrcD en mutantes *nrcE::kat* y los datos negativos de los ensayos de interacción con las subunidades F y N en *E. coli*, hacen difícil proponer la presencia de NrcD asociada a este complejo NrcF-N soluble. En todo caso, la fuerte unión de NrcD a NrcE y el carácter de proteína de membrana de éste sugiere que NrcD sería un intermediario en el transporte de electrones hacia NrcE.

A nivel funcional por tanto, proponemos en nuestro modelo (figura 47) que los electrones procedentes de la oxidación del NADH serían transferidos a un hipotético nucleótido de flavina de NrcN, y de ahí circularían por los 3 centros Fe-S definidos en la secuencia de NrcF hasta alcanzar NrcE, posiblemente a través de la ferredoxina NrcD. NrcE catalizaría la reducción de las quinonas en el lado citoplásmico de la membrana, y la forma reducida de éstas serían a su vez oxidadas por la nitrato reductasa en la cara periplásmica de la membrana, contribuyendo así a la generación del gradiente electroquímico de protones. La falta de conservación en los dominios de unión a quinonas nos impide proponer un dominio concreto de NrcE responsable de la reducción de éstas.

La inhibición de la actividad NDH por Rotenona, Diuron y HQNO en experimentos *in vitro* (tabla 2), demuestra la implicación de la quinonas como intermediarios de transferencia electrónica entre los complejos Nrc y Nar. La quinona que se esperaría interviniese en este proceso es la menaquinona-8, que es la más abundante en las membranas de cultivos de *T. thermophilus* crecidos aeróbica o anaeróticamente con nitrato (da Costa, 2001). De hecho no se ha detectado ubiquinona ni identificado en el genoma homólogos de proteínas implicadas (UbiC) en su síntesis (Henne y col., 2004). Es por ello por lo que predictivamente tanto la NDH-I (Nqo) como Nrc emplearían las mismas quinonas en sus procesos respiratorios.

En conclusión, estos datos relativos a su actividad NDH y estructura tetramérica, junto con los de expresión y respiración *in vitro* dependientes de nitrato, muestran la Nrc como un componente fundamental de una cadena respiratoria única, específicamente dedicada a la respiración de nitrato y codificada dentro de un elemento transferible entre cepas termófilas. En el futuro pretendemos sobreproducir y purificar el complejo Nrc para caracterizar su actividad y tratar de cristalizarlo. En este sentido, ya disponemos de construcciones para la expresión de la subunidad NrcN fusionada en su extremo C-terminal a dos secuencias para su purificación mediante cromatografía de afinidad.

Implicación de Nrc como donador de electrones en desnitrificación

En el tercer capítulo de este trabajo observamos un alto grado de conservación del elemento NCE en varias cepas de *T. thermophilus* (B, NR17, PRQ-16 y PRQ-25) con capacidad desnitrificante completa o parcial ((da Costa, 2001; Manaia, 1994; Pask-Hughes y col., 1977), datos no publicados). En estas estirpes, hemos detectado la conservación de regiones codificantes y promotores de transcripción de las zonas más representativas del elemento NCE (tabla3).

El estudio de la función de los genes *nrc* en las cepas desnitrificantes PRQ-16 y PRQ-25, reveló que los mutantes *nrc* crecían con tiempos de generación superiores a los de las silvestres con nitrito, (figura 43), y mediante ensayos *in vitro* con células permeabilizadas observamos que la actividad NDH se acoplaba a la adición de nitrito y su consumo, mientras que en los mutantes *nrc*, sólo se detectaron niveles irrelevantes de oxidación de NADH (tabla4). Por tanto, concluimos que Nrc no es donador de electrones exclusivo de Nar, sino que también lo es para la nitrito reductasa (Nir), una enzima no identificada en el NCE. Es importante remarcar que no se detectó actividad NDH en fracciones de membrana con nitrito (no mostrado), lo cual sugiere que la nitrito reductasa de *T. thermophilus* es soluble, probablemente asociada a la cara periplásmica de la membrana (Castan y col., 2002) al igual que sucede en Proteobacteria (Zumft, 1997).

Otra observación importante que se deduce de estos ensayos son las relaciones estequiométricas de la oxidación de NADH con respecto a la reducción de nitrito (tabla4). Teóricamente sería esperable una relación 1:2 (mol NADH oxidado: mol nitrito reducido), pero experimentalmente la relación se aproxima más a 1:1 para las estirpes silvestres. Estos datos sugieren que el NO y N₂O, productos de reducción de las etapas sucesivas de la desnitrificación, son también usados como aceptores finales de los electrones enviados por Nrc. De hecho, demostramos la actividad NDH con células PRQ-16 y PRQ-25 permeabilizadas empleando un generador artificial de óxido nítrico (GSNO) como aceptor de electrones en un proceso de transferencia electrónica que depende de la integridad de Nrc (tabla4). En relación a esto, tanto el nitrito como el NO constituyen una señal para la expresión de Nrc estas cepas (figura 35), lo que sugiere que Nrc es expresado simultáneamente con Nir, Nor y, posiblemente, con Nos, posibilitando su uso como donador primario de electrones hacia estas reductasas. Desafortunadamente, no se pudo ensayar el posible uso de N₂O como aceptor de electrones *in vitro* por razones técnicas.

Además de los datos con células permeabilizadas, el notable descenso de los rendimientos celulares con NO y N₂O obtenidos en crecimiento anaeróbico con los mutantes *nrc* de cepas desnitrificantes, apoya que Nrc constituya el principal donador de electrones hacia todas las reductasas implicadas en el proceso de desnitrificación en *Thermus thermophilus* (Nar, Nir, Nor y Nos).

Implicación de Nar en el transporte de electrones durante la desnitrificación

En muchas bacterias entre las que se encuentra *T. thermophilus*, el complejo bc₁ actúa como transportador de electrones entre las quinonas y las oxidasas terminales (Thony-Meyer, 1997). En concreto en *Thermus thermophilus*, el complejo bc₁ transfiere los electrones al citocromo periplásmico soluble c₅₅₂ que los dirige a la citocromo oxidasa de alta afinidad ba₃ y posiblemente también hacia la de baja afinidad caa₃ (Mooser y col., 2006).

El complejo bc₁ también participa en la transferencia de electrones a las reductasas terminales del proceso de desnitrificación, directa o indirectamente (a través del citocromo c₅₅₀ o de pseudoazurina) como en el caso de *Paracoccus denitrificans* (Baker y col., 1998). Sin embargo, este no es el caso en *T. thermophilus*, puesto que durante el crecimiento anaeróbico con nitrato o tras inducción con SNP (generador de NO), el promotor del operón codificante de este complejo (*Pfbc*) se reprime de manera muy acusada, mientras que se encuentra inducido durante el crecimiento aeróbico. Por tanto, debería de existir un intermediario en la cadena de transporte que sustituyera al complejo bc₁ durante la desnitrificación (figura 40).

Relevancia de NarC en desnitrificación

Un hecho que nos puso sobre la pista de cual podría ser el sustituto del complejo bc₁ en las cepas CD de *T. thermophilus* fue que el operón *nar* se expresaba a niveles similares en anoxia tanto si la inducción era provocada por el nitrato, como si era otro el óxido de nitrógeno empleado (nitrito, NO y probablemente N₂O) (figura 41). Esta situación es poco frecuente, dado que los sistemas bacterianos desnitrificantes suelen particionar su sistema regulatorio en dos: antes (Nar, Nir) y después de la reducción del nitrito (Nor, Nos) (Spiro, 2007; Vollack y Zumft, 2001; Zumft, 1997, 2002). Las primeras dos etapas catalizadas por Nar y Nir son habitualmente estimuladas por nitrato y/o nitrito, mientras que el NO es la molécula señalizadora que activa mayoritariamente la expresión de las reductasas de óxido nítrico y nitroso (Nor y Nos), relegando a un segundo plano al N₂O como señalizador.

Por otra parte, la nitrato reductasa de *T. thermophilus* es muy atípica al tratarse de un heterotetrámero que incluye la subunidad NarC, un citocromo c periplásmico anclado a la membrana (Zafra y col., 2005), en vez del clásico heterotrímero que cuelga de la cara citoplásmica de la membrana (Gonzalez y col., 2006). Esta topología de NarC en el complejo Nar sugería la posibilidad de una transferencia de electrones desde Nar hacia enzimas periplásmicas.

De hecho, los mutantes *narC::kat* de las cepas PRQ16 y PRQ25 veían afectada su actividad consumidora de nitrito (<50%) en ensayos con células permeabilizadas (tabla5), así como los rendimientos celulares al crecer con nitrito, NO y N₂O (figura 43), apoyando la hipótesis de la implicación de NarC como mediador en la transferencia de electrones hacia las reductasas finales del proceso de desnitrificación.

Para comprobar esto y conocer el posible papel jugado por cada una de los grupos hemo c de NarC en este proceso, se generaron 2 mutantes dirigidos, en los que se sustituían las cisteínas

implicadas en la definición del sitio de unión para cada uno de los dos grupos hemo c. Sorprendentemente, encontramos que cada uno de los hemo c afectaba de forma distinta a la bacteria en los ensayos de complementación: la reducción de nitrato dependía de la integridad del grupo hemo c próximo al extremo C-terminal (H2), y por el contrario, la reducción de nitrito (y posiblemente al resto de etapas finales) dependía del hemo c localizado en el N-terminal (H1) (figura 44, tabla T7). En este sentido, es importante resaltar que la zona N-terminal de NarC (1-120 aa) incluyendo el motivo de coordinación del hemo H1, es muy similar al presente en el citocromo c_{552} periplásmico (Zafra y col., 2002), donador de electrones de las citocromo oxidetas aeróbicas, por lo que su papel de intermediario hacia las reductasas finales podría tener una base estructural. Por otro lado, el motivo de coordinación de H2 reside en la región de NarC próxima a la membrana, y al hemo b más externo de la subunidad NarI, lo que podría afectar de forma relevante a la funcionalidad de éste. De hecho, la mutación en este hemo c ha de afectar notablemente a la maduración de Nar, dado que no se recupera nada de actividad con un donador artificial que dona los electrones directamente a la subunidad NarG.

Puesto que Nrc es expresado al mismo nivel en estos mutantes, los datos han de explicarse en base a la actuación de NarC como distribuidor del flujo de electrones, de forma que en presencia de nitrato los electrones circularían por los hemo b de NarI hasta alcanzar finalmente el cofactor de molibdeno en NarG al igual que lo hacen en la Nar de *E. coli* (figura 47). Por el contrario, en ausencia de nitrato, los electrones podrían circular hacia los hemo c de NarC y de ahí hacia las reductasas terminales (figura 47), desconociendo si en este último tramo estaría implicado algún otro tipo de intermediario (otro citocromo c, azurina, pseudoazurina) como sucede en *Paracoccus* (Baker y col., 1998).

En este caso, NarI-NarC constituirían un subcomplejo dentro del heterotetrámero Nar homólogo funcional del complejo bc_1 . De ser así, la alteración provocada por la mutación del H2 de NarC en la reducción de nitrato se explicaría únicamente por una alteración conformacional transmitida en cadena entre subunidades de Nar. De todas formas, nuestros datos implican también la existencia de una vía alternativa a Nar capaz de hacer llegar una cantidad significativa de electrones (40-45%) desde la quinonas a las reductasas finales en los mutantes *narC::kat*.

Nrc-Nar forman una cadena respiratoria en anaerobiosis

La utilización de vectores del sistema de doble híbrido bacteriano diseñados para estudiar interacciones entre proteínas de membrana, permitió observar la asociación entre las subunidades NarI-NarC (figura 45). De hecho, la fluorescencia emitida por la sGFP fusionada a NarC se aprecia sólo en la membrana plasmática en aquellos casos en los que la presencia NarI garantiza su estabilidad a través del establecimiento de las interacciones necesarias (figura 46). Algunos casos similares de interacción entre complejos respiratorios han sido recientemente descritos en modelos mitocondriales de levadura y bacterianos explicándolos como un sistema más eficiente para la

canalización de los electrones (Dudkina y col., 2005; Schafer y col., 2006; Schagger, 2002; Stroh y col., 2004).

Es posible que un sistema codificado en un elemento genético conjugativo, que dispone incluso de su propio sistema regulatorio autónomo (Cava y Berenguer, 2006), haya evolucionado en los sistemas bacterianos en los que se haya integrado, adaptándose por ganar eficiencia energética en la velocidad de transferencia electrónica desde el sustrato oxidado (NADH) hasta las reductasas terminales, garantizando tiempos de generación inferiores y con ello una colonización eficaz de nichos anaeróbicos ricos en óxidos de nitrógeno. Por esto, el elemento NCE puede ser considerado como una isla genética respiratoria autónoma que ha evolucionado conjuntamente con *Thermus thermophilus* para generar un eficiente sistema de respiración anaeróbico (desnitrificación completa o parcial) basado en: 1) la asociación genética de todos los componentes necesarios en un elemento integrativo, 2) la rápida movilización del elemento por transferencia horizontal conjugativa, 3) un sistema regulatorio que integra el conjunto de señales externas y coordina la expresión de los componentes necesarios para cada proceso, evitando rutas redundantes, y finalmente 4) una transferencia rápida y eficiente de los electrones hasta las reductasas terminales, canalizados a través de asociaciones específicas entre los complejos de la cadena respiratoria.

NCE controla el metabolismo desnitrificante en *T. thermophilus*

Además de los complejos Nrc y Nar, NCE codifica los reguladores DnrS y DnrT que controlan la expresión de estas dos enzimas y, aparentemente, de las otras reductasas de la desnitrificación.

La proteína DnrS

El análisis de los mutantes *dnrS::kat* (que expresan constitutivamente DnrT), junto con los ensayos de complementación empleando el vector pWURdnrS, mostraron la necesidad de DnrS para el crecimiento anaeróbico con todos los óxidos de nitrógeno ensayados (figuras 38 y 39). Mediante ensayos de inmunodetección y vectores para la prueba de promotores, comprobamos que DnrS era necesario para la expresión de Nar, pero no para la de Nrc. Más aún, observamos que DnrS también está implicado en la co-activación de su propio promotor (*Pdnr*). Sin embargo, la expresión constitutiva de DnrS (pWURdnrS) en el mutante *dnrS::kat*, donde también DnrT se expresa de forma constitutiva, no generó transcripción a partir de *Pnar* o *Pdnr* en condiciones aeróbicas (figura 25A y C). Por ello concluimos que, o bien uno o ambos reguladores eran sensibles a nitrato y/u oxígeno, o se precisaba de algún otro factor adicional aún no identificado para la expresión de *Pnar* y *Pdnr*. El análisis de los efectos independientes de las señales de anoxia y nitrato en células expresando DnrT y DnrS constitutivamente reveló que la señal de anoxia tiene una mayor relevancia que la señal de nitrato en la activación transcripcional de ambos promotores, en especial para el promotor *Pdnr*, en el cual, la anoxia (en ausencia de nitrato) incrementó la transcripción hasta el 73% del valor máximo obtenido por combinación de ambas señales. Teniendo en cuenta estos resultados y la independencia de señales del efecto activador de DnrT sobre *Pnrc* (figura 25B), proponemos a DnrS como sensor redox del sistema de inducción de *Pnar* y *Pdnr*.

En este sentido, la proteína DnrS tiene un dominio GAF en su extremo N-terminal. Este tipo de dominios se encuentran en sensores citosólicos asociados a otros dominios o proteínas de señalización (quinasas, adenilato ciclasas, fosfodiesterasas, fosfatasas) o bien a dominios efectores como el motivo BTAD (Galperin, 2004) también presente en DnrS (figura 21). El papel receptor de la señal de los dominios GAF se suele asociar a su capacidad para unir moléculas pequeñas. De hecho se conocen precedentes como sensores de oxígeno y NO por el dominio GAF de la proteína DosS de *Mycobacterium tuberculosis* (Sardiwal y col., 2005) y NorR de *E. coli* (D'Autreaux y col., 2005). Se desconoce aún el modo que tienen los dominios GAF para transmitir la señal a los dominios efectores, pero por norma general se asume que implica cambios conformacionales que afectan la actividad del dominio regulador (Galperin, 2004). En este sentido, hemos detectado una sensibilidad mayor frente a tratamientos con proteasa cuando la proteína DnrS era expresada en condiciones aeróbicas que cuando las condiciones de crecimiento limitaban la concentración de oxígeno en el medio (figura 26). Desafortunadamente, no podemos asociar estos datos con datos de ensayos *in vitro* (p.e, unión a DNA) porque la proteína DnrS

obtenida de *E. coli* resultó inactiva en todos los intentos realizados. En todo casos, nuestros datos indican que la forma DnrS nativa dispone de un cofactor sensible a oxígeno unido a nivel de su dominio GAF y que durante condiciones reductoras permitiría la unión del regulador a secuencias de reconocimiento específicas en los promotores diana *Pdnr* y *Pnar* a través del dominio BTAD, pero que pasaría a una forma inactiva por oxidación a través de un cambio conformacional transmitido desde su dominio GAF hasta su dominio BTAD.

En este sentido, DnrS simularía el papel desempeñado por FNR como sensor de oxígeno durante la respiración de nitrato en *E. coli* (Korner y col., 2003) y quizá por esto motivo sea también necesaria como co-inductor durante crecimiento anaeróbico con nitrito, NO y N₂O. Un análisis detallado de cómo DnrS es inactivado por O₂ tendrá que esperar hasta disponer de DnrS purificado activamente de cultivos anóxicos de *T. thermophilus*.

DnrT como activador transcripcional

DnrT es necesario para la síntesis de Nar, Nrc y para su propia expresión por lo que se comporta como activador transcripcional central de los tres promotores del sistema de respiración de nitrato codificados por el NCE (figura 50). Sin embargo, el mecanismo de activación varía entre estos tres promotores: mientras que DnrT actúa en coordinación con DnrS para activar *Pdnr* y *Pnar* en un proceso que como ya hemos comentado depende como mínimo de anoxia, su expresión en la célula basta para activar la transcripción del operón *nrc* en un proceso que es independiente de las señales de nitrato y oxígeno. Este comportamiento apoya que DnrT funciona como un factor de transcripción constitutivamente activo cuya función depende básicamente de su concentración celular y no de cambios conformacionales o modificaciones post-traduccionales, que de hecho, no han sido detectadas en los experimentos de la sensibilidad a la tripsina (figura 26). Este tipo de comportamiento contrasta con la estructura general de los factores de la familia CRP que, habitualmente, contienen un módulo sensor en la mitad N-terminal de la proteína que transmite una señal conformacional cuando unen moléculas como el cAMP (CRP) o el 2-oxoglutarato (NtcA), o detectan la concentración de moléculas como O₂ (FNR), CO (CooA), o NO (Dnr, Nnr), permitiendo que la proteína se una a secuencias específicas en promotores concretos, provocando generalmente su inducción, aunque también puedan actuar como represores en algunos de ellos (Korner y col., 2003). En este sentido, es interesante reseñar que, los sitios de unión de AMPc pertenecientes a la estructura de CRP, se conservan en el modelado hecho con DnrT sobre la estructura “molde” de CRP por el Dr. P. Gómez–Puertas (figura 48A), por lo que no podemos descartar una posible interacción de DnrT con alguna molécula suficientemente común como para permitir la generación de una forma constitutivamente activa al ser expresada en *E. coli*.

Una de la observaciones principales de este trabajo fue que la unión de DnrT a su sitio específico en el promotor *Pnrc*, centrado alrededor de la posición -43, daba como resultado el reclutamiento dependiente de SigA (σ^A) de la RNAPh de *T. thermophilus* (thRNAPh) y el

consiguiente inicio de la transcripción en ensayos *in vitro* llevados a cabo a temperaturas próximas a las fisiológicas (figuras 29 y 30). Estos resultados implican la existencia de interacciones específicas entre DnrT y la thRNAPh similares a aquellas descritas entre las regiones AR1 y AR2 de la proteína CRP y la subunidad alfa de la RNAP de *E. coli* y entre la región AR3 y el dominio C-terminal de σ^{70} sobre los promotores tipo II (Busby y Ebricht, 1999; Lawson y col., 2004) (ver figura 22). Para tratar de definir interacciones potencialmente equivalentes entre DnrT y la thRNAPh, se identificaron cada una de dichas regiones equivalentes en el modelo de DnrT (figura 48A) y se obtuvo un modelo “automático” (sin refinamiento manual) de la interacción entre la región AR3 y la estructura de σ^A en la estructura de la thRNAPh interaccionando con el DNA (PDB 1SMY) (Artsimovitch y col., 2004). En ésta (figura 48B), los residuos R63 y K64 de DnrT mantienen interacciones polares poco habituales con los grupos fosfato del esqueleto del DNA lo cual explica la fuerza y estabilidad de las interacciones DnrT-DNA a las altas temperaturas fisiológicas.

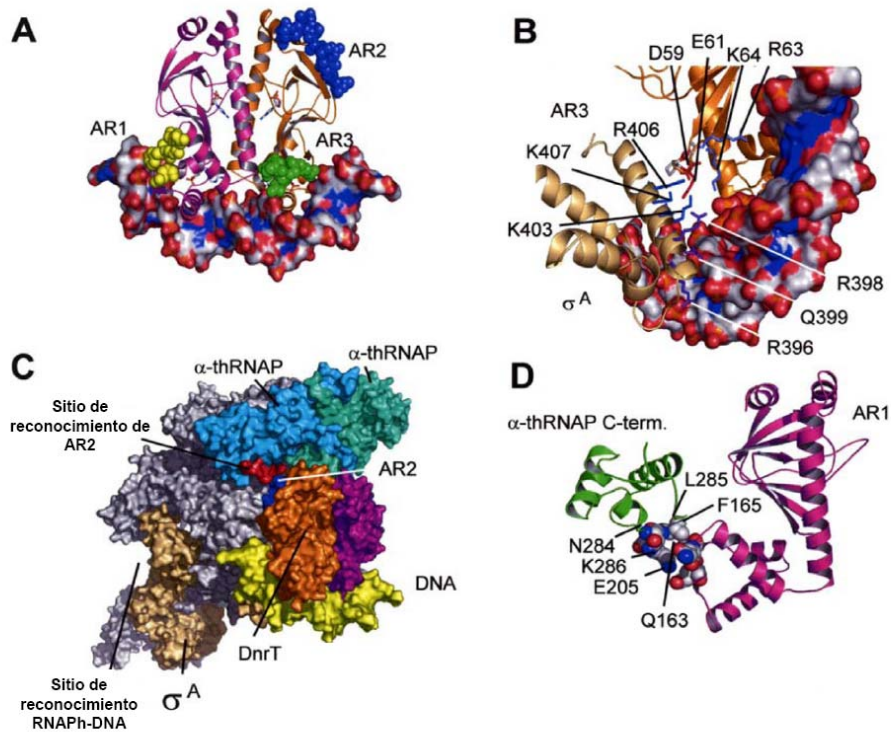


Figura 48. Modelado estructural de DnrT y su interacción con la thRNAP. **A)** Estructura dimérica propuesta para DnrT interactuando con una molécula de DNA, representada en colores acordes a sus propiedades electrostáticas. Los átomos correspondientes a las áreas de las regiones de activación AR1 (amarillo), AR2 (azul) y AR3 (verde) están representados como esferas. El modelo muestra la localización de una larga hélice de dimerización entre ambos monómeros, así como un motivo de hélice-giro-hélice (HTH) en contacto con el surco mayor del DNA. **B)** Detalle de la interacción AR3- σ^A -DNA. Se muestra como los residuos R63 y K64 (varillas azules) del dominio AR3 mantienen interacciones electrostáticas con las cargas del DNA. Las cadenas ácidas de los residuos D59 y E61 (rojo) apuntan a los residuos con carga positiva K403, R406, y K407 de la subunidad sA. Los residuos R396, y R398 parecen interactuar con los fosfatos de la superficie del DNA. **C)** Detalle de la interacción de DnrT con la thRNAPh. Tanto las proteínas como el DNA están representados como superficies atómicas. Se destaca el sitio de reconocimiento entre la subunidad α -thRNAPh y de la región AR2 de DnrT. **D)** Modelo de interacción del dominio C-terminal de la α -thRNAP (lazo verde) con DnrT a través de su región AR1. Los átomos de los residuos que contactan en ambas proteínas están representados como esferas. Se ha eliminado la representación del DNA para simplificar y clarificar la imagen.

Por otra parte, los residuos básicos de σ^A , K403, R406, y K407, interactúan con los residuos ácidos accesibles de la región AR3 de DnrT (D59, E61), mientras que los residuos R396 y R398 de σ^A permanecen próximos a los fosfatos del esqueleto de DNA, lo cual sugiere un incremento en los puntos de interacción entre DnrT y la thRNAP en esta área.

Además, este modelo aporta una explicación estructural para el contacto de la región AR2 del DnrT con su sitio de unión en el dominio N-terminal de la α -thRNAP (figura 48C). El modelo igualmente predice que los residuos AAQRRL del DnrT (posiciones 23-28) y ER (posiciones 107-108) constituyen la región AR2, y los residuos GKHGIKDR (posiciones 154 a 161) conforman los sitios complementarios de interacción en α -thRNAP. Aunque el dominio C-terminal de la α -thRNAP no está resuelto en la estructura de la thRNAP, ha sido posible modelar dicha interacción usando el cristal de CRP unida al dominio C-terminal de la α -ecoRNAP (estructura 1LB2, (Benoff y col., 2002)). El modelo de la interacción equivalente apoya la existencia de interacciones complementarias de carácter polar e hidrofóbico entre los residuos localizados en la región AR1 del DnrT y aquellos complementarios en la región de la subunidad α de la thRNAP (figura 48D).

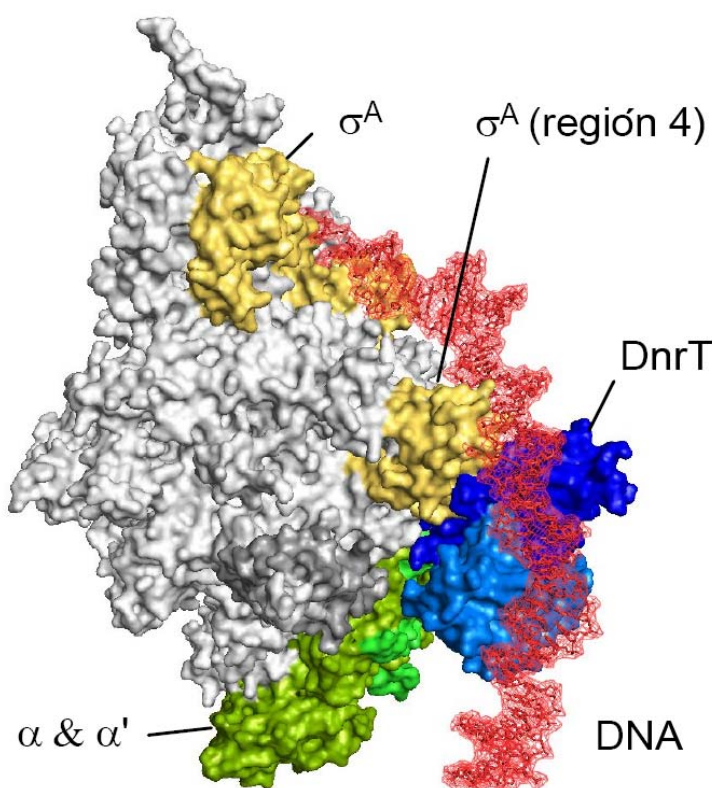


Figura 49. Modelo general de interacción DnrT-thRNAP en complejo de promotor abierto. Las proteínas son representadas como superficies atómicas, destacando las posiciones de las subunidades α y α' (verde) y σ^A (amarillo) del complejo de la thRNAP. Los dos monómeros proximal y distal de DnrT se muestran en azul oscuro y claro respectivamente. Se propone en rojo la posición y curvatura del DNA así como el detalle de los contactos entre el DnrT y la subunidad σ^A (región 4) de la thRNAP

El modelo refinado para el complejo DnrT-thRNAP mostrado en la figura 49 fue generado sobreimponiendo las trayectorias de los DNAs de las estructuras 1T0X (Artsimovitch y col., 2004), 1KU7 (Campbell y col., 2002), y del modelo de DNA unido al dímero de DnrT, manteniendo todos los contactos de σ^A descritos para el reconocimiento de la región -35 (Campbell y col., 2002). El

modelo obtenido es completamente compatible con el anteriormente propuesto para la localización del DNA en el modelo de promotor abierto propuesto por Lawson y cols., (Lawson y col., 2004) y por Artsimovitch y cols., (Artsimovitch y col., 2004). La especificidad de estas interacciones explica la ausencia de transcripción cuando la thRNAPc constituye la holoenzima con el factor sigma-E (figura 30).

En un trabajo en colaboración con el laboratorio de Dr. Welte, se está tratando de obtener cristales de DnrT unido a *Pnrc* de calidad suficiente como para obtener una estructura que nos permita contrastar algunas de las predicciones de interacción aquí comentadas. De momento se dispone de cristales de baja resolución en la zona de interacción con DNA, aparentemente más flexible que el resto, por lo que se han construido y expresado formas truncadas de DnrT para proceder a cristalizar en ausencia de DNA.

El modelo descrito apoya completamente nuestros datos de reclutamiento por DnrT de la thRNAPh para activar la transcripción del operón *nrc*. Sin embargo, no disponemos de datos equivalentes respecto a la interacción de DnrT con *Pnar* y *Pdnr*, puesto que todos los intentos de obtener transcripción *in vitro* resultaron infructuosos incluso en presencia de DnrS. La comparación de las secuencias de estos promotores con la de la región protegida por DnrT en *Pnrc* (figura 28) no permitió deducir similitudes claras entre posibles sitios específicos de unión. En este sentido, se sabe de la necesidad de unión de hasta tres proteínas (FNR, varias copias de NarL fosforilado y IHF) en el promotor del operón que codifica la nitrato reductasa A en *E.coli*, para conseguir su activación *in vitro* (Schroder y col., 1993). Por ello, no sería de extrañar el encontrar un requerimiento de factores adicionales para la activación transcripcional del promotor *Pnar* de *T. thermophilus*.

En relación con esta complejidad, nuestros resultados, además de indicarnos que DnrS es requerida para la activación transcripcional de *Pnar*, apoyan la existencia de algún tipo de interacción DnrT-DnrS, tanto sobre en el promotor *Pnar*, como en solución. Esto se deduce tanto de los ensayos de doble híbrido bacteriano que indican la existencia de tales interacciones, reforzadas en presencia de un tercer plásmido portador del *Pnar* (figura 32D), como del efecto de interferencia que genera la expresión constitutiva de la proteína mutante DnrT SR/AL en la inducción de NarG por nitrato y anoxia en la cepa silvestre (figura 24). La explicación más fácil a esta interferencia sería que la proteína DnrT mutante compite con la silvestre por la interacción con DnrS: Debido a las altas concentraciones de DnrT SR, gran parte del factor DnrS se encontraría "secuestrado" y tan sólo un pequeño porcentaje podría participar en la activación transcripcional de *Pnar* y *Pdnr*.

El efecto de la mutación en la única cisteína (C₁₅₁) presente en DnrT sobre la expresión de *Pnar* y *Pdnr* resulta especialmente interesante. Esta cisteína se encuentra en el modelo de DnrT apuntando hacia el exterior del dímero, por lo que no es previsible que intervenga en la dimerización de la proteína, aunque podría afectar a la unión a DNA por su proximidad relativa al motivo HTH. Nuestros datos indican al respecto que una modificación de esta cisteína con

yodoacetamida provoca un aumento en la concentración de DnrT necesaria para la activación transcripcional de *Pnrc* (figura 32), aunque la expresión constitutiva *in vivo* de mutantes C/S o C/A complementa la expresión de *Pnrc* y de la nitrato reductasa (Tabla 32C) a los mismos niveles que la proteína silvestre (no mostrado). Sin embargo, cuando se efectuaron sustituciones alélicas con estos mutantes, la expresión de *Pdnr* y *Pnar* se vió mucho más afectada que la de *Pnrc*, indicando que o bien la pérdida de afinidad por los sitios de unión en estos promotores es mucho mayor que la observada en *Pnrc*, o que esta cisteína está de alguna forma implicada en la interacción con DnrS. En este sentido, esperamos que futuros experimentos de doble híbrido con estos mutantes puedan despejar esta duda

Por otro lado, la transcripción desde *Pdnr* presenta algunas diferencias con respecto a la observada desde *Pnar*, al margen de la necesidad de ambos reguladores para su activación. En este promotor, el nitrato es menos relevante una vez que ambos reguladores son expresados constitutivamente (figura 25). Según esto, es posible que la respiración de nitrato siga un modelo de inducción secuencial, en el cual, en primer término actuaría sobre *Pdnr* un regulador o reguladores desconocidos en respuesta a nitrato u otros óxidos de nitrógeno en el caso de cepas desnitrificantes, necesario para incrementar los niveles de expresión basal de los reguladores DnrS y DnrT, tal y como sugieren los resultados mostrados en la figura 25. A continuación, o en paralelo, el descenso de la concentración de oxígeno estabilizaría a DnrS en su conformación activa permitiendo la autoamplificación de las concentraciones celulares de ambos reguladores en este ambiente anóxico y la acción específica de cada uno de ellos sobre los promotores correspondientes. Ni en la secuencia del elemento NCE ni en el genoma de las cepas secuenciadas de *T. thermophilus* hemos podido identificar homólogos a los sensores de nitrato de tipo NarX, por lo que es posible que en este organismo su detección dependa de un sistema aún no conocido, al igual que ocurre en *Paracoccus* (Wood y col., 2001). En este sentido, nuestras sospechas se centran en las fases abiertas de lectura OrfA y OrfB localizadas en el extremo 3' del operón *nar* y que sabemos que intervienen en la regulación de *Pdnr*.

NCE controla la ruta de desnitrificación en T. thermophilus

El modelo de inducción anteriormente expuesto, ha de hacerse extensivo a la detección de óxidos de nitrógeno intermediarios en desnitrificación en las cepas PRQ-16 y PRQ-25, cuya capacidad para utilizarlos como aceptores de electrones depende también de los factores DnrS y DnrT (Tabla3). En estas cepas, el promotor *Pdnr* no se induce solo por nitrato (como en NAR1) sino también por nitrito y NO (SNP) (figuras 36 y 37), implicando la existencia de mecanismos sobreimpuestos sensores de estos óxido y de reguladores que actúan junto a DnrS y DnrT en su inducción. Al igual que ocurre con el sensor de nitrato, ni en el NCE ni en el genoma de los *T. thermophilus* secuenciados hemos podido detectar potenciales sensores de NO.

A falta de la identificación del sistema sensor de óxidos de nitrógeno, nuestros datos muestran la necesidad de DnrS y DnrT para la expresión de las reductasas de la ruta de

desnitrificación. Esto se dedujo de la incapacidad de los mutantes *dnrT* y *dnrS* en comparación con el crecimiento disminuído de los mutante *nrc* para crecer con estos aceptores (figura 38 y 39). Dado que Nrc no es por tanto imprescindible para el crecimiento por desnitrificación, y por extensión de lo que ocurre en el crecimiento con nitrato, nuestra conclusión es que tanto DnrT como DnrS son requeridos para la expresión de las reductasas terminales, posiblemente contribuyendo ambos a la activación directa de los promotores de los operones *nir*, *nor*, y *nos* (figura 50). La confirmación definitiva tendrá que esperar a la disponibilidad de las secuencias de las cepas PRQ-16 y PRQ-25 o al menos de las reductasas terminales de la ruta de desnitrificación.

DnrT como represor

Además de su ya mencionado papel como activador de los promotores *Pnar*, *Pnrc* y *Pdnr* (figura 50) del elemento NCE, una de las observaciones más llamativas de los resultados del capítulo 2 fue la capacidad de DnrT para reprimir el promotor *Pnqo* que controla la expresión de la NDH-I aeróbica de *T. thermophilus* (figura 50). Esta represión fue observada *in vivo* e *in vitro* pero para este último se necesitó una cantidad superior de DnrT (figura 31) a la requerida para la activación de *Pnrc* (figura 30), sugiriendo que los niveles celulares de Nqo disminuyen una vez que existe suficiente Nrc activo en membrana, permitiendo una sustitución progresiva de las cadenas respiratorias. Aunque por ser un descubrimiento mas reciente no lo hemos confirmado *in vitro*, nuestros datos muestran que DnrT reprime también la expresión del complejo bc₁ además de la de Nqo, por lo que es el regulador responsable de la sustitución de de la mayor parte (o de toda si se confirmase su implicación en la represión de la citocromo oxidasa ba₃) la cadena respiratoria en la transición hacia condiciones desnitrificantes.

Este reemplazamiento de Nqo por Nrc es aparentemente contradictorio en términos energéticos, dado que la similitud anteriormente comentada con las SQR sugiere que Nrc no bombea protones durante la reducción de las quinonas, aunque, al igual que Nqo, sea inhibida por rotenona. De hecho, en mesófilos como *E. coli*, el complejo Nuo (homólogo a Nqo) se induce durante el crecimiento anaeróbico para compensar la pérdida energética que implica emplear nitrato en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones, mientras que Ndh, la NDH-II no translocadora de protones, es expresada en condiciones aeróbicas, cuando las células no precisan de aportes energéticos altos (Unden y Bongaerts, 1997). Resulta un curioso paralelismo con DnrT que esta sustitución de enzimas respiratorios en *E.coli* ocurra bajo el control de FNR.

Por tanto, es más probable que haya sido la eficiencia en la transferencia de electrones entre los complejos Nrc y Nar (y entre los complejos aeróbicos) la que haya rentabilizado la selección de DnrT como represor de *Pnqo* y *Pfbc* para la sustitución completa de la cadena respiratoria en condiciones desnitrificantes, que la posible ganancia energética que implicaría usar la NDH-Nqo con Nar como aceptor. De hecho, la detección de interacciones Nrc-Nar apunta en esta dirección (figura 45), y existen antecedentes en la bibliografía que han descrito la formación de supracomplejos respiratorios (“respirasomas”) en bacteria (Megehee y col., 2006) y en levadura

(Cruciat y col., 2000). Alternativamente, se podría considerar a DnrT como una herramienta del elemento NCE, desarrollado para asegurar su integridad y selección tras transferencia horizontal: la represión de Nqo convertiría a *T. thermophilus* energéticamente dependiente de la presencia de NCE.

El origen de NCE

Aunque existen interpretaciones evolutivas alternativas que lo sitúan como un intermedio evolutivo entre Gram positivos y Proteobacterias (Gupta, 1998; Hartmann y col., 1989), está más extendida la idea de que el género *Thermus* pertenece a una de las ramas filogenéticas más antiguas de la evolución bacteriana en base a las comparaciones de RNA 16S y de otros relojes moleculares. Comparaciones similares de las secuencias de las principales subunidades de Nar y Nrc apuntan en la misma dirección. Así, tal y como describe Philippot L. (Philippot, 2005) la NarG de *T. thermophilus* se situaría en la base de los árboles filogenéticos. Igualmente, nosotros hemos comparado NrcN, NrcF y NrcD con NDHs tipo-II, subunidades B de SQRs, y ferredoxinas de diversos orígenes, respectivamente, encontrando que en todos los casos las proteínas Nrc se sitúan cerca de la raíz en los árboles filogenéticos generados (anexo II). Por tanto, nuestra conclusión es que el elemento NCE es de origen tan antiguo como el propio género *Thermus*. Por otro lado, el contenido en GC del elemento es similar al presente en el genoma de *Thermus*, lo que sugiere el posible origen de NCE en una cepa relacionada con este género.

Esta probable antigüedad del elemento NCE contrasta de alguna forma con el alto grado de conservación hallado entre los NCE de cepas aisladas de puntos muy diversos y cuyo RNA 16 muestra diferencias significativas (B y PRQ-25), y por el contrario, con las diferencias observadas en secuencias del NCE en cepas muy agrupadas filogenéticamente (VG-7, HN1-11 y B) (M.S. da Costa, datos no publicados). La probable explicación a esto tendría que ver con la naturaleza transferible del elemento que actuaría como fuerza homogeneizadora entre cepas distintas que estuvieron en contacto en algún momento, permitiendo sin embargo su divergencia como consecuencia de algún tipo de aislamiento genético, que podría estar relacionado con la acumulación de mutaciones que afectarían a su capacidad de transferencia. Aunque el desconocimiento de los genes necesarios para la transferencia no nos permite confirmar esta hipótesis, el hecho de haber encontrado pseudogenes en el NCE de la estirpe NAR1 (un posible transportador de Fe^{2+} junto al operón *dnr*, y varios otros corriente abajo de *orfB*), y de encontrar cepas con una nitrato reductasa no funcional (HN1-11), indica que tales mutaciones son algo frecuente, y refuerzan la posibilidad de la existencia de otras mutaciones que afectarían a la transferencia horizontal y provocarían el mencionado aislamiento genético. En este sentido, es de destacar la existencia de sistemas de respiración de nitrato en algunas cepas como Fiji3A1 y VG7 aparentemente muy divergentes con respecto al NCE. Por tanto, creemos que las cepas que disponen de secuencias de NCE con una alta similitud son el resultado de un proceso de selección

reciente dirigido por el propio elemento conjugativo, mientras que la divergencia podría ser la consecuencia de secuencias NCE afectadas por mutaciones primarias en el sistema de conjugación.

En cualquier caso, la presencia en un elemento genético movilizable de los operones que codifican los genes estructurales de la respiración anaeróbica en *T. thermophilus*, junto con sus reguladores transcripcionales Dnr, es un excelente ejemplo de reclutamiento funcional en una isla respiratoria y explica porqué a menudo la adaptación a ambientes cambiantes no requiere necesariamente de un largo proceso evolutivo sino tan solo de la transferencia horizontal oportuna (figura 50).

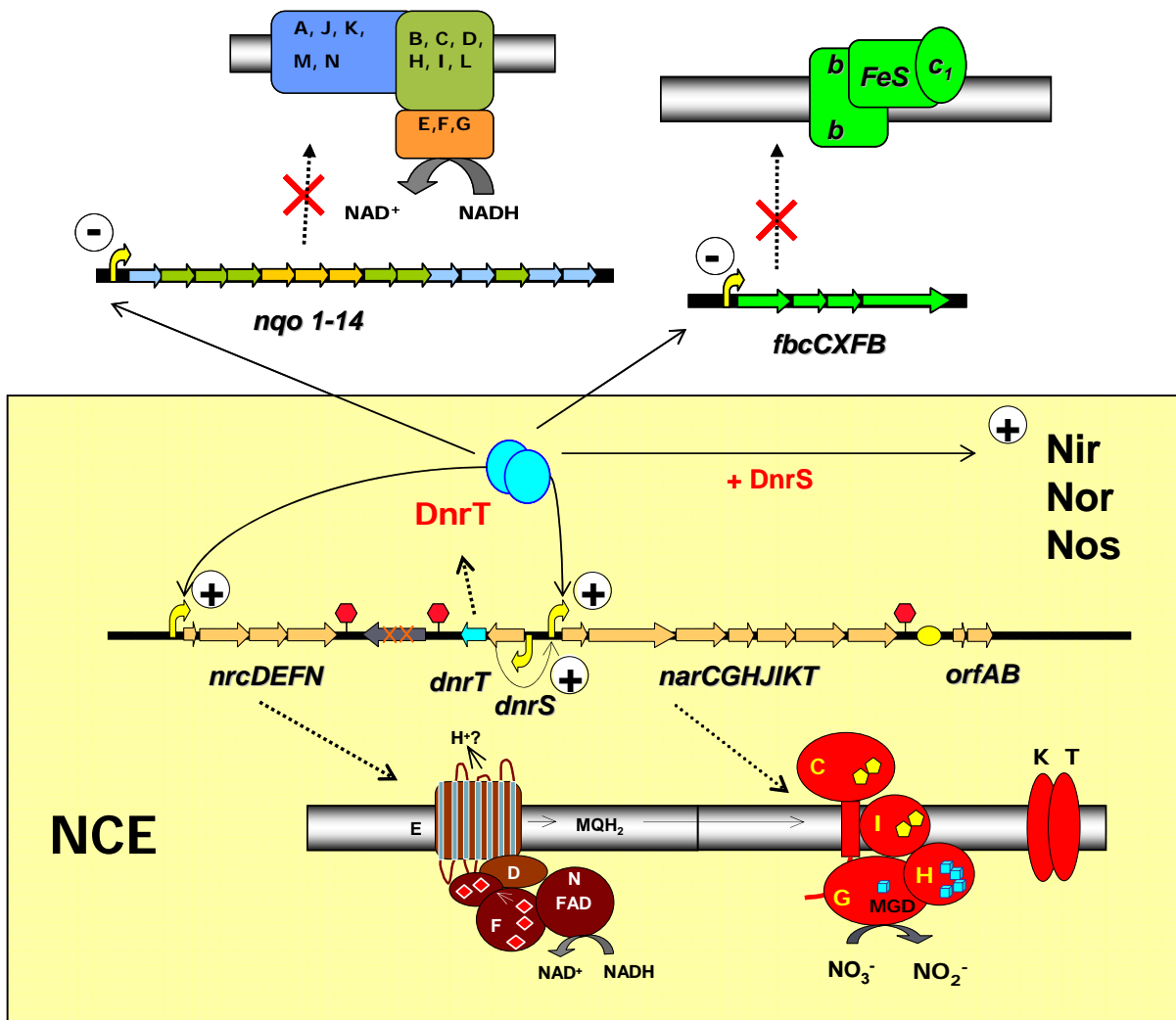


Figura 50. Esquema general de la regulación del metabolismo respiratorio en cepas desnitrificantes de *T. thermophilus*.

6. CONCLUSIONES

De la realización del presente trabajo de Tesis doctoral se han obtenidos las siguientes conclusiones:

1. Además del operón *narCGHJIKT*, el elemento conjugativo de la respiración de nitrato NCE codifica los agrupamientos *nrcDEFN* y *dnrST*, que se expresan como operones inducibles por anoxia y nitrato.

2. El operón *nrcDEFN* codifica un nuevo tipo de NDH respiratoria dedicada a la respiración de nitrato. Sus subunidades NrcD, NrcE, NrcF y NrcD forman un heterotetrámero anclado a membrana a través de NrcE, con el cual interaccionan los otros tres componentes. El complejo Nrc sustituye a la NDH aeróbica (Nqo) durante el crecimiento anaeróbico con nitrato.

3. El operón *dnr* codifica dos activadores transcripcionales de los operones del elemento NCE. DnrS participa en la activación transcripcional del operón *nar* y *dnr* mediante un mecanismo de pérdida de estabilidad y actividad como consecuencia del incremento de la presión parcial de oxígeno. Por su parte DnrT es una proteína dimérica que regula globalmente el metabolismo respiratorio de *Thermus*, siendo necesaria para la activación de todos los operones del NCE y responsable de la represión del operón *nqo*.

4. DnrT es el único regulador necesario para la expresión del operón *nrc*, uniéndose a su promotor en una zona centrada alrededor de la posición -43 y reclutando la RNA polimerasa con el resultado final de la iniciación de la transcripción. Esta capacidad de activación de *nrc* es independiente de las señales externas, las cuales son meros estímulos necesarios para su expresión y no para su activación post-traducciona.

5. Los aminoácidos SR conservados en el dominio de unión a DNA de DnrT son esenciales para la unión a DNA, la consiguiente activación de los promotores del NCE y la represión de *nqo*. La única cisteína de DnrT es también esencial para la activación de los promotores *dnr* y *nar*, efecto que no es tan patente para *nrc in vivo*.

6. La respiración de nitrato se encuentra extendida entre distintas cepas de *T. thermophilus*, incluyendo algunas con capacidad desnitrificante completa como PRQ16 y PRQ25.

7. El complejo Nrc es el principal donador de electrones hacia las reductasas Nar, Nir, Nor y Nos de la ruta de desnitrificación en las cepas PRQ16 y PRQ25. Los reguladores DnrT y DnrS son responsables de esta inducción al ser a su vez expresados en respuesta a todos los óxidos de nitrógeno de la denitrificación.

8. La nitrato reductasa es inducida por los óxidos de nitrógeno de la desnitrificación en las cepas PRQ16 y PRQ25, sustituyendo aparentemente al complejo bc_1 , cuya expresión es reprimida en estas condiciones. En esta transferencia, el grupo hemo c N-terminal (H1) de NarC es indispensable para la transmisión de electrones hacia la Nir, la Nor y la Nos, mientras que el hemo c C-terminal (H2) es más importante para la llegada de electrones hasta NarG.

9. NrcE interacciona con NarI, y éste con NarC, indicando la existencia de supracomplejos respiratorios que probablemente favorezcan las velocidades de transmisión electrónica y con ello la eficiencia termodinámica del proceso. La utilización de una forma estable de la GFP revela la posible concentración de estos complejos en zonas concretas de la membrana.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ackrell, B.A. (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* **466**: 1-5.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amin, D.N., Taylor, B.L., and Johnson, M.S. (2006) Topology and boundaries of the aerotaxis receptor *Aer* in the *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 894-901.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1991) Anaerobically induced expression of the nitrite reductase cytochrome c-551 operon from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **280**: 351-353.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994) Structure and ANR-dependent transcription of the *nr* genes for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1286-1291.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1995) Expression of the *nr* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett* **371**: 73-76.
- Arai, H., Kodama, T., and Igarashi, Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **25**: 1141-1148.
- Arai, H., Hayashi, M., Kuroi, A., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2005) Transcriptional regulation of the *hcyA* gene encoding the aerobic nitrite oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 3960-3968.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**: 458-459.
- Archer, C.D., and Elliott, T. (1995) Transcriptional control of the *nuo* operon which encodes the energy-conserving NADH dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**: 2335-2342.
- Artsmovitch, I., Pattan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassilyev, D.G. (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**: 293-310.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., and Brondsted, L. (1997) Effects of sigmaS and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hlyA* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *J Bacteriol* **179**: 2141-2146.
- Augier, V., Asso, M., Gugliarelli, B., Mori, C., Bertrand, P., Santini, C.L., Blasco, F., Chippaux, M., and Giordano, G. (1993a) Removal of the high-potential [4Fe-4S] center of the beta subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutated enzymes. *Biochemistry* **32**: 5099-5108.
- Augier, V., Gugliarelli, B., Asso, M., Bertrand, P., Frizon, C., Giordano, G., Chippaux, M., and Blasco, F. (1993b) Site-directed mutagenesis of conserved cysteine residues within the beta subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of the mutated enzymes. *Biochemistry* **32**: 2013-2023.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Babcock, G.T., and Wikstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**: 301-309.
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M., and van Spanning, R.J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioregenerative flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1046-1078.
- Balkwill, D.L., Kieft, T.L., Tsukuda, T., Kostandarithes, H.M., Onstott, T.C., Macnaughton, S., Bonwas, J., and Fredrickson, J.K. (2004) Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* **8**: 37-44.
- Barquera, B., Hellwig, P., Zhou, W., Morgan, J.E., Hase, C.C., Gosink, K.K., Nilges, M., Brueshoff, P.J., Roth, A., Lancaster, C.R., and Gennis, R.B. (2002) Purification and characterization of the recombinant Na(+)-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* **41**: 3781-3789.
- Beaumont, H.J., Lens, S.L., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., and van Spanning, R.J. (2004) Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcriptional repressor. *Mol Microbiol* **54**: 148-158.
- Bedzyk, L., Wang, T., and Ye, R.W. (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas sp.* strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J Bacteriol* **181**: 2892-2895.
- Beinert, H., and Kiley, P. (1996) Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters? *FEBS Lett* **382**: 218-219.
- Bell, A.I., Cole, J.A., and Busby, S.J. (1990) Molecular genetic analysis of an FNR-dependent anaerobically inducible *Escherichia coli* promoter. *Mol Microbiol* **4**: 1753-1763.
- Bennoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., Ebright, Y.W., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. *Science* **297**: 1562-1566.
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W., and Richardson, D.J. (1995a) Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* **1232**: 97-173.
- Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F., and Ferguson, S.J. (1995b) Sequence analysis of the mutants of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol Microbiol* **15**: 319-331.
- Bermudez, L.E., and Petrofsky, M. (1997) Regulation of the expression of *Mycobacterium avium* complex proteins differs according to the environment within host cells. *Immunol Cell Biol* **75**: 35-40.
- Berry, E.A., and Trumppower, B.L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome b1 and cytochrome c-a23 complexes. *J Biol Chem* **260**: 2458-2467.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., and Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome b complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005-1075.
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H., and Strynadka, N.C. (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Mol Biol* **10**: 681-687.
- Bertsova, Y.V., and Bogachev, A.V. (2004) The origin of the sodium-dependent NADH oxidase by the respiratory chain of *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett* **563**: 207-212.
- Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E., and Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 4075-4079.
- Bibikov, S.I., Barnes, L.A., Gltin, Y., and Parkinson, J.S. (2000) Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer *Aer* of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5830-5835.
- Blas-Galindo, E., Castaň, P., Lopez-Vinas, E., Mercedia, J., and Berenguer, J. (2007) Use of a Dominant *rpsL* Allele Conferring Streptomycin Dependence for Positive and Negative Selection in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5138-5145.
- Blasco, F., Iobbi, C., Giordano, G., Chippaux, M., and Bonnetoy, V. (1989) Nitrate reductase of *Escherichia coli*: the sequence of the second nitrate reductase of the *nar* operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer. *Mol Gen Genet* **218**: 249-256.
- Blasco, F., Iobbi, C., Raluchniak, J., Bonnetoy, V., and Chippaux, M. (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. *Mol Gen Genet* **222**: 104-111.
- Blasco, F., Nunzi, F., Pommer, J., Brasseur, R., Chippaux, M., and Giordano, G. (1992) Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 209-219.
- Blasco, F., Dos Santos, J.P., Magalon, A., Frizon, C., Gugliarelli, B., Santini, C.L., and Giordano, G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 435-447.
- Bodenmiller, D.M., and Spiro, S. (2006) The *yjeb* (*nsrY*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **188**: 974-981.
- Bogachev, A.V., Bertsova, Y.V., Barquera, B., and Verkhovskiy, M.I. (2001) Sodium-dependent steps in the redox reactions of the Na(+)-motive NADH:quinone oxidoreductase. *Biochemistry* **40**: 7318-7323.
- Bogachev, A.V., Vasyug, V., Ruge, E.K., Wikstrom, M., and Verkhovskiy, M.I. (2002) Spectral changes during reduction of the Na(+)-motive Ni(V) heme *b* of *Vibrio Harveyi*. *Biochim Biophys Acta* **1556**: 113-120.
- Bonnetoy, V., and Demoss, J.A. (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **58**: 289-297.
- Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H. (1991) The Bradyrhizobium japonicum anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. *J Biol Chem* **266**: 4872-4877.
- Bradbury, A.J., Gruer, M.J., Rudd, K.E., and Guest, J.R. (1996) The second acinetone (*acnS*) or *escN* gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142** (Pt 2): 389-400.
- Brekasis, D., and Paget, M.S. (2003) A novel sensor of NADH/NAD+ redox poise in *Streptomyces coelicolor*. *Embo J* **22**: 4856-4865.
- Briefley, C.L. (1978) Bacterial leaching. *CRC Crit Rev Microbiol* **6**: 207-208.
- Brittain, T., Blackmore, R., Greenwood, C., and Thomson, A.J. (1992) Bacterial nitrite-reducing enzymes. *Eur J Biochem* **209**: 793-802.
- Brock, T.D., and Freeze, H. (1998) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* **180**: 289-297.
- Brock, T.D. (1978a) Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer.
- Brock, T.D. (1978b) The genus *Thermus*. In *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Starr, M.P. (ed). New York Heidelberg Berlin: Springer-Verlag, pp. 72-91.
- Bronckij, T.H., Niland, N., Richardson, D.J., and Cole, J.A. (2004) NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing. *Biochem J* **379**: 47-55.
- Brondsted, L., and Atlung, T. (1996) Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cxp-appA*) operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 1556-1560.
- Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**: 11422-11431.
- Bruel, C., Brasseur, R., and Trumppower, B.L. (1996) Subunit 8 of the Saccharomyces cerevisiae cytochrome b1 complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr* **28**: 59-68.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catboxalate activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Buse, G., Hensel, S., and Fae, J.A. (1989) Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome c-subunit II fused protein in the cytochrome c1aa3 of *Thermus thermophilus*. How old is cytochrome oxidase? *Eur J Biochem* **181**: 261-268.
- Calhoun, M.W., and Gennis, R.B. (1993) Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 3013-3019.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J Bacteriol* **175**: 3020-3025.
- Campbell, E.A., Muzzi, O., Chienov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weiman, O., Trester-Zeditz, M.L., and Darst, S.A. (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* **9**: 527-539.
- Capaldi, R.A., Darley-Usmar, V., Fuller, S., and Millett, F. (1982) Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **138**: 1-7.
- Carroll, M.L., Roldan, M.D., Ferguson, S.J., Berks, B.C., and Richardson, D.J. (2002) Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC, the prototype connector between quinol/quinone and peniplasmic oxidoreductases. *Biochem J* **368**: 425-432.
- Castaň, P., Zafra, O., Moreno, R., de Pedro, M.A., Valles, C., Cava, F., Caro, E., Schwarz, H., and Berenguer, J. (2002) The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles* **6**: 225-232.
- Castillo, F., Dobao, M.M., Reyes, F., Blasco, R., Roldan, M.D., Gaviira, M., Caballero, F.J., Moreno-Vivian, C., and Martínez-Luque, M. (1996) Molecular and Regulatory Properties of the Nitrate Reducing Systems of *Rhodospirillum rubrum*. *Curr Microbiol* **33**: 341-346.
- Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M., and Higgins, D.G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *Embo J* **13**: 2516-2525.
- Castresana, J., and Moreira, D. (1999) Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms. *J Mol Evol* **49**: 453-460.
- Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., and Berenguer, J. (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **279**: 45369-45378.
- 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.
- Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahali, Z., Blas-Galindo, E., Gomez-Pueras, P., and Berenguer, J. (2007) Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element *NC2*. *Mol Microbiol* **64**: 630-646.
- Cecchini, G., Schroeder, M., and Maklashina, E. (2002) Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 140-157.
- Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T.M., and Iwata, S. (2003) Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* **546**: 31-38.
- Cole, S.T., Brosch, P., Harris, D., Gordon, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eigmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekalia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Deavin, K., Feltham, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, N., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins, M.D., Shah, H.N., and Minnikin, D.E. (1980) A note on the separation of natural mixtures of bacterial terpenoquinones using reverse phase thin-layer chromatography. *J Appl Bacteriol* **48**: 277-282.
- Comolli, J.C., and Donohue, T.J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* RoXR, a response regulator related to *Rhodospirillum rubrum* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* **45**: 755-768.
- Comolli, J.C., and Donohue, T.J. (2004) Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb3* cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**: 1193-1203.
- Cooper, M., Tavankar, G.R., and Williams, H.D. (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase *cydAB* operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol Microbiol* **25**: 605-615.
- Croal, L.R., Gralnick, J.A., Malasarn, D., and Newman, D.K. (2004) The genetics of cyanobacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 175-202.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome b1 and cytochrome c1 haem complexes associate to form a single supercomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 18093-18098.
- Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P. (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and independent regulatory mechanisms. *Embo J* **14**: 5084-5094.
- Cunningham, L., Gruer, M.J., and Guest, J.R. (1997) Transcriptional regulation of the acinetone genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 12): 3795-3805.
- Cuypers, H., and Zumft, W.G. (1993) Anaerobic control of denitrification in *Pseudomonas stutzeri* escapes mutagenesis of an *nrI*-like gene. *J Bacteriol* **175**: 7236-7246.
- Chang, L., Wei, L.L., Audia, J.P., Morton, R.A., and Schellhorn, H.E. (1999) Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Mol Microbiol* **34**: 756-766.
- Chen, S., Vojtechovsky, J., Parkinson, G.N., Ebright, R.H., and Berman, H.M. (2001) Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP-DNA complex: DNA binding specificity based on energetics of DNA kinking. *J Mol Biol* **314**: 63-74.
- Chiang, R.C., Cavichioni, R., and Gunsalus, R.P. (1992) Identification and characterization of *narQ*, a second nitrate sensor for nitrate-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 1913-1923.
- D'Autreaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor *NorR* senses nitric oxide. *Nature* **437**: 769-772.
- da Costa, M.S., Nobre, M.F., and Rainey, F. (2001) Gene *Thermus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 1: 404-414.
- Darroutzet, E., Cooley, J.W., and Daldal, F. (2004) The Cytochrome bc₁ Complex and its Homologue the b₆ f₀ Complex: Similarities and Differences. *Photosynth Res* **79**: 25-44.
- Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M., and Boquet, P.L. (1991) A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol Gen Genet* **229**: 341-352.
- de Boer, A.P., Reijnders, W.N., Kuenen, J.G., Stouthamer, A.H., and van Spanning, R.J. (1994) Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 111-127.
- de Grado, M., Castaň, P., and Berenguer, J. (1998) A high transformation efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**.
- DeGrado, M., Lasa, I., and J. B. (1998) Characterization of a plasmid ring for the extreme thermophile *Thermus* spp. *FEBS Microbiol Lett* **165**.
- DeGryse, E., Glansd, N., and Piersd, A. (1978) A comparison of an extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Arch Microbiol* **117**: 189-196.
- Delgado-Nixon, V.M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.A. (2000) Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* **39**: 2865-2891.
- Ding, H., and Dempsey, J.A. (2000) Direct measurement of quinol oxidation via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5146-5150.
- Drupal, N., and Sawers, G. (1995) Purification of *ArcA* and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. *Mol Microbiol* **16**: 597-607.
- Dubourdieu, M., and Deltos, J.A. (1992) The *rad* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**(3): 867-872.
- Duckina, N.V., Voronin, D.A., and Kiseleva, E.V. (2004) [Structural organization and distribution of symbiotic bacteria *Wolbachia* in early embryos and ovaries of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila* spp.]. *Microbiol Rev* **68**: 298-299.
- Eigmeier, K., Honore, N., Iuchi, S., Lin, E.C., and Cole, S.T. (1989) Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. *Mol Microbiol* **3**: 869-878.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77.
- Fadeeva, M.S., Yakovtseva, E.A., Belevich, G.A., Bertsova, Y.V., and Bogachev, A.V. (2007) Regulation of expression of Na(+)-translocating NADH:quinone oxidoreductase in *Vibrio Harveyi* and *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol*.
- Faraldo, M.M., Pedro, M.A.d., and Berenguer, J. (1992) Sequence of the S-layer gene of *Thermus thermophilus* HB8 and functionality of its promoter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 7458-7462.
- Fee, J.A., Kulla, D., Mather, M.W., and Yoshida, T. (1996) Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **853**: 153-185.
- Fee, J.A., Chen, Y., Todaro, T.R., Bren, K.L., Patel, K.M., Hill, M.G., Gomez-Moran, E., Loehr, T.M., Ai, J., Thony-Meyer, L., Williams, P.A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D.E. (2000) Integrity of *Thermus thermophilus* cytochrome c552 synthesized by *Escherichia coli* cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, *cmhCDEFGH*: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein. *Protein Sci* **9**: 2074-2084.
- Fernandez-Herrero, L.A., Badet-Denisot, M.A., Badet, B., and Berenguer, J. (1995a) *glnS* of *Thermus thermophilus* HB8: an essential gene for cell-wall synthesis identified immediately upstream of the S-layer gene. *Mol Microbiol* **17**: 1-12.
- Fernandez-Herrero, L.A., Otabarria, G., Caston, J.R., Lasa, I., and Berenguer, J. (1995b) Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **177**: 5460-5466.
- Fischer, H.M. (1984) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-368.
- Flory, J.E., and Donohue, T.J. (1965) Organization and expression of the *Rhodospirillum rubrum* *cyfG* operon. *J Bacteriol* **177**: 4311-4320.
- Fowler, T.A., Holmes, P.R., and Crundwell, F.K. (1999) Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2987-2993.
- Friedrich, A., Hartsch, T., and Averhoff, B. (2001) Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Thiobacillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 2987-2993.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ackrell, B.A. (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* **466**: 1-5.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amin, D.N., Taylor, B.L., and Johnson, M.S. (2006) Topology and boundaries of the aerotaxis receptor Aer in the membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 894-901.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1991) Anaerobically induced expression of the nitrite reductase cytochrome c-551 operon from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **280**: 351-353.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994) Structure and ANR-dependent transcription of the nir genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1286-1291.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1995) Expression of the nir and nor genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett* **371**: 73-76.
- Arai, H., Kodama, T., and Igarashi, Y. (1997) Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **25**: 1141-1148.
- Arai, H., Hayashi, M., Kuroi, A., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2005) Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 3960-3968.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**: 458-459.
- Archer, C.D., and Elliott, T. (1995) Transcriptional control of the nuo operon which encodes the energy-conserving NADH dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**: 2335-2342.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassilyev, D.G. (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**: 299-310.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., and Brondsted, L. (1997) Effects of sigmaS and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli*hya and cbdAB-appA operons in response to carbon and phosphate starvation. *J Bacteriol* **179**: 2141-2146.
- Augier, V., Asso, M., Guigliarelli, B., More, C., Bertrand, P., Santini, C.L., Blasco, F., Chippaux, M., and Giordano, G. (1993a) Removal of the high-potential [4Fe-4S] center of the beta-subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutated enzymes. *Biochemistry* **32**: 5099-5108.
- Augier, V., Guigliarelli, B., Asso, M., Bertrand, P., Frixon, C., Giordano, G., Chippaux, M., and Blasco, F. (1993b) Site-directed mutagenesis of conserved cysteine residues within the beta subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of the mutated enzymes. *Biochemistry* **32**: 2013-2023.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Babcock, G.T., and Wikstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**: 301-309.

- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M., and van Spanning, R.J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1046-1078.
- Balkwill, D.L., Kieft, T.L., Tsukuda, T., Kostandarithes, H.M., Onstott, T.C., Macnaughton, S., Bownas, J., and Fredrickson, J.K. (2004) Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* **8**: 37-44.
- Barquera, B., Hellwig, P., Zhou, W., Morgan, J.E., Hase, C.C., Gosink, K.K., Nilges, M., Bruesehoff, P.J., Roth, A., Lancaster, C.R., and Gennis, R.B. (2002) Purification and characterization of the recombinant Na(+)-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* **41**: 3781-3789.
- Beaumont, H.J., Lens, S.I., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., and van Spanning, R.J. (2004) Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol Microbiol* **54**: 148-158.
- Bedzyk, L., Wang, T., and Ye, R.W. (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J Bacteriol* **181**: 2802-2806.
- Beinert, H., and Kiley, P. (1996) Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters? *FEBS Lett* **382**: 218-219; discussion 220-211.
- Bell, A.I., Cole, J.A., and Busby, S.J. (1990) Molecular genetic analysis of an FNR-dependent anaerobically inducible *Escherichia coli* promoter. *Mol Microbiol* **4**: 1753-1763.
- Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., Ebright, Y.W., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD-DNA complex. *Science* **297**: 1562-1566.
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W., and Richardson, D.J. (1995a) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* **1232**: 97-173.
- Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F., and Ferguson, S.J. (1995b) Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol Microbiol* **15**: 319-331.
- Bermudez, L.E., and Petrofsky, M. (1997) Regulation of the expression of *Mycobacterium avium* complex proteins differs according to the environment within host cells. *Immunol Cell Biol* **75**: 35-40.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J Biol Chem* **260**: 2458-2467.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., and Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005-1075.
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H., and Strynadka, N.C. (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Biol* **10**: 681-687.
- Bertsova, Y.V., and Bogachev, A.V. (2004) The origin of the sodium-dependent NADH oxidation by the respiratory chain of *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett* **563**: 207-212.
- Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E., and Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 4075-4079.

- Bibikov, S.I., Barnes, L.A., Gitin, Y., and Parkinson, J.S. (2000) Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5830-5835.
- Blas-Galindo, E., Cava, F., Lopez-Vinas, E., Mendieta, J., and Berenguer, J. (2007) Use of a Dominant rpsL Allele Conferring Streptomycin Dependence for Positive and Negative Selection in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5138-5145.
- Blasco, F., Iobbi, C., Giordano, G., Chippaux, M., and 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. *Mol Gen Genet* **218**: 249-256.
- Blasco, F., Iobbi, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V., and Chippaux, M. (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the narGHJI operon. *Mol Gen Genet* **222**: 104-111.
- Blasco, F., Nunzi, F., Pommier, J., Brasseur, R., Chippaux, M., and Giordano, G. (1992) Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 209-219.
- Blasco, F., Dos Santos, J.P., Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C.L., and Giordano, G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 435-447.
- Bodenmiller, D.M., and Spiro, S. (2006) The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **188**: 874-881.
- Bogachev, A.V., Bertsova, Y.V., Barquera, B., and Verkhovsky, M.I. (2001) Sodium-dependent steps in the redox reactions of the Na⁺-motive NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **40**: 7318-7323.
- Bogachev, A.V., Bertsova, Y.V., Ruuge, E.K., Wikstrom, M., and Verkhovsky, M.I. (2002) Kinetics of the spectral changes during reduction of the Na⁺-motive NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochim Biophys Acta* **1556**: 113-120.
- Bonnefoy, V., and Demoss, J.A. (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 47-56.
- Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H. (1991) The *Bradyrhizobium japonicum* cycM gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. *J Bacteriol* **173**: 6766-6772.
- Boumans, H., Grivell, L.A., and Berden, J.A. (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem* **273**: 4872-4877.
- Bradbury, A.J., Gruer, M.J., Rudd, K.E., and Guest, J.R. (1996) The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142 (Pt 2)**: 389-400.
- Brekasis, D., and Paget, M.S. (2003) A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo J* **22**: 4856-4865.
- Brierley, C.L. (1978) Bacterial leaching. *CRC Crit Rev Microbiol* **6**: 207-206l.
- Brittain, T., Blackmore, R., Greenwood, C., and Thomson, A.J. (1992) Bacterial nitrite-reducing enzymes. *Eur J Biochem* **209**: 793-802.
- Brock, T.D., and Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* **98**: 289-297.
- Brock, T.D. (1978a) Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. **Springer**.

- Brock, T.D. (1978b) The genus *Thermus*. In *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Starr, M.P. (ed). New York Heidelberg Berlin: Springer-Verlag, pp. 72-91.
- Brondijk, T.H., Nilavongse, A., Filenko, N., Richardson, D.J., and Cole, J.A. (2004) NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing. *Biochem J* **379**: 47-55.
- Brondsted, L., and Atlung, T. (1996) Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (cpx-appA) operon and the appY gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 1556-1564.
- Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**: 11422-11431.
- Bruel, C., Brasseur, R., and Trumpower, B.L. (1996) Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr* **28**: 59-68.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Buse, G., Hensel, S., and Fee, J.A. (1989) Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome c-subunit II fused protein in the cytochrome 'c1aa3' of *Thermus thermophilus*. How old is cytochrome oxidase? *Eur J Biochem* **181**: 261-268.
- Calhoun, M.W., and Gennis, R.B. (1993) Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 3013-3019.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J Bacteriol* **175**: 3020-3025.
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., and Darst, S.A. (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* **9**: 527-539.
- Capaldi, R.A., Darley-Usmar, V., Fuller, S., and Millett, F. (1982) Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **138**: 1-7.
- Cartron, M.L., Roldan, M.D., Ferguson, S.J., Berks, B.C., and Richardson, D.J. (2002) Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol/quinone and periplasmic oxido-reductases. *Biochem J* **368**: 425-432.
- Castan, P., Zafra, O., Moreno, R., de Pedro, M.A., Valles, C., Cava, F., Caro, E., Schwarz, H., and Berenguer, J. (2002) The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles* **6**: 225-232.
- Castillo, F., Dobao, M.M., Reyes, F., Blasco, R., Roldan, M.D., Gavira, M., Caballero, F.J., Moreno-Vivian, C., and Martinez-Luque, M. (1996) Molecular and Regulatory Properties of the Nitrate Reducing Systems of *Rhodobacter*. *Curr Microbiol* **33**: 341-346.
- Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M., and Higgins, D.G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *Embo J* **13**: 2516-2525.
- Castresana, J., and Moreira, D. (1999) Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms. *J Mol Evol* **49**: 453-460.

- Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., and Berenguer, J. (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **279**: 45369-45378.
- 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.
- Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlaifi, 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.
- Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R.P., and Maklashina, E. (2002) Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 140-157.
- Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T.M., and Iwata, S. (2003) Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* **545**: 31-38.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins, M.D., Shah, H.N., and Minnikin, D.E. (1980) A note on the separation of natural mixtures of bacterial menaquinones using reverse phase thin-layer chromatography. *J Appl Bacteriol* **48**: 277-282.
- Comolli, J.C., and Donohue, T.J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* **45**: 755-768.
- Comolli, J.C., and Donohue, T.J. (2004) Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb3 cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**: 1193-1203.
- Cooper, M., Tavankar, G.R., and Williams, H.D. (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 1275-1284.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cotter, P.A., Melville, S.B., Albrecht, J.A., and Gunsalus, R.P. (1997) Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (cydAB) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol Microbiol* **25**: 605-615.
- Croal, L.R., Gralnick, J.A., Malasarn, D., and Newman, D.K. (2004) The genetics of geochemistry. *Annu Rev Genet* **38**: 175-202.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 18093-18098.
- Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P. (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *Embo J* **14**: 5984-5994.

- Cunningham, L., Gruer, M.J., and Guest, J.R. (1997) Transcriptional regulation of the aconitase genes (acnA and acnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 12): 3795-3805.
- Cuypers, H., and Zumft, W.G. (1993) Anaerobic control of denitrification in *Pseudomonas stutzeri* escapes mutagenesis of an *fnr*-like gene. *J Bacteriol* **175**: 7236-7246.
- Chang, L., Wei, L.I., Audia, J.P., Morton, R.A., and Schellhorn, H.E. (1999) Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Mol Microbiol* **34**: 756-766.
- Chen, S., Vojtechovsky, J., Parkinson, G.N., Ebright, R.H., and Berman, H.M. (2001) Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP-DNA complex: DNA binding specificity based on energetics of DNA kinking. *J Mol Biol* **314**: 63-74.
- Chiang, R.C., Cavicchioli, R., and Gunsalus, R.P. (1992) Identification and characterization of *narQ*, a second nitrate sensor for nitrate-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 1913-1923.
- D'Autreaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**: 769-772.
- da Costa, M.S., Nobre, M.F., and Rainey, F. (2001) Genus *Thermus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*: 404-414.
- Darrouzet, E., Cooley, J.W., and Daldal, F. (2004) The Cytochrome bc (1) Complex and its Homologue the b (6) f Complex: Similarities and Differences. *Photosynth Res* **79**: 25-44.
- Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M., and Boquet, P.L. (1991) A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol Gen Genet* **229**: 341-352.
- de Boer, A.P., Reijnders, W.N., Kuenen, J.G., Stouthamer, A.H., and van Spanning, R.J. (1994) Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 111-127.
- de Grado, M., Castán, P., and Berenguer, J. (1999) A high-transformation efficiency cloning vector for *Thermus*. *Plasmid* **42**.
- DeGrado, M., Lasa, I., and J., B. (1998) Characterization of a plasmid origin for the extreme thermophile *Thermus spp.* *FEMS Microbiol. Letters* **In press**.
- Degryse, E., Glansdorff, N., and Pierard, A. (1978) A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Arch Microbiol* **117**: 189-196.
- Delgado-Nixon, V.M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.A. (2000) Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* **39**: 2685-2691.
- Ding, H., and Dimple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5146-5150.
- Drapal, N., and Sawers, G. (1995) Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. *Mol Microbiol* **16**: 597-607.
- Dubourdieu, M., and DeMoss, J.A. (1992) The *narJ* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**(3): 867-872.
- Dudkina, N.V., Voronin, D.A., and Kiseleva, E.V. (2004) [Structural organization and distribution of symbiotic bacteria *Wolbachia* in early embryos and ovaries of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*]. *Tsitologija* **46**: 208-220.

- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3225-3229.
- Duffy, E.B., and Barquera, B. (2006) Membrane topology mapping of the Na⁺-pumping NADH: quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae* by PhoA-green fluorescent protein fusion analysis. *J Bacteriol* **188**: 8343-8351.
- Edwards, J.C., Johnson, M.S., and Taylor, B.L. (2006) Differentiation between electron transport sensing and proton motive force sensing by the Aer and Tsr receptors for aerotaxis. *Mol Microbiol* **62**: 823-837.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M., and Banfield, J.F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* **287**: 1796-1799.
- Eiglmeier, K., Honore, N., Iuchi, S., Lin, E.C., and Cole, S.T. (1989) Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. *Mol Microbiol* **3**: 869-878.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77.
- Fadeeva, M.S., Yakovtseva, E.A., Belevich, G.A., Bertsova, Y.V., and Bogachev, A.V. (2007) Regulation of expression of Na⁽⁺⁾-translocating NADH:quinone oxidoreductase genes in *Vibrio harveyi* and *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol*.
- Faraldo, M.M., Pedro, M.A.d., and Berenguer, J. (1992) Sequence of the S-layer gene of *Thermus thermophilus* HB8 and functionality of its promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7458-7462.
- Fee, J.A., Kuila, D., Mather, M.W., and Yoshida, T. (1986) Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **853**: 153-185.
- Fee, J.A., Chen, Y., Todaro, T.R., Bren, K.L., Patel, K.M., Hill, M.G., Gomez-Moran, E., Loehr, T.M., Ai, J., Thony-Meyer, L., Williams, P.A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D.E. (2000) Integrity of thermophilus cytochrome c552 synthesized by *Escherichia coli* cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, ccmABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein. *Protein Sci* **9**: 2074-2084.
- Fernandez-Herrero, L.A., Badet-Denisot, M.A., Badet, B., and Berenguer, J. (1995a) glmS of *Thermus thermophilus* HB8: an essential gene for cell-wall synthesis identified immediately upstream of the S-layer gene. *Mol Microbiol* **17**: 1-12.
- Fernandez-Herrero, L.A., Olabarria, G., Caston, J.R., Lasa, I., and Berenguer, J. (1995b) Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **177**: 5460-5466.
- Fischer, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352-386.
- Flory, J.E., and Donohue, T.J. (1995) Organization and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cycFG operon. *J Bacteriol* **177**: 4311-4320.
- Fowler, T.A., Holmes, P.R., and Crundwell, F.K. (1999) Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2987-2993.
- Friedrich, A., Hartsch, T., and Averhoff, B. (2001) Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Acinetobacter* sp. strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3140-3148.
- Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A., and 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.

- Friedrich, T., and Scheide, D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett* **479**: 1-5.
- Fulop, V., Moir, J.W., Ferguson, S.J., and Hajdu, J. (1993) Crystallization and preliminary crystallographic study of cytochrome cd1 nitrite reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *J Mol Biol* **232**: 1211-1212.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenberg, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., and Batut, J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.
- Galperin, M.Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552-567.
- Garcia-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R.B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* **176**: 5587-5600.
- Geng, H., Zhu, Y., Mullen, K., Zuber, C.S., and Nakano, M.M. (2007a) Characterization of ResDE-dependent *fnr* transcription in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 1745-1755.
- Geng, H., Zuber, P., and Nakano, M.M. (2007b) Regulation of Respiratory Genes by ResD-ResE Signal Transduction System in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **422**: 448-464.
- Gennis, R.B., and Ferguson-Miller, S. (1996) Protein structure: proton-pumping oxidases. *Curr Biol* **6**: 36-38.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E.C. (2001) Quinones as the redox signal for the *arc* two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-2316.
- Georgiou, C.D., Fang, H., and Gennis, R.B. (1987) Identification of the *cydC* locus required for expression of the functional form of the cytochrome d terminal oxidase complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 2107-2112.
- Gihring, T.M., and Banfield, J.F. (2001) Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 335-340.
- Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G., Perutz, M.F., Kiger, L., Marden, M.C., and Poyart, C. (1994) Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* **33**: 8067-8073.
- Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G., and Perutz, M.F. (1995) Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron. *Biochemistry* **34**: 232-236.
- Giuffre, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W.G., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14718-14723.
- Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., and Chan, M.K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15177-15182.
- Gonzalez, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D., and Moura, J.J. (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem* **100**: 1015-1023.

- Gostick, D.O., Green, J., Irvine, A.S., Gasson, M.J., and Guest, J.R. (1998) A novel regulatory switch mediated by the FNR-like protein of *Lactobacillus casei*. *Microbiology* **144** (Pt 3): 705-717.
- Grabbe, R., Klopprogge, K., and Schmitz, R.A. (2001) Fnr Is required for NifL-dependent oxygen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: 1385-1393.
- Grabbe, R., and Schmitz, R.A. (2003) Oxygen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. *Eur J Biochem* **270**: 1555-1566.
- Green, G.N., Fang, H., Lin, R.J., Newton, G., Mather, M., Georgiou, C.D., and Gennis, R.B. (1988) The nucleotide sequence of the *cyd* locus encoding the two subunits of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 13138-13143.
- Green, J., and Guest, J.R. (1994) Regulation of transcription at the *ndh* promoter of *Escherichia coli* by FNR and novel factors. *Mol Microbiol* **12**: 433-444.
- Green, J., and Paget, M.S. (2004) Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**: 954-966.
- Grigorieff, N. (1998) Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol* **277**: 1033-1046.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Gunsalus, R.P. (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol* **174**: 7069-7074.
- Gupta, R.S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1435-1491.
- Gupta, R.S. (2000) The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* **26**: 111-131.
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M., and Sato, T. (2006) Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 7062-7071.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning: a practical approach*. D. M. Glover. Oxford, IRL Press. Glover, D.M. (ed). Oxford: IRL Press, pp. 109-135.
- Hartig, E., and Zumft, W.G. (1999) Kinetics of *nirS* expression (cytochrome *cd1* nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. *J Bacteriol* **181**: 161-166.
- Hartmann, R.K., Wolters, B., Kroger, B., Shultze, S., Spetch, T., and Erdmann, V.A. (1989) Does *Thermus* represent another deep eubacterial branching? *Syst. Appl. Microbiol.* **11**: 243-249.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069.
- Hederstedt, L. (2002) Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 74-83.
- Hellwig, P., Soulimane, T., and Mantele, W. (2002) Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the *caa3* oxidase from *T. thermophilus*. *Eur J Biochem* **269**: 4830-4838.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk,

- H.P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H.J. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **22**: 547-553.
- Hensel, R., Zwickl, P., Fabry, S., Lang, J., and Palm, P. (1989) Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three urkingdoms: evolutionary implication. *Can J Microbiol* **35**: 81-85.
- Hidalgo, E., and Demple, B. (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *Embo J* **13**: 138-146.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., and Dixon, R. (1996) *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2143-2148.
- Hinchliffe, P., and Sazanov, L.A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**: 771-774.
- Hofmann, K., Bucher, P., and Bairoch, A. (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 215-219.
- Hon-Nami, K., and Oshima, T. (1977) Purification and some properties of cytochrome c-552 from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J Biochem (Tokyo)* **82**: 769-776.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E.E. (1996) Errors in protein structures. *Nature* **381**: 272.
- Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., and Mills, D.A. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu Rev Biochem* **75**: 165-187.
- Hou, S., Freitas, T., Larsen, R.W., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Yamamoto, A., Meleshkevitch, E.A., Zimmer, M., Ordal, G.W., and Alam, M. (2001) Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9353-9358.
- Huber, H., Wilharm, T., Huber, D., y col. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **15**: 340-351.
- Hudson, J., Morgan, H., and Daniel, R. (1989) Numerical classification of *Thermus* isolates globally distributed hot springs. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 250-256.
- Hunsicker-Wang, L.M., Heine, A., Chen, Y., Luna, E.P., Todaro, T., Zhang, Y.M., Williams, P.A., McRee, D.E., Hirst, J., Stout, C.D., and Fee, J.A. (2003) High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* **42**: 7303-7317.
- Hunsicker-Wang, L.M., Pacoma, R.L., Chen, Y., Fee, J.A., and Stout, C.D. (2005) A novel cryoprotection scheme for enhancing the diffraction of crystals of recombinant cytochrome ba3 oxidase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**: 340-343.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., and Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**: 669-684.
- Hutchings, M.I., Shearer, N., Wastell, S., van Spanning, R.J., and Spiro, S. (2000) Heterologous NNR-mediated nitric oxide signaling in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 6434-6439.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Irvine, A.S., and Guest, J.R. (1993) *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family. *Nucleic Acids Res* **21**: 753.

- Ishaque, M. (1992) Energy generation mechanisms in the in vitro-grown *Mycobacterium lepraemurium*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **60**: 61-70.
- Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T., and Lin, E.C. (1990) The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol* **4**: 715-727.
- Iuchi, S., and Lin, E.C. (1993) Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol* **9**: 9-15.
- Iuchi, S., and Weiner, L. (1996) Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. *J Biochem (Tokyo)* **120**: 1055-1063.
- Iwasaki, T., Matsuura, K., and Oshima, T. (1995) Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J Biol Chem* **270**: 30881-30892.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**: 660-669.
- Jayaraman, P.S., Gaston, K.L., Cole, J.A., and Busby, S.J. (1988) The *nirB* promoter of *Escherichia coli*: location of nucleotide sequences essential for regulation by oxygen, the FNR protein and nitrite. *Mol Microbiol* **2**: 527-530.
- Jenney, F.E., Jr., and Daldal, F. (1993) A novel membrane-associated c-type cytochrome, *cyt cy*, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Embo J* **12**: 1283-1292.
- Jenney, F.E., Jr., Prince, R.C., and Daldal, F. (1996) The membrane-bound cytochrome *cy* of *Rhodobacter capsulatus* can serve as an electron donor to the photosynthetic reaction of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* **1273**: 159-164.
- Kahn, D., J. Batut, M. L. Daveran, and J. Fourment. (1993) Structure and regulation of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium meliloti*. *New horizons in nitrogen fixation*. **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.**: 474.
- Kang, Y., Weber, K.D., Qiu, Y., Kiley, P.J., and Blattner, F.R. (2005) Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J Bacteriol* **187**: 1135-1160.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2000a) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin as a tool to analyze molecular interactions in a bacterial two-hybrid system. *Int J Med Microbiol* **290**: 441-445.
- Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2000b) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **328**: 59-73.
- Karimova, G., Ladant, D., and Ullmann, A. (2002) Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int J Med Microbiol* **292**: 17-25.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**: 2233-2243.
- Kasting, J.F. (1993) Earth's early atmosphere. *Science* **259**: 920-926.

- Keightley, J.A., Zimmermann, B.H., Mather, M.W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D.M., and Fee, J.A. (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome ba3 from *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem* **270**: 20345-20358.
- Keightley, J.A., Sanders, D., Todaro, T.R., Pastuszyn, A., and Fee, J.A. (1998) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cytochrome c552 gene from *Thermus thermophilus* HB8. Evidence for genetic linkage to an ATP-binding cassette protein and initial characterization of the *cycA* gene products. *J Biol Chem* **273**: 12006-12016.
- Kelly, M.J., Poole, R.K., Yates, M.G., and Kennedy, C. (1990) Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. *J Bacteriol* **172**: 6010-6019.
- Kieft, T.L., Fredrickson, J.K., Onstott, T.C., Gorby, Y.A., Kostandarthes, H.M., Bailey, T.J., Kennedy, D.W., Li, S.W., Plymale, A.E., Spadoni, C.M., and Gray, M.S. (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1214-1221.
- Kitts, C.L., and Ludwig, R.A. (1994) *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. *J Bacteriol* **176**: 886-895.
- Klinger, A., Schirawski, J., Glaser, P., and Unden, G. (1998) The *fnr* gene of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster. *J Bacteriol* **180**: 3483-3485.
- Kluyver, A.J. (1959) Some aspects of nitrate reduction **Albert Jan Kluyver: his life and work. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.**: 483-502.
- Koo, M.S., Lee, J.H., Rah, S.Y., Yeo, W.S., Lee, J.W., Lee, K.L., Koh, Y.S., Kang, S.O., and Roe, J.H. (2003) A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *Embo J* **22**: 2614-2622.
- Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N., and Furukawa, K. (1986) Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* **166**: 338-340.
- Krafft, T., Bokranz, M., Klimmek, O., Schroder, I., Fahrenholz, F., Kojro, E., and Kroger, A. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *psrA* gene of *Wolinella succinogenes* polysulphide reductase. *Eur J Biochem* **206**: 503-510.
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L., and Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**: 1009-1014.
- Laemmli, U., and Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4.I; DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Lancaster, C.R. (2001) Succinate:quinone oxidoreductases--what can we learn from *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase? *FEBS Lett* **504**: 133-141.
- Lancaster, C.R. (2002) Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 1-6.
- Lancaster, C.R., and Simon, J. (2002) Succinate:quinone oxidoreductases from epsilon-proteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 84-101.
- Lanciano, P., Vergnes, A., Grimaldi, S., Guigliarelli, B., and Magalon, A. (2007) Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein. *J Biol Chem* **282**: 17468-17474.
- Laptenko, O., and Borukhov, S. (2003) Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*. *Methods Enzymol* **371**: 219-232.

- Laptenko, O., Kim, S.S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., Kong, X.P., and Borukhov, S. (2006) pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *Embo J* **25**: 2131-2141.
- Lasa, I., Castón, J.R., Fernandez-Herrero, L.A., Pedro, M.A., and Berenguer, J. (1992) Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.* **11**: 1555-1564.
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10-20.
- Lennox, E.X. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190-206.
- Lin, J., Balabin, I.A., and Beratan, D.N. (2005) The nature of aqueous tunneling pathways between electron-transfer proteins. *Science* **310**: 1311-1313.
- Liu, X., and DeMoss, J.A. (1997) Characterization of NarJ, a system-specific chaperone required for nitrate reductase biogenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 24266-24271.
- Lorence, R.M., Yoshida, T., Findling, K.L., and Fee, J.A. (1981) Observations on the c-type cytochromes of the extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: cytochrome c552 is located in the periplasmic space. *Biochem Biophys Res Commun* **99**: 591-599.
- Lund, K., and DeMoss, J.A. (1976) Association-dissociation behavior and subunit structure of heat-released nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **251**: 2207-2216.
- Lynch, A.S., and Lin, E.C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**: 6238-6249.
- Lloyd, J.R. (2003) Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 411-425.
- Macedo-Ribeiro, S., Martins, B.M., Pereira, P.J., Buse, G., Huber, R., and Soulimane, T. (2001) New insights into the thermostability of bacterial ferredoxins: high-resolution crystal structure of the seven-iron ferredoxin from *Thermus thermophilus*. *J Biol Inorg Chem* **6**: 663-674.
- Macheroux, P., Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., Kim, S.O., Poole, R., and Dixon, R. (1998) Electron donation to the flavoprotein NifL, a redox-sensing transcriptional regulator. *Biochem J* **332 (Pt 2)**: 413-419.
- Magalon, A., Lemesle-Meunier, D., Rothery, R.A., Frixon, C., Weiner, J.H., and Blasco, F. (1997) Heme axial ligation by the highly conserved His residues in helix II of cytochrome b (NarI) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J Biol Chem* **272**: 25652-25658.
- Magalon, A., Asso, M., Guigliarelli, B., Rothery, R.A., Bertrand, P., Giordano, G., and Blasco, F. (1998a) Molybdenum cofactor properties and [Fe-S] cluster coordination in *Escherichia coli* nitrate reductase A: investigation by site-directed mutagenesis of the conserved his-50 residue in the NarG subunit. *Biochemistry* **37**: 7363-7370.
- Magalon, A., Rothery, R.A., Lemesle-Meunier, D., Frixon, C., Weiner, J.H., and Blasco, F. (1998b) Inhibitor binding within the NarI subunit (cytochrome bnr) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J Biol Chem* **273**: 10851-10856.
- Magalon, A., Frixon, C., Pommier, J., Giordano, G., and Blasco, F. (2002) In vivo interactions between gene products involved in the final stages of molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 48199-48204.

- Manaia, C.M., Hoste, B., Gutierrez, M.C., Gillis, M., Ventosa, A., Kersters, K., and da Costa, M.S. (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.
- Martinez, S.E., Beavo, J.A., and Hol, W.G. (2002) GAF Domains: Two-Billion-Year-Old Molecular Switches that Bind Cyclic Nucleotides. *Mol Interv* **2**: 317-323.
- Masui, R.e.a. *Thermus thermophilus* HB8, complete genome. **NCBI**.
- Mather, M.W., Springer, P., Hensel, S., Buse, G., and 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*. *J Biol Chem* **268**: 5395-5408.
- Meganathan, R. (1996) Respiration **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed.**: 642-656.
- Megehee, J.A., Hosler, J.P., and Lundrigan, M.D. (2006) Evidence for a cytochrome *bcc-aa3* interaction in the respiratory chain of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **152**: 823-829.
- Melo, A.M., Bandejas, T.M., and Teixeira, M. (2004) New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 603-616.
- Mesa, S., Bedmar, E.J., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H.M. (2003) Bradyrhizobium japonicum *NnrR*, a denitrification regulator, expands the *FixLJ-FixK2* regulatory cascade. *J Bacteriol* **185**: 3978-3982.
- Meyer, T.E. (1996) Evolution and classification of c-type cytochromes. **Cytochrome c. A multidisciplinary approach.**: 33-99.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minghetti, K.C., Goswitz, V.C., Gabriel, N.E., Hill, J.J., Barassi, C.A., Georgiou, C.D., Chan, S.I., and Gennis, R.B. (1992) Modified, large-scale purification of the cytochrome *o* complex (bo-type oxidase) of *Escherichia coli* yields a two heme/one copper terminal oxidase with high specific activity. *Biochemistry* **31**: 6917-6924.
- Mitchell, P. (1975a) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c1* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* **56**: 1-6.
- Mitchell, P. (1975b) The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* **59**: 137-139.
- Moller, C., and van Heerden, E. (2006) Isolation of a soluble and membrane-associated Fe(III) reductase from the thermophile, *Thermus scotoductus* (SA-01). *FEMS Microbiol Lett* **265**: 237-243.
- Mooser, D., Maneg, O., Corvey, C., Steiner, T., Malatesta, F., Karas, M., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2005) A four-subunit cytochrome *bc(1)* complex complements the respiratory chain of *Thermus thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* **1708**: 262-274.
- Mooser, D., Maneg, O., MacMillan, F., Malatesta, F., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2006) The menaquinol-oxidizing cytochrome *bc* complex from *Thermus thermophilus*: protein domains and subunits. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1084-1095.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., and 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.

- Moser, C.C., Keske, J.M., Warncke, K., Farid, R.S., and Dutton, P.L. (1992) Nature of biological electron transfer. *Nature* **355**: 796-802.
- Moshiri, F., Smith, E.G., Taormino, J.P., and Maier, R.J. (1991) Transcriptional regulation of cytochrome d in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. Evidence that up-regulation during N₂ fixation is independent of nifA but dependent on ntrA. *J Biol Chem* **266**: 23169-23174.
- Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L.A., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2004) Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 745-750.
- Munro, A.W., and Lindsay, J.G. (1996) Bacterial cytochromes P-450. *Mol Microbiol* **20**: 1115-1125.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H., and Hoshino, T. (2005) In vivo directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* **100**: 158-163.
- Nakano, M.M., Geng, H., Nakano, S., and Kobayashi, K. (2006) The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J Bacteriol* **188**: 5878-5887.
- Nealson, K.H., Belz, A., and McKee, B. (2002) Breathing metals as a way of life: geobiology in action. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 215-222.
- Neijssel, O.M., and Teixeira de Mattos, M.J. (1994) The energetics of bacterial growth: a reassessment. *Mol Microbiol* **13**: 172-182.
- Nicholls, P., and Soulimane, T. (2004) The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome ba₃ differs from classical aa₃ in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide. *Biochim Biophys Acta* **1655**: 381-387.
- Nishiyama, M., Kobashi, N., Tanaka, K., Takahashi, H., and Tanokura, M. (1999) Cloning and characterization in *Escherichia coli* of the gene encoding the principal sigma factor of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **172**: 179-186.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205-217.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., and Goldfarb, A. (1997) The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**: 33-41.
- Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Li, Z., and Demple, B. (1993) Negative autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein: a dampening mechanism for the soxRS redox stress response. *J Bacteriol* **175**: 7492-7494.
- Nunoshiba, T., DeRojas-Walker, T., Tannenbaum, S.R., and Demple, B. (1995) Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect Immun* **63**: 794-798.
- Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 186-206.
- 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.
- Oshima, M., and Imahori, K. (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese hot spa. *Int. J. System. Bacteriol.* **24**: 102-112.
- Oszczka, A., Moser, C.C., and Dutton, P.L. (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* **30**: 176-182.

- Otten, M.F., Stork, D.M., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., and Van Spanning, R.J. (2001) Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **268**: 2486-2497.
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., and Dutton, P.L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**: 47-52.
- Palmer, T., Santini, C.L., Iobbi-Nivol, C., Eaves, D.J., Boxer, D.H., and Giordano, G. (1996) Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 875-884.
- Park, H., Suquet, C., Satterlee, J.D., and Kang, C. (2004) Insights into signal transduction involving PAS domain oxygen-sensing heme proteins from the X-ray crystal structure of *Escherichia coli* Dos heme domain (Ec DosH). *Biochemistry* **43**: 2738-2746.
- Pask-Hughes, R.A., Mozaffary, H., and Shaw, N. (1977) Glycolipids in prokaryotic cells. *Biochem Soc Trans* **5**: 1675-1677.
- Pedelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79-88.
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W.J., and Berenguer, J. (2003) Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **31**: 6473-6480.
- Pettigrew, G.W., and G. R. Moore. (1987) Cytochromes c. Biological aspects. **Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.**
- Philippot, L. (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans* **33**: 200-204.
- Pichinoty, F., and d, O. (1961) [Influence of the culture conditions on the formation of nitrate reductase of *Aerobacter aerogenes*.]. *Biochim Biophys Acta* **48**: 218-220.
- Pino, C., Olmo-Mira, F., Cabello, P., Martinez-Luque, M., Castillo, F., Roldan, M.D., and Moreno-Vivian, C. (2006) The assimilatory nitrate reduction system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Biochem Soc Trans* **34**: 127-129.
- Pohlmann, A., Cramm, R., Schmelz, K., and Friedrich, B. (2000) A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. *Mol Microbiol* **38**: 626-638.
- Pollock, M.R. (1946) Adaptation of "nitratase" in washed suspensions of bacteria. *Br. J. Exp. Pathol* **27**: 419-432.
- Pomposiello, P.J., and Demple, B. (2001) Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol* **19**: 109-114.
- Poole, R.K., Salmon, I., and Chance, B. (1994) The high-spin cytochrome o' component of the cytochrome bo-type quinol oxidase in membranes from *Escherichia coli*: formation of the primary oxygenated species at low temperatures is characterized by a slow 'on' rate and low dissociation constant. *Microbiology* **140 (Pt 5)**: 1027-1034.
- Poole, R.K., and Hill, S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*--roles of the terminal oxidases. *Biosci Rep* **17**: 303-317.
- Poole, R.K., and Cook, G.M. (2000) Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Adv Microb Physiol* **43**: 165-224.

- Potter, L.C., Millington, P.D., Thomas, G.H., Rothery, R.A., Giordano, G., and Cole, J.A. (2000) Novel growth characteristics and high rates of nitrate reduction of an *Escherichia coli* strain, LCB2048, that expresses only a periplasmic nitrate reductase. *FEMS Microbiol Lett* **185**: 51-57.
- Preisig, O., Anthamatten, D., and Hennecke, H. (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3309-3313.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R.B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**: 3936-3942.
- Puustinen, A., and Wikstrom, M. (1991) The heme groups of cytochrome o from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6122-6126.
- Quastel, J.H., Stephenson, M., and Whetham, M.D. (1925) Some Reactions of Resting Bacteria in Relation to Anaerobic Growth. *Biochem J* **19**: 304-317.
- Rajagopalan, K.V., and Johnson, J.L. (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* **267**: 10199-10202.
- Ramirez-Arcos, S., Moreno, R., Zafra, O., Castan, P., Valles, C., and Berenguer, J. (2000) Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol* **182**: 2179-2183.
- Ramírez-Arcos, S. (1997) Caracterización y transferencia horizontal de una nitrato reductasa de *Thermus thermophilus* HB8 **Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid**.
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L.A., and Berenguer, J. (1998a) A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochem. Biophys. Acta* **1396**: 215-227.
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L.A., Marín, I., and Berenguer, J. (1998b) Anaerobic Growth, a Property Horizontally Transferred by an Hfr-Like Mechanism among Extreme Thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**: 3137-3143.
- Rawlings, D.E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**: 65-91.
- Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (1997) The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10541-10546.
- Rebbapragada, A. (1999) Quorum family. *Trends Microbiol* **7**: 143.
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.O., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (2000) PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**: 806-816.
- Rich, P.R. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim Biophys Acta* **768**: 53-79.
- Richardson, D.J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146**: 551-571.
- Ritchie, D.W., and Kemp, G.J. (2000) Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins* **39**: 178-194.

- Robles, E.F., Sanchez, C., Bonnard, N., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. (2006) The Bradyrhizobium japonicum napEDABC genes are controlled by the FixLJ-FixK(2)-NnrR regulatory cascade. *Biochem Soc Trans* **34**: 108-110.
- Rock, J.D., Thomson, M.J., Read, R.C., and Moir, J.W. (2007) Regulation of denitrification genes in Neisseria meningitidis by nitric oxide and the repressor NsrR. *J Bacteriol* **189**: 1138-1144.
- Rodionov, D.A., Dubchak, I.L., Arkin, A.P., Alm, E.J., and Gelfand, M.S. (2005) Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput Biol* **1**: e55.
- Rosenberg, A.H., Lada, B.N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J.J., and Studier, W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- Rost, B. (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Methods Enzymol* **266**: 525-539.
- Rothery, R.A., and Weiner, J.H. (1998) Interaction of a menaquinol binding site with the [3Fe-4S] cluster of Escherichia coli fumarate reductase. *Eur J Biochem* **254**: 588-595.
- Rothery, R.A., Blasco, F., Magalon, A., and Weiner, J.H. (2001) The diheme cytochrome b subunit (NarI) of Escherichia coli nitrate reductase A (NarGHI): structure, function, and interaction with quinols. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 273-283.
- Sakamoto, J., Handa, Y., and Sone, N. (1997) A novel cytochrome b(o/a)3-type oxidase from Bacillus stearothermophilus catalyzes cytochrome c-551 oxidation. *J Biochem (Tokyo)* **122**: 764-771.
- Salmon, K., Hung, S.P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W., and Gunsalus, R.P. (2003) Global gene expression profiling in Escherichia coli K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* **278**: 29837-29855.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, C., and Schneider, R. (1991) Database of Homology-Derived Structures and the Structural Meaning of Sequence Alignment. *Proteins* **9**: 56-68.
- Saraste, M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* **23**: 331-366.
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lubben, M., and van der Oost, J. (1991) The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans* **19**: 608-612.
- Saraste, M. (1994) Structure and evolution of cytochrome oxidase. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 285-287.
- Saraste, M., and Castresana, J. (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett* **341**: 1-4.
- Sardiwal, S., Kendall, S.L., Movahedzadeh, F., Rison, S.C., Stoker, N.G., and Djordjevic, S. (2005) A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible Mycobacterium tuberculosis DosS protein binds haem. *J Mol Biol* **353**: 929-936.
- Sargent, F. (2007) Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. *Microbiology* **153**: 633-651.
- Sasakura, Y., Kanda, K., Yoshimura-Suzuki, T., Matsui, T., Fukuzono, S., Han, M.H., and Shimizu, T. (2004) Protein microarray system for detecting protein-protein interactions using an anti-His-tag antibody and fluorescence scanning: effects of the heme redox state on protein-protein interactions of heme-regulated phosphodiesterase from Escherichia coli. *Anal Chem* **76**: 6521-6527.

- Sato, R. (1956) The cytochrome system and microbial reduction of nitrate **A symposium on inorganic nitrogen metabolism: function of metallo-flavoproteins. In W. D. McElroy and B. Glass (ed.):** 163-175.
- Sawers, G. (1999) The aerobic/anaerobic interface. *Curr Opin Microbiol* **2**: 181-187.
- Sawers, R.G. (1991) Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1469-1481.
- Sazanov, L.A., and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**: 1430-1436.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **281**: 15370-15375.
- Schafer, G., Anemuller, S., and Moll, R. (2002) Archaeal complex II: 'classical' and 'non-classical' succinate:quinone reductases with unusual features. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 57-73.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**: 1777-1783.
- Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**: 154-159.
- Schmitz, R.A., He, L., and Kustu, S. (1996) Iron is required to relieve inhibitory effects on NifL on transcriptional activation by NifA in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**: 4679-4687.
- Schroder, I., Darie, S., and Gunsalus, R.P. (1993) Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (narGHJI) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J Biol Chem* **268**: 771-774.
- Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., and Kiley, P.J. (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9009-9014.
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J. (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14895-14900.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381-3385.
- Sears, H.J., Sawers, G., Berks, B.C., Ferguson, S.J., and Richardson, D.J. (2000) Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (napEDABC) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology* **146 (Pt 11)**: 2977-2985.
- Silvestrini, M.C., Galeotti, C.L., Gervais, M., Schinina, E., Barra, D., Bossa, F., and Brunori, M. (1989) Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: sequence of the gene and the protein. *FEBS Lett* **254**: 33-38.
- Skulachev, V.P. (1989) Bacterial Na⁺ energetics. *FEBS Lett* **250**: 106-114.
- Snell, F.D., and Snell, C.T. (1949) *Colorimetric Methods of Analysis*. New York: Van Nostrand.
- Soballe, B., and Poole, R.K. (1999) Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* **145 (Pt 8)**: 1817-1830.
- Sone, N., Sekimachi, M., and Kutoh, E. (1987) Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc1 complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *J Biol Chem* **262**: 15386-15391.

- Sone, N., Tsuchiya, N., Inoue, M., and Noguchi, S. (1996) Bacillus stearothermophilus qcr operon encoding rieske FeS protein, cytochrome b6, and a novel-type cytochrome c1 of quinol-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* **271**: 12457-12462.
- Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D. and Sensen, C. (eds). Menlo Park: AAAI Press, pp. 175-182.
- Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M.E., Huber, R., and Buse, G. (1997) Cytochrome-c552 from Thermus thermophilus: a functional and crystallographic investigation. *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 572-576.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., and Than, M.E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from thermus thermophilus. *Embo J* **19**: 1766-1776.
- Spector, M.P., Garcia del Portillo, F., Bearson, S.M., Mahmud, A., Magut, M., Finlay, B.B., Dougan, G., Foster, J.W., and Pallen, M.J. (1999) The rpoS-dependent starvation-stress response locus stiA encodes a nitrate reductase (narZYWV) required for carbon-starvation-inducible thermotolerance and acid tolerance in Salmonella typhimurium. *Microbiology* **145 (Pt 11)**: 3035-3045.
- Spiro, S., and Guest, J.R. (1987) Regulation and over-expression of the fnr gene of Escherichia coli. *J Gen Microbiol* **133**: 3279-3288.
- Spiro, S., Roberts, R.E., and Guest, J.R. (1989) FNR-dependent repression of the ndh gene of Escherichia coli and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol Microbiol* **3**: 601-608.
- Spiro, S., and Guest, J.R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 399-428.
- Spiro, S. (1994) The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 23-36.
- Spiro, S. (2007) Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 193-211.
- Steuber, J. (2001) The Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase (NDH I) from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli: implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 179-186.
- Stewart, V. (1988) Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol Rev* **52**: 190-232.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **9**: 425-434.
- Stickland, L.H. (1931) The reduction of nitrates by Bact. coli. *Biochem J* **25**: 1543-1554.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schagger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in Paracoccus denitrificans. *J Biol Chem* **279**: 5000-5007.
- Sturr, M.G., Krulwich, T.A., and Hicks, D.B. (1996) Purification of a cytochrome bd terminal oxidase encoded by the Escherichia coli app locus from a delta cyo delta cyd strain complemented by genes from Bacillus firmus OF4. *J Bacteriol* **178**: 1742-1749.
- Takahashi, H., S. Taniguchi, and F. Egami. (1957) Nitrate reduction in aerobic bacteria and that in Escherichia coli coupled to phosphorylation. *J. Biochem. (Tokyo)* **43**: 223-233.

- Tanaka, T., Kawano, N., and Oshima, T. (1981) Cloning of 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of an extreme thermophile and partial purification of the gene product. *J Biochem (Tokyo)* **89**: 677-682.
- Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J.R., and Green, J. (2002) Escherichia coli aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of sodA expression. *Microbiology* **148**: 1027-1037.
- Tang, Y., Guest, J.R., Artymiuk, P.J., Read, R.C., and Green, J. (2004) Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Mol Microbiol* **51**: 1817-1826.
- Taniguchi, S., R. Sato, and F. Egami. (1956) The enzymatic mechanisms of nitrate and nitrite metabolism in bacteria. **A symposium on inorganic nitrogen metabolism: function of metallo-flavoproteins.:** 87-108.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- Taylor, B.L., Rebbapragada, A., and Johnson, M.S. (2001) The FAD-PAS domain as a sensor for behavioral responses in Escherichia coli. *Antioxid Redox Signal* **3**: 867-879.
- Taylor, B.L. (2004) An alternative strategy for adaptation in bacterial behavior. *J Bacteriol* **186**: 3671-3673.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Thony-Meyer, L., Stax, D., and Hennecke, H. (1989) An unusual gene cluster for the cytochrome bc1 complex in Bradyrhizobium japonicum and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* **57**: 683-697.
- Thony-Meyer, L., James, P., and Hennecke, H. (1991) From one gene to two proteins: the biogenesis of cytochromes b and c1 in Bradyrhizobium japonicum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5001-5005.
- Thony-Meyer, L. (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 337-376.
- Tisdale, H.D., Wharton, D.C., and Green, D.E. (1963) Studies of the electron transfer system. LIII. The isolation and composition of succinic-coenzyme Q reductase and succinic-cytochrome c reductase. *Arch Biochem Biophys* **102**: 114-119.
- Tokuda, H., and Unemoto, T. (1982) Characterization of the respiration-dependent Na⁺ pump in the marine bacterium Vibrio alginolyticus. *J Biol Chem* **257**: 10007-10014.
- Tokuda, H., and Unemoto, T. (1984) Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of Vibrio alginolyticus. *J Biol Chem* **259**: 7785-7790.
- Tosques, I.E., Shi, J., and Shapleigh, J.P. (1996) Cloning and characterization of nnrR, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in Rhodobacter sphaeroides 2.4.3. *J Bacteriol* **178**: 4958-4964.
- Tosques, I.E., Kwiatkowski, A.V., Shi, J., and Shapleigh, J.P. (1997) Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in Rhodobacter sphaeroides 2.4.3. *J Bacteriol* **179**: 1090-1095.
- Towe, K.M. (1994) Earth's early atmosphere: Constraints and opportunities for early evolution. **Early life on Earth.:** 36-47.
- Trageser, M., and Uden, G. (1989) Role of cysteine residues and of metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **3**: 593-599.
- Trumpower, B.L. (1990) Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* **54**: 101-129.

- Trumpower, B.L., and Gennis, R.B. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem* **63**: 675-716.
- Tseng, C.P., Albrecht, J., and Gunsalus, R.P. (1996) Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 1094-1098.
- Tucker, N.P., D'Autreaux, B., Spiro, S., and Dixon, R. (2006) Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem Soc Trans* **34**: 191-194.
- Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c552 and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem* **231**: 259-265.
- Tyson, K.L., Bell, A.I., Cole, J.A., and Busby, S.J. (1993) Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli* nirB promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol Microbiol* **7**: 151-157.
- Uden, G., Trageser, M., and Duchene, A. (1990) Effect of positive redox potentials (greater than +400 mV) on the expression of anaerobic respiratory enzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**: 315-319.
- Uden, G., and Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217-234.
- Uden, G., and Schirawski, J. (1997) The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. *Mol Microbiol* **25**: 205-210.
- Vakser, I.A. (1995) Protein docking for low-resolution structures. *Protein Eng* **8**: 371-377.
- van Amsterdam, I.M., Ubbink, M., Einsle, O., Messerschmidt, A., Merli, A., Cavazzini, D., Rossi, G.L., and Canters, G.W. (2002) Dramatic modulation of electron transfer in protein complexes by crosslinking. *Nat Struct Biol* **9**: 48-52.
- van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E.R., Dijkhuizen, L., and Meijer, W.G. (1998) The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J Bacteriol* **180**: 1411-1417.
- Van Spanning, R.J., De Boer, A.P., Reijnders, W.N., Spiro, S., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H., and Van der Oost, J. (1995) Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. *FEBS Lett* **360**: 151-154.
- Van Spanning, R.J., De Boer, A.P., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H., and Van Der Oost, J. (1997) FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **23**: 893-907.
- Vassilyeva, M.N., Lee, J., Sekine, S.I., Laptenko, O., Kuramitsu, S., Shibata, T., Inoue, Y., Borukhov, S., Vassilyev, D.G., and Yokoyama, S. (2002) Purification, crystallization and initial crystallographic analysis of RNA polymerase holoenzyme from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1497-1500.
- Vasudevan, S.G., Armarego, W.L., Shaw, D.C., Lilley, P.E., Dixon, N.E., and Poole, R.K. (1991) Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **226**: 49-58.

- Vazquez-Tello, A., Castan, P., Moreno, R., Smith, J.M., Berenguer, J., and Cedergren, R. (2002) Efficient trans-cleavage by the *Schistosoma mansoni* SMalph1 hammerhead ribozyme in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nucleic Acids Res* **30**: 1606-1612.
- Vergnes, A., Pommier, J., Toci, R., Blasco, F., Giordano, G and Magalon, A (2006) NarJ Chaperone Binds on Two Distinct Sites of the Aponitrate Reductase of *Escherichia coli* to Coordinate Molybdenum Cofactor Insertion and Assembly*. *JBC* **281**: 2170-2176.
- Verhoeven, W. (1956a) Some remarks on nitrate and nitrite metabolism in microorganisms **A symposium on inorganic nitrogen metabolism: function of metallo-flavoproteins**: 61-86.
- Verhoeven, W. (1956b) Studies on true dissimilatory nitrate reduction. V. Nitric oxide production and consumption by micro-organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **22**: 385-406.
- Viera, J., and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Volkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A., and Stetter, K.O. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2918-2926.
- Vollack, K.U., Hartig, E., Korner, H., and Zumft, W.G. (1999) Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol Microbiol* **31**: 1681-1694.
- Vollack, K.U., and Zumft, W.G. (2001) Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **183**: 2516-2526.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**: 52-56, 29.
- Walker, J.E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys* **25**: 253-324.
- Walker, M.S., and DeMoss, J.A. (1991) Promoter sequence requirements for Fnr-dependent activation of transcription of the narGHJI operon. *Mol Microbiol* **5**: 353-360.
- Way, S.S., Sallustio, S., Magliozzo, R.S., and Goldberg, M.B. (1999) Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome bd expression on *Shigella flexneri* virulence. *J Bacteriol* **181**: 1229-1237.
- 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.
- Weiss, H., and Friedrich, T. (1991) Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone reductase (complex I). *J Bioenerg Biomembr* **23**: 743-754.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., and Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem* **197**: 563-576.
- Williams, C.H., Stillman, T.J., Barynin, V.V., Sedelnikova, S.E., Tang, Y., Green, J., Guest, J.R., and Artymiuk, P.J. (2002) *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition. *Nat Struct Biol* **9**: 447-452.
- Wissenbach, U., Kroger, A., and Uden, G. (1990) The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **154**: 60-66.
- Wissenbach, U., Ternes, D., and Uden, G. (1992) An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. *Arch Microbiol* **158**: 68-73.

- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S.J., Richardson, D.J., and Moir, J.W. (2001) Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. *J Bacteriol* **183**: 3606-3613.
- Wu, G., Delgado, M.J., Vargas, C., Davies, A.E., Poole, R.K., and Downie, J.A. (1996) The cytochrome bc1 complex but not CycM is necessary for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **142 (Pt 12)**: 3381-3388.
- Wu, J., Dunham, W.R., and Weiss, B. (1995) Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 10323-10327.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**: 60-66.
- Yagi, T. (1993) The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* **1141**: 1-17.
- Yagi, T., Yano, T., and Matsuno-Yagi, A. (1993) Characteristics of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* as revealed by biochemical, biophysical, and molecular biological approaches. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 339-345.
- Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S., and Matsuno-Yagi, A. (1998) Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 125-133.
- Yano, T., Chu, S.S., Sled, V.D., Ohnishi, T., and Yagi, T. (1997) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. Complete DNA sequence of the gene cluster and thermostable properties of the expressed NQO2 subunit. *J Biol Chem* **272**: 4201-4211.
- Ye, R.W., Fries, M.R., Bezborodnikov, S.G., Averill, B.A., and 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. *Appl Environ Microbiol* **59**: 250-254.
- Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. (2000) Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* **182**: 4458-4465.
- Yoshimura, T., Sagami, I., Sasakura, Y., and Shimizu, T. (2003) Relationships between heme incorporation, tetramer formation, and catalysis of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*: a study of deletion and site-directed mutants. *J Biol Chem* **278**: 53105-53111.
- Yu, C.A., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Zhang, L., Kachurin, A.M., and Yu, L. (1998) Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 151-158.
- Yu, J., Hederstedt, L., and Piggot, P.J. (1995) The cytochrome bc complex (menaquinone:cytochrome c reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. *J Bacteriol* **177**: 6751-6760.
- Zafra, O., Ramirez, S., Castan, P., Moreno, R., Cava, F., Valles, C., Caro, E., and Berenguer, J. (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.
- Zafra, O. (2004) Implicación de un citocromo c en la biosíntesis de la nitrato reductasa respiratoria de *Thermus thermophilus*. **Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.**
- Zafra, O., Cava, F., Blasco, F., Magalon, A., and Berenguer, J. (2005) Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **187**: 3990-3996.

- Zhang, W., and Phillips, G.N., Jr. (2003) Structure of the oxygen sensor in *Bacillus subtilis*: signal transduction of chemotaxis by control of symmetry. *Structure* **11**: 1097-1110.
- Zhang, X., and DeMoss, J.A. (1996) Structure modification induced in the narG promoter by binding of integration host factor and NARL-P. *J Bacteriol* **178**: 3971-3973.
- Zhou, W., Bertsova, Y.V., Feng, B., Tsatsos, P., Verkhovskaya, M.L., Gennis, R.B., Bogachev, A.V., and Barquera, B. (1999) Sequencing and preliminary characterization of the Na⁺-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **38**: 16246-16252.
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L., and Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* **22**: 331-333.
- Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M., and Haas, D. (1991) Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on anr, a regulatory gene homologous with fnr of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1483-1490.
- Zimmermann, B.H., Nitsche, C.I., Fee, J.A., Rusnak, F., and Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome ba3: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5779-5783.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616.
- Zumft, W.G. (2002) Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 277-286.
- Zumft, W.G. (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem* **99**: 194-215.

ANEXO I. Materiales

Tabla 1. Cepas utilizadas.

Las cepas de *E. coli* y *T. thermophilus* que se han utilizado en la realización de este trabajo se describen a continuación.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> INV α F'	<i>F' endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS gal (ϕclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	(Rosenberg y col., 1987)
<i>E. coli</i> BTH101	<i>F', cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1(Str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	(Karimova y col., 2000b)
Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>T. thermophilus</i> NAR1	Silvestre. Operón <i>narCGHJIKT</i>	(Oshima and Imahori, 1974) ATCC 27634
<i>T. thermophilus</i> HB27	Silvestre	Cedida por el Dr. Koyama
<i>T. thermophilus</i> HB27c:: <i>nar</i>	<i>T. thermophilus</i> HB27 <i>Cm^r::nar</i> transferido por conjugación	(Ramírez-Arcos y col., 1998b)
<i>T. thermophilus</i> B	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> CC-16	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> Fiji 3A1	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> HN1-11	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> NR-17	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa, (Manaia, 1994)
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25	Silvestre	Cedida por el Dr. Da Costa, (Manaia, 1994)
<i>T. thermophilus</i> VG-7	Silvestre.	Cedida por el Dr. Da Costa

<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>gdh</i>	NAR1 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>gdh</i> Cm ^r	NAR1 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcE</i>	NAR1 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcF</i>	NAR1 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcN</i>	NAR1 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcN::bgaA::kat</i>	NAR1 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcE</i> Cm ^r	NAR1 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcF</i> Cm ^r	NAR1 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcN</i> Cm ^r	NAR1 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2004)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>nrcN::bgaA::kat</i> Cm ^r	NAR1 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>gdh</i>	PRQ-16 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>gdh</i> Cm ^r	PRQ-16 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcE</i>	PRQ-16 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcF</i>	PRQ-16 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcN</i>	PRQ-16 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcN::bgaA::kat</i>	PRQ-16 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcE</i> Cm ^r	PRQ-16 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcF</i> Cm ^r	PRQ-16 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcN</i> Cm ^r	PRQ-16 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo

<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>nrcN::bgaA::kat</i> Cm ^r	PRQ-16 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>gdh</i>	PRQ-25 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>gdh</i> Cm ^r	PRQ-25 <i>gdh::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcE</i>	PRQ-25 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcF</i>	PRQ-25 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcN</i>	PRQ-25 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcN::bgaA::kat</i>	PRQ-25 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcE</i> Cm ^r	PRQ-25 <i>nrcE::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcF</i> Cm ^r	PRQ-25 <i>nrcF::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcN</i> Cm ^r	PRQ-25 <i>nrcN::kat</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>nrcN::bgaA::kat</i> Cm ^r	PRQ-25 <i>nrcN::bgaA</i> , fusión transcripcional <i>nrcDEFN-βgal</i> , Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>dnrT</i>	NAR1 pK18ΔNtCt- <i>dnrT</i> Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>dnrT</i> SR/AL	NAR1 pK18ΔNt <i>dnrT</i> Kan ^r S185A/R186L	Este trabajo. (Cava y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>dnrT</i> C/A	NAR1 pK18ΔNt <i>dnrT</i> C151A Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>dnrT</i> C/S	NAR1 pK18ΔNt <i>dnrT</i> C151S Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>dnrS</i>	NAR1 <i>dnrS::kat</i> Kan ^r	Este trabajo. (Cava y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>dnrT</i>	PRQ-16 pK18ΔNtCt- <i>dnrT</i> Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>dnrS</i>	PRQ-16 <i>dnrS::kat</i> Kan ^r	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>dnrT</i>	PRQ-25 pK18ΔNtCt- <i>dnrT</i>	Este trabajo

<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>dnrS</i>	PRQ-25 <i>dnrS::kat Kan^r</i>	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>narC</i>	NAR1 <i>narC::kat Kan^r</i>	(Zafra y col., 2005)
<i>T. thermophilus</i> NAR1 Δ <i>narC</i>	NAR1 Δ <i>narC</i> . Muante de deleción obtenido mediante integración del plásmido suicida pS18 <i>narC</i> .	(Blas-Galindo y col., 2007)
<i>T. thermophilus</i> PRQ-16 <i>narC</i>	PRQ-16 <i>narC::kat Kan^r</i>	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> PRQ-25 <i>narC</i>	PRQ-25 <i>narC::kat Kan^r</i>	Este trabajo
<i>T. thermophilus</i> NAR1 <i>narI</i>	NAR1 <i>narI::kat Kan^r</i>	(Zafra y col., 2005)

Tabla 2. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos que se han usado durante la realización de este trabajo se describen en la siguiente tabla.

Nombre	Marcador / Utilidad	Referencia
pUC7	Amp ^r , <i>P_{lac-lacZ'}</i> , Vector de clonaje.	(Viera and Messing, 1982)
pUC18/19	Amp ^r , <i>P_{lac-lacZ'}</i> , Vector de clonaje.	(Viera and Messing, 1982)
pUC18Not	Amp ^r , <i>P_{lac-lacZ'}</i> , Vector de clonaje derivado de pUC18, presenta dianas <i>NotI</i> a ambos lados del sitio de policlonaje.	Datos de laboratorio.
pUC118/119	Amp ^r , <i>P_{lac-lacZ'}</i> Vector de clonaje.	(Viera and Messing, 1982)
pET19b	Amp ^r , <i>lacI</i> , promotor ϕ 10 de T7. Vector para la expresión de genes dirigida por la RNA polimerasa del fago T7. Se puede obtener una proteína de fusión con 6 histidinas en C-terminal.	Novagen
pET19bsigA	Amp ^r , vector de expresión de 6His-SigA de <i>T. thermophilus</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cedido por la Dra. Lee
pET19bsigE	Amp ^r , vector de expresión de 6His-SigE de <i>T. thermophilus</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cedido por la Dra. Lee
pET22b(+)	Amp ^r , <i>lacI</i> , promotor ϕ 10 de T7. Vector para la expresión de genes dirigida por la RNA polimerasa del fago T7. Se puede obtener una proteína de fusión con 6 histidinas en C-terminal.	Novagen
pET28b(+)	Kan ^r , <i>lacI</i> , promotor ϕ 10 de T7. Vector para la expresión de genes dirigida por la RNA polimerasa del fago T7. Se puede obtener una proteína de fusión con 6 histidinas en N-terminal.	Novagen

pBluescriptKS/SK	Amp ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Vector de clonaje. Utilizado para el clonaje a romos de productos de PCR amplificados con <i>Pfu</i> .	Stratagene
PCR2.1	Amp ^r , Kan ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Promotores <i>T7</i> y <i>Sp6</i> . Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Invitrogen
pGEM-T easy	Amp ^r , Kan ^r , <i>Plac-lacZ'</i> Promotores <i>T7</i> y <i>Sp6</i> . Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Promega
pMK18	Kan ^r , <i>Plac-lacZ'</i> , promotor del gen <i>slpA</i> (<i>PsipA</i>). Vector bifuncional, <i>Thermus-E. coli</i> .	(de Grado y col., 1999)
pKT1	Amp ^r , Kan ^r bajo el promotor del gen <i>slpA</i> (<i>Ps</i>). Purificación del gen de resistencia a kanamicina para mutagénesis insercional.	(Lasa y col., 1992)
pK18	Kan ^r . pUC18 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por kanamicina. Vector suicida para mutagénesis en <i>T. thermophilus</i> .	(Cava y col., 2004)
pMK184	Kan ^r . Derivado del plásmido pMK18. BamH1 es diana única en el sitio de multiclonaje.	(Cava y col., 2007)
pMH184	Hyg ^r . Derivado del plásmido pMK184. El gen de resistencia de higromicina (<i>hph5</i>) sustituye al <i>kat</i> (<i>NdeI</i> - <i>BglII</i>).	(Cava y col., 2007)
pS18a	Amp ^r Str ^{r/d} . Plásmido integrativo derivado del pUC18 para construir mutantes de delección en <i>Thermus</i> a través de la resistencia/dependencia a estreptomomicina (<i>rpsL1</i>).	(Blas-Galindo y col., 2007)
pS18 Δ narC	Str ^{r/d} . Plásmido derivado del pS18 que porta las secuencias flanqueantes del gen <i>narC</i> (<i>EcoR1</i> / <i>BamH1</i>).	(Blas-Galindo y col., 2007)
pNIT3	Amp ^r . Derivado de pUC119 que contiene un fragmento de DNA de 5.4 Kb que codifica la región promotora, el primer gen (<i>narC</i>) y casi todo el segundo gen (<i>narG</i>), del operón de la nitrato reductasa.	(Ramírez-Arcos, 1997)
pNIT3Bg	Amp ^r . Derivado de pUC119 que contiene un fragmento de DNA de 4 kpb que codifica la región promotora (<i>Pnar</i>), el primer gen (<i>narC</i>) y la parte inicial del segundo gen (<i>narG</i>) del operón de la nitrato reductasa.	(Ramírez-Arcos, 1997)
pNIT6	Amp ^r . pNIT3Bg/ <i>BamHI</i> - <i>BamHI</i> . Contiene fragmento de 0'9 kpb que codifica <i>narC</i> hasta la diana <i>BamHI</i> y una pequeña parte de la región promotora.	(Ramírez-Arcos, 1997)

pNIT7	Amp ^r . Derivado de pUC119 que contiene región promotora y los genes <i>narCGHJI</i> .	(Ramírez-Arcos, 1997)
pNIT9	Amp ^r . Derivado de pUC119 que contiene fragmento de 5'4 kpb que codifica los genes <i>narJ, narI, narK1, narK2</i> .	(Ramírez-Arcos, 1997)
pMKEbgaA	Kan ^r . Vector para prueba de promotores, gen <i>bgaA</i> controlada por el <i>Pnar</i>	(Moreno y col., 2003)
pWUR112/77-1	Ble ^r . Vector de expresión constitutiva (<i>PslpA</i>) en <i>Thermus</i> . Derivado del pMK18 sustituyendo la resistencia a kanamicina por bleomicina.	(Brouns y col., 2005)
pTEV-P31-hph5	Hyg ^r . Kan ^r . Vector que porta el gen de resistencia termoestable a higromicina (<i>hph5</i>) bajo el control del promotor <i>PslpA</i> .	(Nakamura y col., 2005)
pMKsGFP	Kan ^r . Vector derivado de pMK18 que expresa la forma termoestable de la GFP (<i>sgfp</i>) bajo el control del promotor <i>PslpA</i> .	Cedido por Dr. Westblade y Dr. Waldo

Tabla 3. Plásmidos construidos en este trabajo.

Durante la realización de este trabajo han sido construidos los siguientes plásmidos.

Nombre	Marcador / Utilidad	Referencia
pUP1B	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119. Contiene el operón <i>dnrST</i>	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pUP1A	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119. NCE ⁻	Este trabajo
pUP2B	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119. Contiene parcialmente el operón <i>nrcDEFN</i>	Este trabajo
pUP2A	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119. NCE ⁻	Este trabajo
pUP3B	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119 que porta un fragmento de 3'5 kpb situado a 4'6 kpb hacia 5' desde <i>narC</i> de <i>T. thermophilus</i> . Codifica el operón <i>nrc</i> completo.	Este trabajo, (Cava y col., 2004)
pDOWN1	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119. Contiene el final del operón <i>nar</i> , el oriV y parcialmente <i>orfAB</i> .	Este trabajo
pDOWN2	Amp ^r . Clon obtenido por paseo cromosómico usando una librería genómica en pUC119 que porta un fragmento de 2.3 kpb desde el final de <i>narK2</i> hacia 3' del operón <i>nar</i> de <i>T. thermophilus</i> .	Este trabajo

pUP3nrcEkat	Amp ^r Kan ^r . Vector derivado del pUP3B. Inserción del <i>kat</i> un sitio NcoI del pUP3B que genera una proteína truncada en posición 310.	Este trabajo
pUP3nrcFkat	Amp ^r Kan ^r . Vector derivado del pUP3B. Inserción del <i>kat</i> un sitio XhoI del pUP3B que genera una proteína truncada en posición 151.	Este trabajo
pUP2nrcNkat	Amp ^r Kan ^r . Vector derivado del pUP2B. Inserción del <i>kat</i> un sitio PstI del pUP2B que genera una proteína truncada en posición 304.	Este trabajo
pKUPRBSβgal	Kan ^r . Plásmido derivado del pK18. Secuencia RBS- <i>bgaA</i> precedida de <i>nrcF-nrcN</i> (de posición +1 a 498) para generar un mutante de inserción en <i>nrcN</i> y promover la fusión transcripcional <i>nrcDEFN-bgaA</i> .	Este trabajo, (Cava y col., 2004)
pET22bnrcD	Amp ^r . Derivado de pET22b con <i>nrcD</i> (NdeI/EcoRI).	Este trabajo
pET28bnrcD	Kan ^r . Derivado de pET28b con <i>nrcD</i> (NdeI/EcoRI). Expresa la fusión de NrcD a una cola de 6His en el dominio N-terminal (6His-NrcD).	Este trabajo
pET28bdnrT	Kan ^r . Derivado de pET28b con <i>dnrT</i> (NdeI/EcoRI). Expresa la fusión de DnrT a una cola de 6His en el dominio N-terminal (6His-DnrT).	Este trabajo
pET22bdnrS	Amp ^r . Derivado de pET22b con <i>dnrS</i> (NdeI/EcoRI).	Este trabajo
pET28bdnrS	Kan ^r . Derivado de pET28b con <i>dnrS</i> (NdeI/EcoRI). Expresa la fusión de DnrS a una cola de 6His en el dominio N-terminal (6His-DnrS).	Este trabajo
pET28bdnrT SR	Kan ^r . Plásmido derivado de pET28b, <i>dnrT</i> portando las mutaciones puntuales S185A/R186L (NdeI/EcoRI).	Este trabajo
pET28bdnrTC/S	Kan ^r . pET28b derivative, with <i>dnrT</i> portando las mutaciones puntuales C151S (NdeI/EcoRI).	Este trabajo
pET28bdnrTC/A	Kan ^r . pET28b derivative, with <i>dnrT</i> portando las mutaciones puntuales C151A (NdeI/EcoRI).	Este trabajo
pK18ΔNtCt-dnrT	Kan ^r . Plásmido derivado de pK18 que porta el fragmento central de <i>dnrT</i> (de posición +101 a 548) con una delección N-terminal y C-terminal de <i>dnrT</i> ΔNtCt- <i>dnrT</i> que (EcoRI/BamHI).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pK18ΔNtdnrT SR/AL	Kan ^r . Plásmido derivado de pK18 con una delección N-terminal de <i>dnrT</i> (de posición +101 a 548) portando las mutaciones SR/AL, ΔNt- <i>dnrT</i> SR/AL) (EcoRI/BamHI).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pK18ΔNtdnrT C/A	Kan ^r . Plásmido derivado de pK18 con una delección N-terminal de <i>dnrT</i> (de posición +101 a 548) portando las mutaciones C/A, ΔNt- <i>dnrT</i> C/A) (EcoRI/BamHI).	Este trabajo

pK18 Δ NtdnrT C/S	Kan ^r . Plásmido derivado de pK18 con una deleción N-terminal de <i>dnrT</i> (de posición 1) importando las mutaciones C/S Δ Nt- <i>dnrT</i> C/S) (EcoRI/BamHI)	Este trabajo
pUP1BdnrSkat	Amp ^r Kan ^r . Vector derivado del pUP1B. Inserción del <i>kat</i> un sitio PstI en posición +1255 con respecto al ATG iniciador de <i>dnrS</i> .	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pWURdnrT	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrT procedente del pET28bdnrT (Xba1/EcoR1).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pWURdnrTSR	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrTSR/AL procedente del pET28bdnrT SR (Xba1/EcoR1).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pWURdnrTC/S	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrT C/S procedente del pET28bdnrT C/S (Xba1/EcoR1).	Este trabajo
pWURdnrTC/A	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrT C/A procedente del pET28bdnrT C/A (Xba1/EcoR1).	Este trabajo
pWURdnrS22	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrS procedente del pET22bdnrS (Xba1/EcoR1).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pWURdnrS28	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsdnrS procedente del pET28bdnrS (Xba1/EcoR1).	Este trabajo
pWURnrcN	Ble ^r . Plásmido derivado de pWUR con rbsnrcN desde producto de PCR incluyendo sitios de restricción para el clonaje (Xba1/EcoR1).	Este trabajo
pMKnrcbgaA	Kan ^r . Vector derivado de pMKEbgaA en el que se ha sustituido el promotor <i>Pnar</i> por <i>Pnrc</i> (Xba1/NdeI).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pMKnqobgaA	Kan ^r . Vector derivado de pMKEbgaA en el que se ha sustituido el promotor <i>Pnar</i> por <i>Pnqo</i> (Xba1/NdeI).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pMKdnrbgaA	Kan ^r . Vector derivado de pMKEbgaA en el que se ha sustituido el promotor <i>Pnar</i> por <i>Pdnr</i> (Xba1/NdeI).	Este trabajo, (Cava y col., 2007)
pMKfbcbgaA	Kan ^r . Vector derivado de pMKEbgaA en el que se ha sustituido el promotor <i>Pnar</i> por <i>Pfbc</i> (Xba1/NdeI).	Este trabajo
pMHnarbgaA	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnar-rbsbgaA</i> procedente del pMKEbgaA (Xba1/HindIII).	Este trabajo
pMHnrcbgaA	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnrc-rbsbgaA</i> procedente del pMKnrcbgaA (Xba1/HindIII).	Este trabajo
pMHnqobgaA	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnqo-rbsbgaA</i> procedente del pMKnqobgaA (Xba1/HindIII).	Este trabajo
pMHdnrbgaA	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pdnr-rbsbgaA</i> procedente del pMKdnrbgaA (Xba1/HindIII).	Este trabajo

pMHfbcbgaA	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pfbc-rbsbgaA</i> procedente del pMKfbcbgaA (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMKnarC	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqobgaA en el que se ha sustituido el gen <i>bgaA</i> por <i>narC</i> (NdeI/HindIII).	Este trabajo
pMKnarCH1	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqobgaA en el que se ha sustituido el gen <i>bgaA</i> por <i>narCH1</i> (NdeI/HindIII).	Este trabajo
pMKnarCH2	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqobgaA en el que se ha sustituido el gen <i>bgaA</i> por <i>narH2C</i> (NdeI/HindIII).	Este trabajo
pMHnarC	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnqo-rbsnarC</i> procedente del pMKnarC (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMHnarCH1	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnqo-rbsnarCH1</i> procedente del pMKnarCH1 (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMHnarCH2	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonado <i>Pnqo-rbsnarCH2</i> procedente del pMKnarCH1 (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMKPnqoeGFP	Kan ^r . Vector derivado del pMKnqobgaA en el que se ha sustituido el gen testigo <i>bgaA</i> por el gen <i>egfp</i> que codifica la forma de GFP conocida como "enhanced" (Cormack y col., 1996) (NdeI/HindIII).	Este trabajo
pMKPnqosGFP	Kan ^r . Vector derivado del pMKnqobgaA en el que se ha sustituido el gen testigo <i>bgaA</i> por el gen <i>sgfp</i> que codifica la forma de GFP conocida como "superfolded" (Pedelacq y col., 2006) precedido por un sitio de multiclonaje y un brazo espaciador flexible para la fusión traduccional (NdeI/HindIII).	Este trabajo
pMKPnqosGFP groE10	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqosGFP para la expresión de la fusión GroE-sGFP (BcuI/ClaI).	Este trabajo
pMKPnqosGFP narC	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqosGFP para la expresión de la fusión NarC-sGFP (BcuI/ClaI).	Este trabajo
pMHPnqoeGFP	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se ha clonado el gen testigo <i>egfp</i> controlada por el promotor <i>Pnqo</i> (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMHPnqosGFP	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se ha clonado el gen testigo <i>sgfp</i> , precedido de un sitio de multiclonaje y un brazo espaciador flexible, para la expresión de proteínas de fusión controlada por el promotor <i>Pnqo</i> (XbaI/HindIII).	Este trabajo
pMHPnqosGFP groE10	Hyg ^r . Vector derivado del pMHPnqosGFP para la expresión de la fusión GroE-sGFP (BcuI/ClaI).	Este trabajo
pMHPnqosGFP narC	Hyg ^r . Vector derivado del pMHPnqosGFP para la expresión de la fusión NarC-sGFP (BcuI/ClaI).	Este trabajo

Plásmidos para experimentos de doble híbrido.

Plásmido	Descripción	Referencia
pT18	Derivado de pUC19 expresando el fragmento T18 (aminoácidos 225-399) del gen <i>cyaA</i> , como dominio C-terminal, Amp ^r .	Karimova y cols., 2000
pT25	Derivado de pACYC184 expresando el fragmento T25 (aminoácidos 1-224) del gen <i>cyaA</i> , como dominio N-terminal, Cm ^r .	Karimova y cols., 2000
pKT25	Derivado del plásmido de bajo número de copias pSU40, expresando el fragmento T25 (aminoácidos 1-224) del gen <i>cyaA</i> como dominio N-terminal, Kan ^r .	Karimova y cols., 2000
pKNT25	Derivado del plásmido de bajo número de copias pSU40, expresando el fragmento T25 (aminoácidos 1-224) del gen <i>cyaA</i> como dominio C-terminal, Kan ^r .	Karimova y cols., 2000
pT18zip	Derivado de pT18, cremallera de leucina del factor de transcripción de levaduras GCN4, fusionada al fragmento T18.	Karimova y cols., 2000
pT25zip	Derivado de pT25, cremallera de leucina del factor de transcripción de levaduras GCN4, fusionada al fragmento T25.	Karimova y cols., 2000
Plásmido	Descripción	Referencia
pT25gdh	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-Gdh, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18gdh	Derivado de pT18, proteína de fusión Gdh-T18, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25narC	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-NarC, Cm ^r	Este trabajo, Zafra y cols, 2005
pT18narC	Derivado de pT18, proteína de fusión NarC-T18, Amp ^r	Este trabajo, Zafra y cols, 2005
pKT25narC	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-NarC, Kan ^r	Este trabajo
pKNT25narC	Derivado de pT25, proteína de fusión NarC - T25, Kan ^r	Este trabajo
pT25narG	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-NarG, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18narG	Derivado de pT18, proteína de fusión NarG-T18, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25narJ	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-NarJ, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18narJ	Derivado de pT18, proteína de fusión NarJ-T18, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pKT25narI	Derivado de pKT25, proteína de fusión T25-NarI, Kan ^r	Este trabajo

pKNT25narI	Derivado de pKNT25 proteína de fusión NarI-T25, Kan ^r	Este trabajo
pT25narI	Derivado de pT25, proteína de fusión T25-NarI, Cm ^r	Este trabajo, Zafra y cols, 2005
pT18narI	Derivado de pT18, proteína de fusión NarI-T18, Amp ^r	Este trabajo, Zafra y cols, 2005
pT18nrcD	Derivado de pT18, NrcD-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25nrcD	Derivado de pT25, T25-NrcD, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18nrcE	Derivado de pT18, NrcE-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25nrcE	Derivado de pT25, T25-NrcE, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pKT25nrcE	Derivado de pKT25, T25-NrcE, proteína de fusión, Kan ^r	Este trabajo
pKNT25nrcE	Derivado de pKNT25, NrcE-T25, proteína de fusión, Kan ^r	Este trabajo
pT18c-nrcE	Derivado de pT18, c-NrcE-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25c-nrcE	Derivado de pT25, T25-c-NrcE, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18nrcF	Derivado de pT18, NrcF-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25nrcF	Derivado de pT25, T25-NrcF, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18nrcN	Derivado de pT18, NrcN-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT25nrcN	Derivado de pT25, T25-NrcN, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo, Cava y cols, 2004
pT18dnrS	Derivado de pT18, DnrS-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo
pT25dnrS	Derivado de pT25, T25-DnrS, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo
pT18dnrT	Derivado de pT18, DnrT-T18, proteína de fusión, Amp ^r	Este trabajo
pT25dnrT	Derivado de pT25, T25-DnrT, proteína de fusión, Cm ^r	Este trabajo

Tabla 4A. Oligonucleótidos generales utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Hibridación/ figura resultados
ferred.nde1	ggtgacatatgccgcacgt	<i>nrcDI</i> 12B, 13B, 14, 18D, 31B, T3
ferred.rev	ctactcctccagcacgt	<i>nrcDI</i> 12B, 14, 18D, 31B, T3
orf F.dir	ggaggacatatgagggtggt	<i>nrcFI</i> 13B, 14, T3
orf F. rev	tcagaaggcctcctcca	<i>nrcFI</i> 14, T3
orf N.dir	gaacatatgggcggggctt	<i>nrcNI</i> 12B, 14, T3
orf N.rev	ctagtcgggcaggaccgc	<i>nrcNI</i> 12B, 13B, 14, T3
H24	acgcgctgcacgatgaaggtagagccacat	<i>narHI</i> 12B, T3
H25	attcgatatctcgccccgaaggggggctgga	<i>narHI</i> /12B, T3
gdh1.ndel	ctagtcgggcaggaccgc	<i>gdh1I</i> 12B, T3
gdh1.not	ctagtcgggcaggaccgc	<i>gdh1I</i> 12B, T3
csaF2	gatgtgggcgagaagcc	<i>csaBI</i> 12B, T3
csaRint	gtggaggcgcatggaga	<i>csaBI</i> 12B, T3
H22	acgcgctgcacgatgcgggactggatcaagga	<i>narGI</i> T3
H23	gtagatatccactccggcggggtctccagcttg	<i>narGI</i> T3
H42	aaaaactgcagggatgccgggcaaccctaacct	<i>narJI</i> T3
H43	gtagatatcccctctgtcaagttcccctgca	<i>narJI</i> T3
O27-56	cccaagcccggggtgt	<i>narKI</i> T3
O27-70	cggagaggaagatgccg	<i>narTI</i> T3
O27-85	ctcgggcggcccgcctcca	<i>nrcN</i> , 13A
NQOEcoR1	ccggaattcctcttcgcccgtaa	<i>nqol</i> 7D, 18D, 31B
NQOBamH1	cgcgatccgaagaagaggaagaa	<i>nqol</i> 7D, 18D, 31B
dnrTNde1	agcatatggagctgccc	<i>dnrTI</i> T3
dnrTEcoR1rev	tgaattcttagcggatcaaggccctc	<i>dnrTI</i> T3
dnrTmutSR	ggtggccctcaacctgggggagcttta	<i>dnrT</i>
dnrTEcoR1	ccggaattcctctctctctgga	<i>dnrT</i>
dnrTmutC/S	ctctccgagttcctcctggaaaggc	<i>dnrT</i>
dnrTmutC/A	ctcgccgagttcctcctggaaaggct	<i>dnrT</i>
dnrTBamH1	cgcgatcccagggtgcgggaca	<i>dnrT</i>
dnrTstop	ttagcggatcaaggccctc	<i>dnrT</i> , 21B
regANde1	cctgcatatgcgggact	<i>dnrSI</i> 21B, T3

regArev	ccggaattctcacccttagggcgagg	<i>dnrSI</i> T3
o27-77	agggtgctccacgtg	<i>dnrTI</i> 21B
o27-81	gaaggcctccccggaa	Región entre <i>dnr</i> y <i>narI</i> 21B
Pnqodir (Xba1)	ccgctctagacctccctccagggcctt	<i>Pnqo</i> , 31C
Pnqorev (Nde1)	ggaattccatatgccctccttctgtgcct	<i>Pnqo</i> , 31C
PromUP Xba1	ccgctctagacaaaacgcca	<i>Pnqol</i> T3, 25, 32
PromUP Nde1	gaaggcaccatatggcgga	<i>Pnqol</i> T3, 25, 32
FP Pnrkdir	gccgacctggtccgga	<i>Pnrcl</i> 28AB, 30
FP Pnrc47rev	atgcagggtcgcagatcac	<i>Pnrcl</i> 28B, 29A, 30
FP Pnrcrev	cacgtgcggcatcctca	<i>Pnrcl</i> 28A, 30
Pnrkdir avidin	Biotina-gccgacctggtccgga	<i>Pnrcl</i> / 29A
PfbcXbadir	tctagagggttctgctggacgtggg	<i>Pfbcl</i> 40
PfbcNderev	catatgctcgctccctctctgaaaagggg	<i>Pfbcl</i> 40
o27-69	ggggctcgcgctcagg	<i>Pnar</i> (790 bp)/ T3, 15, 25, 32, 41B
Pnarext	ggcctcctcgcgccact	<i>Pnar</i> (790 bp)/ T3, 15, 25, 32, 41B
FP Pnardir	ctggaccaggtggcgca	<i>Pnar</i> (212 bp)/ 28B
FP Pnarrev	tcctcacctccgcccaca	<i>Pnar</i> (212 bp)/ 28B
PdnrXba1	gctctagaccggcgctccgggagctg	<i>Pdnrl</i> 25, 36
PdnrNde1B	aaaacatatggcgagggcctccggag	<i>Pdnrl</i> 25, 36
RBSbgalrev	gtagatatctcatgtctcctcccaca	<i>rbsbgaA</i>
RBSbgaldir	gtagatatccgaccttaaggaggtgtga	<i>rbsbgaA</i>
narCH1rev	ggccccgtggcgctggcggtgggttcc	<i>narC</i>
narCH2dir	ggggctcccggcaggcccccacaccgtg	<i>narC</i>
narCNde1	aaacatatggcgagaaggctcctacc	<i>narC</i> / T3
narCHindstoprev	aaaagctttcacctcctaagctggcgcg	<i>narC</i> / T3
nrcNrbsXba1	aaatctagaggaggaaggcatggcggggcttg	<i>nrcN</i>
KATNCODIR	catgcatggagtataacagaaacctt	<i>Kat</i>
KATNCOREV	catgcatgggtcaaaatggatgctgtt	<i>Kat</i>

Tabla 4B. Oligonucleótidos empleados en la construcción de vectores de expresión de proteínas de fusión con sGFP (figura 46).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Hibridación
NdeMCSLINKsGFPdir	catatgccatggactagatcgatgaattctctggaggaggaggaatgagcaaaggag aagaacttttactggagtggtccc	<i>sgfp</i> directo
HindsGFPprev	aagcttttattattgtagagctcatcc	<i>sgfp</i> reverso
groE10Bcu1dir	actagtgaggaggagtgatggtgcccggagggtgaagac	<i>groE10</i> directo
groE10Cla1dir	atcgatctgcaggaccgcaagcaggtcg	<i>groE10</i> reverso
narCBcu1dir	actagtgagggtgaggatggcgagaaggctcctaccc	<i>narC</i> directo
narCCla1rev	atcgatcctcctaagctgggcgcggtatcc	<i>narC</i> reverso

Tabla 5. Oligonucleótidos para el ensayo de doble híbrido (figuras 17, 32, 45).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Hibridación
H1	ctgggtacctcaggacggaaggccctctacgg	pT18narC directo (Kpn1)
H2	attcgatatcctcctaagctgggcgcggtatc	pT18narC reverso(EcoRV)
H2'	attcgatatcctcctaagctgggcgcggtatc	pKNT25narC reverso (EcoRV)
H2EcoR1	attcgaattccccctcctaagctgggcgcggtatc	pKNT25narC reverso (EcoR1)
H5	gcgggctgcagggatgcccggactggatcaaggag	pT25narG directo (Pst1)
H6	gtagatatcccactccggcggggtctccagcttg	pT25narG reverso (EcoRV)
NarJ Tt Kpn	tgggtacctatgccgggcaaccctaacctctg	pT18narJ directo (Kpn1)
NarJ Tt Hind	tatcaagcttatcctcctgtcaagttcccctg	pT18narJ reverso (HindIII)
H9	aaaaggatcccatgaagtgaacgccgcgctcttc	pT25narI directo (BamH1)
H10	tttaggtacctcgccccgaaggggggctggatg	pT25narI reverso (Kpn1)
H11	aaaaggatcccatgggcggggcttgcca	pT25nrcN directo (BamH1)
H12	gtagatatcgtcgggcaggaccgca	pT25nrcN directo (EcoRV)
H13	ctgggtaccgatccgcacgtgatctgcga	pT18nrcD directo (Kpn1)
H14	attcgatatcctccagcacgtgga	pT18nrcD reverso (EcoRV)
H15	ctgggtaccatgagggtggtttggaga	pT18nrcF directo (Kpn1)
H16	attcgatatcaaggcctcctccaggat	pT18nrcF reverso (EcoRV)
H17	aaaactgcagggatggcgagaaggctcctaccc	pT25NarC directo (Pst1)
H18	attcgatatcctcctaagctgggcgcggtatc	pT25narC reverso (EcoRV)
H21	aaaactgcagggtggcgagaaggctcctaccc	pKNT25narC directo (Pst1)
H22	acgcgtcgacgatgcccggactggatcaagga	pT18narG directo (Sal1)

H23	gtagatatccactccggcggggtctccagcttg	pT18narG reverso (EcoRV)
H26	acgcgtcgacgatgaagtgaacgccgcgtcttc	pT18narI directo (Sal1)
H27	attcgatatcagctgacctcgccagttgcg	pT18narI reverso (EcoRV)
H27'	attcgatatcgctgacctcgccagttgcg	pKNT25narI reverso (EcoRV)
H32	aaaactgcagggatgaagagcgaaccccttfc	pT25gdh directo (Pst1)
H33	attcgatatcagggataggccccggagggccc	pT25gdh reverso (EcoRV)
H34	acgcgtcgacgatgaagagcgaaccccttfc	pT18gdh directo (Sal1)
H35	attcgatatcgggtataggccccggagggccc	pT18gdh reverso (Pst1)
H36	aaaactgcagggatgccgcacgtgatctgag	pT25nrcD directo (Pst1)
H37	attcgatatcctcctccagcacgtggacgt	pT25nrcD reverso (EcoRV)
H38Bis	aaaactgcagggatgaggggtggtttggag	pT25nrcF directo (Pst1)
H39	attcgatatcgaaggcctcctccaggatcct	pT25nrcF reverso (EcoRV)
H40	acgcgtcgacgatggcggggcttgccagag	pT18nrcN directo (Sal1)
H41	attcgatatctcgggcaggaccgcaccccg	pT18nrcN reverso (EcoRV)
H42	aaaaactgcagggatgccgggcaaccctaacct	pT25narJ directo (Pst1)
H43	gtagatatccctcctgtcaagttcccctgca	pT25narJ reverso (EcoRV)
H44	aaaactgcagggatggccttgccctcgggcct	pT25nrcE directo (Pst1)
H45	acgcgtcgacgatggccttgccctcgggcct	pT18nrcE directo (Sal1)
H46	attcgatatcggcttctccaccagaaaccggt	pT18c-nrcE reverso (EcoRV)
H46'	attcgatatcgcttctccaccagaaaccggt	pKNT25nrcE reverso (EcoRV)
H47	attcgatatcggcttctccaccagaaaccggt	pT25c-nrcE reverso (EcoRV)
H48	aaaactgcagggacctgccccctctaccggca	pT25c-nrcE directo (Pst1)
H49	acgcgtcgacgatgacctgccccctctaccggca	pT18c-nrcE directo (Sal1)
H50	aaaactgcagatggagctcggccaggtg	pT18dnrT directo (Pst1)
H51	attcgaattcccgggatcaaggccctc	pT18dnrT reverso (EcoR1)
H54	attcgaattcccccttagggcgaggag	pT18dnrS reverso (EcoR1)
H55	aaaactgcagtggagctcggccaggtg	pKT25dnrT directo (Pst1)
H56	attcgaattcttagcggatcaaggccctc	pKT25dnrT reverso (EcoR1)
H61	attctctagatatggaggcgggagctcttc	pKT25dnrS directo (Xba1)
H62	attcgaattctcacccttagggcgagg	pKT25dnrS reverso (EcoR1)

Oligonucleótidos de secuenciación y comprobación de construcciones.

Nombre/ Localización	Secuencia 5'-3'
Secuenciación del operón <i>nar</i>	
o27-35	cgcagtaccagtcgtag
o27-52	cccagggtacaggacg
o27-54	ccaccctcctctctc
o27-56	ccaagcccgggtgt
o27-66	cgcagggcacgcccgcg
o27-70	cggagaggaagatgccg
Pnarext	ggcctcctcgcccact
oextcit	cagtgggtccgtaga
Secuenciación del extremo 3' del operón <i>nar</i>	
o27-71	ttcccagggctggtggg
o27-72	cccaggttgcggccca
o27-73	gtccgaggaccgcctca
o27-74	cccgaagcccaggagga
o27-75	gaaggaaaggcccacgta
o27-76	gaggaggtcccgaaga
o27-78	ggagccctccacctga
o27-78BIS	cacctcttctgctga
orirevSal2	cctcccagtcgacctcgggtga
orirevSal1	gggcccggctgaccctggcca
oridirSal2	ggggcgtcgacgtgcagaaca
oridirSal1	gagctgtcgaccaccagctc
oriVdirEcoR1	gctgaattccccaaggga
Secuenciación del operón <i>dnr</i>	
o27-79	aggtcatgaggaccag
o27-80	gaggcgggtgccgcaa
o27-94	gtcttcaggcccacca
Secuenciación del operón <i>nrc</i>	
o27-82	gagcgggcccctcgcgca
o27-83	ggaggcaccatccctta

o27-84	gagctcgtgggcttcca
o27-85	ctcgggcgcccgtcca
o27-86	ggccgtcccgcagccga
o27-87	gtccagccgctcctca
o27-88	ccccgagggcaggcct
o27-89	gccaaggtggcctta
o27-90	gagcttctggggccgga
o27-91	ctcctacgggcttca
o27-95	ccgccccgccccacgat
o27-96	gagcttctcctgccga
PromUPext	cctcctggcaactccggtcct

Secuenciación del extremo 5' del operón *nrc*

o27-92	ccagcgtctgcaggcca
o27-93	gggggtgtagaggagga
o27-97	cgggatgcgcccca
o27-98	ctgggagagggttccga
o27-99	caagggttgccgtcca

Otros cebadores

o-bgal	ggggttggcctggcca
oLA360	cttgacaaggcgct
gdhanti2	cgatgggctccccgtca
gdh1Not	ttcgggccgctcctta
gdh2Not	cggcgccgctaagggtta
gdhNde1	gtgatcatatgccgctaa

MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO.**Tabla 6. Tampones y otras soluciones utilizadas.**

Nombre	Composición	Utilidad
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.
TES	Tris 25 mM pH 7.5, sacarosa 50 mM, EDTA 5mM	Lavado de células, purificación de DNA génomico.
TS 1X	Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5	Lavado de células
Tampón Z 1X	Tampón fosfato pH 7, 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ , 50 mM β-mercaptoetanol.	Actividad beta-galactosidasa
Tampón de ruptura de Laemmli 5X	Tris-HCl 300 mM pH 6.8, SDS 5%, β-mercaptoetanol 10 %, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.002%, 25 mM EDTA	Preparación de muestras de proteínas para su análisis en SDS- PAGE.
Tampón "running" 5X	Tris 125 mM pH 8.8, glicina 1 M, SDS 20 mM	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.
Tampón nativo 5X	Tris 125 mM pH 8.8, glicina 1 M	Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.
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 semiseco.
TBS-Tween 1X	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1% (Sigma)	Preparación de la solución de bloqueo y dilución de los anticuerpos para los ensayos de Western blot.
Tampón de carga de DNA 10X	TAE 10X, glicerol 30%, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF	Preparación de muestras de DNA para su electroforesis.
Tampón SSC 24X	NaCl 3.6 M, citrato sódico 0.4 M	Componente de las soluciones del ensayo de Southern-blot.
Denhardt 100X	Ficoll 400 al 2%, BSA al 2%, polivinilpirrolidona al 2%, filtrar con filtro 0.4 μm.	Prehibridación en ensayos de Southern-blot.

RNasa A	2 mg/ml de RNasa A en Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 0.1M, glicerol 20% y hervir durante 10 minutos para eliminar DNasas.	Eliminación de RNA de una muestra.
Tampón EM	HEPES 20 mM pH 6.96, NaCl 150 mM, glicerol 10%, EDTA 1 mM, DTT 2 mM	Cromatografía de exclusión molecular para DnrT
Tampón Footprint 1X	8 mM HEPES, pH 7.5, 6 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA	Ensayos de protección frente a permanganato potásico y DNasa I.
Tampón reclutamiento de la RNA polimerasa	HEPES 20 mM, pH 6.9, NaCl 50 mM, glicerol 10 mM; BSA 0.1 mg/ml, 5 mM β-mercaptoetanol, 8 mM MgCl ₂	Ensayos de reclutamiento de la RNA polimerasa
Tampón TB 1X	MOPS 50 mM, pH. 6.5, KCl 40 mM, 10 mM MgCl ₂ , DTT 0.1 mM	Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>
TSB 2X	Formamida desionizada 90%, 50 mM EDTA, 0.002% azul de bromofenol, y 0.002% verde xilencianol	Tampón de parada de las recciones de transcripción <i>in vitro</i>
Mezcla de NTPs 1X	GTP 0.8 mM, ATP 0.8 mM, CTP 0.1 mM, UTP 0.2 mM incluyendo [α- ³² P]-CTP	Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>
Tampón NDH	tampón glicina 125 mM pH 10, NADH 1.5 mM, Nox. a concentración final variable.	Respiración <i>in vitro</i> ,
Tampón NR	tampón glicina 125 mM pH 10, metil viológeno 50 mM, nitrato 20 mM.	Actividad nitrato reductasa <i>in vitro</i>

Tabla 7. Antisueros usados en este trabajo.

Nombre	Características	Referencia
α -NR	Anticuerpo de conejo contra proteína NarG desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-blot.	(Ramírez-Arcos, 1997)
α -NarJ	Anticuerpo de conejo contra proteína NarJ desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-blot.	(Zafra y col., 2005)
α -DnrT	Anticuerpo de conejo contra proteína DnrT desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-blot.	Este trabajo
α -DnrS	Anticuerpo de conejo contra proteína DnrS desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-blot.	Este trabajo
α -NrcD	Anticuerpo de conejo contra proteína NrcD desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> NAR1. Usado en ensayos de Western-blot.	Este trabajo
α -GFP	Anticuerpo de conejo contra proteína GFP desnaturalizada de <i>Aqueorea victoria</i> . Usado en ensayos de Western-blot	Invitrogen
α -6His	Anticuerpo de ratón contra tag de 6 His Usado en ensayos de Western-blot.	Invitrogen
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano. Usado como anticuerpo secundario en Western-blot	Biorad
GAM-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano. Usado como anticuerpo secundario en Western-blot	Biorad

ANEXO II

Secuencias, alineamientos y análisis filogenético.

Número de depósito (EMBL) de las secuencias obtenidas en este trabajo: Operón *dnr*: AM101043; Operón *nrc*: A.650200

Alineamiento de secuencia entre *NarC* y *Cyt C₂₆₂* de *T. thermophilus*

```

NarC  MARRLLPFLALFLGLSLGDDKALYVTRCASCHGABQGIIPGAIFFLAG
Cyt C262  --MKRTLPAPLGLGLALAGADGAKIYACAGCCHQNGQIGPAPFFLAG
      :  * : * ** * * * * * : * * * * : * * * * * * * * * *
NarC  -----NFRVQDEAYVRAVREGLSGPFLVGVGVTYDGVNPLFQVSEAR
Cyt C262  HVAEILAREGGREYLILVLLYLQGGIVSRKRYMVMVMSFPAQKDEEIA
      :  :  * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *
NarC  ALACVLEKLOGAPAJAARPAQVQDDPALGSAFLYQKALNKGACCAQCS
Cyt C262  AVLNHIATANG-----
      * : * * * *
NarC  TVAGVDFPQDGLGDLTDAARLGGAGLAAVLENPAFVMEAYKKEP
Cyt C262  -----DANKVSG-----FKP
      * * * *
NarC  LTKHEATALAFLVQVQAPFSPSLYRFLVAGLVALLLQVAVLM
Cyt C262  FTASEVRLRAKLTLP-----
      : * * * * * * *
NarC  QLRPESLAERIRAGLER
Cyt C262  ---QVLAERKGLGL-
      : * * * * * *
  
```

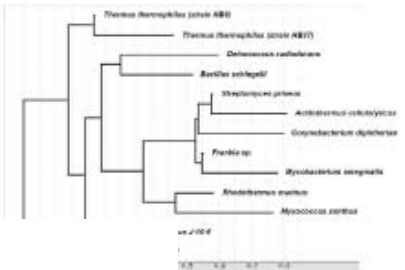
■ motivo de coordinación de hierro
■ sitio específico de corte de la Sflpa

operones *nrc* y *dnr*

```

irc 13  gagcggcggccggcctgcgccccaccctggaggtggaggtgaggtg
14  atgcccgaagtgatctgagcgcctgcctggcctgaggaaccgg
15  H P H V I C E F V C I G V H D R
16  agtggccaggaggtttgagcctggaggtgaggtgaggtgaggtg
17  S C Q R E V C P V E C I V D A G
18  gagcaggtttacatgcaacccggagaggtgaggtgaggtgaggtg
19  E Q L Y I H P D E C I D C G A
20  tgcctggcctgtgagcctgagcctgacatgacccggagaggtg
21  C T P A C P V H A I Y P E E D
22  gtcccggagcgtggaggtttacatgcaacccggagaggtgaggtg
23  Y P E Q W H I V I E K H H T W
24  gcccacacccctgcccacagctgagcctgagcaggtgaggtg
25  A Q T L F H V H V L K E
26  atgagcttgcctcggcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
27  H A L P S S L U V E V H Q E V
28  cctctctggcctcggcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
29  F F L E K V A F T L I S L A S
30  tgcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
31  L L D A S I F T S L S L D S A M
32  gtagcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
33  A W L R V H W L L W L C S L
34  gctctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
35  A L D S F A A W H A F Y L H R E
36  cggatctcagcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
37  P D L F E A S G F L E E G R
38  gtctggcctcggcctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
39  Y W A R L A R H L A W H L S L
40  aagcctcctctgagcctgagcctgagcctgagcctgagcctg
41  T A D L S L F F A Y L G G L K
  
```

Origen del elemento NCE, *NrcD*



```

Pnar 125 atggaagccctggcggagatccgcttgcaggtcaaggcctctgtg
170 cgggaggttagcggcgaagcctccctgggttttggcggcgggc
215 gtcgctgcccaccctgctccagggaaggaccccttggcggc
260 ccgcttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
305 gctacacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
350 cgggacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
395 taccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
440 tactccaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
485 gggatcaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
530 gaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
575 tccctaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
620 aggcctggttgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
665 ctgaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
710 gctactcaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
755 gtcgctcctcctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
800 aa
845 ga
890 ac
935 ac
980 ct
1025 gt
1070 tp
1115 ct
1160 cp
1205 gg
1250 ga
1295 tt
  
```

Promotores

Promotor *Pnar* (794 bp)

```

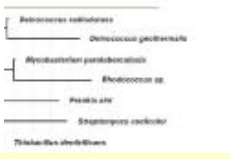
GGGGGAGG GAGGTTGGG ACGGGATGA GGCCTGGGG GAGGTCGAG
GGGAGGGA GAGGTTGGG GTACCGGAG GGCCTGGGG GTCCTGGAG
RpnI
GTAGGAGG TCTTGTCCA GGCCTGGGG GAAAGGGG TCGGCTTCA
GGGCAAGT CCGGGGATG GCTCTGGGG AGGGGAGG AGGGCTTTC
CGGAGGCG TCGGCTGGG GAGGTTGGG AGGCTTGGG AGGAGTGGG
GTGCTTGGG GTGAGGAGG AAGGTTGGG GGCCTGGGG GCGGAGGCG
HcoI
TCCGAGGG CCGGAGGGA GTCTGAGCT CTTGGGCGA AGGCTTGGG
GTGCTGGGG AGGTTGGGG TGAAGTAGA GGCCTGGGG AGGAGTGGG
GGCCTGGGG CCGTGGGG TAAAGTCCA CCAAGAGCC TTCGGCTTC
CGGTTGGGG GGCAGGAGG GCTCTGGGG TTCAGAGCA GGGGCTTTC
GGGGGATG GGGGGGCT TAACTGGGG GAGGTTGGG GAGGTTGGG
AAGGTTGGG CCGGAGGAG TCTTGTCTT GAGGAGGTT GCGGAGGCG
AGGCTTGGG CCGGAGGAG GAGGTTGGG GAGGTTGGG ATCGGCTTC
HpaII HpaII
AGGTTGGGG GGTTCGGTA GAGGAGTGT CCGGGGCTT GCGGTTGGG
GGGAGGCG CCGGAGGAG TAAAGTCCA TAAAGTCCA
  
```

Promotor *Pnrc* (448bp)

```

CGGGGAGG TTAATGGGG GTACAGGGG GGTTCGATC GGGGTTGGG
GATTCGATC GTAGAGGG GGTTCGATC GGGGTTGGG
EamHI
GGCCTGGGG GGGGTTGGG GAGGTTGGG GGCCTGGGG
CAGGAGGAG TTTGGGCTT TGTGGAGGAG GAGGTTGGG
TAAAGTCCA GTTGGGCTT TGTGGAGGAG AGCAGGCTT
GGCAGGCTT ACTGGAGAG GGTTCGGAT CCGTTCGGG
GGCCTGGGG GTCTGGGG TGTAGAGAA GCGGAGGCG
HpaII
AGGCTTGGG GTAGGAGG GGTTCGATC TGTATGGG
AGTTCGGG TCGGCTTTC AAGAGGCG GAGGTTGGG
GGGAGGCG GTGGGAGG GGTTCGATC GGCCTGGGG AGGAGGCG
AGCTTGGG CTTGGGCTT GGGGAGGAG ACCGCTGGG GAGGTTGGG
CAGGCTTTC TGGGCTTTC GGGGAGGAG GTCTTCGAT TTAAGTCCA
GGGAGGCG TAAAGTCCA GAGGTTGGG GGCCTGGGG GAGGTTGGG
HpaII
GGGAGGCG GGGGAGGAG TTTGGGCTT GTGGGAGGAG GTGGGAGG
GAGGTTGGG GGTTCGATC GGTTCGATC GAGGTTGGG
GGGAGGCG CATAGAGAG AGGAGGCTT GGGGAGGAG CCGGAGGAG
GTCTTCGAT TAAAGTCCA GAGGTTGGG GGCCTGGGG
AGGTTGGG AGGAGGCG TTC
nrcF
  
```

CE, *NrcF*



ANEXO II

ANEXO II

Secuencias, alineamientos y análisis filogenético.

Número de depósito (EMBL) de las secuencias obtenidas en este trabajo: Operón *dnr*: AM161043; Operón *nrc*: AJ585200

Alineamiento de secuencia entre NarC y Cyt C₅₅₂ de *T. thermophilus*

```

NarC  MARRLLPLALAFLLGLS LAQDGKALYGTH CASCHGAEGQGI PGAI PPLAG
Cyt c552 --MKRTLMAFLLLGLLA LAQADGAKIYAQ CAGCHQONGQGI PGAF PPLAG
      :   : * : * * : * * * . *   : : * * . * *   : * * * * * : * * * * *

```

```

NarC  -----NPRVQDEAYVVRVREGLSGPLEVGGVTYDGVMPPLPQVSEAEAR
Cyt c552 HVAEILAKEGGREYLILVLLYGLQGQIEVKGMKYNGVMSSFAQLKDEEIA
      . :   . . * : : . :   * * . *   : * * * : . * : * * * . . . : * : : *

```

```

NarC  AIAQYLKGLGGAPAQAAPAPQVQGD PALGRALYLGQKALKNGGAP CQACH
Cyt c552 AVLNHIATAWG-----
      * :   : :   *

```

```

NarC  TVAGVGF FGGGALGKDLTDAAKRLGGEAGLAALVENPAFPVMREAYKGRP
Cyt c552 -----DAKKVKG-----FKP
      * * * * *

```

```

NarC  LTKEEATALAAFLVQVSQEAPRPSSLYVGRFLVAGLVVLALLLLYQAVLW
Cyt c552 FTAEVVKKLRAKKLTP-----
      : * * * . . * * :

```

```

NarC  QLRPRSLAERIRAQLRR
Cyt c552 ---QQVLAERKKLGLK-
      : * * * * : * :

```

motivo de coordinación de hemo
 sitio específico de corte de la SPasa

operones *nrc* y *dnr*

Pnrc ↓ 1 accccggtcattg

13 gaccgcgcccggcctcgccccaccctgggagggtggagggtgaagg

58 atgccgcacgtgatctgcgagccctgcatcggcgtgaaggaccgg
M P H V I C E P C I G V K D R

103 agttgccaggagggtctgcccgggtggagtgcattctacgacgccggg
S C Q E V C P V E C I Y D A G

nrcD 148 gagcagctttacatccaccccgacgagtgcaattgactgcccggcc
E Q L Y I H P D E C I D C G A

193 tgcgtgcccgttgcccgggtgaacgccatctaccccaggaggat
C V P A C P V N A I Y P E E D

238 gtccccgagcagtgggcggtttacatagaaaagaaccgcacctgg
V P E Q W R I Y I E K N R T W

283 gccaaaaccctgccaacgtccacgtgctggaggagtagg 322
A Q T L P N V H V L E E *

323 atggccttgccctcgggectgggtggagggtccgccaagagggtg
M A L P S G L V V E V R Q E V

369 cccttccctgccaagggtggcctttaccctcatcagcctggcctcc
P F L P K V A F T L I S L A S

414 ttgctgggggggatctttaccggcctgcacctgggcttgccccg
L L G A I F T G L H L G L A P

459 gcatggctcgctgtgctgctggctcctcctctggctttgctgctg
A W L A V R W L L L W L C A L

504 gccttgggggttgccgcttgccggggccttctacctccgcaaggag
A L G F A A W R A F Y L R K E

549 ccggatctaccggaggcctcgggggttttgaggaggaagggcgg
P D L P E A S G F L E E E G R

594 gtctggggcccacctggcccggaggctcgcttgcccctggccctc
V W A H L A R R L A W P L A L

639 acggccccctttccctttcttctgctatctgggcccgtataaaa
T A P L S L F F A Y L G G L K

684 ggccccctcttcccttgccaccctgcttcttgccggcggcctgtgg
G P L F L G T L L L A A A L W

729 gcgggatggcccggggccttgcctcggccctgggctcttc
A G W P R A A F A S A L G L F

774 ctctctgggctgggcccacacccctaccccggaagggttcctc
L L W A W A D T L T P E G F L

nrcE 819 ctacgggcttcaactttctgcctttggcctctggctcgggtggg
L R A L H F L A F G L W L G G

864 gcgcttttaacctcgggggtcaacgtgcccgtgggtatgcgtcac
A L F N L G V N V P V G M R H

909 cccaggtgcccggcgtggtggcggggccaggcagctggaacgc
P Q V P A V V A G A R Q L E R

954 ttccgctgggtggtgctttctccctgcccacggtactcctcacc
F R W V V R F S L P T V L L T

999 ggctggggatggcctggcctaccgcttcccttcccgaacttc
G L G M A L A Y R L P L P D F

1044 cttgcctttcccttgcctcattcccttgaagctcttctgctt
L A F P F A L I P L K L F L L

1089 ctggcctcgtgggtcatcttcatcactgccccctctaccggcag
L G L V V I F I T C P L Y R Q

1134 tgcctccccgggtgaaggggtgtgcgcctcgaggacctccgcgtc
C S P V K G V C R L E D L R V

1179 cgccgctccgcgcctggacaaccgcgtaccccgtgcccctg
R P L R R L D N R R T P C A L

1224 ggctgatccgggccacggaggccatgggggaactgccctcgggg
G L I R A T E A M A E L P S G

nrcF

1269 gcggtgctggagctcctttccaaggacgtctacgccccctacgag
 A V L E L L S K D V Y A P Y E
 1314 gtccccgcctgggaggcaagtaacggtaccggatcctcaaacac
 V P A W A G K Y G Y R I L K H
 1359 gaacaaagggggtttttcccttccggtaccaccggtttctggtg
 E Q R G V F P F R Y H R F L V
 1404 gagaagccatga 1414
 E K P *
 1411 atgagggtggttttgagatccggcggcaggcggcgccct
 E A M R V V L E I R R Q A A P
 1450 ggggggccttcccgtgggcgctacgttctagaggcctctcct
 G G P S R W A R Y V L E A S P
 1495 agggagcgggtcttgacctcctcttgcgggtgaagccgaggag
 R E R V L D L L L R V K A E E
 1540 gacgggagcctggcctttcgtactcctgcccaggggcgtctgc
 D G S L A F R Y S C G Q G V C
 1585 ggctccgagccctcaccatcaacggccgcaaccggctggcctgc
 G S D A L T I N G R N R L A C
 1630 aagacgctgtaaaaggacgtgggcccctgggtccgctggagccc
 K T L V K D V G P W V R V E P
 1675 ctgaagaccttcaggccgctcaaggacctcattgtggacatggag
 L K T F R P L K D L I V D M E
 1720 cccttcttgcgcctaccggcgggtgaagccctacctcatcaac
 P F F A A Y R A V K P Y L I N
 1765 cccgagccccacctgagcgggagaggttacaagccccgaggag
 P E P P P E R E R L Q S P E E
 1810 cggcgctgctacgaggaagccaccgggtgcatectttgcggcgc
 R A C Y E E A T R C I L C G A
 1855 Tgcac-tcgagctgccccgtctactgggtgaacggcgctacatc
 C T S S C P V Y W V N G R Y I
 1900 ggtccggcggccatcgtgcaggcgcaccgcttcttttgattcc
 G P A A I V Q A H R F L F D S
 1945 cgggatctggggcggaggagcggcttgcggatggcttgggggg
 R D L G A E E R L A G W L G G
 1990 cggagtggggttggcgggtgccgaacgccacaaactgcaccgag
 R S G V W R C R N A H N C T E
 2035 gcctgccctcgggggattgacgtgaaccggctcatcaccgaggtc
 A C P R G I D V N R L I T E V
 2080 aagcggagatcctggaggagccttctga 2109
 K R R I L E E A F *

nrcN

2110 ctctgaggggtgcgacagggtaggatgcggaagaaggc 2149
 2150 atggcggggccttgccagaggtgtaatcctggcggaggcttt
 M G G A W P E V V I L G G F
 2195 gcgggcttgccgcgcccgggttctgaaagggcggattccc
 A G L A A A R V L E R A R I P
 2240 tacctcttggtagcggcgaaccaccacctgttcagccgctc
 Y L L V D A R N H H L F Q P L
 2285 ctctaccaggtggccacggccttctggaggggcggccatgcc
 L Y Q V A T G F L E G P A I A
 2330 taccocctgcgggccttggcggcggggcgggtgcttctcgcc
 Y P L R A L V R R G R V L L A
 2375 cggcggcggcgggtggacctcgaggccgaaggctcctcctggag
 R A R A V D L E G R R L L L E
 2420 gacgggatgttcttccctaccgccacctcgtcgtggccaccgga
 D G D V L P Y R H L V V A T G
 2465 agcctcccagcgatctaggggtgccgggggtgggggagcagcc
 S L P S D L G V P G V G E R A
 2510 ctctgctcaagaccctaggccaggcccttaggggtgcggcaccgc
 L L L K T L G Q A L R V R H R

nrcN

```

2555 ctctcatggcgctggagcgggcccgcgagagggggcccccttg
    L L M A L E R A A R E G A P L
2600 agcctggtggtggtggcgggggctaccgggtggagctctcc
    S L V V V G G G P T G V E L S
2645 ggagctttagccgagttcctgcgctacgccctgcccgggacttc
    G A L A E F L R Y A L P R D F
2690 cccgagattcccgaagcccgggtggtccttctggaggcggggccc
    P E I P E A R V V L L E A G P
2735 aggctccttcccgccttccgcccgccttcccggttacgccgag
    R L L P A F R P A L S R Y A E
2780 cgggccctcgcgcacctgggggtgaggtcgccttggggcccaa
    R A L A H L G V E V R L G A Q
2825 gtggcggcggtggaggaaaggggggtgcggttggcctcgggcgaa
    V A A V E E R G V R L A S G E
2870 gggcttggtgggtacctcattctctggcggtggcggtgaggggc
    G L V G Y L I L W A V G V R G
2915 aaccccttgccggggttcccgcggacccccggggccgggtgcc
    N P L P G L P A D P R G R V P
2960 acggaccctatctacgcctcccggccaccccgaggtctacgtg
    T D P Y L R L P G H P E V Y V
3005 gaggcgcacctcaacgggctcggcttctcagcttgccccgtg
    E G D L N G L G F P Q L A P V
3050 gcccctgcaagtagggggcctggcgcgggtaacctctcagggcc
    A L Q Q G A W A A G N L L R A
3095 ctaaggggccaggacccctgccttccgctaccgcgaccggggc
    L R G Q D P L P F R Y R D R G
3140 cagcttgcggtgatcgccggaaccggcggtggccgagctttgg
    Q L A V I G R N R A V A E L W
3185 ggccggggttctcgtgggttcccgcctggctcctctgggccttc
    G R G F A G F P A W L L W A F
3230 gtgcaccttagagagctcgtgggttccgcaaccgcctcttggtc
    V H L R E L V G F R N R L L V
3275 ttttgactgggcctacacctcttccgagcccgggggtg
    F L D W A Y T Y L F R E P G V
3320 cgggtcctgcccgaactag 3337
    R V L P D *

```

 sitio de inserción del *kat* para cada mutante

narC

1 agggctaagggtaggagccttctcgccatcctca
 tcccgattcccacctcctcggaagagcgta
 A L P L L R R A M

35 cctccggccccagtggtgcccgggctcctcgcgcccactggcaag

80 ccccgggacatctgtcctaccggaacccccctaggctgagggcgg

Pnar

125 atggaagccctggcgcggatccgccttgacgggtcaaggcctcgtg

170 cgggaggtagaggccgaagcctcctggggtttcgcgcccggggc

215 gtgccttgcgcccacctgggtccagggaaaggaccccttcggccgg

260 ccgctttgcgcccgggtgcccggcgctccgggagctgaagcggggc

305 gcctaccgcgccagcacgccccctcgtggtgaacggggcgcaggctc

Pdnr

350 cgggtccaggcctaccgggagggggaagggttcttggtggagctc

395 taccocgagcggaccaaggggcccgcacctcctgcgggaagcctcc

440 tacctcaccagcacctgctccggcaccggaggccttcgccc

485 ggagtccaggacttctcctcgggcccctcggggaggccctcgcctatg
 M

530 gaggcggcggagctcttctcgcgcgaccctgagggacggcacctc
 E A A E L F L A D P E G R H L

575 ttctcaccgcttacgacggccccccaccgggagggccttctctggaa
 F L T A Y D G P H R E A F L E

620 aggccttggttcgcccctgggaggggctaccgggggatcgtggcc
 R P W F A L G E G Y P G I V A

665 ctgagggcgcgagccccctttcccccacgccttgagcaagacccc
 L R R E P L F T H A L E Q D P

710 cgctacctcagggagcgggtcaaggccctggggatccggacctac
 R Y L R E R V K A L G Y R T Y

755 gtctgcttccccttgagctccccacggcctcctcggcgctc
 V C F P L E L P H G L I G V L

dnrS

800 aacctcgcctcccgcgacccccgagggcgaccacggggcggctcctc
 N L A S R D P E A D H G A V L

845 gaggccctgggcccacctcggccccctcctcgcgcgccacctctat
 E A L G H L G P L L A A T L Y

890 accgtcctcaccgcctggggcagaccgggtctcgcgccccctgggg
 T V L T R L G E T G L E P L G

935 accgcccctgtggcggccagggcagcggaggccacggaaaggttc
 T A L W R G Q A T E A T E R F

980 ctggccgaggtgcgcggttctcccaggccacgggggcccggatc
 L A E V R R F S Q A T G A R I

1025 gtggggcggggcggcgccgcgcccagctgggctggctcccggccc
 V G R G G R R A E L G W L P P

1070 tgcgggatgcgggactgccccgcctggcggggccaggtggtgggc
 C G M R D C P A W R G Q V V G

1115 ctgaagacgggcctgcccactgcccggaggccgagggccgcccc
 L K T G L P D C P E A E G R P

1160 cgcactgcctgccccctctgggcccacggggaggtggtggccgtg
 R I C L P L W A H G E V V A V

1205 gggatgctcttccacgcccgccccccaagccccccaccgcccc
 G M L F H A R P P K P P T A P

1250 gcgcccccgctgctctggttctcccgcctcgcggttccccctcctc
 A A P V L W F S R L A V P L L

1295 ttccccaaggagggcggagggggaaggaggccccggagctcagaggtg

dnrS

F P K E A E G K E A P E L E V
 1340 tacgccctcgggggcttccgggtgcgctaccgggggaggagctc
 Y A L G G F R V R Y R G R E L
 1385 ggccccgggacttcggaaggcggggggcctaccagctcttcaag
 G P R D F G R R G A Y Q L F K
 1430 ttctcctcgccaacaaggaccgggcatctacctggaggagctc
 F L L A N K D R A I Y L E E L
 1475 gccgagaccttcttccccgagcttccccccgagcgggcccggcag
 A E T F F P E L P P E R A R Q
 1520 gaggtctacacctgggtctaaccggctgaggaagaccttccccggg
 E V Y T W S N R L R K T L P G
 1565 atcgtggagcgggaggggcctactaccggctccacctccccgaa
 I V E R E G A Y Y R L H L P E
 1610 aagcgttctctggactttgagcgttttgaggagctcatgcgcaa
 K R F L D F E R F E E L M R K
 1655 gccgacctggaggaggggcttccgccttcaagacctccgccag
 A D L E E G L S A F K T L R Q
 1700 gccctggagctttacaaaggccccctcttcggcgacgaccttac
 A L E L Y K G P L F G D D P Y
 1745 ggggagtgggcggaggcggaaaaagcctacctgcagcagcggggcc
 G E W A E A E K A Y L Q E R A
 1790 ctctccggcctgctgcgcctaggggacctagccgaggccctgggt
 L S G L L R L G D L A E A L G
 1835 tacaaggaagtggccaaggaagcttacgccccgcgacctgaggctc
 Y K E V A K E A Y A R A L R L
 1880 gagcccttctctggaggagctcgcgccccgctcctcgccctaagg
 E P F L E E A R A R L L A L R
 1925 gggtgaggcc 1934
 G *

dnrT

1935 gtggagctcgcccaggtgcccccttctccgacctcgccccggag
 V E L A Q V P L F R D L A P E
 1980 gacctcgaggccctggaaagggcgcgccagcggcctccttggc
 D L E A L E R A A Q R R L L G
 2025 aagggcgaggtccttctctggagggggagcccgtccggccctc
 K G E V L F L E G E P V R A L
 2070 ttctgtgtgaaaaggggctcatcaaggtctacaagctggacct
 F V V K R G L I K V Y K L D P
 2115 gagggcgcaagcaggtggtcctccacgtggaagccccggggagg
 E G R K Q V V L H V E G P G R
 2160 gtctcgcggaggtagcccttctctggagcggccccacctaccg
 V L A E V A L F L E R P T Y P
 2205 gcgagcggcggccttggaggaaagcaggtcctggccatcccc
 A S A E A L E E S E V L A I P
 2250 aaggagcgttcttccagctcctggagggtgaggccccagctcgcc
 K E R F F Q L L E V R P Q L A
 2295 cgcagcctgatccgctacctcgcccgaaggcaggagaggcttctc
 R S L I R Y L A R R Q E R L L
 2340 cacctcctggaccgctggtcttccacgaggtgcgggagaggctc
 H L L D R L V F H E V R E R L
 2385 tgcgagttcctcctggaaaggctcgccgaagagggcagggtctc
 C E F L L E R L A E E G Q G F
 2430 cgcctccccaccaacccccgagctcgccgcccccttgggcaagggt
 R L P T N P E L A A L L G T V
 2475 cccgaggcgggtgtcccgaacctgggggagcttaccgccccgggc
 P E A V S R N L G E L Y R R G
 2520 ctcatccgcttgcgggaaggcgggtggagggtccccgacccccgag
 L I R L A G R R V E V P D P E
 2565 gccttgaggccttgatccgctaa
 A L R A L I R *

Promotores

Promotor *Pnar* (790 bp)

	CGCGGGAGGC	GAGGTTGAGG	ACGCCGATGA	GGCCGTGGGG	GAGCTCCAAG
	GGGAAGCAGA	CGTAGGTCCG	<u>GTACCC</u> CAGG	GCCTTGACCC	GCTCCCTGAG
			KpnI		
	GTAGCGGGG	TCTTGCTCCA	GGGCGTGGGT	GAAAAGGGGC	TCGCGCCTCA
	GGGCCACGAT	CCCCGGGTAG	CTCCTCGCCC	AGGGCGAACC	AGGGCCTTTC
	CAGGAAGGCC	TCCCGGTGGG	GGCCGTCGTA	AGCCGTTGAGG	AAGAGGTGCC
	GTCCCTCAGG	GTCGGCGAGG	AAGAGCTCCG	CCGCCTCCAT	<u>GCGAGGGCC</u>
				NcoI	
	TCCCGGAGGG	CCCGGAGGAA	GTCCTGGACT	CCTTGGGCGA	AGGCCTCCGG
	GTGCCGAGC	AGGTGCTGGG	TGAGGTAGGA	GGCTTCCCGC	AGGAGGTCCG
	GCCCCTTGGT	CCGCTCGGGG	TAGAGCTCCA	CCAAGAACC	TCCCCCTCC
	CGGTAGGCCT	GGCACC GGAG	CCTGCGCCCG	TTCACCACGA	GGGGCGTGCT
	GGCGCGGTAG	GCGCCCCGCT	TCAGCTCCCG	GAGCGCCGGG	CACCGGGCGC
<i>Pnar</i>	AAAGCGGCCG	GCCGAAGGGG	TCCTTTCCCT	GGACCAGGTG	GCGCAGGGC
	ACGCCCGCGG	CGCGAAACC	CAGGGAGGCT	TCGGCCTCTA	CCTCCCGCAC
	GAGGCCTTGA	CCGTCAAGGC	GGATCCGCGC	CAGGGCTTCC	ATCCGCCCTC
		-35	BamHI		mRNA
	AGCCTAGGGG	GTTTCCGGTA	GGACAGATGT	CCCGGGGCTT	GCCAGTGGGC
GCGAGGAGGC	CCGGGCACAC	TGGGGCCGGA	GGTGAGGATG	GCG	
				<i>narC</i>	

Promotor *Pnrc* (648pb)

	CCCGCCGCGC	TTAATGCGCC	GCTACAGGGC	GCGTCCATTC	GCCATTCAGG
	GATCCGCTAC	CTAGAAGAGG	GGTTGAGGCG	GGGGGGATCT	CCCGGGCCTA
			BamHI		
	GGCCCCTGCC	GCGGGTCCCC	GAGGCTGGGC	GGCGCATCCC	CGTTCGCACC
	CACGAGGAGC	TTTGGGCTCT	TCTGGAGGAC	GAGGGTGGAC	CTGCTGGACC
	TTAACGTCTG	GTTTGCCCTC	TTGGTGCCCG	AGCACCCCTT	CCACCCCGG
	GCCCCGGCTT	ACTGGGAGAG	GGCTTCCGAT	CCCTTCCTGG	TCCGGGTAC
	GGCCTTGGGC	CTCCTCCGCC	TCTTGACAAA	CGCCAAGGCC	<u>ATGGACGGCA</u>
				NcoI	
	AGCCCTTGGG	GGTAGGGGAG	GCCTGGAAAG	TCTATTGGGA	GCTCCGCTTG
	AGCTCGGGAG	TCCCGCTTTT	AGAAGAGCCC	GAGGGCCTGG	ACGAGGTCTT
<i>Pnrc</i>	GGCCGACCTG	GTCCGCGGAG	GGTTTTCTCC	CCGGCTTTGG	ACGGACGCCT
	ACCTGGCGGC	CTTCGCCCTG	GCGGGGGGCC	ACCGCCTGGT	GACCTTTGAC
	CAGGACTTTC	TGGGCTTTCC	CGGACTGGAG	GTCCTTCACC	<u>TACTCCTTG</u>
	ACCCCGGTCA	TGGACCGCGC	CCGGCCTCGC	CCCCACCCTG	<u>GGAGGTGGAG</u>
		-35			mRNA
	GTGAAGGATG	CCGCACGTGA	TCTGCGAGCC	CTGCATCGGC	GTGAAGGACC
	GGAGTTGCCA	GGAGGTCTGC	CCGGTGGAGT	GCATCTACGA	CGCCGGGGAG
	CAGCTTTACA	TCCACCCCGA	CGAGTGCATT	GACTGCGGGG	CCTGCGTGCC
	CGCTTGCCCG	GTGAACGCCA	TCTACCCCGA	GGAGGATGTC	CCCGAGCAGT
	GGCGGATTTA	CATAGAAAAG	AACCGCACCT	GGGCCCAAAC	CCTGCCCAAC
	GTCCACGTGC	TGGAGGAGTA	GGATGGCCTT	GCCCTCGGGC	CTGGTGGTGG
	AGTCCGCCA	AGAGGTGCC	TTC		<i>nrcF</i>

Promotor *Pdnr* (252pb)

CCGGCGCTCC GGGAGCTGAA GCGGGGCGCC TACCGCGCCA GCACGCCCT
 CGTGGTGAAC GGGCGCAGGC TCCGGTGCCA GGCCTACCGG GAGGGGAAG
 GTTCTTGGT GGAGCTCTAC CCCGAGCGGA CCAAGGGGCC CGACCTCTG
 CGGGAAGCCT CCTACCTCAC CCAGCACCTG CTCCGGCACC CGGAGGCCTT
 CGCCCAAGGA GTCCAGGACT TCCTCCGGGC CCTCCGGAG GCCCTCGCCA
 TG
 →
dnrS

Promotor *Pfbc* (361pb)

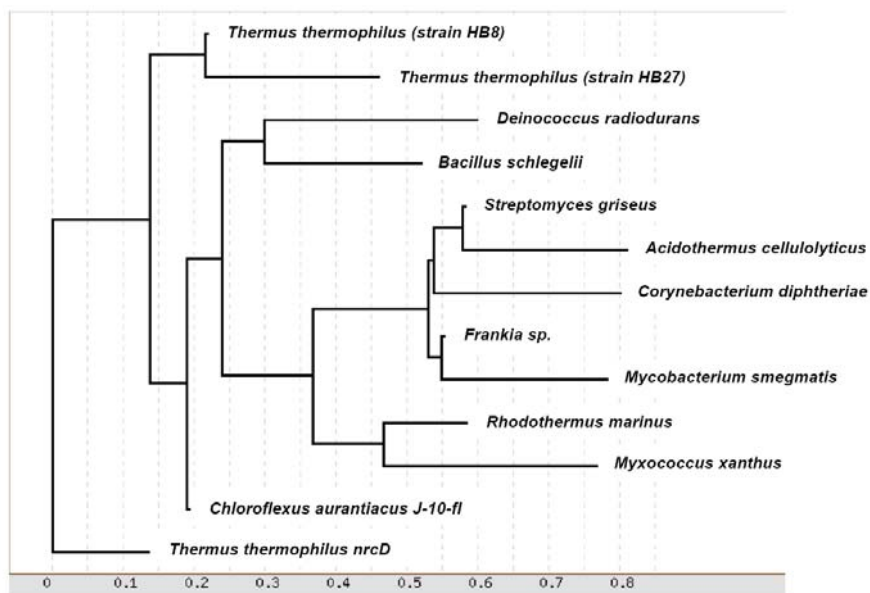
GGGTTCTGCC TGGACGTGGG GCACGCCCTG GTGGAGCTCG GGCCCAAGGG
 GCCTTTCGCG TACCTCGAGG CCCTGGGGGA CCGGCTTCTC CACCTCCACC
 TCCACGACAA CCACGGGCGG CGGGACGACC ACCTCCCCGT GGGCTCGGGG
 CGCGTCCCCT GGGAGGGGCT TGCCCCCTTC CTCCGGGGGT TTTCCGGCAC
 GGCCGCCTTG GAGGTGGTGG GCGGCCCGA GGGGGTGCGG CGGAGCGTGG
 AGCGGCTTGC CGCCCTCTC GCCCGTGAC GGGACATCTG TCCTTGGCCG
 AGGGGTCTGTA TAGTGGTGAG GTGGGTCTT GCGCCCCTT TCACGAGAGG
 GAGGCGAGAT G
 →
fbcC

Promotor *Pnqo* (451pb)

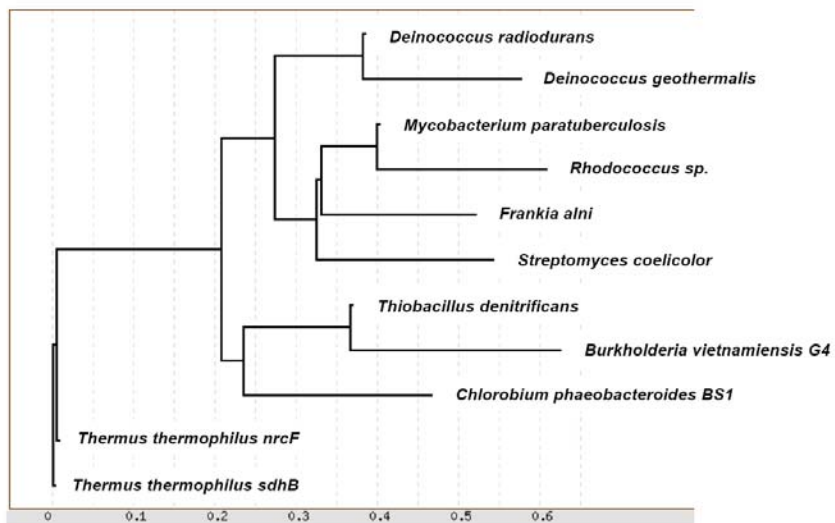
GGCTCTTGA CCTCCCTCCA GGGGCCTTCT TTCCCCGCC CAAGGTGTGG
 AGCAGCCTGG TGCGCCTTAC CCCACGGGC GCCCGGACG ACCCCGGCCT
 CTTCCGCTC GTTGAGGCCG CCTTCGAAA GCGGCGAAA ACGCTTTTAA
 ACGCCCTGGC CGCGGCCGGC TACCCAAGG CGCGGGTGA GGAGGCCCTG
 AGGGCCTTGG GCCTTCCCC TAGGGTGCGG GCCGAGGAGC TGGACCTCGA
 GGCCTTCGC CGGCTGAGGG AGGGCCTCGA GGGGGCGGTG TAGGCCCGCC
 TCCCTTCCCT ACACCGTCCC TTCTCCTTCT GTGTAGCCA CCCCCCTTGC
 GCCCCACCC GGGGTGATAA GATGGGCGG AAATGAGGCC GGCCCTTTG
 GGGCTTTGGG GACCGTTTC GTGAAGAAAG GCACGAAAGG AGGGGACCTT
 G
 →
nqoA

naranja: RBS
 azul: caja -35 y -10
 rojo: triplete iniciador
 subrayado: secuencia protegida por DnrT
 → : Inicio de la transcripción (+1)
mRNA

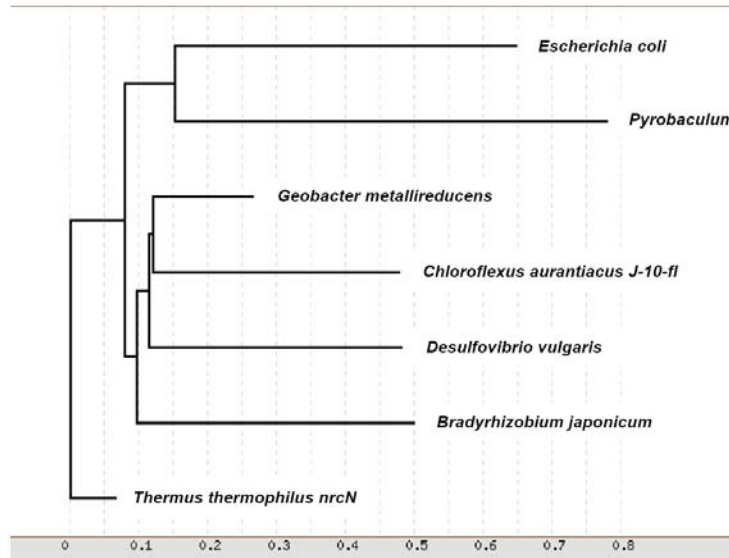
Origen del elemento NCE, NrcD



Origen del elemento NCE, NrcF



Origen del elemento NCE, NrcN



Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., and Berenguer, J. (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **279**: 45369-45378.

Zafra, O., **Cava, F.**, Blasco, F., Magalon, A., and Berenguer, J. (2005) Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **187**: 3990-3996.

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.

Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafl, 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.

Trabajos a publicar y en preparación:

Cava, F., Zafra, O., da Costa, M. S., and Berenguer, J. (2007) The role of the nitrate respiration element (NCE) of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. Enviado a *Environ. Microbiol.*

Cava, F., and Berenguer, J. Implication of the NarC cytochrome C subunit of the nitrate reductase from *Thermus thermophilus* as electron transporter to the denitrification apparatus. En preparación.

A New Type of NADH Dehydrogenase Specific for Nitrate Respiration in the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus**

Received for publication, April 29, 2004, and in revised form, July 7, 2004
Published, JBC Papers in Press, July 28, 2004, DOI 10.1074/jbc.M404785200

Felipe Cava^{‡§}, Olga Zafra[‡], Axel Magalon[¶], Francis Blasco[¶], and J. Berenguer^{‡||}

From the [‡]Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain and the [¶]Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 chemin J. Aiguier, 13402 Marseille, Cedex 09, France

A four-gene operon (*nrcDEFN*) was identified within a conjugative element that allows *Thermus thermophilus* to use nitrate as an electron acceptor. Three of them encode homologues to components of bacterial respiratory chains: NrcD to ferredoxins; NrcF to iron-sulfur-containing subunits of succinate-quinone oxidoreductase (SQR); and NrcN to type-II NADH dehydrogenases (NDHs). The fourth gene, *nrcE*, encodes a membrane protein with no homologues in the protein data bank. Nitrate reduction with NADH was catalyzed by membrane fractions of the wild type strain, but was severely impaired in *nrc::kat* insertion mutants. A fusion to a thermophilic reporter gene was used for the first time in *Thermus* spp. to show that expression of *nrc* required the presence of nitrate and anoxic conditions. Therefore, a role for the *nrc* products as a new type of membrane NDH specific for nitrate respiration was deduced. Consistent with this, *nrc::kat* mutants grew more slowly than the wild type strain under anaerobic conditions, but not in the presence of oxygen. The oligomeric structure of this Nrc-NDH was deduced from the analysis of insertion mutants and a two-hybrid bacterial system. Attachment to the membrane of NrcD, NrcF, and NrcN was dependent on NrcE, whose cytoplasmic C terminus interacts with the three proteins. Interactions were also detected between NrcN and NrcF. Inactivation of *nrcF* produced solubilization of NrcN, but not of NrcD. These data lead us to conclude that the Nrc proteins form a distinct third type of bacterial respiratory NDH.

Many facultative anaerobes adapt their respiratory electron-transport chains to changing environmental conditions by synthesizing specific primary dehydrogenases and final reductases (or oxidases) (1). As a paradigmatic example, *Escherichia coli* encodes up to 15 primary dehydrogenases and 10 final reductases, many of which appear to be biochemically redundant (2). However, these enzymes actually show differences, such as substrate affinity, or the ability to couple electron transport to proton or sodium extrusion (3), which are adapted to specific growth conditions. Therefore, there is a sophisticated regulatory network of transcriptional controls that finely tunes their

expression according to environmental signals and leads to the coexistence of a limited number of dehydrogenase-reductase pairs in a given cell. Regulatory elements responding to dioxygen and to diverse electron acceptors are the major environmental factors responsible for such transcriptional tuning, allowing a hierarchical expression of final reductases and, in some cases, appropriate dehydrogenase(s), even when different electron acceptors are simultaneously present (3).

Two types of NADH dehydrogenases (NDHs)¹ can function as the first component of respiratory chains in *E. coli* and other Enterobacteria. Type I NDH is a H⁺-translocating NADH:quinone reductase, homologous to the 42-subunit mitochondrial respiratory complex I (4). In *E. coli*, this enzyme consists of 14 subunits and a large number of prosthetic groups and redox centers (5). These 14 subunits are cotranscribed in a single mRNA, which is preferentially expressed under “energy-limited” growth conditions (anaerobic or microaerophilic) to provide a higher H⁺/e⁻ ratio. Under aerobic conditions with highly reduced substrates (“high energy”), an alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase, or type II NDH, plays the main role in supplying electrons to the respiratory chain. With the exception of the mitochondria from certain yeast and fungi, type II NDH homologues are absent from eukaryotes. Type II NDHs are monomeric enzymes (47 kDa) that do not couple NADH oxidation to proton pumping, thus keeping a lower H⁺/e⁻ ratio under high energy growth conditions. Functionally, these enzymes are peripheral membrane proteins containing FAD as a cofactor, which can feed the electron transport chains by direct reduction of the quinone pool (5).

Most isolates of the ancient thermophilic bacteria *Thermus* spp. require oxygen to grow (6), despite the presence in their genome of genes encoding homologues to proteins involved in the anaerobic energy metabolism of other bacteria. In the recently sequenced HB27 strain of the aerobe *Thermus thermophilus*, a single type I NDH and a succinate dehydrogenase seem to be the major electron providers for respiratory chains toward either low (*caa3*) or high (*baa3*) affinity cytochrome *c* oxidases (7).

By contrast with the aerobic character of the HB27 strain, the closely related isolate *T. thermophilus* HB8 can grow anaerobically with nitrate as the electron acceptor (8). Such dissimilative nitrate reduction ends with nitrite as the final product, and depends on the presence of a seven-gene operon (*narCGHJK₂*), which encodes a respiratory nitrate reductase (NarGHI), a dedicated chaperone (NarJ), two proteins

* This work was supported in part by project BIO2001-1627 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and an institutional grant from the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-4978099; Fax: 34-91-4978087; E-mail: jberenguer@cbm.uam.es.

¹ The abbreviations used are: NDH, NADH dehydrogenases; kbp, kilobase pair; NR, nitrate reductase; RT, reverse transcriptase; SQR, succinate-quinone oxidoreductase; HQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide.

TABLE I
Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Ref. or source
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZM15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	14
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ cI ^s 857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	36
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁺ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (Str ^R), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	23
<i>T. thermophilus</i> HB8	Wild type strain, facultative anaerobe.	ATCC 27634
<i>T. thermophilus</i> HB27c	HB27 exconjugant derivative, HB27 Cm ^R :: <i>nar</i>	11
<i>T. thermophilus</i> HB27	Wild type strain, strict aerobe.	Dr. Koyama
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcF</i>	HB8 <i>nrcF</i> :: <i>kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcN</i>	HB8 <i>nrcN</i> :: <i>kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrc/bgaA</i>	HB8 <i>nrcN</i> :: <i>bgaA</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcE</i>	HB8 <i>nrcE</i> :: <i>kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcF</i> Cm ^R	HB8 <i>nrcF</i> :: <i>kat</i> Cm ^R	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcN</i> Cam ^R	HB8 <i>nrcN</i> :: <i>kat</i> Cm ^R	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrc/bgaA</i> Cm ^R	HB8 <i>nrcN</i> :: <i>bgaA</i> Cm ^R	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>nrcE</i> Cm ^R	HB8 <i>nrcE</i> :: <i>kat</i> Cm ^R	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>gdh</i>	HB8 <i>gdh</i> :: <i>kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8 <i>gdh</i> Cm ^R	HB8 <i>gdh</i> :: <i>kat</i> Cm ^R	This work
pET22b	<i>E. coli</i> expression plasmid. Amp ^R	Novagen ^R
pUC118/119	<i>E. coli</i> cloning plasmids. Amp ^R	37
pUP3B	pUC119 derivative. Gene library clone carrying the whole <i>nrc</i> operon. Amp ^R	This work
pKT1	<i>E. coli</i> plasmid carrying the kanamycin thermostable resistance gene (<i>kat</i>). Amp ^R , Kan ^R	18
pK18	pUC18 derivative Kan ^R . Ampicillin resistance gene replaced by the kanamycin thermostable resistance gene	This work
pRBS β gal	pUC119 derivative containing the <i>bgaA</i> gene preceded by the Shine-Dalgarno sequence of the <i>slpA</i> gene of <i>T. thermophilus</i> HB8	This work
pKUPRBS β gal	pK18 derivative, <i>nrcDEFN-lacZ</i> transcriptional fusion, Kan ^R	This work
pT18	pUC19 derivative expressing T18 fragment of <i>CyaA</i> , Amp ^R	23
pT25	pACYC184 derivative expressing T25 fragment of <i>Cya</i> , Cm ^R	23
pT18zip	pT18, leucine zipper fused to T18 fragment (225–399 aa of <i>CyaA</i>)	23
pT25zip	pT25, leucine zipper fused to T25 fragment (1–224 aa of <i>CyaA</i>)	23
pET22 <i>nrcD</i>	pET22b derivative, <i>NrcD</i> overexpression, Amp ^R	This work
pT18 <i>nrcD</i>	pT18 derivative, <i>NrcD</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>nrcD</i>	pT25 derivative, T25- <i>NrcD</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>nrcE</i>	pT18 derivative, <i>NrcE</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>nrcE</i>	pT25 derivative, T25- <i>NrcE</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18c- <i>nrcE</i>	pT18 derivative, c- <i>NrcE</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25c- <i>nrcE</i>	pT25 derivative, T25-c- <i>NrcE</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>nrcF</i>	pT18 derivative <i>NrcF</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>nrcF</i>	pT25 derivative, T25- <i>NrcF</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>nrcN</i>	pT18 derivative, <i>NrcN</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>nrcN</i>	pT25 derivative, T25- <i>NrcN</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>narG</i>	pT18 derivative, <i>NarG</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>narG</i>	pT25 derivative, T25- <i>NarG</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>narJ</i>	pT18 derivative, <i>NarJ</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>narJ</i>	pT25 derivative, T25- <i>NarJ</i> fusion protein, Cm ^R	This work
pT18 <i>gdh</i>	pT18 derivative, <i>Gdh</i> -T18 fusion protein, Amp ^R	This work
pT25 <i>gdh</i>	pT25 derivative, T25- <i>Gdh</i> fusion protein, Cm ^R	This work

involved in nitrate/nitrite transport (NarK₁, NarK₂), and a di-heme cytochrome *c* (NarC), which is required for the synthesis of active enzyme (9, 10). The *nar* operon is actually encoded as part of a genetic element that could be transferred by conjugation to the aerobic strain HB27, allowing the exconjugant (HB27::*nar*) to grow anaerobically (11). Pulse-field gel electrophoresis revealed that a DNA fragment with a minimum size of 30 kbp was transferred from the chromosome of the donor strain (HB8) to that of the receptor (HB27) during conjugation. As the size of the *nar* operon (~12 kbp) was around a third of this, it seemed likely that genes related to regulation and/or the use of nitrate as an electron acceptor could also be encoded within this mobile DNA element. Therefore, we wondered whether anaerobically expressed genes could also form part of this element to render the receptor cells optimally suited for anaerobic growth.

In this work we describe the presence of a four-gene operon (*nrcDEFN*) within this mobile DNA element that confers on the receptor cells the ability to grow anaerobically. We demonstrate that the *nrc* operon encodes a dedicated new type of primary dehydrogenase that is synthesized in parallel with the nitrate reductase (NR), leading to a complete respiratory chain with nitrate as the final electron acceptor. We present evidence to support the hypothesis that the *nrc* operon makes the organism capable of a more efficient anaerobic growth by using nitrate as an electron acceptor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Plasmids, and Growth Conditions—Table I sets out the details of the description and origin of the bacterial strains and plasmids used in this work. *E. coli* was grown in LB (12) at 37 or 30 °C. Kanamycin (30 mg/liter), ampicillin (100 mg/liter), and/or chloramphenicol (20 mg/liter) were used as required. Aerobic growth of *T. thermophilus* was conducted at 70 °C with shaking (150 rpm) in TB (8). For plasmid and mutant selection, kanamycin (30 mg/liter) was added. For anaerobic growth, cells grown under aerobic conditions were inoculated in 10-ml cultures of TB with KNO₃ (40 mM), and subsequently incubated in 15-ml tubes filled to the top with mineral oil and screw-capped.

For induction of nitrate/anoxia-dependent promoters, cells were grown aerobically in TB without nitrate up to an A₅₅₀ of 0.4, and transcription was activated by the addition of KNO₃ (40 mM) and the simultaneous cessation of shaking. Because of the low solubility of oxygen at high temperatures, and its consumption by growing bacteria, unshaken cultures rapidly become anaerobic. Cells were kept in such conditions for 4–7 h before being processed.

T. thermophilus transformation was achieved on naturally competent cells (13). Transformation of *E. coli* was carried out as described (14). Plates containing the appropriate antibiotic(s) and concentrations were used for selection.

Nucleic Acid Techniques—DNA isolation, plasmid purification, restriction analysis, and plasmid construction were developed as described (15). Automatic methods (Applied Biosystems) were used for sequencing. RNA was purified with the Tri-Reagent-Is kit (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH). PCR and RT-PCR of the experiment shown in Fig. 3 were performed with the DNA polymerase from *T. thermophilus*, and the Retrotools kit as described by the manufac-

TABLE II
Oligonucleotides used

Restriction sites included in the sequence of the primers are also indicated.

Name	Sequence (5'-3')	Purpose
ferred.ndeI	ggtgacatatgccgcacgt	pET22nrcD, RT-PCR
ferreda.rev	ctactcctccagcagct	pET22nrcD, RT-PCR
Orf F.dir	ggaggacatatgaggggtg	RT-PCR
Orf F.rev	tcagaaggcctcctcca	RT-PCR
Orf N.dir	gaacatatggggcgggctt	RT-PCR
Orf N.rev	ctagtcgggcaggaccgc	RT-PCR
gdh1.ndeI	ctagtcgggcaggaccgc	PCR
gdh1.not	ctagtcgggcaggaccgc	PCR
csaF2	gatgtgggcgagaagcc	PCR
csaRint	gtggaggcgcattggaga	PCR
o27-85	ctcgggcccgcctcca	Northern blot
NarJ Tt Kpn	tgggtacatagccgggcaaccctaacctctg	THS, ^a pT18narJ forward (KpnI)
NarJ Tt Hind	tatcaagcttatcctctctgtcaagtccctg	THS, pT18narJ reverse (HindIII)
H5	gctggctcgagggatcgccgactggatcaagg	THS, pT25narG forward (PstI)
H6	gtagatatccactcgcgggctccagcttg	THS, pT25narG reverse (EcoRV)
H11	aaaagatccatggggcgggcttgcca	THS, pT25nrcN forward (BamHI)
H12	gtagatatcgtcgggcaggaccgc	THS, pT25nrcN reverse (EcoRV)
H13	ctgggtaccgatccgcacgtgatctgca	THS, pT18nrcD forward (KpnI)
H14	attcgatatcctccagcagctgga	THS, pT18nrcD reverse (EcoRV)
H15	ctgggtaccatgaggggtggtttggaga	THS, pT18nrcF forward (KpnI)
H16	attcgatatacaggcctcctccaggat	THS, pT18nrcF reverse (EcoRV)
H22	acgcgtcgacgatcgccgactggatcaagga	THS, pT18narG forward (SalI)
H23	gtagatatccactcgcgggctccagcttg	THS, pT18narG reverse (EcoRV)
H24	acgcgtcgacgatgaaggttagagccacat	PCR for narH
H25	attcgatatcctcccccgaagggggctgga	PCR for narH
H32	aaaactcgaggatgaagagcgaacccttcc	THS, pT25gdh forward (PstI)
H33	attcgatatacagggtataggccccgaggcc	THS, pT25gdh reverse (EcoRV)
H34	acgcgtcgacgatgaagagcgaacccttcc	THS, pT18gdh forward (SalI)
H35	attcgatatacgggtataggccccgaggcc	THS, pT18gdh reverse (PstI)
H36	aaaactcgaggatgcccacgtgatctgca	THS, pT25nrcD forward (PstI)
H37	attcgatatacctccagcagctggagct	THS, pT25nrcD reverse (EcoRV)
H38Bis	aaaactcgaggatgaggggtggtttggag	THS, pT25nrcF forward (PstI)
H39	attcgatatacgaagcctcctccagatct	THS, pT25nrcF reverse (EcoRV)
H40	acgcgtcgacgatggggcgggcttgccagag	THS, pT18nrcN forward (SalI)
H41	attcgatatacgggcaggaccgcaccccc	THS, pT18nrcN reverse (EcoRV)
H42	aaaactcgaggatgcccgggcaaccctaact	THS, pT25narJ forward (PstI)
H43	gtagatatccctctgtcaagtccctgca	THS, pT25narJ reverse (EcoRV)
H44	aaaactcgaggatggccttgccctgggct	THS, pT25nrcE forward (PstI)
H45	acgcgtcgacgatggccttgccctgggct	THS, pT18nrcE forward (SalI)
H46	attcgatatacggcttctccaccagaaaccggt	THS, pT18c-nrcE reverse (EcoRV)
H47	attcgatatacggcttctccaccagaaaccggt	THS, pT25c-nrcE reverse (EcoRV)
H48	aaaactcgaggactgcccctctaccggca	THS, pT25c-nrcE forward (PstI)
H49	acgcgtcgacgatgcccctctaccggca	THS, pT18c-nrcE forward (SalI)
NQOEcoRI	ccggaattcctctccgctaa	RT-PCR
NQOBamHI	cgcgatccgaagaagaggaagaa	RT-PCR

^a THS, Two-hybrid system.

turer (BIOTOOLS B&M, Madrid, Spain). For long mRNA, 2 ng of purified single-stranded DNA binding protein from *T. thermophilus* were added to improve the RT-PCR (16). For semiquantitative RT-PCR the Ready-To-Go™ kit (Amersham Biosciences) was used. Appropriate primers (Table II) and PCR conditions were used. Northern and Southern blots were done as described, and specific RNA or DNA was detected with ³²P-labeled DNA probes (15).

Cloning of the nrc Operon—The *nrc* operon was cloned from a *T. thermophilus* HB8 gene library constructed in λEMBL3 (17). ³²P-labeled probes from the 5' extreme of the *nar* operon (*narC* gene) were used for screening. Positive clones were analyzed by enzyme restriction, and adequate DNA restriction fragments were subcloned into pUC119 for sequencing purposes. The plasmid pUP3b (Table I), which contains the whole *nrc* operon, was selected.

Isolation of nrc Mutants—*nrc::kat* mutants were obtained by insertion of the *kat* gene, which encodes a thermostable resistance to kanamycin (18) at appropriate restriction sites of the target gene, always maintaining the same transcription direction of the operon to allow the expression of downstream genes. Previous work on the role of *narC* allowed us to ensure the transcription of downstream genes after insertion of the *kat* cassette (10). To inactivate *nrcF*, the *kat* gene was inserted into a XhoI site, which led to the truncation of the NrcF protein at amino acid position 151. *nrcN* was inactivated by inserting the *kat* gene at a PstI site, which caused truncation of the NrcN sequence at amino acid position 304. Inactivation of *nrcE* required the insertion of *kat* gene at a NcoI site, leading to a truncated NrcE protein of 310 amino acids that included the whole membrane domain. Plasmids con-

taining the inserted *kat* genes were used to transform *T. thermophilus* HB8 to obtain the expected replacement after homologous recombination. Those colonies that grew after 48 h at 70 °C on plates containing kanamycin were analyzed for the presence of the expected mutation by PCR and Southern blot.

The suicidal plasmid pKUPRBSβgal was used for the insertion of the *bgaA* gene into *nrcN*. This plasmid is a pK18 (Table I) derivative that carries a DNA fragment for recombination that includes the whole *nrcF* gene and a region from +1 to 492 of the *nrcN* coding sequence, followed by the *bgaA* gene. This gene encodes a thermostable β-galactosidase from *Thermus* sp. T2 (19), preceded by the Shine-Dalgarno sequence of the *slpA* gene, which codes for the S-layer protein of *T. thermophilus* HB8 (20). After transformation with this suicidal vector, those clones resistant to kanamycin were tested for the presence of the expected transcriptional fusion.

Overproduction of NrcD and Antiserum Preparation—To overproduce NrcD, its coding region was amplified by PCR (primers *ferred.ndeI* and *ferred.rev*, Table II) and cloned into the NdeI and EcoRI restriction sites of plasmid pET22b (Novagen) to render pET22nrcD. After induction of exponential cultures of transformed *E. coli* BL21/DE3 cells with isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (1 mM), the soluble fraction was subjected to heat denaturation to yield a NrcD-enriched soluble fraction. Slices of 10% SDS-PAGE containing the overexpressed protein were sent to a private company (Charles River Laboratories, Chalaronne, France) for immunization of New Zealand rabbits. Antiserum was incubated with *E. coli* cells (DH5α) for 1 h and centrifuged before use.

Fitness Assays and Kinetics of Anaerobic Growth—An insertion mutant in a gene coding for glutamate dehydrogenase (*gdh::kat*) was used as a wild type strain in these experiments to avoid any putative influence arising from the presence of the *kat* gene during growth. A spontaneous chloramphenicol-resistant mutant (Cam^r) was isolated from this strain to distinguish it after the competition experiments by its ability to grow on plates containing this antibiotic. Complementary experiments were developed in which Cam^r derivatives from each of the *nrc* mutants were used to ensure the absence of selection bias because of chloramphenicol resistance.

Competition assays were developed by inoculating an identical number of viable cells of the strains to be assayed (a Cam^r wild type, and Cam^s *nrc::kat* mutant, or vice versa) into the same tubes containing 10 ml of TB with potassium nitrate (40 mM). Tubes were filled to the top with mineral oil, screw-capped, and incubated at 70 °C. After 24 h, viable cells were plated in parallel on TB plus kanamycin (permissive medium) and on TB plus kanamycin and chloramphenicol (restrictive medium) and incubated aerobically at 70 °C. Individual growth was followed in a similar way, but with each strain inoculated in separate tubes. Anaerobic growth was followed by inoculating identical amounts of cells of a specific organism in several tubes, which were incubated at 70 °C, as above. At given times, a tube was removed from the oven, and the optical density was measured and the number of viable cells estimated, as before. Competition experiments under aerobic conditions were conducted in a similar manner, but using a 100-ml flask containing 20 ml of TB and shaken at 150 rpm.

Electron Transport Assays—Electron transport toward the NR was measured as the amount of nitrite produced after 5 min at 80 °C (21) by membrane fractions containing 10 µg of protein isolated from cultures of the wild type and each *nrc::kat* mutant grown for 7 h with nitrate (40 mM) under anoxic conditions. To avoid extensive membrane oxidation during cell disruption, the buffer Tris-HCl, 20 mM, dithiothreitol, 1 mM, pH 8, was used, and cells were ruptured by sonication under N₂ flow. No other special conditions were employed during the NADH-oxidation and nitrite-production assays, which were carried out under atmospheric oxygen pressure. NADH was assayed as putative electron donor over a wide concentration range to check for saturating conditions in a buffer of glycine (125 mM, pH 10) containing 20 mM potassium nitrate.

Enzyme Activities—The NR activity was measured at 80 °C on entire cells permeabilized with (0.1% w/v) tetradecyl-trimethylammonium bromide (8) with reduced methyl viologen as the electron donor, and potassium nitrate (20 mM) as the electron acceptor (21). The thermostable β-galactosidase was assayed at 70 °C with *ortho*-nitrophenyl galactopyranoside on the soluble fraction from disrupted cells. Enzyme units were normalized as described and expressed in Miller units (22). NDH activity was tested spectrophotometrically at 80 °C on soluble or membrane fractions (10 µg of protein) by NADH consumption after 15 min, using buffer, Tris-HCl, 50 mM, dithiothreitol 0.2 mM, pH 7.5. Potassium nitrate (20 mM) was added for the assays with membrane fractions. Different concentrations of rotenone ((2*R*,6*aS*,12*aS*)-1,2,6,6*a*,12,12*a*-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-*b*]furo[2,3-*h*]chromen-6-one), diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), or HQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide) were added in the inhibition assays.

Bacterial Two-hybrid Assays—To analyze the putative interactions between the products of the *nrc* genes, a bacterial two-hybrid system was used based on functional reconstitution of the adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* (23). The complete amino acid sequences of NrcD, NrcE, NrcF, and NrcN and the C-terminal domain of NrcE (positions 264–363) were expressed in plasmids pT25 and pT18 as N- or C-terminal fusion to the T25 and T18 domains of the adenylate cyclase from *B. pertussis*, respectively (23). Each coding gene was cloned in both plasmids to check for any possible dependence of the interactions on the N- or C-terminal location of the protein within the fusions. Constructions were carried out with the primers described in Table II. Positive controls for interaction between mesophilic proteins were developed by using fusions of a leucine zipper domain to the T18 (pT18zip) and T25 (pT25zip) domains (23). Two additional positive controls for the interaction between thermophilic proteins were used: (i) the homo-oligomeric glutamate dehydrogenase Gdh (Gdh/Gdh), and (ii) NarG and its chaperone NarJ (NarG/NarJ) from the nitrate reductase, both from *T. thermophilus* HB8. Positive interactions were detected by β-galactosidase activity of *E. coli* BTH101 cells cotransformed with pT18 and pT25 derivatives.

Sequence Comparison and Analysis—Sequence comparisons and multiple alignments were carried out using the BLAST and CLUSTALW programs (24) available at <http://us.expasy.org>. Phylogenetic analyses were done at http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html.

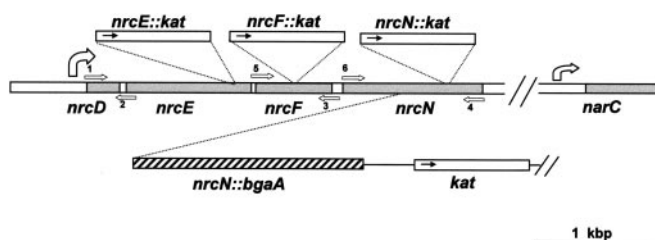


FIG. 1. **The *nrc* cluster.** A schematic representation of the *nrc* gene cluster is depicted in which the approximate insertion sites for the *kat* and *bgaA* genes in *nrcE*, *nrcF*, and *nrcN* mutants are indicated. Numbered arrows indicate the hybridization positions for primers used in PCR and RT-PCR (Table II). Promoters for the *nrc* and *nar* clusters are indicated by curved arrows. The positions of the following primers are indicated: 1) ferred.nde1; 2) ferred.rev; 3) orfF.rev; 4) orfN.rev; 5) orfF.dir; and 6) orfN.dir.

RESULTS

Cloning the *nrc* Cluster

The use of a probe against the *narC* gene in a λEMBL3 gene library of the facultative anaerobe *T. thermophilus* HB8 allowed the cloning of a large DNA region upstream of the *nar* operon. Its sequence revealed the presence of a type II NDH homologue and components of electron transport chains in the same DNA strand as the *nar* operon. A ~3500-bp DNA fragment from this region, for which the 3' extreme was located 4.6 kbp upstream from *narC*, was subcloned into pUC119 to yield pUP3b, and sequenced. Based on their physical proximity to the *nar* operon and their similarity to electron transport components (see below), the genes were named *nrc* (nitrate respiration chain) (Fig. 1). When the sequence of the *nrc* cluster (accession number AJ585200) was compared with the genome of the aerobic strain *T. thermophilus* HB27 (accession numbers AE017221 and AE017222), no positive hits were found, implying that this cluster was specific to facultative anaerobic strains of *T. thermophilus*.

The *nrc* Cluster Is Transferred by Conjugation Along the *nar* Operon

The putative genetic linkage between the *nrc* gene cluster and the *nar* operon was checked by PCR. As shown in Fig. 2, amplification products corresponding to the first (*nrcD*) and the last (*nrcN*) genes of the *nrc* cluster were identified in the facultative anaerobes HB27::*nar*, and HB8 (*lanes* 2 and 3), but not in the aerobe HB27 (*lanes* 1). Identical results were obtained when a gene from the *nar* operon (*narH*) was assayed. By contrast, the *gdh* (glutamate dehydrogenase)² and *csaB* (cell-surface anchoring) (25) genes, which are not involved in energy metabolism, were identified in the three strains. Therefore, the *nrc* cluster was part of the conjugative genetic element transferred by conjugation along the *nar* operon during the isolation of the facultative anaerobic strain HB27::*nar*.

The Four *nrc* Genes Are Cotranscribed

The sequence and organization of the *nrc* genes suggested that they were cotranscribed into a single mRNA. To check this, we isolated total RNA from aerobically grown and nitrate/anoxia-induced cultures ("Experimental Procedures") of *T. thermophilus* HB8, and tested for the presence of *nrc* mRNA by Northern blot and RT-PCR.

As shown in Fig. 3A, an mRNA of around 3.2 kb was detected in cells subjected to anoxic conditions with nitrate, but not in cells grown aerobically. Data from RT-PCR (Fig. 3B) confirmed these results and revealed the cotranscription of the four genes

² J. L. Ruiz, F. Cava, J. Ferrer, J. Berenguer, and M. J. Bonete, unpublished results.

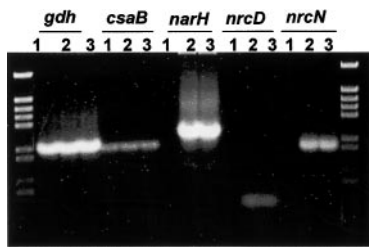


FIG. 2. The *nrc* cluster is transferred by conjugation. Identical amounts of total DNA from the aerobic strain *T. thermophilus* HB27 (1), and the facultative anaerobes HB27::*nar* (2) and HB8 (3) were subjected to PCR to detect the presence of the indicated genes. Note the absence of amplified DNA fragments of the *nar* (*narH*) and *nrc* (*nrcD* and *nrcN*) operons from total DNA preparations of the aerobic strain HB27. PCR were developed with the following primer pairs: *gdh*, *gdh1.nde1/gdh1.not*; *csaB*, *csaF2/csaRint*; *narH*, H24/H25; *nrcD*, *ferred.nde1/ferred.rev*; *nrcN*, *orfN.dir/orfN.rev*. Two lanes with DNA size markers are included (4.37, 2.9, 2.5, 2.2, 1.93, 1.33, 1.15, 0.76, and 0.61 kbp).

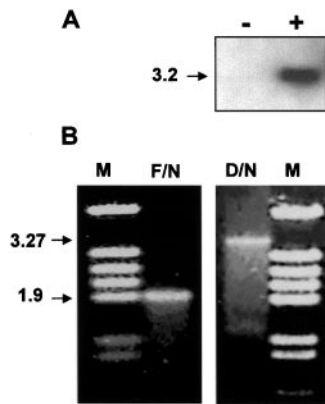


FIG. 3. The *nrc* genes are cotranscribed. Panel A, Northern blot of total RNA isolated from aerobic (–) or nitrate/anoxia-induced (+) cultures of *T. thermophilus* HB8 hybridized with a ^{32}P -labeled oligonucleotide (o27–85). The approximate size of the transcript is indicated. Panel B, RT-PCR on total RNA from nitrate/anoxia-induced cultures of *T. thermophilus* HB8. F/N, primers *orfN.rev* plus *orfF.dir* were used to detect a common transcript for *nrcF* and *nrcN*; D/N, primers *orfN.rev* plus *ferred.nde1* were used to detect a common transcript for *nrcD* and *nrcN*. The size of the amplified cDNAs are indicated in kbp.

into a single mRNA that extends from the 5' sequences of *nrcD* to the 3' extreme of *nrcN*. Parallel assays with sense primers located 0.5 kbp upstream of *nrcD* did not detect any transcripts (not shown), implying that *nrcD* constitutes the first gene of the *nrc* operon. On the other hand, the absence of any significant open reading frame in the sense strand downstream of *nrcN*, and the presence of an open reading frame encoded in the complementary strand of this region (not shown), suggest that *nrcN* is the final gene of the transcript. Consequently, the four *nrc* genes constitute an operon that requires either anoxia, nitrate, or both to be expressed.

Nitrate and Anoxia Are Required for Transcription of *nrc*

To check if nitrate or anoxia were independently able to induce expression of the *nrc* operon, and to quantify the induction levels achieved, we developed a new suicidal vector that carries a reporter gene (*bgaA*) encoding a thermophilic β -galactosidase preceded by its own Shine-Dalgarno sequence. A fragment of *nrcN* was placed upstream of the reporter as a recombination target. Insertion of this construction into the chromosome was selected by the thermostable resistance to kanamycin conferred by the *kat* gene located in the suicidal plasmid ("Experimental Procedures"). In the mutant strain *nrcN::bgaA*, the reporter gene was located at position 483 of *nrcN* (Fig. 1), giving rise to a transcriptional fusion *nrcDEFN::bgaA*.

As shown in Fig. 4, the presence of oxygen repressed the

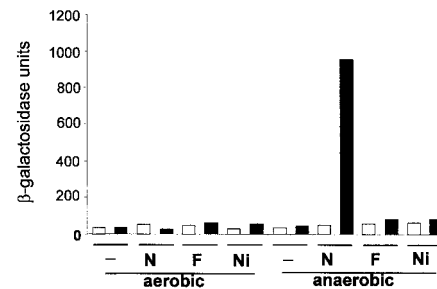


FIG. 4. Induction of the *nrc* operon. Cells (3×10^7) of *T. thermophilus* HB8 (white bars) and its *nrcN::bgaA* derivative (black bars) were incubated under aerobic or anaerobic conditions in 10 ml of TB medium, or in TB containing 40 mM nitrate (N), 40 mM fumarate (F), or 20 mM nitrite (Ni). β -Galactosidase activity was measured after 14 h at 70 °C, and expressed in Miller units.

expression of the reporter gene in the *nrcN::bgaA* mutant (aerobic cultures). Under anoxia (anaerobic cultures) the presence of nitrate (N) was required for induction. The inductor effect of nitrate could not be mimicked either by fumarate (F) or by nitrite (Ni). The use of a combination of nitrate and fumarate or nitrite did not improve the effects of nitrate alone (not shown). Similarly, induction under anoxia and nitrate was not affected by the presence of glucose or succinate. Consequently, we inferred that transcription of the *nrc* operon was dependent on nitrate and anoxia, but that it did not respond to the carbon source. Therefore, a specific role for the *nrc*-encoded proteins in nitrate respiration was concluded.

Analysis of the Proteins Encoded by the *nrc* Cluster

The four open reading frames encoded by the *nrc* cluster (Fig. 1) were preceded by respective Shine-Dalgarno sequences (GGA(G/A)(G/A)) located between positions –11 and –9 with respect to their ATG start codons. With the exception of NrcN, the distance between the stop codon of one gene and the ATG start codon of the next was quite small, even overlapping by one base in the case of *nrcE-nrcF*. However, in *nrcN*, this distance was apparently longer, but the presence of an in-frame GTG codon preceded by a putative Shine-Dalgarno sequence close to the end of NrcF suggests that this could be the actual translational start point of the protein.

Computer predictions suggest a cytoplasmic location for the translation products of all these genes, except for NrcE, for which an integral membrane protein containing seven putative transmembrane spanning helices is strongly suggested (see below). This putative membrane protein has no homologues in the protein data banks, unlike the significant sequence similarities of NrcD, NrcF, and NrcN and proteins involved in electron transport and NADH oxidation (Table III). Phylogenetic analysis situates these Nrc proteins at the root of the corresponding phylogenetic trees. The essential sequence information about these proteins is provided below.

NrcD—NrcD encodes an 87-amino acid-long protein (9917 Da) highly similar (86% identity) to a soluble seven-iron ferredoxin from *T. thermophilus* (FdTt, 79 amino acids long, accession number P03942), whose three-dimensional structure is known (26). Sequence alignment of both proteins revealed a complete conservation of the cysteine residues that coordinate the [3Fe-4S] and [4Fe-4S] clusters of FdTt. The major difference between them is the presence of a 10-amino acid C-terminal sequence in NrcD that is absent from FdTt.

NrcF—NrcF is predicted to be a 26,223-Da protein similar in sequence to the iron-sulfur subunit (B subunit) from succinate-quinone oxidoreductases (SQRs) and quinol-fumarate reductases. The cysteine residues involved in the coordination of the [2Fe-2S], [4Fe-4S], and [3Fe-4S] clusters of the B subunit from

TABLE III
Comparison of Nrc protein sequences

Product	Size ^a	Homologue ^b	E value ^c	Identity ^c
NrcD	87	Ferredoxin (P03942) from <i>T. thermophilus</i>	1e-37	65/75 (86%)
NrcE	362	ND ^d		
NrcF	232	Iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase/fumarate reductase from several organisms	1e-70	128/217 (58%)
NrcN	395	NADH dehydrogenase from <i>Xanthomonas axonopodis</i>	6e-75	176/406 (43%)

^a Number of amino acids in the protein.

^b Only the protein with the highest similarity is indicated.

^c Only the highest scores are shown.

^d Protein without homologues in any data bank.

both enzymes are fully conserved in NrcF, as does residue Asp⁶¹, which is involved in the coordination of the [2Fe-2S] cluster.

NrcN—NrcN is homologous to type II NDH (EC 1.6.99.3) of different origins. This protein family contains a pyridine nucleotide-oxidoreductase motif consisting of a small NADH binding domain within a larger FAD-binding domain. As is frequently the case with other thermophilic proteins, NrcN (395 amino acids) is smaller than its mesophilic counterparts (430 to 465 amino acids).

NrcE—The *nrcE* gene encodes a 362-amino acid-long protein (40,388 Da) without homologues in the protein data banks. Topology predictions suggest the presence of seven-transmembrane α -helices, with a small N-terminal region facing the periplasm, and a larger (110 amino acids) C-terminal cytoplasmic domain, which contains four cysteine residues that could coordinate a redox center. Unexpectedly for a thermophilic protein, a fifth cysteine residue is present within the sequence of the first transmembrane α -helix.

Location of Nrc Proteins

Immunodetection of NrcD revealed lower electrophoretic mobility (~30 kDa) than expected from its predicted size (~10 kDa), independently of the bacterial host in which it was expressed (Fig. 5). As no signal was detected in the aerobic strain (HB27, not shown) the specificity of the antiserum for NrcD was guaranteed.

As shown in Fig. 5, NrcD was overproduced as a soluble protein in *E. coli* (Ec), as predicted by computer. Moreover, as it remained soluble after 30 min of incubation at 70 °C, its thermostability was also assessed. By contrast, NrcD was associated with the membrane fraction of nitrate/anoxia-induced cultures of *T. thermophilus* (lanes M). Therefore, the existence of an interaction with a membrane component in the thermophile was concluded. As the membrane location of NrcD was not affected in *nrcF::kat* and *nrcN::kat* mutants, neither NrcF nor NrcN could be responsible for attachment of NrcD to the membrane. Conversely, NrcD was not detected in the membrane fractions of *nrcE::kat* mutants, and only faint signals of NrcD and of small proteins were detected in its soluble fraction. Therefore, we concluded that NrcE anchors NrcD to the membrane, and that solubilization of NrcD results in degradation of the protein.

Oxidation of NADH provided some clues concerning the location of NrcN and NrcF. Membrane fractions of nitrate/anoxia-induced cultures exhibited significant NADH oxidative activity in the presence of nitrate (Fig. 6B). In the absence of nitrate, NADH oxidation by these membrane fractions was negligible. By contrast, the presence of nitrate did not affect NADH oxidation by membrane fractions of aerobically grown cells (data not shown).

Interestingly, parallel assays revealed low NADH oxidation activity (~1/10 of that of the membrane) in soluble fractions of nitrate/anoxia-induced wild type cells. This soluble activity was not nitrate-dependent and disappeared completely in *nrcN::kat* and *nrcN::bgaA* mutants. By contrast, there was a 3-fold in-



FIG. 5. Location of the NrcD protein in *nrc::kat* mutants. Western blot with antiserum against NrcD on soluble (S) and particulate (M) fractions of nitrate/anoxia-induced cells of the following strains of *T. thermophilus*: HB8 (8), HB27::nar (27c), HB8 *nrcF::kat* (F), HB8 *nrcN::kat* (N), HB8 *nrcN::bgaA* (β), and HB8 *nrcE::kat* (E). Soluble and particulate cell fractions of *E. coli* BL21DE3 overexpressing NrcD are also shown (Ec). The electrophoretic mobility of protein markers of the indicated sizes is shown (kDa).

crease over the wild type values in *nrcE::kat* and *nrcF::kat* mutants, concomitantly with a decrease in the membrane fraction (Fig. 6B). Therefore, we concluded that: 1) NrcN was responsible for the observed NDH activity; 2) NrcN was bound to the membrane through NrcE and NrcF; and 3) NrcN became a permissive electron donor upon solubilization.

Nitrate Reduction by Membrane Fractions of *nrc* Mutants

To test whether the Nrc proteins were directly involved in electron transfer from NADH to the nitrate reductase, membrane fractions from cultures of the wild type strain and the *nrc* mutants grown for 7 h under anoxia in TB medium containing nitrate were tested for the production of nitrite with NADH as the electron donor. Reduced methyl viologen, a direct electron donor to the $\alpha\beta$ complex of the NR (27), was used as control for the amount of active NR in the membrane fractions.

As shown in Fig. 6, NADH was a highly efficient electron donor for nitrate reduction (296 ± 36 nmol of nitrite/min mg of protein). Reduction of nitrate with NADH was decreased 10-fold in *nrcE::kat*, *nrcN::kat*, and *nrcN::bgaA* mutants. Nitrate reduction in *nrcF::kat* mutants decreased by a factor of five (Fig. 6A). A similar pattern was observed for the oxidation of NADH: membranes from nitrate/anoxia-induced cultures of the wild type exhibited NADH-oxidation activity (353 ± 11 nmol of NADH consumed/min mg of protein) in accordance with the amount of nitrite produced (296 ± 36 nmol of nitrite/min mg of protein), whereas NADH consumption was effectively undetectable in all but the *nrcF::kat* mutant, in which it decreased by a factor of 10. These findings imply that the Nrc proteins constitute a membrane-bound NDH required for nitrate reduction. It is also clear from these results that a quantitatively less important Nrc-independent pathway for nitrate reduction is also present on the membranes of *T. thermophilus* HB8 during anaerobic respiration. Interestingly, membranes isolated from cell cultures of each of the mutants grown for shorter times (2–4 h) under nitrate/anoxia presented a higher percentage of NDH and nitrate reduction residual activities (data not shown), thus showing that this Nrc-independent pathway decreases in relevance during anaerobic growth. This fact is related with the repression of the transcription of the *nqo* operon, encoding type I NDH, detected by RT-PCR (Fig. 6C).

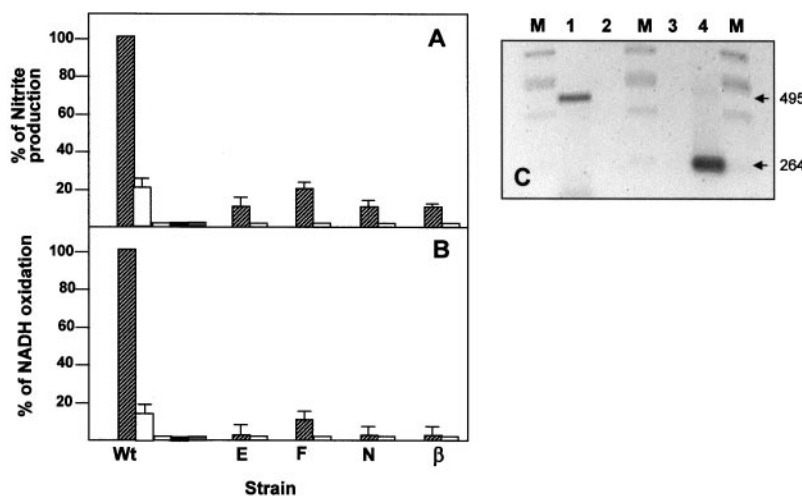


FIG. 6. **Nitrate reduction and NADH oxidation.** Equivalent amounts (10 μ g of protein) of membrane fractions from nitrate/anoxia-induced cultures of the wild type (Wt) and the *nrcE::kat* (E), *nrcF::kat* (F), *nrcN::kat* (N), and *nrcN::bgaA* (β) mutants were incubated with NADH (1.5 mM) and nitrate (20 mM) in the absence (striped columns) or presence of rotenone at 0.2 μ M (dotted columns) and 2 μ M (white columns); diuron, 0.2 μ M (black columns); or HQNO, 0.2 μ M (gray columns). Nitrite production with reduced methyl viologen was used to normalize the amount of NR on the membranes. The percentage of nitrite production (A) and NADH oxidation (B) with respect to that of the wild type strain were represented. Panel C, RT-PCR on 20 ng of total RNA from an aerobic culture (1 and 2) and from a culture grown for 7 h under nitrate/anoxia conditions (3 and 4). The mRNA encoding the subunit 8 of type I NDH (1 and 3) was detected with primers NQOEcoR1 and NQOBamH1. The mRNA coding for NrcD (2, 4) was detected with primers ferred.nde1 and ferrede.rev. The sizes of the amplified fragments are indicated in bp.

Quinones Mediate Electron Transfer between the Nrc and NR Complexes

To establish whether electron transfer between NADH and nitrate was mediated by the respiratory quinones, different concentrations of inhibitors such as rotenone, diuron, and HQNO were used, and the corresponding inhibitory concentrations compared with that required to inhibit NADH oxidation by membrane fractions of cells grown aerobically (type I NDH). Similar concentrations of diuron and HQNO (0.2 μ M) were required for complete inhibition of the membrane-bound NDH activity from aerobically grown cells (type I NDH) and from cells grown for 7 h under nitrate/anoxia conditions (Nrc-NDH). In contrast, a small difference in rotenone sensitivity was found: at 0.1 μ M, NDH from aerobic membranes (type I) was completely inhibited, whereas 50% NADH oxidation was still detected in nitrate/anoxia-induced membranes (Nrc). At 0.2 μ M, rotenone completely inhibited NADH oxidation by aerobic membranes, but a 20% of activity was still detected with "anaerobic" membranes (Fig. 6B). At 2 μ M, both type I and Nrc NDH were completely inhibited. On the other hand, nitrate reduction was insensitive to such inhibitors when reduced methyl viologen, which donates the electrons directly to the NarG subunit of the NR, was used as electron donor (data not shown).

Interactions between the Ncr Proteins

We used a bacterial two-hybrid system (23) to test for putative interactions between Nrc proteins. Fig. 7 shows the mean results of six measurements of β -galactosidase activity in cells transformed with pairs of plasmids derived from pT18 and pT25 that express the assayed Nrc proteins as fusions to the C-terminal (Nrc-T18) and N-terminal (T25-Nrc) domains of the adenylate cyclase from *B. pertussis* (23). All the *nrc* genes were cloned in both plasmids to avoid specific effects because of their positions at the N or C terminus of the fusion proteins. Negative controls (<100 units) were performed for each of the Nrc fusions and the complementary T18/T25 fragment fused to a leucine zipper domain (Zip). Three kinds of positive control were used: the leucine zipper fusions to the T18 and T25 fragments (~1000 units), and two pairs of thermophilic proteins from *T. thermophilus* HB8, the NarG subunit of NR and

its chaperone NarJ (~280 units), and the glutamate dehydrogenase, an homo-oligomeric enzyme (~400 units).

Interaction was also detected between NrcE and NrcD (~600 units). Weaker but positive signals were detected between NrcE and NrcF (~200 units) and between NrcE and NrcN (~300 units). However, no interactions were detected between NrcD and NrcF or NrcN (<100 units). On the other hand, NrcN and NrcF (~300 units) were also shown to interact to a similar extent as do NarG and NarJ. All these results were independent of the direction used in the assays (*i.e.* Nrc proteins expressed as N- or C-terminal parts of the fusion proteins).

As NrcE seemed to interact with all the other Nrc proteins, we decided to check whether such interactions were dependent on its C-terminal domain, which is predicted to face the cytoplasm (amino acids 264 to 362). For this, the C-terminal domain of NrcE (c-NrcE) was fused to plasmids pT25 and pT18 and used in the same assays. As shown in Fig. 7, the results for c-NrcE were almost identical to those obtained for the entire protein, indicating that the interactions between NrcE and the other Nrc proteins take place through its cytoplasmic C-terminal domain.

The Role of the *nrc* Operon in Nitrate Respiration

To analyze the role of *nrc* *in vivo*, the growth of mutants in *nrcE* (*nrcE::kat*), *nrcF* (*nrcF::kat*), and *nrcN* (*nrcN::kat*) under anaerobic or aerobic conditions was assayed. As illustrated in Fig. 8B, all mutants grew anaerobically with nitrate after 24 h, implying that the *nrc* cluster was not an absolute requirement for anaerobic growth. However, when each mutant was cocultivated with the wild type strain, the latter outgrew each of them (~15% of mutants remaining in the culture) after 24 h of anaerobic growth. This growth bias was the consequence of a slower growth rate of all mutants compared with the wild type under such anaerobic conditions (Fig. 8C).

Conversely, when the competition experiments were developed under aerobiosis, no significant population bias was detected (Fig. 8A). Therefore, the *nrc* operon confers a selective advantage only during anaerobic growth with nitrate.

DISCUSSION

Two types of respiratory NDHs have so far been described in bacteria. Type I NDHs are heteromultimers built of 14 sub-

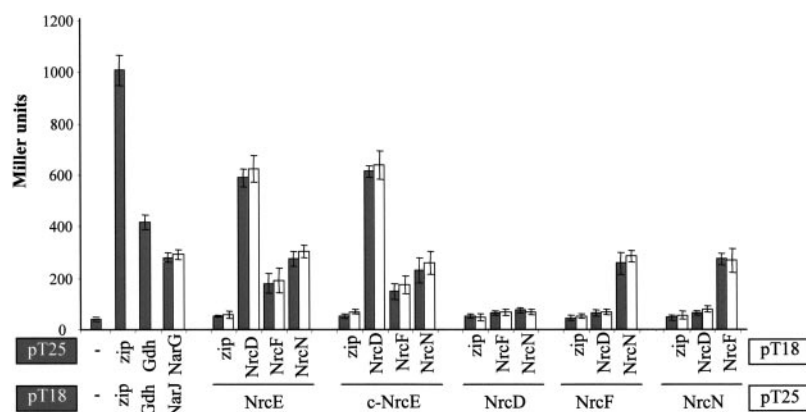


FIG. 7. **Interaction between components of the *nrc* operon.** Two-hybrid bacterial assays were developed for the proteins encoded by the *nrc* operon. Each Nrc component and a C-terminal domain of NrcE (*c-NrcE*) were expressed in *E. coli* BTH101 as fusion proteins to the T18 or T25 domains of the adenylate cyclase from *B. pertussis* from plasmids derived from pET18 and pET25, respectively. β -Galactosidase activity was used as a measure of reconstituted adenylate cyclase. Positive controls with mesophilic (*zip/zip*) and thermophilic proteins (*Gdh/Gdh*, and *NarJ/NarG*) were used. Putative interactions were sought with protein domains fused both as C- or N-terminal domains. Gray and white bars correspond to assays with genes cloned as indicated in plasmids labeled on gray or white backgrounds, respectively. Controls for negative (–/–) and positive (*zip/zip*, *Gdh/Gdh*, *NarJ/NarG*) interactions were also performed. The values are the means of six measurements in two independent experiments.

units that can couple quinone reduction to proton extrusion during respiration. In the genome of the aerobic strain *T. thermophilus* HB27, a single type I NDH is encoded, and is currently used as a model for the structural analysis of this type of enzyme (7, 28). In many other bacteria, but not in aerobic strains of *T. thermophilus*, the so-called alternative or type II NDH can also reduce the membrane quinones under specific growth conditions (3). These are simple, monomeric enzymes, which interact directly with the membranes and do not extrude protons (3, 29). What we describe in this article is a new type of respiratory NDH that is expressed concomitantly with nitrate reductase, leading to the production of a complete respiratory chain. The presence of their respective encoding operons in a conjugative plasmid incorporated into the chromosome (11) implies that they constitute the first description of a mobile “respiratory island.” Specific points reinforcing these conclusions are discussed below.

NrcN Is the Catalytic Subunit of a Multimeric NDH—Although it was not possible to produce NrcN in an active form in *E. coli* or to assay the activity of the recombinant protein directly (not shown), the role of NrcN as the catalytic subunit of a NDH was first inferred from the presence of a pyridine nucleotide-oxidoreductase motif in its sequence, and from its similarity to monomeric respiratory type II NDH sequences. Further confirmation of this role was provided by the analysis of the NADH-oxidative capability of the membrane and soluble fractions of cells grown with nitrate under anoxic conditions, where our data showed a clear relationship between NADH oxidation and NrcN integrity.

It is interesting to note that NADH oxidation by membrane fractions of nitrate/anoxia-induced cells of the wild type strain was completely dependent on the presence of nitrate and proportional to the amount of nitrite produced. Given that mutations in *nrcN*, the final gene of the operon, made NADH oxidation undetectable and severely decreased nitrite production, it was concluded that NrcN is responsible for this membrane-associated NDH activity.

The nature of NrcN as a subunit of a multimeric enzyme was deduced from the effect of *nrcF* and *nrcE* mutations. In both cases, NADH oxidation by membrane fractions was severely decreased, leading to the conclusion that NrcE and NrcF are proteins associated to NrcN that are required for its membrane-bound NDH activity.

Interestingly, an increase in nitrate-independent NADH oxidation was found in the soluble fraction of *nrcE* and *nrcF*

mutants. As there was no such activity in *nrcN* mutants and was very weak in the wild type strain, we concluded that it was associated with a solubilized NrcN protein. Therefore, NrcN has its own NADH oxidative capability that is specific for nitrate as the electron acceptor when bound to the membrane through NrcE and NrcF, but which becomes nitrate-independent upon mechanical (in the wild type) or genetic (*nrcE* and *nrcF* mutants) solubilization.

A Tentative Model for Nrc-NDH—A tentative model for the oligomeric structure of Nrc-NDH emerges from our data (Fig. 9), by which NrcE functions as a membrane anchor for the three other proteins. This is based on the computer-predicted presence of seven-membrane spanning helices within its sequence, and on the observed solubilization of NrcD and the NrcN-associated NDH activity in the absence of NrcE. The implication of the C-terminal cytoplasmic domain of NrcE in such subunit anchoring was first deduced from the position of the *kat* gene cassette close to the 3' terminus of the gene in the *nrcE::kat* mutant, which should allow the synthesis of a truncated, 310-amino acid long NrcE protein. Further evidence was obtained from the results of the two-hybrid assays, which revealed specific interactions between this C-terminal domain of NrcE and NrcD, NrcF, and NrcN.

Concomitantly, several lines of evidence support the computer-predicted soluble nature of the other components of the Nrc complex. The soluble nature of NrcN was deduced from the increase in the aforementioned solubilization of NDH activity, and that of NrcD, through their detection by Western blots in *nrcE* mutants. The soluble nature of NrcF can be deduced indirectly. First, NrcN is solubilized in *nrcF* mutants, suggesting an NrcN-NrcF interaction, which was subsequently confirmed by the two-hybrid assays. Second, NrcN is also solubilized in *nrcE* mutants. Finally, a complex between the A and B subunits of the respiratory SQR, homologues of NrcF and NrcN, respectively, can be solubilized in *E. coli* (Ref. 30, see below). Consequently, the most probable explanation of our results is that NrcF forms a soluble complex with NrcN in *nrcE* mutants. The presence of NrcD in this soluble complex cannot be ruled out by our data, but the absence of detectable interactions with NrcD, NrcF, and NrcN, and its rapid degradation in *nrcE* mutants, makes this unlikely.

This Nrc enzyme model (Fig. 9) is distinct from that of the multimeric (13–14 subunits) respiratory type I NDH (28) and, also from that of the monomeric alternative type II NDH (29). By contrast, it shares some sequence and structural similarities

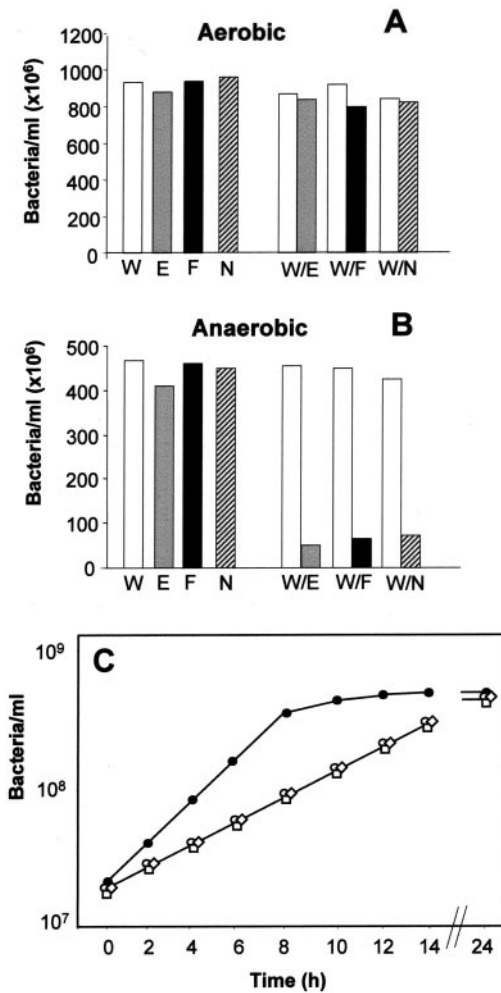


FIG. 8. The *nrc::kat* mutants are not proficient at anaerobic growth. Identical cell numbers from *T. thermophilus* HB8 *gdh::kat* (W) and/or *T. thermophilus* HB8 *nrcE::kat* (E), *nrcF::kat* (F), and *nrcN::kat* (N) were inoculated as individual (W, E, F, N) or mixed (W/E, W/F, W/N) cultures in TB media with nitrate and kanamycin. Cultures were incubated at 70 °C aerobically (A) or anaerobically (B) for 20 and 24 h, respectively. The number of cells of each of the strains was deduced from the comparison between the number of viable cells on TB plates with kanamycin (both strains grew) and that obtained on TB plates with kanamycin plus chloramphenicol (only the wild type strain grew). Panel C, independent anaerobic growth of the wild type strain (black circles) and each of the *nrc::kat* mutants (white symbols) was followed for the indicated time by measuring cell viability.

with another respiratory enzyme, the SQR (30, 31). The catalytic domain of SQR is a soluble complex of the iron-sulfur B subunit (NrcF homologue) and a large (~600 amino acids) A subunit, a protein with a pyridine nucleotide-oxidoreductase motif (30). In many bacteria, including *E. coli*, the A-B complex is attached to the membrane by the C and D subunits, each of which has three membrane-spanning helices. In other bacteria, like *Bacillus subtilis* and *Wollinella succinogenes*, a single membrane protein containing five membrane-spanning helices substitutes for the C-D subunits. In *T. thermophilus* two membrane proteins encoded downstream of the A and B subunit genes probably constitute the two-component membrane anchor and quinone reduction subunit of its SQR (7). NrcE plays a similar role in our model. In this comparative context, electrons from succinate (SQR) or NADH (Nrc complex) are transferred to the flavine at the A (SQR) or NrcN subunits, and then to the four iron-sulfur clusters of the B (SQR) or NrcF subunits, to reach the NrcE membrane subunit either directly, through the C-D complex (SQR), or indirectly, through a ferredoxin (NrcD). In our model,

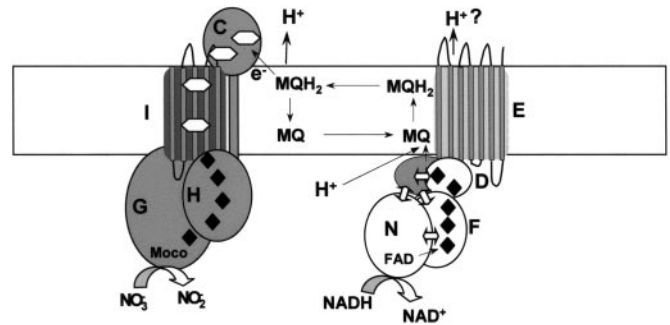


FIG. 9. Model for the Nrc-NDH. A model for the complete respiratory chain formed by the Nrc-NDH and the nitrate reductase is proposed. NADH reduces the FAD cofactor predicted for NrcN. Electrons are then transferred through five iron-sulfur centers (black diamonds) of NrcF (three) and NrcD (two) to the membrane subunit NrcE, where they are used to reduce menaquinone (MQ). Reduced menaquinone (MQH₂) is subsequently oxidized by the NR, first at its cytochrome c (NarC) component. Electrons are canalized through hemes c (NarC) and b (NarI) (white hexagons) to five consecutive iron-sulfur centers of NarH (four) and NarG (one) to reach the molybdenum cofactor (Moco), where nitrate is finally reduced. Putative proton extrusion during NADH oxidation is indicated (H⁺?). The interactions detected by the two-hybrid assays are indicated (white double arrowheads).

NrcE catalyzes the reduction of a membrane quinone at the cytoplasmic face of the membrane. Reduced quinones will then travel toward the NR, where they will be oxidized at the periplasmic face of the membrane. The absence of conserved sequence motifs for quinone binding sites among quinol reductases prevents us proposing a protein domain in NrcE as responsible for such quinone reduction. However, the observed inhibition of nitrate reduction and NADH oxidation by rotenone, diuron, and HQNO in our *in vitro* experiments strongly supports this model, according to which quinones shuttle electrons between the Nrc and NR complexes (4).

The quinone most likely to be involved in this process is menaquinone-8, which is by far the most important respiratory quinone in *T. thermophilus* (32). In fact, no ubiquinone has been found in *T. thermophilus* (32), and homologues of UbiC and other enzymes implicated in the synthesis of ubiquinone are not encoded among the sequence of *T. thermophilus* HB27 (7), being also not found among the 22 kbp of the *nar* element so far sequenced. Therefore, the Nrc and the NDH-I complexes likely use the same quinones. In support of this conclusion is the fact that the amount of residual nitrate reduction with NADH as electron donor in *nrcN::kat* mutant, where only NDH-I is functional, decreases along the time when cells are grown under nitrate/anoxia conditions. Thus, it follows that the quinone reduced by NDH-I, essentially menaquinone-8 (28, 32), is oxidized by the NR. Consequently, it is unlikely that the specificity of nitrate reduction by Nrc-mediated NADH oxidation was based on the use of different quinones, but more probably on the repression of NDH-I expression, as revealed by the semiquantitative RT-PCR assays of Fig. 6C.

Nrc Is Specific for Nitrate Respiration—The model discussed above clearly shows that the Nrc complex constitutes a membrane-bound NDH that is structurally different from both type I and type II NADH dehydrogenases. Its involvement in nitrate respiration is based on three arguments: 1) its dependence on nitrate and anoxia for expression; 2) the NADH-dependent *in vitro* assays of nitrate reduction; and 3) the lower growth rates of *nrc* mutants under anaerobic conditions.

The insertion of a thermostable reporter gene in *nrcN* allowed us to define the requirements for transcription of the *Pnrc* promoter. In fact, as the NR can be easily detected by the production of nitrite (8), we were able to confirm that the expression of the *nrc* operon in *nrcN::bgaA* mutants was

parallel to the expression of the NR. Such coordinated synthesis probably depends on signal-transduction systems that respond to nitrate and anoxia, similarly to the FNR and NarL/NarX two-component systems described for *E. coli* (3), although neither FNR nor NarL binding sequences are found around the *Pnrc* and *Pnar* promoters. However, the genes coding for transcription regulators involved in the expression of the *Pnar* promoter are transferred by conjugation along the *nar* operon (33). Accordingly, we have identified a homologue to DNR transcription factors encoded between the *nar* and *nrc* operons, but no NarL/NarX homologues could be identified neither in the conjugative element nor in the genome of *T. thermophilus* HB27 (7). The DNR transcription factors constitute a subgroup of the CRP/FNR protein family that were initially identified in the context of investigation of the anaerobic respiratory system of nitrate denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* (34). Proteins of this subgroup have been implicated in the detection of specific N-oxides for the induction of the corresponding terminal reductases (35). One of them, DnrE, to which the protein encoded between the *nar* and *nrc* operons shows high similarity (35% of identity), seems to be implicated in a nitrate sensory pathway (35). Future work will reveal if its thermophilic homologue also plays such a role in *T. thermophilus*.

Our *in vitro* assays demonstrated that the Nrc complex is the major NDH activity that feeds electrons to the nitrate reductase in cultures grown for 7 h under nitrate/anoxia conditions, accounting for 80 to 90% of the nitrite produced in these assays. The low relevance of aerobic type I NDH can be explained on a genetic basis, as the transcription of its encoding operon decreases dramatically under these conditions. Therefore, in *nrc* mutants, NADH oxidation has to be carried out by a small number of type I NDH complexes, which are not enough to provide electrons to the NR at the same rate as in the wild type where a high number of Nrc-NDH complexes does. As a consequence, the *nrc* mutants grow at a lower rate than the wild type. Interestingly, the *nrcF* mutants are less affected than *nrcE* or *nrcN* mutants in electron transference from NADH to NR, a fact that could be related to the presence of a homologue, the B subunit of its SQR (65% identity) in the genome of this bacteria that could partially substitute for NrcF (7). In conclusion, all our data support the hypothesis that the *nrc* operon has evolved as an efficient primary electron donor system that is specifically tuned for nitrate respiration.

The Origin of the Nrc-NDH—A final point concerns the putative origin of this Nrc-NDH. As the genus *Thermus* spp. belongs to one of the oldest phylogenetic branches of the Bacteria kingdom, we may speculate about an “ancient” origin for the Nrc-NDH complex. This view is supported by the comparison of NrcN and NrcF with type II NDH, and B-subunits of SQRs from different origins, respectively, which place both Nrc proteins close to the root of the corresponding phylogenetic trees (not shown). However, as a type I NDH similar to that found in “modern” bacteria is the only respiratory NDH encoded in the genome of aerobic strain HB27 of *T. thermophilus* (7), and considering that Nrc-NDH is actually encoded by a conjugative plasmid (8), the origin of this cluster could even be earlier than that of the genus.

In any case, the presence of the *nar* and *nrc* operons encoding a complete respiratory chain and their transcriptional regulators within a transferable genetic element provides an excel-

lent example of gene functional recruitment in a respiratory island and explains why adaptation to a completely different environment does not necessarily require a lengthy evolutionary process, but simply an appropriate mating partner.

Acknowledgments—We are very grateful to Dr. D. Ladant (Pasteur Institut, Paris, France) and Dr. L. Selig (Hybrigenics S.A., Paris, France) for providing the two-hybrid bacterial system. We also thank Dr. A. Henne (Goettingen Genomics Laboratory, Institute for Microbiology and Genetics, Göttingen, Germany) for the comparisons of the Nrc proteins with the genome of the aerobic HB27 strain of *T. thermophilus*.

REFERENCES

- Richardson, D. J. (2000) *Microbiology* **146**, 551–571
- Poole, R. K., and Cook, G. M. (2000) *Adv. Microb. Physiol.* **43**, 165–224
- Uden, G., and Bongaerts, J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 217–234
- Friedrich, T., and Scheide, D. (2000) *FEBS Lett.* **479**, 1–5
- Gennis, R. P., and Stewart, V. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology* (Neidhart, F. C., ed) Vol. 1, pp. 217–261, ASM Press, Washington, D. C.
- Brock, T. D. (1978) in *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures* (Starr, M. P., ed) pp. 72–91, Springer-Verlag, New York
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczek, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H. J. (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**, 547–553
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L. A., and Berenguer, J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 215–227
- Ramírez-Arcos, S., Moreno, R., Zafra, O., Castan, P., Valles, C., and Berenguer, J. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2179–2183
- Zafra, O., Ramirez, S., Castan, P., Moreno, R., Cava, F., Valles, C., Caro, E., and Berenguer, J. (2002) *FEBS Lett.* **523**, 99–102
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L. A., Marin, I., and Berenguer, J. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3137–3143
- Lennox, E. X. (1955) *Virology* **1**, 190–206
- de Grado, M., Castán, P., and Berenguer, J. (1999) *Plasmid* **42**, 241–245
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W. J., and Berenguer, J. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 6473–6480
- Fernández-Herrero, L. A., Badet-Denisot, M. A., Badet, B., and Berenguer, J. (1995) *Mol. Microbiol.* **17**, 1–12
- Lasa, I., Castón, J. R., Fernández-Herrero, L. A., Pedro, M. A., and Berenguer, J. (1992) *Mol. Microbiol.* **11**, 1555–1564
- Koyama, Y., Okamoto, S., and Furukawa, K. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2251–2254
- Faraldo, M. M., de Pedro, M. A., and Berenguer, J. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 7458–7462
- Snell, F. D., and Snell, C. T. (1949) *Colorimetric Methods of Analysis*, Van Nostrand, New York
- Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5752–5756
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- Cava, F., de Pedro, M. A., Schwarz, H., Henne, A., and Berenguer, J. (2004) *Mol. Microbiol.* **52**, 677–690
- Macedo-Ribeiro, S., Martins, B. M., Pereira, P. J., Buse, G., Huber, R., and Soulimane, T. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 663–674
- Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W., and Richardson, D. J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1232**, 97–173
- Yano, T., Chu, S. S., Sled, V. D., Ohnishi, T., and Yagi, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4201–4211
- Kerscher, S. J. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 274–283
- Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R. P., and Maklashina, E. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 140–157
- Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T. M., and Iwata, S. (2003) *FEBS Lett.* **545**, 31–38
- Fee, J. A., Kula, D., Mather, M. W., and Yoshida, T. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 153–185
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., and Berenguer, J. (2003) *Plasmid* **49**, 2–8
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1995) *FEBS Lett.* **360**, 151–154
- Körner, H., Sofia, H. J., and Zumft, W. (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 559–592
- Rosenberg, A. H., Lada, B. N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier, W. (1987) *Gene (Amst.)* **56**, 125–135
- Viera, J., and Messing, J. (1987) *Methods Enzymol.* **153**, 3–11

Membrane-Associated Maturation of the Heterotetrameric Nitrate Reductase of *Thermus thermophilus*

Olga Zafra,¹ Felipe Cava,¹ Francis Blasco,² Axel Magalon,² and Jose Berenguer^{1*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain,¹ and Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS 31, Chemin J. Aiguier, 13402 Marseille, cedex 09, France²

Received 3 December 2004/Accepted 10 March 2005

The *nar* operon, coding for the respiratory nitrate reductase of *Thermus thermophilus* (NRT), encodes a di-heme b-type (NarJ) and a di-heme c-type (NarC) cytochrome. The role of both cytochromes and that of a putative chaperone (NarI) in the synthesis and maturation of NRT was studied. Mutants of *T. thermophilus* lacking either NarI or NarC synthesized a soluble form of NarG, suggesting that a putative NarCI complex constitutes the attachment site for the enzyme. Interestingly, the NarG protein synthesized by both mutants was inactive in nitrate reduction and misfolded, showing that membrane attachment was required for enzyme maturation. Consistent with its putative role as a specific chaperone, inactive and misfolded NarG was synthesized by *narJ* mutants, but in contrast to its *Escherichia coli* homologue, NarJ was also required for the attachment of the thermophilic enzyme to the membrane. A bacterial two-hybrid system was used to demonstrate the putative interactions between the NRT proteins suggested by the analysis of the mutants. Strong interactions were detected between NarC and NarI and between NarG and NarJ. Weaker interaction signals were detected between NarI, but not NarC, and both NarG and NarH. These results lead us to conclude that the NRT is a heterotetrameric (NarC/NarI/NarG/NarH) enzyme, and we propose a model for its synthesis and maturation that is distinct from that of *E. coli*. In the synthesis of NRT, a NarCI membrane complex and a soluble NarGJH complex are synthesized in a first step. In a second step, both complexes interact at the cytoplasmic face of the membrane, where the enzyme is subsequently activated with the concomitant conformational change and release of the NarJ chaperone from the mature enzyme.

Membrane-bound nitrate reductases are heterotrimeric enzymes that catalyze the reduction of nitrate, coupled to the generation of a proton-motive force across the cytoplasmic membrane during anaerobic respiration. In the nitrate reductase A (NRA) of *Escherichia coli*, different primary dehydrogenases transfer electrons to quinones, which function as electron donors to NarI, a di-heme b-type cytochrome with quinol dehydrogenase activity. From the outward-facing acceptor site of NarI, electrons are channeled to the inner face of the membrane, where they are transferred to NarH, a protein with four iron-sulfur clusters. Electrons are then transferred to an iron-sulfur cluster of NarG (23), finally to reach its Mo-bis molybdopterin guanine dinucleotide cofactor (MGD), where nitrate reduction takes place (1, 2, 31).

The NarG and NarH subunits form a complex that interacts with the NarI subunit at the inner face of the cytoplasmic membrane. The three-dimensional structure of NRA shows the existence of interactions between a C-terminal β -strand of the NarI subunit and two β -hairpins, one located at the N terminus of NarG and the other at an internal region of NarH (2). Therefore, attachment of the NarGH complex to the membrane depends on interactions between NarI and both components of the NarGH complex. Despite such interactions, a fraction of the NarGH active complex can be irreversibly de-

tached from the membrane after cell disruption (17). This soluble NarGH complex can still reduce nitrate in the presence of artificial electron donors, such as reduced viologens, which donate the electrons at a currently unknown point of this complex, probably the MGD cofactor (5). Moreover, *Escherichia coli* mutants that do not synthesize the NarI subunit produce a soluble and active NarGH complex, thus showing that its attachment to the membrane is not required for the synthesis of an active enzyme (3).

In all the organisms so far analyzed, the three structural subunits of the enzyme are expressed from a single operon, which also encodes a fourth protein, named NarJ. In *E. coli*, NarJ is required for the production of an active NarGH complex because of its role as a specific chaperone required for MGD incorporation into NarG (3, 4). It has been proposed for *E. coli* that such a maturation step takes place in the cytoplasm, before the attachment of the active NarGH complex to the NarI membrane subunit (4, 27).

In addition to NarGHJI homologues, three additional proteins are encoded by the *nar* operon of *Thermus thermophilus*. Two of these genes are located downstream of *narI* and code for nitrate/nitrite transporters (NarK and NarT). Although the presence of at least one of them is required for anaerobic growth, their absence does not affect the synthesis of an active NRT (22). The first gene of the operon is also specific to *T. thermophilus* and codes for a membrane-bound di-heme c-type cytochrome (NarC). We have shown that in the absence of NarC, the NarG protein remains soluble and inactive in nitrate reduction (29). Consequently, we proposed that NarC was required for the attachment of the NarGH complex to the

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-4978099. Fax: 34-91-4978087. E-mail: jberenguer@cbm.uam.es.

TABLE 1. Strains and plasmids used

Strain or plasmid	Description or use	Reference or source
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	10
<i>E. coli</i> BTH101	F' <i>cyo-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1(Str^r) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	12
<i>T. thermophilus</i> HB8	Wild-type strain	19; ATCC 27634
<i>T. thermophilus</i> HB8narC	HB8 <i>narC::kat</i>	29
<i>T. thermophilus</i> HB8narI	HB8 <i>narI::kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB8narJ	HB8 <i>narJ::kat</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> HB27nar	<i>T. thermophilus</i> HB27: <i>nar</i>	21
<i>T. thermophilus</i> L	<i>T. thermophilus</i> HB27: <i>nar</i> Δ <i>leuB</i>	This work
<i>T. thermophilus</i> LnarC	<i>T. thermophilus</i> HB27: <i>nar</i> Δ <i>leuB narC::kat</i>	This work
pUC118/119	<i>E. coli</i> cloning plasmids; Amp ^r	28
pUP3B	pUC119 derivative; clone carrying the whole <i>nrc</i> operon; Amp ^r	7
pKT1	<i>E. coli</i> plasmid carrying the kanamycin thermostable resistance gene (<i>kat</i>); Amp ^r , Kan ^r	15
pTH3 Δ EcoRV	Plasmid for the isolation of Δ <i>leuB</i> mutants	26
pIW	Suicidal vector; selection for leucine prototrophy	26
pIWnarC	Insertion of the wild-type <i>narC</i> gene into the <i>leuB</i> locus	This work
pT18	pUC19 derivative expressing T18 fragment of CyaA; Amp ^r	12
pT25	pACYC184 derivative expressing T25 fragment of Cya, Cm ^r	12
pT18zip	pT18, leucine zipper fused to T18 fragment	12
pT25zip	pT25, leucine zipper fused to T25 fragment	12
pT25gdh	pT25 derivative, T25-Gdh fusion protein, Cm ^r	7
pT18gdh	pT18 derivative, Gdh-T18 fusion protein, Amp ^r	7
pT25narJ	pT25 derivative, T25-NarJ fusion protein, Cm ^r	7
pT18narJ	pT18 derivative, NarJ-T18 fusion protein, Amp ^r	7
pT25narG	pT25 derivative, T25-NarG fusion protein, Cm ^r	7
pT18narG	pT18 derivative, NarG-T18 fusion protein, Amp ^r	7
pT25narH	pT25 derivative, T25-NarH fusion protein, Cm ^r	This work
pT18narI	pT18 derivative, NarI-T18 fusion protein, Amp ^r	This work
pT25narC- Δ Ps	pT25 derivative T25-NarC Δ Ps fusion protein, Cm ^r	This work
pT18narC- Δ Ps	pT18 derivative, NarC Δ Ps-T18 fusion protein, Amp ^r	This work
pT25narC-Cd	pT25 derivative, T25-NarCCd fusion protein, Cm ^r	This work
pT18narC-Cd	pT18 derivative, NarCCd-T18 fusion protein, Amp ^r	This work

membrane and that this binding was necessary for a subsequent “maturation” step. Bearing in mind that biochemical (9), genetic (3), and structural (2) evidence demonstrated that the attachment site for this respiratory enzyme in other bacteria was the NarI protein, we wondered what the actual role of NarI was in the synthesis and maturation of the thermophilic nitrate reductase.

In this article we investigate the role of the cytochrome *b* (NarI) on the attachment to the membrane and activation of the NRT and its relationship with the periplasmic cytochrome *c* (NarC). Our data demonstrate that NarI and NarC interact and that both are required for NarJ-dependent activation of the NarGH complex, which, unlike the NRA of *E. coli*, occurs after its binding to the membrane.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions. Table 1 lists the bacterial strains and plasmids used in this work. The *E. coli* strains were grown in Luria broth (LB) at 37 or 30°C. *T. thermophilus* was grown in TB medium (20), either aerobically with shaking (150 rpm) or anaerobically in TB with KNO₃ (40 mM) (7). Induction of the NRT synthesis was carried out under microaerobic conditions, as described previously (7). The minimal M162 medium was used to isolate Δ *leuB* derivatives of *T. thermophilus* (8).

Transformation was carried out by natural competence in *T. thermophilus* (13) and by conventional methods in *E. coli* (10). Selection of the transformed cells was done on TB or LB plates with kanamycin (30 mg/liter), ampicillin (100 mg/liter), and/or chloramphenicol (20 mg/liter).

Nucleic acid and protein analysis. Standard methods were used for DNA purification, restriction analysis, PCR, and DNA sequencing. Topology predictions were carried out online using the TMHMM program available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/> (25). For cell fractionation, samples from induced cultures of *T. thermophilus* were centrifuged, and the cells were resuspended in 1/10 volume of TS buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.5) containing a protease inhibitor cocktail (C-Complete Mini; Roche) at the concentration recommended by the manufacturer. After cell disruption by sonication (Braun Labsonic; 1 min in 0.5 s pulses, maximal power), the samples were centrifuged to discard unbroken cells (5,000 \times g, 5 min), and soluble and particulate fractions were separated by ultracentrifugation (150,000 \times g, 15 min at 4°C). Sensitivity to trypsin was assayed in 80- μ l cell fraction samples containing 2 mg/ml of protein. Two microliters of trypsin solution (50 mg/ml in HCl 1 mM) were added to the samples, which were then incubated at room temperature for the indicated times. Digestion was stopped by boiling in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer, and the proteins were separated by SDS-PAGE (14). NarG and NarJ were identified by Western blot with specific rabbit antisera (29) and detected by chemiluminescence with the ECL detection kit (Amersham).

Nitrate reductase activity. The activity of the nitrate reductase from *T. thermophilus* was measured at 80°C (20), with reduced methyl-viologen (MVr) as electron donor and potassium nitrate (40 mM) as electron acceptor (24). One enzyme unit was defined as the amount required to produce 1 nmol of nitrite per min. For practical reasons, the total units were normalized to 1 ml of a culture at an optical density at 550 nm (OD₅₅₀) of 1 (~10⁹ cells).

Isolation of insertion mutants. The isolation of the *narC::kat* mutant has already been described (29). In this mutant, the *kat* cassette interrupted *narC* at nucleotide position 125 from its ATG translation start codon. This *kat* gene codes for a thermostable resistance to kanamycin expressed from a constitutive promoter and does not have any transcriptional terminator to allow the expression of downstream genes (15). Therefore, in all the mutants used in this work the *kat* gene was inserted in the same transcription sense as the *nar* operon.

For the isolation of *narI* and *narJ* mutants, the *kat* gene was inserted into a PstI restriction site for *narI* and a SacI site for *narJ* in such a way that the coding sequences were interrupted at positions 522 and 324 relative to their ATG start codon, respectively. Upstream and downstream DNA sequences were added in both cases to provide appropriate arms for homologous recombination. Trans-

TABLE 2. Oligonucleotides used

Name	Sequence	Purpose
H1	5'-CTGGGTACCTCAGGACGGGAAGGCCCTCTACGG-3'	pT18narC-ΔSP
H2	5'-ATTCGATATCCTCCTAAGCTGGGCGCGGATC-3'	pT18narC-ΔSP/Cd
H4	5'-CTGGGTACCTGTCTCTGGCAGCTTCGGCCGAG-3'	pT18narC-Cd
H7	5'-AAAAGTGCAGGGATGAAGGTTAGAGCCCACATGTCC-3'	pT25narH
H8	5'-TTTAGGTACCTCGCCCCGCAAGGGGGGCTGGATG-3'	pT25narH
H17	5'-AAAAGTGCAGGGCAGGACGGGAAGGCCCTCTACGG-3'	pT25narC-ΔSP
H18	5'-ATTCGATATCCTCCTAAGCTGGGCGCGGATC-3'	pT25narC-ΔSP/Cd
H20	5'-AAAAGTGCAGGGGTCCTCTGGCAGCTTCGGCCGAG-3'	pT25narC-Cd
H24	5'-ACGCGTCGACGATGAAGGTTAGAGCCCACAT-3'	pT18narH
H25	5'-ATTCGATATCTCGCCCCGCAAGGGGGGCTGGA-3'	pT18narH
H26	5'-ACGCGTCGACGATGAAGTGAACGCCGCGCTCTTC-3'	pT18narI
H27	5'-ATTCGATATCAGCTGACCTCGCCAGTTGCG-3'	pT18narI
o27-35	5'-CGCAGTACCAGTCGTAG-3'	Presence of <i>narC::kat</i>
okat2	5'-GAAACTTCTGGAATCGC-3'	Presence of <i>narC::kat</i>
okat3	5'-GGAACGAATATTGGATA-3'	Presence of <i>kat</i>
okat4	5'-AGAAATTCTCTAGCGAT-3'	Presence of <i>kat</i>

formation and mutant selection were carried out as described previously (29). Mutants were checked by PCR and Southern blot.

Complementation of the *narC::kat* mutants. Complementation of the *narC::kat* mutant was carried out by insertion into its chromosome of a wild-type *narC* gene expressed under the control of the *narp* promoter. Selection was based on the complementation of a $\Delta leuB$ mutant (26) constructed in *T. thermophilus* HB27::*nar*. This strain is a facultative anaerobic derivative of the high transformation efficiency HB27 strain, to which the cluster for anaerobic respiration of the HB8 strain was transferred (21). Isolation of the $\Delta leuB$ derivative was carried out by transformation with plasmid pTH3ΔEcoRV (26) followed by negative selection with ampicillin (6) of leucine auxotrophs in M162 medium. A *narC::kat* derivative of this $\Delta leuB$ mutant was isolated as above to render the host strain used for complementation.

For complementation, the *narC* gene, expressed from the *narp* promoter, was inserted into the suicidal vector pIW, which contains a wild-type *leuB* gene (26), obtaining the pIWnarC plasmid. After transformation of the $\Delta leuB$ narC host strain with the latter, leucine prototrophs were selected on M162 medium with kanamycin. The simultaneous presence of the *narC::kat* mutation and the wild-type gene was assessed by PCR with the appropriate primers (Table 2).

Bacterial two-hybrid assays. A bacterial two-hybrid system based on the functional reconstitution of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase from its T18 and T25 domains was used to determine the putative interactions between the *nar* gene products (11, 12). For this, the coding sequences of the *nar* genes were cloned into plasmids pT18 or pT25 in order to be expressed as N- or C-terminal domains fused to the T18 or T25 domains of the adenylate cyclase, respectively (Table 1). Fusions containing deletion derivatives of NarC expressing the whole protein without its signal peptide (ΔSP, from amino acid positions 20 to 262) or its cytoplasmic domain (Cd, the C-terminal 20 amino acids) were also expressed by both plasmids. Constructions were carried out by adding appropriate enzyme restriction sites during amplification (Table 2).

The homo-oligomeric glutamate dehydrogenase, Gdh, from *T. thermophilus* HB8 was used as a control for positive interactions between thermophilic proteins. Negative controls were also carried out by assaying our fusion proteins against fusions expressing a leucine-zipper domain (12). Interactions were assayed through the β -galactosidase activity (12) of *E. coli* BTH101 cells cotransformed with pT18 and pT25 derivatives.

RESULTS

NarC and NarI are required for membrane attachment and maturation of the NRT. Figure 1A shows a scheme of the *narCGHJIKT* operon of *T. thermophilus*, in which the approximate insertion points and the transcription sense of the *kat* gene in the three *nar::kat* mutants used in this work are indicated.

Computer predictions about the NarC amino acid sequence (accession number Q934F6 in the Translated European Molecular Biology Laboratory TrEMBL database) suggest a peri-

plasmic location with a C-terminal anchor region consisting of a transmembrane helix followed by a positively charged cytoplasmic domain (Fig. 1B). Sequence comparisons also show the presence of two heme C binding motifs. Consistent with this, a specific staining procedure showed the presence of a cytochrome *c* of the size expected for NarC in membrane fractions of the wild-type strain, which was absent from the *narC::kat* mutant (29).

As expected from our previous work (29), the *narC::kat* mutant synthesized a soluble form of NarG (accession number O06459), the large subunit of the NRT (Fig. 2A). This soluble NarG was not able to reduce nitrate with MVr as the electron donor. To exclude the possibility that such a phenotype could

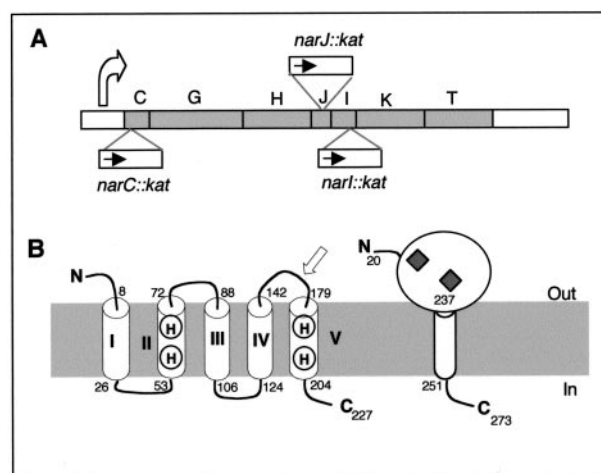


FIG. 1. The *nar::kat* mutants. A) Scheme showing the structure of the *nar* operon, the approximate location of the inserted *kat* gene inside *narC*, *narI*, and *narJ*, and the *narp* promoter location (curved arrow). B) Proposed topology for the NarI and NarC proteins. Amino acid positions that define the five membrane-spanning helices (I to V) in NarI and NarC are labeled. Conserved histidines involved in heme B coordination are indicated on helices II and V. The white arrow indicates the position where the NarI protein is interrupted in the *narI::kat* mutant. Diamonds indicate the presence of heme C groups in NarC. The cytoplasmic (in) and periplasmic (out) faces of the membrane are indicated.

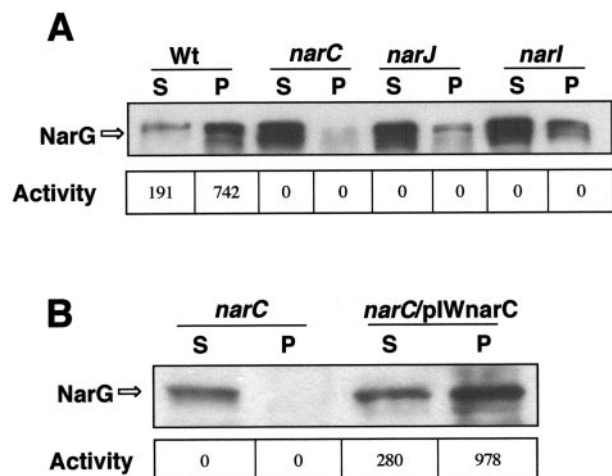


FIG. 2. Phenotype of *narC::kat* mutants. A) Western blot for detecting NarG in soluble (S) and particulate (P) fractions of nitrate/anoxia-induced cultures of the wild-type strain (Wt) and its three *narC::kat* derivatives (*narC*, *narJ*, *narI*). B) The presence of NarG is analyzed in the soluble (S) and particulate (P) fractions from a *narC::kat* mutant (*narC*) and from a derived strain complemented with a wild-type *narC* gene (*narC/pIWnarC*) by transformation with plasmid pIWnarC. The enzyme activities (nmol of nitrite/min and OD₅₅₀ unit) from each fraction are indicated.

be the consequence of a putative polar effect of the *kat* gene on the expression of genes located downstream of *narC* in the operon, we inserted a wild-type *narC* gene under the control of the *narp* promoter into the *leuB* locus of the chromosome (Materials and Methods). As shown in Fig. 2B, a normal membrane location and activity of the enzyme was recovered in the complemented strain. Therefore, the absence of NarC was responsible for the phenotype observed in the *narC::kat* mutant.

NarI (accession no. O06462 in TrEMBL) is predicted to have five membrane-spanning α -helices (I to V), its N- and C-termini facing the periplasm and the cytoplasm, respectively (Fig. 1B). As in its *E. coli* counterpart, four histidine residues are located in α -helices II and V, which coordinate two heme B groups in the mesophilic protein, implying a similar role in *T. thermophilus*. In the *narI* mutant, the *kat* gene was inserted close to the 3' end of the gene (arrow in Fig. 1B). Therefore, the fifth transmembrane helix (V), which carries two of these histidine residues required for heme B coupling, was deleted in this mutant.

The expected inability of the *narI::kat* mutant to couple the electron flow to the reduction of nitrate was confirmed by the absence of anaerobic growth with nitrate (not shown). When analyzed in more detail, the *narI::kat* mutants showed a phenotype almost identical to that of *narC::kat* mutants, in the sense that a large amount of NarG was found in the cytoplasmic fraction and that the enzyme was completely inactive in nitrate reduction with MVr as the electron donor (Fig. 2A).

Interaction between NarC and NarI. The results above showed that NarC and NarI were required for the attachment of NarG to the membrane (Fig. 2A). Therefore, it is reasonable to speculate that a membrane complex between both cytochromes could constitute the attachment site for the catalytic subunit of the enzyme. If this were true, some interactions between them should exist.

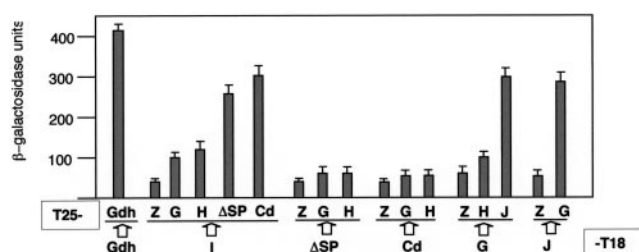


FIG. 3. Two-hybrid assays. Bacterial two-hybrid assays were developed, and the mean values of the β -galactosidase activity corresponding to six samples in two independent experiments were represented. The whole coding regions of *narI* (I), *narG* (G), *narH* (H), and *narJ* (J) and deletion derivatives of *narC* coding for a signal peptide-defective protein (Δ Ps) or for its cytoplasmic C-terminal (Cd) domain were cloned into plasmid pT18 and/or pT25 to generate the appropriate X-T18 and T25-X protein fusions, as indicated. Pairs of pT18 and pT25 derivatives were assayed for β -galactosidase expression in *E. coli* BTH101 cells. Controls for negative (Z) and positive (Gdh/Gdh) interactions were used.

To test this hypothesis, we used a bacterial two-hybrid system, which has proved to be effective for detecting interactions between components of the MGD biosynthesis pathway (18), between membrane components of the type IV secretion systems of the conjugative apparatus of *E. coli* (16) and also between membrane and soluble subunits of a new type of respiratory NADH that constitutes the natural electron donor for the NRT (7). The results are shown in Fig. 3. As may be seen, significant β -galactosidase activities (\sim 300 units) were detected when the interaction between NarG and NarJ was assayed, independently of their location as N- or C-terminal domains of the fusion proteins. This was consistent with the role of NarJ as a NarG-specific chaperone proposed for its homologue in *E. coli* (4). The values for the interaction detected between NarG and NarJ were only \sim 25% lower than those detected between our positive control, a homotrimeric glutamate dehydrogenase (Gdh) that is synthesized as enzymatically active forms both as C- and N-terminal fusion proteins from these plasmids (7).

The values obtained for the interaction between NarI and NarC derivatives lacking its signal peptide (Δ SP from amino acid position 20 to 262) to prevent its secretion were similar to that obtained for the interaction between NarJ and NarG. Moreover, protein fusions carrying only the cytoplasmic (Cd, the C-terminal 20 amino acids) domain of NarC, rendered even higher β -galactosidase signals with NarI. On the other hand, lower-but-significantly-higher-than-background β -galactosidase activities were detected in NarI than with both the NarG and NarH proteins. By contrast, interactions were not detected when the NarC derivatives were assayed with these proteins.

Thus, our data show that NarC interacts with NarI, essentially through its cytoplasmic domain, and suggest that the major contact of a NarCI complex with NarGH most probably takes place through NarI, as happens in the NRA of *E. coli* (2).

NarG is misfolded in *narI::kat* and in *narC::kat* mutants. When MVr was used as a direct electron donor, nitrite production was catalyzed by both the soluble (\sim 20% of total activity) and the particulate (\sim 80% of total activity) fractions of the wild-type strain (Fig. 2). However, neither the soluble

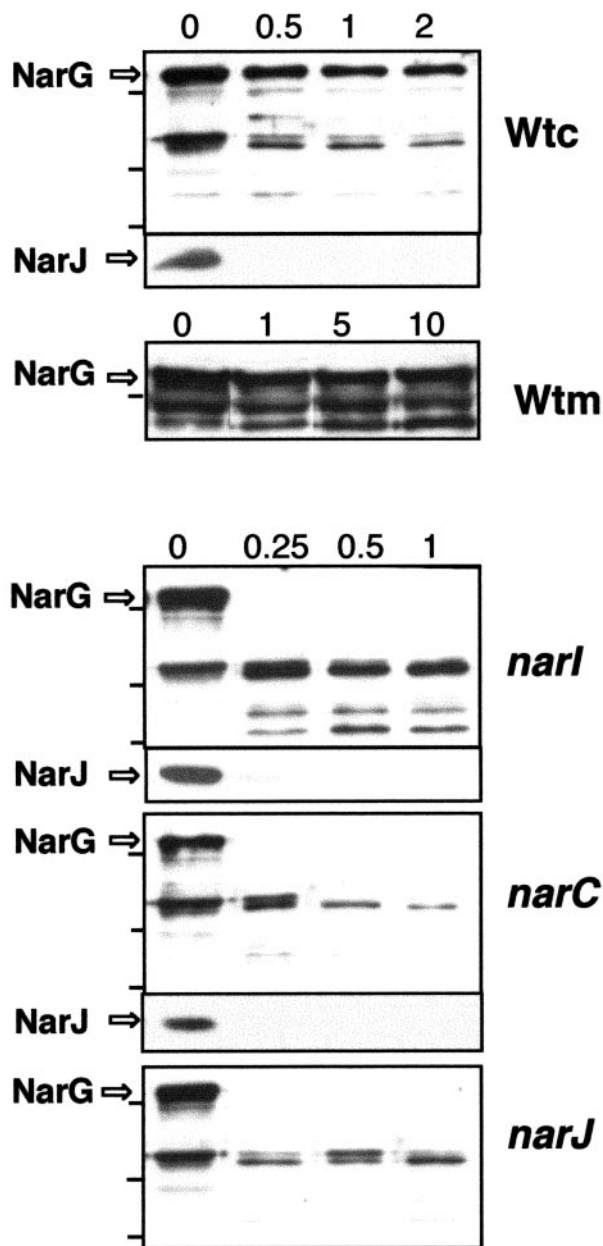


FIG. 4. Sensitivity of NarG to trypsin in *narI*, *narC*, and *narJ* mutants. The sensitivities to trypsin of NarG and NarJ from the soluble fraction of the wild-type strain (Wtc) and its three *nar::kat* derivatives were compared. The sensitivity of NarG was also assayed in membrane fractions of the wild type (Wtm). The samples were incubated with the protease for the indicated times (min).

nor the particulate fractions of the *narC::kat* and the *narI::kat* mutants were active in nitrate reduction (Fig. 2). As MVr donates the electrons directly to the NarGH complex (5), these data suggest that NarC and NarI are both involved in a maturation step of the enzyme.

To check whether such absence of activity was related to enzyme folding, we compared the sensitivity of the NarG protein to trypsin in the soluble fraction of each mutant with that of the soluble fraction of the wild-type strain. As shown in Fig. 4, whereas the NarG protein from either of the *nar::kat* mu-

tants was digested in less than 15 seconds by the protease, undigested NarG was detected in the wild-type strain even after 2 min of treatment. As an internal control, the NarJ protein was detected by Western blot in the same samples, where it showed identical protease sensitivity in the mutant and in the wild-type strains.

It was of particular note that the sensitivity of NarG to the protease in the soluble fraction of the *narJ::kat* mutant was similar to that of the *narC::kat* or the *narI::kat* mutants. Therefore, the NarC and NarI proteins are as important for the maturation of the NarG protein as its specific chaperone NarJ.

NarJ is also required for membrane attachment of NarG. As shown above, the *T. thermophilus narJ::kat* mutant synthesized an inactive and misfolded form of NarG (Fig. 4). However, whereas most of this inactive NarG protein remains attached to the membrane in *narJ* mutants of *E. coli* (3), most of the NarG protein appeared in the soluble fraction in the *narJ::kat* mutant of *T. thermophilus* (Fig. 2). Thus, in the thermophile, NarJ is also required for the attachment of the enzyme to the membrane NarCI complex.

DISCUSSION

The ability of *T. thermophilus* to grow anaerobically depends on the presence of a conjugative element, which encodes a complete respiratory electron transport chain consisting of a terminal reductase (NRT), and a primary electron donor, a new type of NADH dehydrogenase (NRC). Both enzyme complexes are expressed under the control of transcription factors that are also encoded by this "respiratory island" (7, 20, 21).

The structure of the *E. coli* NRA has been resolved at a resolution of 1.9 Angstrom (2). The enzyme consists of three subunits, containing eight redox centers that conduct the electrons from the outer face of the membrane through two heme B groups of NarI, four iron-sulfur clusters of NarH, to reach another iron-sulfur cluster of NarG, and finally its MGD cofactor, where nitrate reduction takes place. The amino acid residues that participate in the coordination of these eight redox centers are conserved in the sequence of the corresponding thermophilic homologues from the NRT, supporting the idea that the electron transfer pathway and, therefore, their spatial location in the structure of the enzyme are probably similar.

Similarly, the high degree of sequence identity between NarG (50%) and NarH (52.3%) of the NRT and their NRA counterparts (20) is consistent with the hypothesis of the conservation in the thermophilic enzyme of the extended interactions observed between their mesophilic homologues. In fact, the long α -helix that in the *E. coli* NarG (Asn28-Gln40) is engulfed by NarH, is also well conserved in the thermophilic NarG protein, implying the existence of a similar interaction between the thermophilic proteins. Despite this, we could not detect any significant interactions between NarG and NarH (Fig. 3), and, in parallel experiments, between their mesophilic homologues NarG and NarH (data not shown). Since extensive interactions between these proteins are evident from their structure (2), our data suggest the requirement of an additional component, probably the NarJ protein, to allow the detection of effective interactions between them. In support of this, the presence of the three proteins, NarG, NarH, and NarJ, of

NRA is required to obtain positive interactions with the proteins of the MGD biosynthesis pathway in this two-hybrid assay (27).

In contrast to the great similarity of NarG and NarH to their *E. coli* counterparts, the NarI protein shows a lower degree of identity (28%) with the *E. coli* NarI. In fact, the C-terminal cytoplasmic domain, which is involved in important electrostatic and hydrogen-bonded interactions with the NarGH complex, is longer and more hydrophobic in the thermophilic NarI protein, suggesting that there are differences in the way in which the NarGH complex attaches to the membrane in the NRT. Concomitantly, the thermophilic NarG protein presents interesting sequence differences with the *E. coli* NarG near to its N terminus, which should affect the way in which it binds to NarI: the N-terminal α -helix (Ser1-Arg6), involved in membrane anchoring, and the immediate β -hairpin, which forms a twisted β -sheet with the C-terminal β -strand of NarI, are absent from the thermophilic NarG protein. Therefore, the existence of a different set of interactions between NarI and the NarGH complex in the nitrate reductase of *T. thermophilus* is supported at the sequence level.

In this context, our data strongly suggest that NarC constitutes an additional subunit of the NRT. Computer predictions of the topology of this protein suggest that a single transmembrane α -helix keeps the protein anchored to the membrane, with a small (20 amino acids) and positively charged (6 residues of Arg) C-terminal domain protruding into the cytoplasm. Our two-hybrid assays indicate that this small domain is responsible for its interaction with NarI (Fig. 3) but does not rule out the possible existence of interactions between this protein and either NarG, NarH, or even NarJ, whose presence is required for binding the enzyme to the membrane. Overall, and although putative conformational effects on NarI require consideration, the most likely explanation of the solubilization of NarG in the absence of NarC is the existence of some kind of interaction between them.

In addition to being required for membrane attachment, NarC contains two heme C-binding sequences, implying that two more redox centers are present in the NRT than in its mesophilic counterparts. Based on the aforementioned topology, and on the inhibition of electron transport toward the NRT by inhibitors of the quinone cycle (7), we propose that one of these heme C groups of NarC constitutes the first electron acceptor from the reduced menaquinone-8, the major quinone present in the membranes of anaerobically grown cells of *T. thermophilus*. Two unpublished results support this hypothesis. First, electron transport towards the NRT is sensitive to antimycin A, an inhibitor that acts between cytochromes *b* and *c*₁ in mitochondrial respiration. Second, reduced TMPD (tetramethyl-para-phenyl-diamine), which donates the electrons preferentially to the cytochrome *c* in mitochondria (between complexes III and IV) (30), also functions as an electron donor for the NRT in a rotenone-insensitive manner.

In addition to the heterotetrameric nature of NRT, there are also important differences between the maturation pathways of the mesophilic and the thermophilic enzymes. First, a deficiency in either NarI or NarC results in an inactive enzyme, whereas in *E. coli* an active enzyme is synthesized even in the absence NarI (3, 5). Therefore, binding to the membrane is required for the activation of the enzyme in *T. thermophilus* but

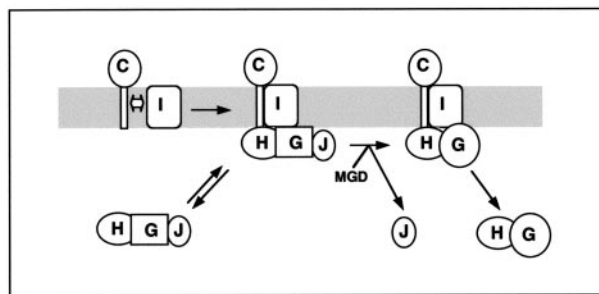


FIG. 5. Model for the synthesis of nitrate reductase in *T. thermophilus*. A membrane NarCI and a soluble NarGHJ complex are initially formed. In the soluble complex, the NarG protein is inactive (squares). After attachment to the membrane, an inactive pentameric apo-nitrate reductase is formed. The enzyme is subsequently activated through the insertion of the Mo-bis-MGD cofactor (MGD) and the concomitant exit of the NarJ chaperone to render an active, heterotetrameric enzyme (circled NarG). Eventually, the active NarGH complex irreversibly separates from the membrane, giving rise to soluble forms that are active in nitrate reduction with artificial electron donors but not functional in nitrate respiration.

not in *E. coli*. Second, whereas a deficiency in NarJ results in a membrane-bound apo-nitrate reductase in *E. coli*, in *T. thermophilus* the absence of NarJ results in soluble apo-nitrate reductase. Consequently, NarJ is also required for the binding of the enzyme to the membrane in *T. thermophilus*.

All these data lead us to propose the model of enzyme maturation shown in Fig. 5. In this model, the synthesis of the NRT starts in two parallel cytoplasmic and membrane-bound pathways. We propose that a NarCI membrane complex is formed, as suggested by the two-hybrid assays and by the effect of the inactivation of any of them in the solubility of NarG. Thus, it can be inferred from our data that the cytoplasmic domain of NarC interacts with one or more of the cytoplasmic domains of NarI to form the binding site for the cytoplasmic complex.

The cytoplasmic pathway is more similar to that proposed for *E. coli*. It has been recently shown in this organism that a tripartite NarJ-NarG-NarH complex is required for the interaction with enzymes of the MGD synthesis pathway (27). Interactions between NarG and NarJ were detected in the *T. thermophilus* model, and there is no doubt that extensive interactions between NarG and NarH are required for the activity of the enzyme. The presence of a significant fraction (50 to 60%) of protease-sensitive apo-nitrate reductase in the cytoplasm of wild-type cells of *T. thermophilus* during the synthesis of the NRT supports the existence of such a soluble and inactive NarGHJ complex.

In a subsequent step, this tripartite complex binds to the membrane, probably in a reversible manner. The requirement for NarJ in this complex was deduced from the solubilization of NarG in *narJ::kat* mutants and also from the presence of minor amounts of NarJ in membrane fractions (not shown). Moreover, the small amount of protease-sensitive NarG in the membrane (<10% [Fig. 4]) reflects the presence of such a membrane-bound complex before activation.

Once the five-member complex is bound to the cytoplasmic face of the membrane, activation takes place through the catalyzed insertion of the MGD cofactor and the concomitant

conformational change, which produces a protease-resistant enzyme, and the exit of NarJ from the complex. In the *E. coli* system, this step requires interaction with proteins of the MGD biosynthesis pathway and takes place in the cytoplasm (27). Consequently, the participation of additional unknown factors in this activation process is a likely requirement in *T. thermophilus*. In this context, the soluble activity found after cell fractionation is explained as the result of some kind of turnover process that is not yet understood, as revealed by the increase in the amount of soluble activity after inhibition of the protein synthesis (not shown). Therefore, the soluble fraction of a wild-type cell growing anaerobically contains a mixture of “new” inactive and sensitive-to-protease apo-nitrate reductase and “old” but still active enzyme that has been separated from the membrane, probably irreversibly, as happens with its *E. coli* counterpart (9).

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by project BIO2004-02671 from the “Ministerio de Educación y Ciencia”. An institutional grant from the Fundación Ramón Areces to CBMSO is acknowledged. O. Zafra and F. Cava held fellowships from the Comunidad de Madrid and the “Ministerio de Educación y Ciencia,” respectively.

We greatly appreciate the kind provision of the bacterial two-hybrid system by D. Ladant (Pasteur Institute, Paris, France) and L. Selig (Hybrigenics S.A., Paris, France). We are also grateful to M. Tamakoshi for sending us the *leuB*-based complementation system.

REFERENCES

- Berks, B. C., S. J. Ferguson, J. W. Moir, and D. J. Richardson. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* **1232**:97–173.
- Bertero, M. G., R. A. Rothery, M. Palak, C. Hou, D. Lim, F. Blasco, J. H. Weiner, and N. C. Strynadka. 2003. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat. Struct. Biol.* **10**:681–687.
- Blasco, F., J. Pommier, V. Augier, M. Chippaux, and G. Giordano. 1992. Involvement of the *narJ* and *narW* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**:221–230.
- Blasco, F., J.-P. d. Santos, A. Magalon, C. Frixon, B. Guigliarelli, C.-L. Santini, and G. Giordano. 1998. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**:435–447.
- Buc, J., C. L. Santini, F. Blasco, R. Giordani, M. L. Cárdenas, M. Chippaux, A. Cornish-Bowden, and G. Giordano. 1995. Kinetic studies of a soluble alpha beta complex of nitrate reductase A from *Escherichia coli*. Use of various alpha beta mutants with altered beta subunits. *Eur. J. Biochem.* **234**:766–772.
- Castán, P., M. A. de Pedro, C. Risco, C. Vallés, L. A. Fernández, H. Schwarz, and J. Berenguer. 2001. Multiple regulatory mechanisms act on the 5' untranslated region of the S-layer gene from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* **183**:1491–1494.
- Cava, F., O. Zafra, A. Magalon, F. Blasco, and J. Berenguer. 2004. A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **279**:45369–45378.
- Degryse, E., N. Glansdorff, and A. Piérard. 1978. A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Arch. Microbiol.* **117**:189–196.
- Demoss, J. A., T. Y. Fan, and R. H. Scott. 1981. Characterization of subunit structural alterations which occur during purification of nitrate reductase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**:54–64.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5752–5756.
- Karimova, G., A. Ullmann, and D. Ladant. 2000. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **328**:59–73.
- 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.
- Laemmli, U., and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4.I: DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**:575–599.
- Lasa, I., J. R. Castón, L. A. Fernández-Herrero, M. A. Pedro, and J. Berenguer. 1992. Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.* **11**:1555–1564.
- Llosa, M., S. Zunzunegui, and F. de la Cruz. 2003. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:10465–10470.
- MacGregor, C. H. 1976. Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in *Escherichia coli*: evidence for a soluble precursor. *J. Bacteriol.* **126**:122–131.
- Magalon, A., C. Frixon, J. Pommier, G. Giordano, and F. Blasco. 2002. In vivo interactions between gene products involved in the final stages of molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**:48199–48204.
- Oshima, M., and K. Imahori. 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese hot spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**:102–112.
- Ramírez-Arcos, S., L. A. Fernández-Herrero, and J. Berenguer. 1998. A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochem. Biophys. Acta* **1396**:215–227.
- Ramírez-Arcos, S., L. A. Fernández-Herrero, I. Marín, and J. Berenguer. 1998. Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **180**:3137–3143.
- Ramírez-Arcos, S., R. Moreno, O. Zafra, P. Castán, C. Vallés, and J. Berenguer. 2000. Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* **182**:2179–2183.
- Rothery, R. A., M. G. Bertero, R. Cammack, M. Palak, F. Blasco, N. C. Strynadka, and J. H. Weiner. 2004. The catalytic subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase A contains a novel [4Fe-4S] cluster with a high-spin ground state. *Biochemistry* **43**:5324–5333.
- Snell, F. D., and C. T. Snell. 1949. Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand, New York, N.Y.
- Sonnhammer, E., G. von Heijne, and A. Krogh. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, p. 175–182. Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB98).
- Tamakoshi, M., M. Uchida, K. Tanabe, S. Fukuyama, A. Yamagishi, and T. Oshima. 1997. A new *Thermus-Escherichia coli* shuttle integration vector system. *J. Bacteriol.* **179**:4811–4814.
- Vergnes, A., K. Gouffi-Belhabich, F. Blasco, G. Giordano, and A. Magalon. 2004. Involvement of the molybdenum cofactor biosynthetic machinery in the maturation of the *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J. Biol. Chem.* **279**:41398–41403.
- Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**:3–11.
- Zafra, O., S. Ramírez-Arcos, P. Castán, R. Moreno, F. Cava, C. Vallés, E. Caro, and J. Berenguer. 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.
- Zhang, Z., L. Huang, V. M. Shulmeister, Y. I. Chi, K. K. Kim, L. W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry, and S. H. Kim. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc1*. *Nature* **392**:677–684.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Rev.* **61**:533–616.

Biochemical and regulatory properties of a respiratory island encoded by a conjugative plasmid in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*

F. Cava and J. Berenguer¹

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Abstract

In the present paper, we summarize the current knowledge on the first step of the denitrification pathway in the ancestral extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. In this organism, nitrate respiration is performed by a mobilizable respiratory island that encodes a new type of respiratory NADH dehydrogenase as electron donor, a tetrameric membrane nitrate reductase as final electron acceptor, two nitrate/nitrite transporters and the transcription factors required for their expression in response to nitrate and anoxia.

The genus *Thermus*

At present, the genus *Thermus* includes hundreds of thermophilic strains isolated from different environments all over the world. From an evolutionary point of view, this genus belongs to one of the deepest branches of the bacterial phylogenetic trees based on the 16 S RNA sequence [1], supporting the hypothesis that its metabolic pathways preceded in evolution those found in 'modern' bacteria. This ancient origin and properties such as fast growth, natural competence and the availability of a few genetic tools [2] had made some strains of this genus excellent laboratory models for the study of thermophilic bacteria. In addition, the thermostability of their enzymes makes them ideal not just for biotechnological applications, but also for structural biology owing to their easier crystallization. In fact, many high-resolution crystals from hetero-oligomeric complexes such as the RNA polymerase [3] or the ribosome have been obtained first from *Thermus thermophilus* [4]. At present, two strains have been sequenced, allowing a better knowledge of the biology of this genus.

Horizontal transference of nitrate respiration

Despite the initial description of the genus as obligate aerobes, some strains of *Thermus* spp. can grow anaerobically with different electron acceptors. This is the case for *T. thermophilus*, a species that includes aerobic strains, such as HB27, and facultative ones, which use nitrogen oxides as electron

acceptors to either produce nitrite as the final product or carry out a complete denitrification of N₂.

Interestingly, the ability to respire nitrate could be transferred by conjugation from a facultative to an aerobic strain of *T. thermophilus*, allowing the latter to grow anaerobically [5]. The genetic analysis of the exconjugant strain revealed the insertion into its chromosome of a DNA fragment of at least 30 kb in size. The partial sequence of this DNA insertion revealed the presence of two putative operons in the same DNA strand, one coding for homologues of the membrane-bound nitrate reductase subunits and nitrate transporters (*nar* operon) and the other coding for homologues of electron transporters and type II NADH dehydrogenase (*nrc* operon). Putative regulators (*regAB*) and an inactive homologue of Fe²⁺ transporters separate these operons in the complementary strand. Two additional ORFs (open reading frames) coding for well-conserved homologues of genes of unknown functions encoded around nitrogen fixation clusters were located immediately downstream of *narT* (Figure 1A). A cryptic replicative origin (*ori*) functional in facultative strains was identified immediately upstream of these conserved genes.

The *nar* operon

The structure and biology of the heterotrimeric respiratory NRA (nitrate reductase A) from *Escherichia coli* and other proteobacteria are well known [6–9]. During respiration, electrons from reduced quinones are delivered at the external face of the membrane to a polytopic dihaem cytochrome *b* (NarI), which transfers them to the cytoplasmic face of the membrane. There they reduce NarH, a protein with four iron–sulphur clusters. From this protein, electrons reach NarG, a protein that contains another 3Fe–4S cluster, and an MGD (Mo–bis–molybdopterin guanine dinucleotide) cofactor, where nitrate reduction takes place [9].

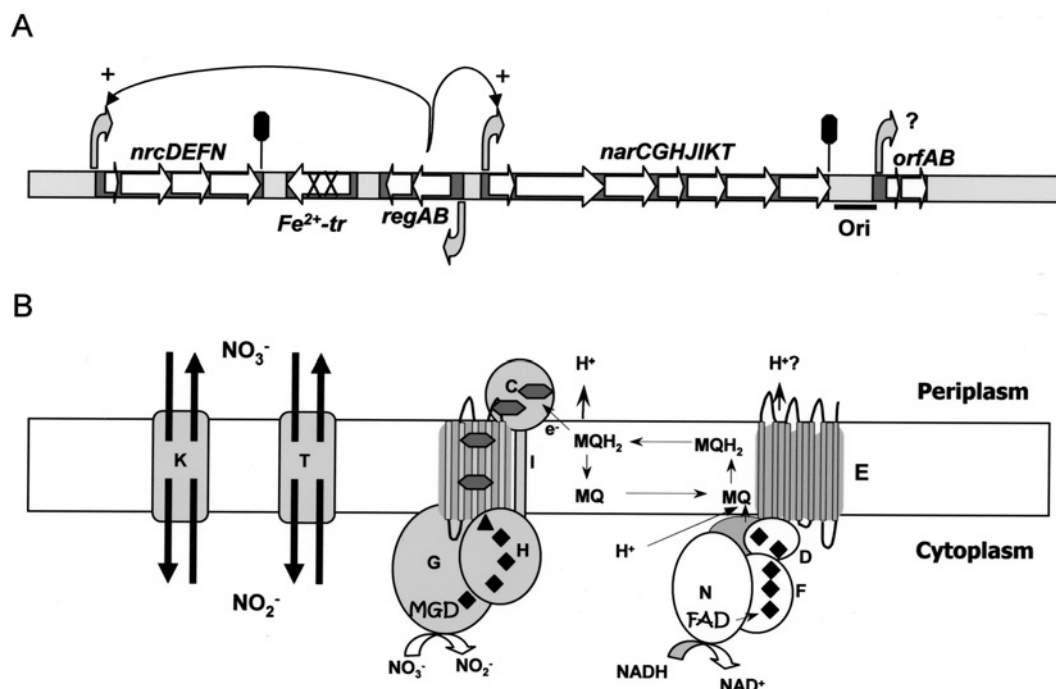
Key words: anaerobic growth, horizontal transference, NADH dehydrogenase, nitrate respiration, thermophile, *Thermus*.

Abbreviations used: MGD, Mo-bis-molybdopterin guanine dinucleotide; NDH, respiratory NADH dehydrogenase; NR, nitrate reductase; NRA, nitrate reductase A; NRC, nitrate respiration chain; ORF, open reading frame; SQR, succinate:quinone oxidoreductase.

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

Figure 1 | Genes and proteins of the nitrate respiration island of *T. thermophilus*

(A) The scheme shows the approximate location and transcription sense of the operons and gene clusters implicated in nitrate reduction (*nar*), NADH oxidation (*nrc*) and regulation (*reg*). An inactive homologue of iron transporters containing two mutations (Fe^{2+} -tr), and two conserved genes of unknown function (*orf*) are also shown. (B) The subunit structure of NR (C, I, H and G) and Nrc (E, D, F and N) is shown with the approximate location of the iron-sulphur clusters (triangles and diamonds), the haem *b* and *c* groups (hexagons), the putative FAD and MGD. The polytopic membrane transporters (K and T) are also shown. The hypothetical redox cycle of menaquinone-8 (MQ) is suggested.



In most bacteria, these subunits are encoded within a four-gene operon in the order *narG-narH-narJ-narI*. The fourth component, *narJ*, codes for a specific chaperone required for the activation of NarG [10]. The *nar* operon from *T. thermophilus* codes for homologues of these four proteins [11]. Sequence comparisons show high similarities between NarG and NarH from the thermophile and their counterparts from NRA (48–50% identity). This includes the conservation of the sequences corresponding to all of the redox centres, indicating that the electron-transfer pathway operates through these subunits, and therefore their spatial locations in the three-dimensional structure are probably similar. In contrast, the thermophilic NarI shows lower overall similarity to its *E. coli* counterpart, especially near the cytoplasmic C-terminal domain, which in the three-dimensional structure of NRA makes extended contacts with both NarI and NarG [9]. This, and some differences in the sequence close to the N-terminus between the corresponding NarG subunits, supports the existence of differences in the way in which NarI interacts with NarG and NarH in the NR (nitrate reductase) from *T. thermophilus* [12].

In addition to these four genes, the *nar* operon from *T. thermophilus* (*narCGHJIKT*) codes for three more proteins. The last two genes code for homologues of nitrate/

nitrite polytopic membrane transporters of the major facilitator superfamily. They can functionally replace each other upon mutation, but the absence of both of them precludes anaerobic growth [13]. Such apparent redundancy of nitrate transporters has been found in *Pseudomonas* and in a related genus, *Paracoccus*, where a gene fusion of two transporters with different activities was described [14]. Therefore, and despite their ability to replace each other after mutation, some kind of specificity in the roles of these two NarK homologues should exist in *T. thermophilus* to allow their maintenance in an organism of a small genome size (2 Mb) that shows very few gene duplications [15].

The heterotetrameric nature of the NR from *T. thermophilus*

The first gene of the *nar* operon encodes a dihaem cytochrome *c* (NarC) that shares 38% identity within its first 100 amino acids with the periplasmic cytochrome c_{552} . This includes the presence of an almost identical signal peptide for secretion in such a way that NarC is predicted to be a periplasmic protein anchored to the membrane through a C-terminal transmembrane α -helix, and showing a short (20 amino acids) and positively charged sequence at the cytoplasmic face [16].

NarC is essential for nitrate respiration. In its absence, NarG remains soluble, inactive in nitrate reduction with artificial electron donors and misfolded [12]. Therefore NarC is required to anchor NarG to the membrane and also for an as yet unknown maturation step that, in contrast with the *E. coli* NRA [10], takes place at the cytoplasmic face of the membrane. A bacterial two-hybrid assay showed that NarC interacts with NarI, thus indicating that NarC constitutes a fourth subunit of the NR from *T. thermophilus* (Figure 1B) [12].

A nitrate-specific respiratory NDD (NADH dehydrogenase)

The four-gene operon *nrcDEFN* (for nitrate respiration chain) is located upstream of the *nar* operon (Figure 1A). Three of these genes encode homologues of electron transporters of respiratory chains: NrcD to ferredoxins, NrcF to the iron-sulphur subunit of SQRs (succinate:quinone oxidoreductases) and NrcN to type II NDHs. Despite its predicted soluble nature, these three components are membrane-bound in the wild-type strain. In contrast, NrcE codes for a polytopic integral protein with a large (120 amino acids) C-terminal cytoplasmic domain without homologues in the protein data banks. Mutation of NrcE results in solubilization of all the other components. This, and results from two-hybrid assays showing the existence of strong interactions between the C-terminal cytoplasmic domain of NrcE and the three other Nrc proteins, supports the notion that the *nrc* operon encodes a heterotetrameric complex bound to the membrane through NrcE (Figure 1B) [17].

The absence of one among *nrcE*, *nrcF* and *nrcN* results in very low anaerobic growth rates under nitrate respiration conditions, thus supporting a relevant role in this process. In fact, an *in vitro* assay demonstrated that the NRC complex was implicated in an NADH oxidation step tightly coupled with nitrate reduction: in the absence of nitrate, there was no NADH oxidation. However, such coupling was mediated by the quinone pool (menaquinone-8), as inhibitors such as rotenone, diuron and HQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide) blocked both NADH oxidation and nitrite production. Consequently, the NRC complex was defined as a tetrameric respiratory NDH specific for nitrate respiration [17].

From an evolutionary point of view, it is interesting to note that most bacteria can synthesize two types of respiratory NDH, although a third type of Na⁺-pumping NDH has been described, especially, but not only, in marine bacteria [18,19]. During high-energy conditions, such as aerobic growth in rich medium, *E. coli* synthesizes a monomeric type II NDH that reduces the quinones without extruding protons. In contrast, under low-energy conditions, such as anaerobic respiration, a multimeric (14 subunits) proton-translocating enzyme known as type I NDH is the major primary electron donor to the respiratory chain [20]. In comparison with these, the NRC (nitrate respiration chain) complex constitutes a new type (IV) of respiratory NDH, more similar, from

a structural point of view, to the SQR than to the other NDHs (Figure 1B) [17]. It is not known whether or not this nitrate-specific NDH can extrude protons during NADH oxidation.

Regulation of nitrate respiration

During aerobic growth, type I NDH (encoded by the *nqo* operon) is strongly expressed in *T. thermophilus*, probably because there is not any homologue of type II NDH encoded into its chromosome [15]. When cells are shifted to anaerobic growth conditions, the *nar* and the *nrc* operons are expressed simultaneously from their promoters and, concomitantly, the *nqo* promoter is repressed [17]. It is noteworthy that such an effect requires the absence of or a decrease in the oxygen concentration and the presence of nitrate, indicating that a two-signal integration system co-ordinates their expression, in a similar way to that of denitrifying bacteria. As neither the *nrc* nor the *nar* promoter functions in the aerobic strain HB27, but they do in its facultative exconjugant derivative, it was concluded that such regulatory elements were encoded within the transferred DNA fragment [2,17]. Subsequent sequence analysis revealed the presence of two ORFs in the complementary chain between the *nrc* and the *nar* operons, which encode homologues of transcription regulators (provisionally named RegA and RegB), one of them related to the CRP (cAMP receptor protein)/FNR (fumarate and nitrate reductase regulator) protein family. Their detailed role in cell signalling, and the way in which they interact with each promoter, are currently under study, but preliminary results demonstrate that both are required for the induction of the P_{nrc} and the P_{nar} promoters.

Concluding remarks

The ability to respire nitrate in *T. thermophilus* is encoded within a small DNA fragment that can be transferred to and inserted into the chromosome of the aerobic strain HB27, making it competent to colonize nitrate-rich anaerobic environments. The inserted DNA fragment codes not just for the expected terminal NR, but also for a new type of respiratory NDH and for the regulatory elements involved in their expression. A cryptic replicative origin (Figure 1A, Ori) is also located immediately downstream of the *nar* operon, and the still unidentified origin for conjugative transference seems to be downstream and apparently not far from the *nar* operon. Therefore this DNA element constitutes an apparently self-mobilizable 'nitrate respiratory island', the putative origin of which might be only speculated upon. Phylogenetic analysis of NarG [21] and other subunits of the NR and NRC complexes (F. Cava and J. Berenguer, unpublished work) supports an ancient origin for both enzymes, in agreement with the phylogenetic position of *Thermus* spp. deduced from its 16S RNA sequence. The G + C content of this 'island' is also similar to that of the whole chromosome, and the thermal stability of NR and NRC is clearly fitted to the growth conditions of the genus. In contrast, the presence of mutated genes between

the *nar* and the *nrc* operons (iron transporter), and also downstream of the *nar* operon (results not shown), indicates that the nitrate respiration island has been acquired recently by *T. thermophilus*, probably from another *Thermus* sp. strain.

This work has been supported by project BIO2004-02671 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. An institutional grant to the CBMSO from the Fundación Ramón Areces is also acknowledged.

References

- Hartmann, R.K., Wolters, B., Kroger, B., Shultze, S., Spetch, T. and Erdmann, V.A. (1989) *Syst. Appl. Microbiol.* **11**, 243–249
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F. and Berenguer, J. (2003) *Plasmid* **49**, 2–8
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K. and Darst, S.A. (1999) *Cell (Cambridge, Mass.)* **98**, 811–824
- Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001) *Cell (Cambridge, Mass.)* **106**, 233–241
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L.A., Marín, I. and Berenguer, J. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3137–3143
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W. and Richardson, D.J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1232**, 97–173
- Zumft, W.G. (1997) *Microbiol. Mol. Rev.* **61**, 533–616
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S. and Taylor, C.J. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 165–178
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H. and Strynadka, N.C. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 681–687
- Blasco, F., Pommier, J., Augier, V., Chippaux, M. and Giordano, G. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 221–230
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L.A. and Berenguer, J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 215–227
- Zafra, O., Cava, F., Blasco, F., Magalon, A. and Berenguer, J. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 3990–3996
- Ramírez-Arcos, S., Moreno, R., Zafra, O., Castén, P., Vallés, C. and Berenguer, J. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2179–2183
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. and Moir, J.W. (2002) *Mol. Microbiol.* **44**, 157–170
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martínez-Arias, R. et al. (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**, 547–553
- Zafra, O., Ramírez-Arcos, S., Castán, P., Moreno, R., Cava, F., Vallés, C., Caro, E. and Berenguer, J. (2002) *FEBS Lett.* **523**, 99–102
- Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F. and Berenguer, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 45369–45378
- Melo, A.M., Bandejas, T.M. and Teixeira, M. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 603–616
- Hayashi, M., Nakayama, Y. and Unemoto, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 37–44
- Uden, G. and Bongaerts, J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 217–234
- Philippot, L. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1577**, 355–376

Received 5 September 2005

Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE

Felipe Cava,¹ Oleg Laptenko,^{2†} Sergei Borukhov,²
Zahra Chahlaflafi,¹ Emilio Blas-Galindo,¹
Paulino Gómez-Puertas¹ and José Berenguer^{1*}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,
Departamento de Biología Molecular, Universidad
Autónoma de Madrid, Madrid, 28049, Spain.

²Department of Cell Biology, UMDNJ-SOM, Stratford, NJ
08084-1489, USA.

Summary

The strains of *Thermus thermophilus* that contain the nitrate respiration conjugative element (NCE) replace their aerobic respiratory chain by an anaerobic counterpart made of the Nrc-NADH dehydrogenase and the Nar-nitrate reductase in response to nitrate and oxygen depletion. This replacement depends on DnrS and DnrT, two homologues to sensory transcription factors encoded in a bicistronic operon by the NCE. DnrS is an oxygen-sensitive protein required *in vivo* to activate transcription on its own *dnr* promoter and on that of the *nar* operon, but not required for the expression of the *nrc* operon. In contrast, DnrT is required for the transcription of these three operons and also for the repression of *nqo*, the operon that encodes the major respiratory NADH dehydrogenase expressed during aerobic growth. Thermophilic *in vitro* assays revealed that low DnrT concentrations allows the recruitment of the *T. thermophilus* RNA polymerase σ^A holoenzyme to the *nrc* promoter and its transcription, whereas higher DnrT concentrations are required to repress transcription on the *nqo* promoter. In conclusion, our data show a complex auto-inducible mechanism by which DnrT functions as the transcriptional switch that allows the NCE to take the control of the respiratory metabolism of its host during adaptation to anaerobic growth.

Introduction

In many prokaryotes, nitrogen oxides substitute for oxygen during denitrification, a series of four consecutive steps (NO_3^- : NO_2^- : NO : N_2O : N_2) catalysed by the respective reductases (Zumft, 1997; Richardson *et al.*, 2001). For a few of them, a hierarchical regulatory mechanism has been shown that co-ordinates the expression of each of these reductases in response to two specific environmental signals: (i) oxygen depletion and (ii) presence of the appropriate nitrogen oxide. In most denitrifiers, oxygen depletion is detected through a [4Fe–4S] iron–sulphur redox centre located at the N-terminal domain of a CRP (cAMP receptor protein)-like transcription factor, similar to the *Escherichia coli* FNR (fumarate and nitrate reductase regulatory protein) (Korner *et al.*, 2003). In the presence of oxygen, the iron–sulphur centre is oxidized, causing the factor to monomerize and become inactive (Crack *et al.*, 2004). In the absence of oxygen, the reduction of the [4Fe–4S] centre leads to protein dimerization through a central α -helix, allowing the protein to bind to a palindromic sequence known as anaerobox through its C-terminal helix–turn–helix (HTH) motif (Korner *et al.*, 2003). Also, there are examples of FNR and other CRP-like factors acting as transcriptional repressors at specific promoters (Busby and Ebright, 1999; Korner *et al.*, 2003).

Additionally, the presence of an appropriate nitrogen oxide must be detected by specific sensory proteins. Nitrate is usually detected by a membrane sensor (NarX) that phosphorylates a response regulator (NarL), which then binds to specific sequences upstream from the transcription start site of the corresponding nitrate reductase operons (Stewart, 1993; 2003). However, in organisms like *Paracoccus pantotrophus*, which lacks NarL homologues, a member of the CRP family of regulators named NarR detects nitrate through a yet unknown mechanism (Wood *et al.*, 2001). Interestingly, the other main signal in denitrification, nitric oxide (NO), is also detected through a subgroup of the CRP family known as Dnr (Vollack *et al.*, 1999; Korner *et al.*, 2003).

The genus *Thermus* sp. belongs to one of the oldest lineages of the bacterial phylogenetic tree (Hartmann *et al.*, 1989), and most of its isolates show an overall aerobic nature. The extreme thermophilic *Thermus*

Accepted 20 February, 2007. *For correspondence. E-mail jberenguer@cbm.uam.es; Tel. (+34) 91 497 80 99; Fax (+34) 91 497 80 87. †Present address: Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY 10027, USA.

thermophilus shows the same overall aerobic nature of the genus, but there are isolates of this species that carry out the first step of the denitrification pathway, growing anaerobically with nitrate and excreting nitrite as the end-product (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a), and even others that fulfil a complete denitrification, reducing nitrite to N₂ as final product (Rainey and da Costa, 2001). This ability is encoded within a > 30 kb DNA fragment that can be transferred by conjugation to aerobic strains of the same species through an Hfr-like mechanism, allowing the new hosts to grow as facultative anaerobes (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). This nitrate respiration conjugative element (NCE) encodes two main operons, named *nar* and *nrc*. The *nar* operon codes for a thermophilic membrane nitrate reductase (Nar), which contains a periplasmic cytochrome *c* as a fourth subunit in addition to homologues to the NarG, NarH and NarI enzyme subunits found in other bacteria (Zafra *et al.*, 2005). The *nrc* operon codes for a new class of respiratory NADH dehydrogenase (NDH) made of four subunits, in contrast to the 14- to 16-meric multimer that constitutes the type I NDH, or to the monomeric type II NDH found in most bacteria (Cava *et al.*, 2004). Phylogenetic comparisons of the amino acid sequences of Nar and Nrc subunits are in agreement with the 16S RNA-based phylogeny of the genus, and also suggest an ancient origin for both enzymes (Philippot, 2002; Cava *et al.*, 2004). When a NCE-carrying *T. thermophilus* strain grows in a nitrate-rich medium under laboratory conditions, depletion of oxygen either due to consumption by the increasing population or experimentally induced leads to the apparently simultaneous induction of the *nar* and *nrc* operons (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a; Cava *et al.*, 2004). Interestingly, transcription of the *nqo* operon, which encodes the aerobic type I NDH of the host, is concomitantly repressed (Cava *et al.*, 2004). Therefore, the *T. thermophilus* strains carrying NCE replace not just the final electron acceptor enzyme, but the whole respiratory chain, during transition to anaerobic growth with nitrate. In contrast, menaquinone-8 is common to both respiratory processes (Cava *et al.*, 2004).

In a previous work we observed that the nitrate- and anoxia-dependent transcription of the *nar* operon promoter required the presence of the NCE (Moreno *et al.*, 2003), and therefore we concluded that the regulatory factors required for the respiratory chain replacement in response to these signals were encoded within this transferable element. Here we identify a bicistronic operon (*dnr*) in the NCE that encodes DnrS and DnrT (RegA and RegB in Cava and Berenguer, 2006), two homologues to bacterial transcription and sensory factors. The development of new promoter-probe and expression vectors allow us to show here that both proteins are required for the expression of the operons of the NCE when the cells

grow in a medium with nitrate under low oxygen concentrations. We find that DnrS is an oxygen-sensitive protein required for the expression of the *nar* and *dnr* operons under anaerobic conditions, whereas DnrT is the central regulatory factor required not only to activate the transcription from all the NCE operons but also to repress the transcription from the *nqo* operon. To our knowledge, this is the first time in which a single thermophilic transcription factor is shown to activate and to repress *in vitro* transcription by the RNA polymerase of *T. thermophilus* on two different promoters. Its dual role as transcription activator of the NCE operons and as repressor of the chromosomally encoded Nqo points to DnrT as the central switching mechanism by which the NCE controls the respiratory metabolism of its host during adaptation to anaerobic growth.

Results

NCE encodes two homologues of bacterial transcription factors

Sequence analysis of the NCE revealed the presence of two genes, preliminarily named *regA* and *regB* (Cava and Berenguer, 2006), encoded in the DNA region that separates the *nar* and the *nrc* operons (EMBL Accession No. AM161043) (Fig. 1A). The proximity of the coding sequences of both genes (4 bp) and the presence of a Rho-independent transcription terminator downstream of the translation stop codon of *regB* suggested that they form a bicistronic operon. This was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays on RNA isolated from cells incubated for 4 h under anoxic conditions with nitrate (*Experimental procedures*), in which the expected 1440 bp amplification fragment was obtained with forward primer 1, specific for *regA*, and reverse primer 3, specific for *regB* (Fig. 1B). In contrast, the use of reverse primer 4, which hybridizes downstream the putative transcription terminator, was unsuccessful.

The amino acid sequence motifs and main similarities to proteins from the databank of the hypothetical proteins encoded by *regA* and *regB* are also shown in Fig. 1. The *regA* gene encodes a 467-amino-acid-long protein, with a theoretical size of 52.6 kDa. A search for sequence motifs at the NCBI server revealed the presence of an N-terminal (positions 1–120) GAF (cGMP-specific and -stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylate cyclases and *E. coli* FhlA) domain usually involved in signal detection in several proteins (Aravind and Ponting, 1997; Galperin, 2004). There is an additional BTAD domain (bacterial transcriptional activator domain) shared by all the members of the DNRI/REDD/AFSR family of transcription regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces* sp. and related Actinobacteria (Yeats *et al.*,

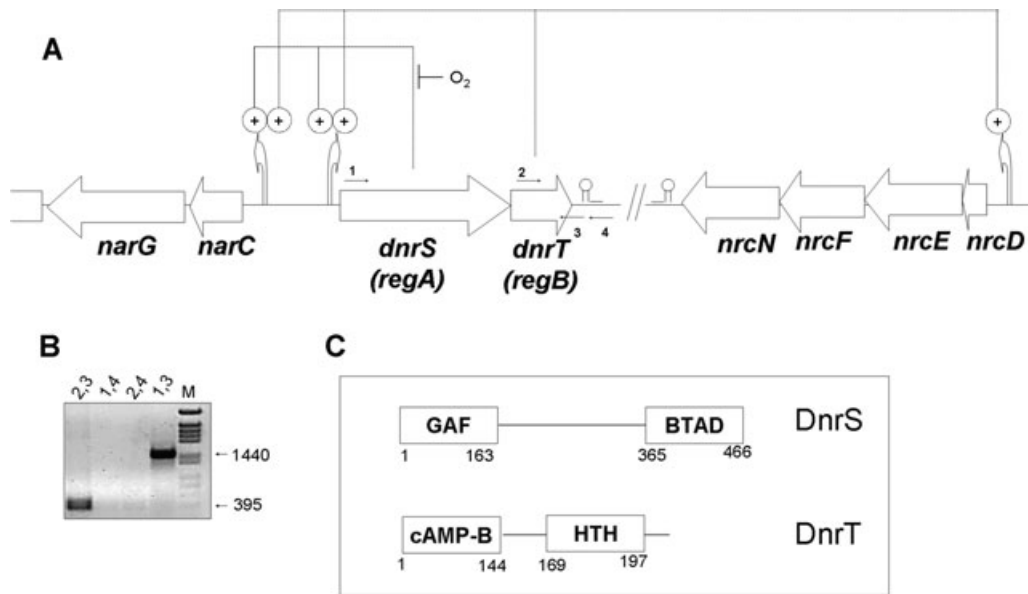


Fig. 1. The *dnr* operon.

A. Scheme of the *dnr* operon, and the relative position of the *nrc* and part of the *nar* operons that surrounds it. Dotted lines on the top indicate the roles of DnrS and DnrT as transcription activators of the indicated NCE promoters shown in this article.

B. RT-PCR assay with the indicated primers pairs on total RNA isolated from cells grown for 4 h under nitrate/anoxia conditions. Primers used were regANde1 (1), o27-77 (2), dnrTstop (3) and o27-81 (4), and their approximate annealing positions are indicated in (A).

C. Scheme of the positions of the domains identified in DnrS and DnrT.

Details are described in the text.

2003). This domain structure suggests a putative role as a signal-sensitive transcription factor for the hypothetical RegA protein. This protein will be named DnrS thereafter to avoid confusion with proteins from other microorganisms.

On the other hand, *regB* encodes a 217-amino-acid-long protein with a theoretical size of 24.8 kDa. Its coding sequence starts with a GTG codon. Sequence comparisons revealed that RegB belongs to the CRP family of transcription activators, sharing the C-terminal HTH DNA-binding motif common to all the family members, and also showing an N-terminal nucleotide-binding motif, like the CRP protein. More precisely, the sequence alignment with members of this family (Fig. S1) revealed the highest percentages of identity with members of the Dnr subgroup of this CRP family, most of which are implicated in signal transduction of NO (DnrE, DnrD) or nitrate (NarR) presence in denitrifying Proteobacteria (Korner *et al.*, 2003). Due to these similarities and to the role in nitrate respiration that we describe in this article, we renamed *regB* as *dnrT*. As all its closest homologues, DnrT lacks the four cysteine residues that in members of the CRP family, like the FNR protein, are responsible for the detection of oxygen through a 4Fe-4S cluster. Interestingly, the sequence of the HTH motif of DnrT keeps the highly conserved residues E182, S185 and R186, which interact directly with the DNA sequence target in most proteins of the CRP family (Korner *et al.*, 2003) (Fig. S1).

DnrS and DnrT are induced in T. thermophilus during anaerobic respiration

To be sure that hypothetical DnrS and DnrT proteins were actually synthesized in *T. thermophilus*, their respective coding genes were cloned, overexpressed in *E. coli*, and specific polyclonal rabbit antisera were prepared for each of them (*Experimental procedures*). These antisera showed similar sensitivities for their respective proteins in parallel Western blot assays (Fig. S2A), thus making it possible to compare DnrS and DnrT amounts by their respective signals.

As shown in Fig. 2A, specific signals for proteins of the sizes expected for DnrS and DnrT were immunodetected in the soluble fraction of the facultative wild-type strain NAR1 (lane 3) treated for 4 h under anoxic conditions with nitrate (An conditions). Parallel immunodetection of NarG (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a) and NrcD (Cava *et al.*, 2004) were carried out on the corresponding membrane fractions to confirm the expression of the Nar and Nrc respiratory enzymes under these conditions. As expected, none of these proteins (DnrT, DnrS, NrcD and NarG) were detected in the aerobic strain *T. thermophilus* HB27 (lane 1) subjected to the same treatment, but they did in its HB27c derivative (lane 2) that carries the NCE element (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). Interestingly, when the facultative wild-type strain was grown aerobically (A), a low amount of DnrT was detected by Western blot (lane 3),

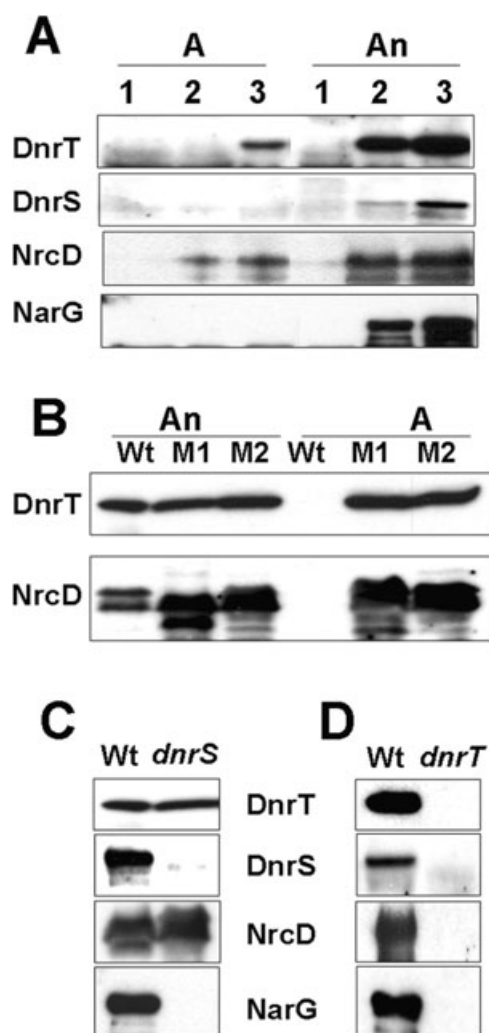


Fig. 2. Requirement of the *dnr* operon genes for the expression of the Nar and Nrc respiratory complexes.

A. Total proteins from the *T. thermophilus* strains HB27 (1), HB27c (2) and NAR1 (3), grown either aerobically (A) or after 4 h under nitrate/anoxia conditions (An), were subjected to parallel Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG.

B. Western blots showing DnrT and NrcD were carried out on cultures of the NAR1 wild-type strain (Wt) and in two independent *dnrS::kat* null mutants (M1 and M2) grown either aerobically (A) or treated for 4 h under nitrate/anoxia-inducing conditions (An). Note the constitutive expression of DnrT and NrcD under aerobic conditions in the mutants.

C. Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG on nitrate/anoxia induced cultures of the wild-type NAR1 strain (Wt) or of a *dnrS::kat* null mutant (*dnrS*).

D. Western blots to detect DnrT, DnrS, NrcD and NarG were carried out as in (C) on the wild-type strain and on the *dnrT* null mutant.

and longer exposure times allowed its detection also in the HB27c strain. Detection of NrcD followed the same pattern. In contrast, detection of DnrS under aerobic conditions was not evident unless larger protein amounts and longer exposure times were used. The final conclusion from these experiments was that DnrT and DnrS are not

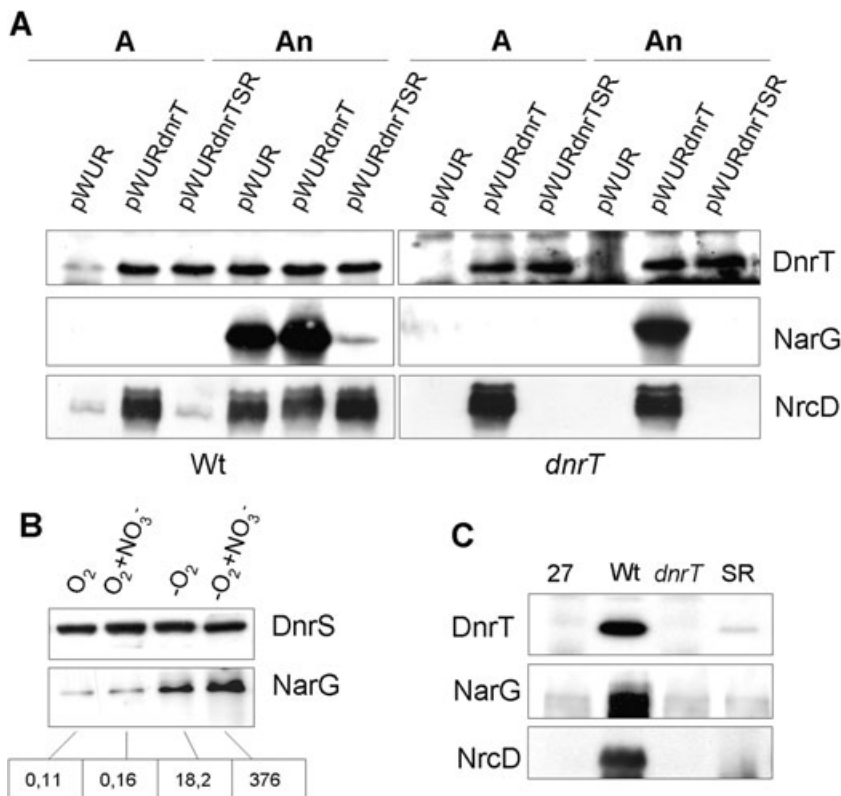
hypothetical but actual proteins, which are expressed in *T. thermophilus* at low levels during aerobic growth but induced during anaerobic growth with nitrate. Having in mind that the respective antisera show similar sensitivities for immunodetection of both proteins by Western blot (Fig. S2A), and that the two proteins are translated from a single mRNA (Fig. 1B), these data suggest for DnrS either lower translation efficiency or a less stable character than for its co-expressed DnrT counterpart.

DnrS and *DnrT* are required for anaerobic growth

Null mutants of *dnrT* and *dnrS* were isolated (*Experimental procedures*). Due to their operon nature and to the absence of a transcription terminator at the end of the *kat* gene, the DnrT protein was constitutively expressed in two independent *dnrS::kat* mutants (Fig. 2B, lanes M1 and M2), in such a way that similar levels of DnrT were detected in cultures grown aerobically (A) as in those treated for 4 h with nitrate under anoxic conditions (An). By comparison, the DnrT protein was expressed by the wild-type strain under aerobic conditions at such a low level that it was not detected under the exposure time shown in this figure. On the other hand, no polar effect of the *dnrT* null mutation on the expression of the DnrS protein was expected. In fact, expression of DnrS required the presence of DnrT (see below).

Parallel growth experiments revealed that neither the *dnrS* nor the *dnrT* null mutant was able to grow under complete anaerobic conditions with nitrate (not shown). As all the *nrc::kat* null mutants are still able to grow anaerobically with nitrate (Cava *et al.*, 2004), the inability of the *dnrS* and the *dnrT* null mutants to grow under such conditions suggests that the expression of DnrT and DnrS is required for the synthesis of the nitrate reductase, the only component of the respiratory machinery which is fully required for anaerobic growth (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a). This was confirmed by the results of Fig. 2C and D, which show that NarG was not expressed in any of the mutants under inducing conditions. However, there was a clear difference between both mutants with respect to the expression of NrcD: whereas the *dnrT* null mutant was unable to express it (Fig. 2D), in the *dnrS::kat* mutant the NrcD protein was expressed anaerobically (Fig. 2C) and even during the aerobic growth (Fig. 2B). It is then noteworthy that the expression of NrcD is concomitant to that of DnrT, which is expressed constitutively in *dnrS::kat* mutants. A final conclusion from these assays was that the DnrS protein was not expressed in the *dnrT* null mutant, supporting that DnrT is also required for the expression of its own operon (Fig. 2D).

To confirm these results, complementation experiments of each mutant were carried out. For this we used pWUR112/77-1 (pWUR thereafter) derivatives, which



confer a thermostable resistance to Bleomycin (Brouns *et al.*, 2005) that is compatible with the resistance to Kanamycin of the *dnrS* and *dnrT* null mutants (this work). As shown in Fig. 3A, transformation of the wild-type strain or the *dnrT* null mutant with pWUR $dnrT$ results in constitutive expression of DnrT during aerobic growth (A). Concomitant to the constitutive synthesis of DnrT, the NrcD protein is strongly expressed. In contrast, constitutive expression of DnrT does not guarantee the expression of NarG in the wild type or in the *dnrT* null mutant during aerobic growth, and its synthesis was still dependent on oxygen depletion and nitrate presence (An).

On the other hand, constitutive expression of DnrS from pWUR $dnrS$ in a *dnrS::kat* genetic background, in which DnrT is also constitutively expressed (Fig. S2B), does not result in the expression of significant amounts of NarG under aerobic conditions (Fig. 3B, lane O₂). However, it is interesting to note the existence of a partial expression of NarG under anoxic conditions in the absence of nitrate when both, the DnrT and the DnrS proteins, are constitutively expressed (Fig. 3B, lane -O₂). Nevertheless, full expression of NarG still requires nitrate in addition to anoxia.

These results allowed us to conclude that: (i) DnrT is required for the synthesis of NarG, NrcD and DnrS, (ii) the DnrT-dependent activation of the NrcD synthesis is insensitive to oxygen and does not require nitrate, (iii) DnrS is

Fig. 3. Constitutive expression of DnrS and DnrT, and the role of the HTH motif of DnrT. A. Western blots to detect DnrT, NarG and NrcD were carried out on aerobic (A) or on nitrate/anoxia-induced (An) cultures of the NAR1 (Wt) and the *dnrT* null strains (*dnrT*) transformed, either with the pWUR control plasmid, or with its derivatives that express the wild-type DnrT (pWUR $dnrT$) protein or its SR/AL mutant (pWUR $dnrT$ TSR).

B. Cultures of the *dnrS::kat* null mutant transformed with plasmid pWUR $dnrS$ were grown aerobically, or incubated overnight under anoxic conditions in the presence or in the absence of nitrate (40 mM) before immunodetection of DnrS and NarG. The nitrate reductase activity of the cultures was also measured (nmol of nitrite produced per minute and per milligram of protein).

C. Detection of the indicated proteins on nitrate/anoxia-treated cultures of the aerobic HB27 strain (27), the facultative NAR1 strain (Wt), the *dnrT* null mutant, and a mutant in which the *dnrT* gene was replaced by that encoding the SR/AL DnrT mutant (SR).

required for the expression of NarG but not for that of NrcD, and (iv) expression of NarG is still dependent on nitrate and anoxia, although DnrT and DnrS were present.

The HTH motif of DnrT is required to activate the expression of the three NCE operons

In order to analyse *in vivo* if this activator role of DnrT on the synthesis of the NarG, NrcD and DnrS was related to its hypothetical ability to bind to the respective gene promoters, the complementation experiment of the *dnrT* null mutant was repeated with a DnrT site-directed mutant in which two highly conserved residues of its putative HTH motif (S185 and R186) were changed by A and L respectively (SR/AL mutant thereafter). Figure 3A shows how the constitutive expression of this SR/AL DnrT protein from plasmid pWUR $dnrT$ TSR does not allow the synthesis of NarG or NrcD in a *dnrT* null mutant background. As the amount of the SR/AL mutant protein detected by Western blot in cells transformed with pWUR $dnrT$ TSR was similar to the amount of wild-type DnrT observed in cells transformed with pWUR $dnrT$, the differences in their effects on the expression of NarG and NrcD were necessarily the consequence of a mutation-associated function loss, and not due to putative differences in their stability. Thus, the DnrT-dependent synthesis of NarG and NrcD is most likely a consequence of the transcription activation of the

respective gene promoters after the binding of DnrT through its HTH motif. It is also noteworthy that the expression of the SR/AL mutant from pWURdnrTSR interferes with the synthesis of NarG under nitrate and anoxia in the wild-type strain (Fig. 3A).

The experiments above supported the hypothesis that the activating effect of DnrT on Pnar and Pnrc was dependent on its HTH motif, but did not inform us about the putative role of DnrT on its own expression. To analyse this, the chromosomal wild-type *dnrT* gene was replaced by the mutant one encoding the SR/AL DnrT protein (*Experimental procedures*). The results of Fig. 3C show that neither the DnrT SR/AL mutant protein nor the NarG or the NrcD protein was induced under conditions in which the three proteins were expressed in the wild-type strain. Consequently, DnrT most likely acts as a transcription activator by binding through its HTH motif to the promoters of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons.

Effects of DnrS and DnrT on the activity of the Pnar, Pnrc and Pdnr promoters

To analyse and to quantify the putative effect of DnrS and DnrT on the transcription of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons, the promoter region of each of them was cloned upstream of a reporter gene (*bgaA*) encoding a thermostable beta-galactosidase (*Experimental procedures*). The constructs were then inserted into pMH184, a new cloning vector that confers a thermostable resistance to Hygromycin B (Nakamura *et al.*, 2005; this work), which is compatible with the thermostable resistances to Kanamycin and Bleomycin. In this way, it was possible to quantify the beta-galactosidase activity expressed from each promoter even in Kanamycin-resistant mutants (*dnrT* and *dnrS*) transformed with plasmids conferring Bleomycin resistance (pWUR-derivatives). The beta-galactosidase activities were measured under four different conditions: presence or absence of oxygen, and presence or absence of nitrate. The results are shown in the Fig. 4.

As expected, none of these promoters were expressed under any condition in the aerobic strain *T. thermophilus* HB27, which lacks the NCE (< 20 units). In contrast, in the wild-type facultative strain (NAR1), the Pnar and the Pnrc promoters were strongly induced under anoxic conditions with nitrate ($5\text{--}6 \times 10^3$ units), whereas the Pdnr promoter was induced at a much weaker level ($6\text{--}7 \times 10^2$ units), as it could be expected for genes encoding regulatory proteins. These data represents for Pnar, Pnrc and Pdnr, a 56-fold, 97-fold and 14-fold induction of their respective basal levels (40–100 units) under aerobic growth without nitrate. Neither nitrate nor anoxia was able to induce the Pnar or Pnrc promoters independently in a significant way (less than 2-fold), although a slight expression of Pdnr (3- to 4-fold) was observed with nitrate alone (Fig. 4C). The

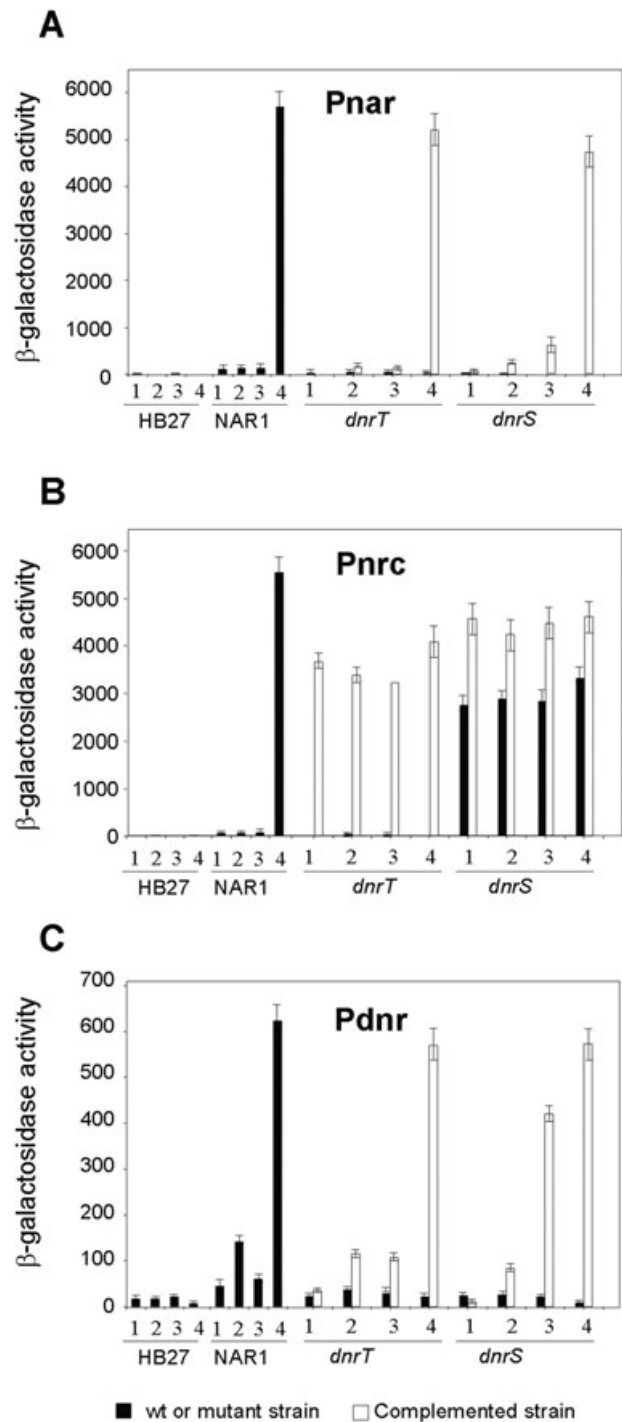


Fig. 4. Quantification of the transcriptional activity of the *nar*, *nrc* and *dnr* operon promoters. The indicated strains carrying the promoter-probe plasmids pMHnarbgaA (A), pMHnrcbgaA (B) or pMHdnrbgaA (C) were transformed either with pWUR (black bars) or with a pWUR derivative that complemented the strains by expressing the corresponding DnrS or DnrT proteins constitutively (white bars). Then the beta-galactosidase activity of cultures grown aerobically without (1), or with nitrate (2), or anaerobically without (3) or with nitrate (4) was measured (*Experimental procedures*). The represented data correspond to the mean values of three independent experiments.

results also showed that none of these promoters was expressed in a *dnrT* null mutant, reinforcing the view of DnrT as a central transcription activator during nitrate respiration. We also observed that constitutive expression of DnrT (from pWURdnrT) induced transcription from Pncr (60- to 70-fold), independently of the presence or absence of oxygen and/or nitrate (Fig. 4B). In contrast, constitutive expression of DnrT did not affect the nitrate and anoxia dependence of Pdnr and Pnar. These results support that the activator effect of DnrT on the Pncr promoter is signal-insensitive, and that DnrT and one or more additional signal-sensitive transcription factors are required to activate the transcription from the Pnar and Pdnr promoters.

On the other hand, the absence of DnrS in the *dnrS::kat* mutant abolished transcription from Pnar and Pdnr (Fig. 4A and C). In contrast, Pncr was constitutively expressed (47- to 70-fold) in the *dnrS::kat* mutant, as expected from the polar effect of the mutation on *dnrT* (Fig. 2B). Interestingly, simultaneous expression of DnrS from the complementation pWURdnrS plasmid and of DnrT (because of the polar effect of the *dnrS::kat* mutation, Fig. S2B) does not make the transcription from Pnar and Pdnr signal-independent. In such conditions, anoxia by itself has a minor (sixfold) stimulating effect on Pnar expression, but combination with nitrate is still required to get a strong induction (47-fold). This is in agreement with the data from Fig. 3B showing a minor induction of the NarG protein and of the nitrate reductase activity under anoxic conditions. In contrast, Pdnr was significantly induced by anoxia alone (10-fold, a 70% of the maximum detected in the wild-type strain), whereas nitrate had only a minor effect on its expression (Fig. 4C) in these complemented *dnrS::kat* mutants. Thus, we deduced that DnrS functions as an oxygen-sensitive transcription factor that works in cooperation with DnrT for the activation of Pnar and Pdnr. However, a yet unknown nitrate-sensitive component of the induction apparatus is apparently also required, in special to stimulate transcription from the Pnar promoter.

DnrS changes its folding in the presence of oxygen

The data above supported that DnrS requires anaerobic conditions to allow transcription from the Pdnr promoter. Thus, we wondered if oxygen-induced inactivation of DnrS could affect its folding. To check this, the DnrS protein was expressed from vector pWURdnrS in two cultures of *T. thermophilus* grown under aerobic conditions or under anoxic conditions with nitrate, before its sensitivity to trypsin was compared and detected by Western blot (*Experimental procedures*). As shown in Fig. 5, the DnrS protein expressed under anaerobic conditions remained undigested by the protease after 1 min of treatment, whereas most of the DnrS protein

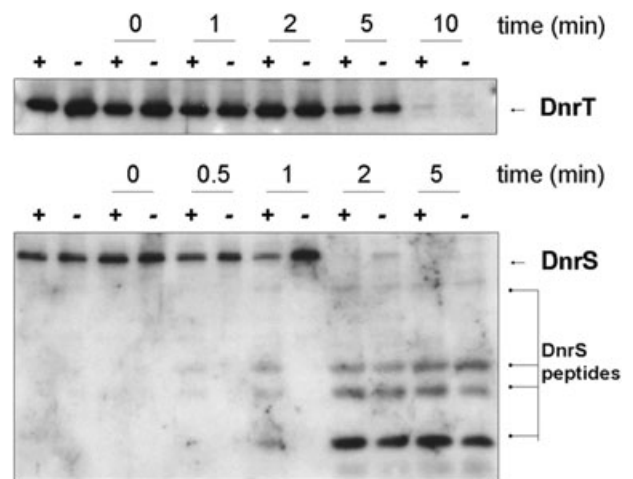


Fig. 5. Sensitivity of DnrT and DnrS to oxygen. The cytoplasmic fraction of aerobic (+) and anaerobic (-) cultures of the wild-type mutant transformed with pWURdnrT or with pWURdnrS was treated during the indicated periods with trypsin (*Experimental procedures*), and the remaining protein and resulting peptides were immunodetected by Western blot with the respective antisera.

from the aerobic culture was digested in the same period. In contrast, the DnrT protein expressed from pWURdnrT showed a lower sensitivity to the protease irrespective of the conditions used to express the protein. It is interesting to note that DnrS degradation products were similar in the protein expressed under both conditions, suggesting that similar oxygen-mediated folding change is taking place during the protease treatment.

Purified DnrT activates transcription on Pncr

The results from the Fig. 4 showed the relevance of DnrT as a common transcription activator required for the expression of the *nar*, *nrc* and *dnr* operons, and revealed its post-translational signal-insensitive character, at least when acting on the Pncr promoter. Taking advantage of this apparently insensitive nature, we expressed in *E. coli* and purified the DnrT wild-type protein and its SR/AL mutant (*Experimental procedures*). During this purification, size-exclusion chromatography revealed a retention time for DnrT corresponding to 45–50 kDa, around twice its theoretical size, suggesting that DnrT forms a dimer (data not shown).

Subsequent *in vitro* experiments with the purified protein showed the ability of the wild-type DnrT protein to bind to the Pncr promoter. In particular, DNase I footprint assays at 50°C revealed that DnrT was able to protect a large sequence (CCTTCACCTTACTCCTTGACCCCG-GTCAT) creating a hypersensitivity site at position -43 (underlined) with respect to the transcription start point of the Pncr promoter (Fig. S3). Further recruitment experi-

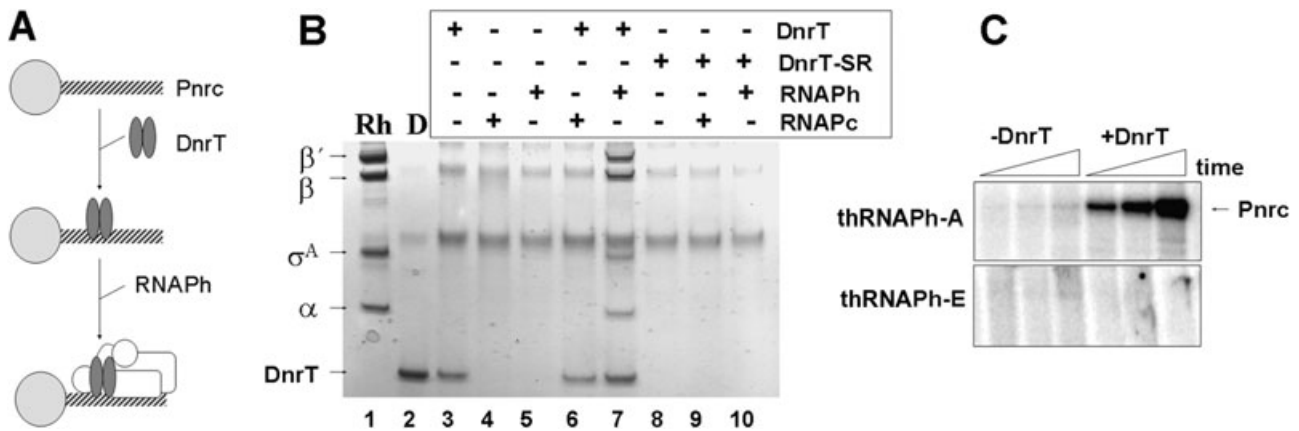


Fig. 6. Activation of Pnrc by DnrT.

A. Scheme of the recruitment experiment. The Pnrc promoter (grey-black helix) bound to streptavidin-agarose beads (grey ball) was incubated with DnrT or its SR/AL mutant, and subjected to a further incubation with thRNAP core or holoenzyme. Proteins bound to the beads were recovered by centrifugation and analysed by PAGE.

B. Results of the recruitment experiment. Samples of the immobilized Pnrc were incubated in the presence (+) or absence (–) of DnrT (DnrT), its SR/AL mutant (DnrT-SR), the thRNAPh (RNAPh) or the thRNAPc (RNAPc), and proteins bound to the beads were analysed through a 4–20% NuPAGE Bis-Tris gradient gel (lanes 3–10, see the text for details). Standards corresponding to purified thRNAPh (Rh, 1) and DnrT (D, 2) were run in parallel, and positions of each protein subunit are indicated. Common bands in all the lanes correspond to the BSA fraction present in the buffer.

C. *In vitro* transcription on Pnrc by the thRNAPh carrying either the σ^A (thRNAPH-A) or the σ^E (thRNAPH-E) in the presence or absence of 5 pmol of DnrT. Samples were taken after 2, 5 and 15 min. The full transcript corresponds to a 47-mer run-off of the Pnrc promoter.

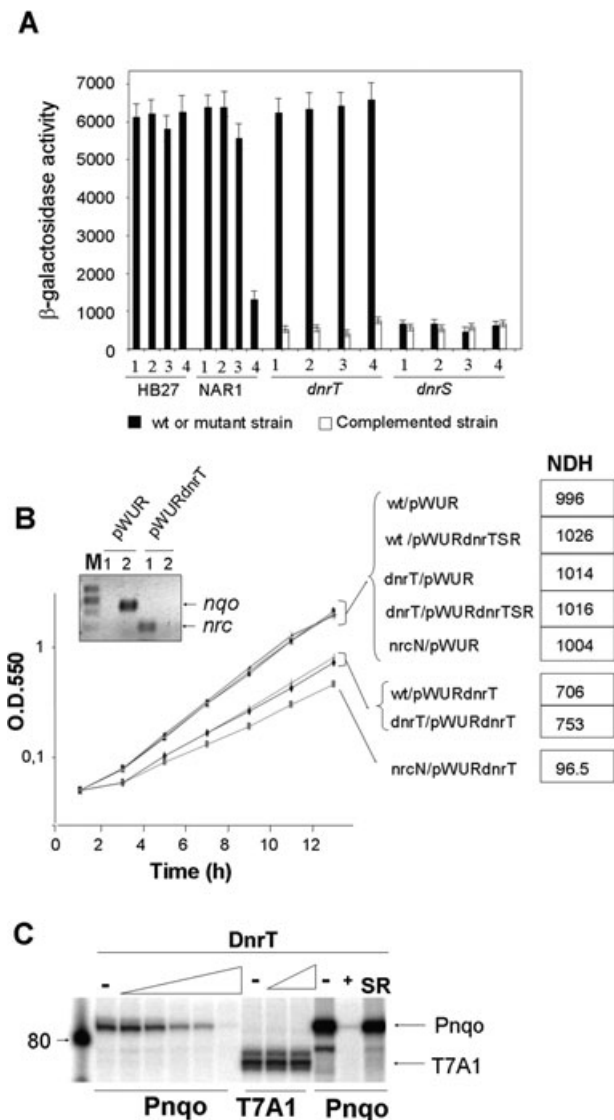
ments were carried out to determine if DnrT was required or not for the binding of the *T. thermophilus* RNA polymerase (thRNAP) to the Pnrc promoter. Figure 6A shows a scheme of the procedure followed. In this, biotin-labelled Pnrc promoter was bound to streptavidin-agarose beads and used as a bait to bind the wild-type DnrT protein or its SR/AL derivative at 50°C. Then the samples were incubated with the RNA polymerase core (thRNAPc) or its SigA (σ^A)-bearing holoenzyme (thRNAPH), and the bound proteins were recovered by centrifugation and analysed by SDS-PAGE. The results are shown in Fig. 6B. As expected, the wild-type DnrT was recovered bound to the Pnrc promoter (lane 3), whereas its SR/AL mutant did not (lane 8). Neither thRNAPc nor thRNAPH was able to bind to the promoter by themselves (lanes 4 and 5). However, the presence of DnrT efficiently recruited thRNAPH (lane 7) but not thRNAPc (lane 6). As expected, the SR/AL mutant protein was able to recruit neither thRNAPc nor thRNAPH (lanes 9 and 10), because of its inability to bind itself to the promoter. Thus, we concluded that DnrT binds to the Pnrc promoter through its HTH domain and recruits the thRNAPH.

Further evidence of the role of DnrT on the activation of the transcription from Pnrc by the thRNAPH was obtained by *in vitro* experiments at near physiological (60°C) temperatures. As shown in Fig. 6C, thRNAPH alone exhibits only trace transcriptional activity on Pnrc, whereas in the presence of increasing concentrations of the DnrT protein, it efficiently generates a full-length transcript. Interestingly, a thRNAPH carrying the σ^E (SigE)

factor instead of the σ^A (SigA) was unable to initiate transcription in the presence of DnrT. Therefore, *in vitro* transcription from Pnrc requires only DnrT and its cognate σ^A -thRNAPH, is insensitive to oxygen, and does not require nitrate. In contrast, transcription experiments on the Pnar and Pdnr promoters with the DnrT and thRNAPH were unsuccessful (not shown), in agreement with our *in vivo* data showing a requirement for at least DnrS in addition to DnrT (Fig. 4). Addition of purified DnrS protein (from *E. coli*) to the *in vitro* transcription reactions was also unsuccessful.

DnrT represses *nqo*

As commented before, the *nqo* operon encodes the type I NDH that constitutes the main electron donor during aerobic growth. As *nqo* transcription is repressed during anaerobic growth with nitrate (Cava *et al.*, 2004), we decided to test whether DnrT or DnrS was implicated in such repression. As a first approach, we used promoter-probe constructs to analyse the transcription from the Pnqo promoter under the same conditions and strains used in the experiment shown in Fig. 4. As it can be deduced from Fig. 7A, the Pnqo promoter was constitutively active in the aerobic strain HB27 ($6\text{--}7 \times 10^3$ units) in every condition assayed (1–4). In contrast, in the facultative NAR1 strain, this promoter was repressed (to around one-fifth of its activity) upon incubation with nitrate and anoxia for 4 h (4). Interestingly, this repression did not occur in a *dnrT* null mutant, supporting the responsibility



of DnrT on this effect. This was confirmed by expressing DnrT in a constitutive way from pWURdnrT, which resulted in Pnqo repression (1/10 of its normal activity) even under aerobic growth. Moreover, a similar repression was also found in *dnrS::kat* mutants (they express DnrT constitutively), reinforcing the idea that DnrT but not DnrS was responsible for the observed Pnqo repression.

To test this directly, DnrT was constitutively expressed in *T. thermophilus* from pWURdnrT during aerobic growth (without nitrate) and the amount of mRNA synthesized from *nqo* and *nrc* operons was subsequently analysed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the expression of DnrT leads to the repression of Pnqo and to the concomitant activation of Pnrc even during aerobic growth (Fig. 7B, inset). Interestingly, when the growth of the wild-type and the *dnrT* null mutant strains bearing

Fig. 7. DnrT represses Pnqo.

A. The transcriptional activity of the Pnqo promoter was measured under the four conditions used in Fig. 4 on the indicated strains carrying the pMHnqobgaA plasmid and complemented (white bars) or not (black bars) with the pWUR derivatives expressing either DnrS or DnrT.

B. Inset shows the result of a semi-quantitative RT-PCR performed to detect the transcripts from *nrc* (1) or *nqo* (2) in aerobic cultures of the NAR1 strain carrying pWUR or pWURdnrT. M: DNA size markers (759, 611, 453 and 273 bp). The graph shows the growth curves at 60°C of aerobic cultures of the NAR1 strain (wt) and of its *dnrT* and *nrcN* null mutants, transformed either with pWUR control plasmid or with pWURdnrT or pWURdnrTSR derivatives. The NDH activity of membrane fractions corresponding to 8 h of growth of each culture is indicated (nmol of NADH oxidized per minute and per milligram of protein).

C. *In vitro* transcription on Pnqo in the presence of thRNAPh and increasing concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80 pmol) of DnrT. Parallel control experiments were carried out with the T7A1 promoter and DnrT (0, 40, 80 pmol) to show the absence of repression by DnrT on this unrelated promoter. An independent experiment is also shown in which transcription from Pnqo was carried out without (-) or with 80 pmol of DnrT (+) or its DnrT-SR/AL mutant (SR). The run-off transcript from Pnqo and PT7A1 correspond to 90 mer and 50 mer respectively. All reactions were performed at 60°C for 10 min.

or not the pWUR derivatives were compared, it was observed that expression of DnrT (from pWURdnrT) decreased the growth rate in comparison with the same strain carrying the control plasmid pWUR, or expressing the DnrT SR/AL mutant (from pWURdnrTSR). We concluded that DnrT was actually decreasing the respiratory efficiency during aerobic growth due to the replacement of type I Nqo-NDH by the Nrc-NDH. Accordingly, the NDH activity from membrane fractions isolated from the cultures (time 8 h) revealed that the expression of DnrT results in a decrease in the activity of 25–30% (700–750 units) compared with those expressing the SR/AL mutant or carrying the control pWUR plasmid (around 1000 units). To identify which part of this activity was actually due to the Nrc-NDH and which was due to the Nqo-NDH remaining in the membrane, we included the *nrcN::kat* mutant in the experiment (Cava *et al.*, 2004). As shown in Fig. 7B the *nrcN::kat* mutant grows aerobically as the wild-type strain when carrying the pWUR control plasmid or when expressing the SR/AL mutant, and shows similar NDH activity (around 1000 units). In contrast, expression of DnrT in this *nrcN::kat* mutant resulted in a very low NDH activity (around 100 units) and in a further decrease of the growth rate of the strain in comparison with that shown by the wild-type strain expressing DnrT. This residual NDH activity most likely corresponds to the Nqo-NDH still remaining in the membrane, which is in agreement with the repression of the *nqo* promoter by the pWURdnrT plasmid detected in Fig. 7A. Additionally, these data show that the Nrc complex is active as NDH in the wild-type strain when expressed under aerobic conditions, but not as efficient for growth as the Nqo type I NDH is.

A final approach to ascertain the repression of *nqo* operon by DnrT was an *in vitro* transcription assay with the thRNAPh. As shown in Fig. 7C, Pnqo was transcribed by the thRNAPh, and the addition of increasing concentrations of DnrT to the reaction mix resulted in decreased transcription until complete repression. In contrast, in control experiment, transcription from unrelated T7A1 promoter was not affected, even by the highest concentration of DnrT assayed. As expected, transcription from Pnqo was not repressed by the SR/AL mutant in an independent experiment (lane SR). These results support our conclusion that the observed repression of Pnqo by DnrT was promoter-specific and dependent on its HTH motif.

Discussion

The ability of some strains of *T. thermophilus* to use nitrate as electron acceptor during anaerobic growth requires the replacement of the aerobic respiratory chain, whose main electron donor is the Nqo type I NDH, by a specific respiratory chain made of the heterotetrameric enzymes NDH (Nrc) and nitrate reductase (Nar) (Cava *et al.*, 2004). Here we identify a new operon of the NCE that encodes two transcription factors implicated in this replacement of respiratory chains. In the following paragraphs we discuss their specific roles according to our data.

The DnrS protein

The analysis of null *dnrS::kat* mutants, in which the DnrT protein is constitutively expressed, and the complementation assays with plasmid pWURdnrS revealed the requirement of the DnrS protein for the expression of Nar but not for the expression of Nrc. The development of a new system of promoter-probe vectors, compatible with other thermostable antibiotic resistances, allowed us to observe that this effect took place at the transcription level. Moreover, we could observe that DnrS was required also to activate transcription from its own promoter. Having in mind that DnrS has a C-terminal BTAD domain, found in the DNRI/REDD/AFSR family of regulators of secondary metabolism of Actinobacteria, we concluded that DnrS most likely acts as a transcription activator on the Pnar and Pdnr promoters.

However, constitutive expression of DnrS from plasmid pWURdnrS in a *dnrS::kat* mutant, in which DnrT is constitutively expressed, did not allowed transcription from Pnar or Pdnr under aerobic growth. Therefore, either the activities of DnrS or DnrT were sensitive to nitrate or to oxygen, or alternatively, an unknown factor necessary for the transcription from these promoters was not expressed or inactive under such conditions. The analysis of the separate effects of these two signals in cells expressing

DnrS and DnrT constitutively revealed that maximum activity required both signals. Nevertheless, oxygen depletion was more relevant than nitrate on the transcription of the Pnar and Pdnr promoters. This was specially relevant for the Pdnr promoter, in which oxygen depletion produced a significant transcription increase (73% of its maximum) in the absence of nitrate. Having in mind the apparently insensitive character of DnrT on the activation of Pnrc (see below), these results lead us to propose DnrS as an O₂-sensitive component of the induction system.

In agreement with its apparent O₂-sensitive character, the protein DnrS has a GAF domain at its N-terminus. Such domains are found in several cytoplasmic sensory proteins, either associated to other signalling domains such as histidin kinases, adenylate cyclases, diguanilate cyclase/phosphodiesterases and protein phosphatases, or associated to output domains (Galperin, 2004), like the BTAD domain found in DnrS. The signal receptor role of the GAF domains is usually associated to their capability to bind small molecules. In fact, there are precedents of oxygen and/or NO sensing by the GAF domains of the DosS protein of *Mycobacterium tuberculosis* (Sardiwal *et al.*, 2005) and of the NorR protein of *E. coli* (D'Autreaux *et al.*, 2005). The way by which the signal is transmitted from the GAF to the output domains is not yet understood, but it is generally assumed that it implies a conformational change, which affects the folding state and, concomitantly, the activity of the regulatory domain (Galperin, 2004). In this sense, we have detected a higher protease sensitivity of the DnrS protein exposed to oxygen during its synthesis than when expressed under oxygen depletion, supporting that an oxygen-dependent conformational change that unstabilizes the protein is actually taking place. Unfortunately, we cannot associate this conformational change to a loss of function in *in vitro* assays (DNA binding, for example) because the DnrS protein purified from *E. coli* was inactive in all the assays carried out. Thus, we hypothesize that native DnrS has an oxygen-sensitive cofactor at its GAF domain that under reducing conditions allows the protein to bind to specific sequences on the Pdnr and Pnar promoters, but that upon oxidation makes the protein inactive through a conformational change. In this way, the DnrS protein could mimic the role that the FNR factor plays as oxygen sensor during nitrate respiration in *E. coli* (Korner *et al.*, 2003). A detailed molecular analysis of the way by which DnrS is inactivated by O₂ will have to wait until active DnrS could be purified from anaerobic cultures of *T. thermophilus*.

DnrT as transcription activator

DnrT is required for the synthesis of the Nar and Nrc enzymes, and also for its own expression, so it behaves

as a central regulator of the nitrate respiratory system. It is also clear from the experiments with the promoter-probe vectors that DnrT acts at the transcription level on the corresponding operon promoters. However, the form by which these three promoters are activated by DnrT differs: while it has to act in co-ordination with DnrS to stimulate transcription from Pdnr and Pnar under nitrate respiration conditions, its sole presence allows Pnrc to be transcribed, independently of the presence or absence of nitrate or oxygen. This behaviour supports that DnrT, in contrast to DnrS, is insensitive to any of these signals, in such a way that it could be considered as a constitutively active transcription factor, whose function depends basically on the concentration reached and not on a putative conformational change. In agreement to this, we found no differences in the sensitivity to trypsin between DnrT proteins produced either aerobically or anaerobically (Fig. 5). This signal-insensitive behaviour contrasts with the modular structure of the CRP family of transcription activators to which DnrT belongs. Actually, most CRP-like factors contain sensory modules at the N-terminal half of the protein that upon binding of molecules such as cAMP (CRP), 2-oxoglutarate (NtcA), or upon detection of signalling molecules such as O₂ (FNR), CO (CooA) or NO (Dnr, Nnr) by specific protein-bound sensory cofactors, suffer a conformational change that allows the protein to interact with a target sequence on specifically induced (or repressed) promoters (Korner *et al.*, 2003). In those modules evolved to detect O₂, either iron–sulphur centres or haem groups are present (Korner *et al.*, 2003), but none of them have been detected in the purified DnrT protein. However, besides iron–sulphur centres or haem groups, we cannot rule out formally the possibility that small molecules, common enough to be expressed in *E. coli*, could bind to the ‘cAMP-binding domain’ present in the DnrT sequence. In fact, a model for DnrT conserves the two pockets that in the CRP structure contain the cAMP molecules (Fig. S4A).

In any case, the DnrT protein purified from overproducing strains of *E. coli* was able to bind *in vitro* to the Pnrc promoter through its HTH motif (the SR/AL mutant did not bind), and to recruit purified thRNAPh in a SigA (σ^A)-dependent way, allowing the transcription to proceed under thermophilic conditions (Fig. 6C). As neither the thRNAPc nor the thRNAPh was able to bind to Pnrc by themselves under these experimental conditions, and having in mind that DnrT binds to the Pnrc promoter at a position (–43) similar to CRP on type II promoters (Fig. S3), these results support the existence of specific DnrT–thRNAPh interactions on Pnrc similar to those observed on such promoters between activation region AR3 of CRP and the C-terminal domain of σ^{70} (Busby and Ebright, 1999; Lawson *et al.*, 2004). To check if similar interactions in the *T. thermophilus* pro-

teins were likely, and having in mind the availability of high-resolution structures of thRNAPh, we used docking programs to define a putative DnrT–thRNAPh interaction model by using the DnrT AR3 region deduced from the model, and the structure of σ^A in the thRNAPh crystal (Fig. S4B). It is noteworthy that automatic docking, without any hand-conducted refinement, resulted in a DnrT–thRNAPh complex similar to modelled open promoter complex proposed by Lawson *et al.* (2004) and by Artsimovitch *et al.* (2004) (Fig. S4C). In this automatic DnrT–thRNAPh model, the AR2 region of DnrT and its putative target in the α -thRNAP are very close to each other, supporting that interactions through them take place in the DnrT–thRNAPh complex also. On the other hand, it was possible to model a nicely complementary set of interactions between the putative AR1 region of the DnrT model and the C-terminal region of the α -thRNAP on the basis of the co-crystal between CRP and the α -ecoRNAP of structure 1LB2 (Benoff *et al.*, 2002) (Fig. S4D). Although yet a model, these data support the existence of specific DnrT–thRNAPh interactions on the Pnrc promoter similar to those produced between CRP and ecoRNAPh on type II promoters (Busby and Ebright, 1999). The specificity of such interactions deduced from our model explains the absence of transcription when the thRNAPh containing σ^E was used in the transcription experiments on Pnrc (Fig. 6C).

DnrT is also required to activate transcription on Pnar and Pdnr, but comparison of their sequence with that of the region protected by DnrT on the Pnrc promoter did not reveal clear similarities, probably as a consequence of the complexity of both promoters, which also require the presence of DnrS to be activated. In spite of having no *in vitro* evidence for the binding of DnrS to DNA, our data suggest that this is most likely the way by which it helps DnrT to activate transcription. In this sense, the promoter of the operon encoding the nitrate reductase A of *E. coli* requires the binding of three proteins to get active transcription in *in vitro* assays: promoter-proximal binding of reduced dimers of FNR; promoter-distal binding of several copies of the phosphorylated nitrate-response regulator NarL; and binding of the IHF (integration host factor) protein in an intermediate region (Schroder *et al.*, 1993). Therefore, it is not surprising to find a similar complex expression requirement for the transcription of the thermophilic Pnar counterpart. In this sense, our results suggest the existence of DnrT–DnrS interactions on the Pnar promoter, not just due to the obvious requirement for both proteins to activate transcription, but also because of the inhibitory effect that the presence of DnrT SR/AL mutant has on the expression of NarG in the wild-type strain under normally inducing conditions (Fig. 3A). The most likely explanation for this result is that the mutant and the wild-type DnrT proteins

compete for interaction with DnrS, and due to the higher concentration of the first, few DnrS proteins remain available to activate transcription. In contrast, this effect does not affect expression of NrcD because of its only dependence on DnrT.

On the other hand, transcription from P_{dnr} presents some differences with respect to the expression from P_{nar}, despite the common requirement for DnrT and DnrS. On this promoter the putative nitrate-response regulator has a less relevant role once both DnrS and DnrT have been expressed. A putative 'sequential induction' model could explain this (Fig. 1A). In this model, a yet unknown nitrate-response regulator could be required to get an increase of the basal expression level of P_{dnr} as suggested by the results from Fig. 4C. A parallel or further decrease in oxygen concentration could subsequently stabilize DnrS in an active conformation (Fig. 5), allowing the autoamplification of the regulators in an anoxic environment (Fig. 4C). In this way, P_{nrc} could be induced by DnrT to provide an appropriate electron donor for nitrate (Fig. 4B) and, putatively, also for the whole denitrification pathway, whereas expression from P_{nar} would be more dependent on the continuous presence of nitrate (Fig. 4A). Supporting this hypothesis, we have preliminary evidences showing that the Nrc-NDH also constitutes the main electron donor in complete denitrifying strains of *T. thermophilus* growing on nitrite (in preparation).

DnrT as repressor

In addition to its role as transcription activator of the *nrc*, *nar* and *dnr* operons from the NCE, a main observation of this work is that DnrT also acts as repressor of the chromosomal *nqo* operon, which encodes the aerobic type I NDH. For this repression to be detected *in vitro*, a greater concentration of DnrT was required compared with that needed to activate transcription on *nrc* (Fig. 7C), thus suggesting that the amount of Nqo decreases after enough Nrc is synthesized, allowing a progressive replacement of the respiratory chains.

This replacement of Nqo by Nrc is apparently contradictory in terms of energy supply. In fact, in mesophiles like *E. coli* the proton-extruding Nqo homologue (Nuo) is induced during anaerobic growth with nitrate as a way to compensate the loss of energy that the use of nitrate instead of oxygen implies, whereas the non-proton-pumping type II NDH is expressed in the presence of oxygen, when the cells do not require the use of a high-yield energy metabolism (Unden and Bongaerts, 1997). Interestingly, this replacement of respiratory enzymes in *E. coli* is under the control of FNR, a DnrT homologue. Although Nrc is inhibited by Rotenone as Nqo does, its subunit architecture, similar to the non-proton-pumping succinate:quinone oxidoreductases (Cava *et al.*, 2004),

suggests that it lacks the ability to pump protons upon NADH oxidation. Moreover, the observation that the replacement of Nqo by Nrc in cells growing aerobically (strains carrying pWUR_{dnrT}) results in a much lower growth rate, and the relatively minor effect on these growth rates of a *nrcN* mutation (Fig. 7B) supports a lower energy yield for Nrc than for Nqo per mol of NADH oxidized when oxygen is the final electron acceptor. Therefore, the energy yield seems not to be the driving force that had selected for the adaptation of DnrT to its repressor role on *nqo*, unless some kind of electron channelling between respiratory complexes exists that could limit the energy yield after the partial replacement (Nqo by Nrc) of components. In this sense, there are growing evidences of the formation of respiratory supra-complexes in bacteria (Megehee *et al.*, 2006) and yeasts (Cruciat *et al.*, 2000). Alternatively, one can imagine DnrT as a mechanism evolved by a selfish mobile element, like NCE, to ensure its integrity upon selection after horizontal transference: repression of Nqo could make the cell more energetically dependent on the presence of NCE.

Concluding remarks and perspectives

This work has shown the DnrT protein as the direct responsible for the replacement of respiratory chains that takes place during adaptation of *T. thermophilus* to nitrate respiration, showing for the first time *in vitro* and *in vivo* the direct activation and repression of thRNAP_H transcription activity by a thermophilic CRP homologue. However, our data also opened several questions about how the absence of oxygen and the presence of nitrate are sensed by this organism. We have presented evidences that suggest that *T. thermophilus* uses for this purpose completely different mechanisms from that shown by *E. coli* to detect both signals. Instead of using a FNR homologue as oxygen sensor, *T. thermophilus* apparently uses DnrS, a protein containing a GAF domain, but the actual O₂-sensory cofactor remains unidentified. On the other hand, the mechanism by which nitrate affects the expression of the *dnr* and *nar* operons remains unsolved. In most bacteria, nitrate as a non-permeable solute is sensed at the periplasm by homologues of NarX, the membrane partner of a two-component regulatory system of *E. coli*, and the signal is transmitted by phosphorylation of homologues of NarL, the corresponding response regulator. However, neither the NCE nor the genomes of the sequenced strains of *T. thermophilus* encode homologues of such a nitrate-sensory transmission system. This suggests that as it apparently happens with O₂ detection, a different mechanism for nitrate detection and transcription activation has evolved in this ancient bacterial lineage. The availability of new genetic tools for this extreme ther-

mophile, described and used in this work for the first time, will help to find answers to these questions.

Experimental procedures

Strains and growth conditions

The *E. coli* strains DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] and BL21DE3 [*hsdS*, *gal* (λ clts857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7* gene 1)] were used for plasmid construction and protein expression respectively. *T. thermophilus* NAR1 is the facultative anaerobic wild-type strain in which the presence of the NCE was first described. This strain was identified as HB8 in previous works (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998a), but sequence comparisons with the recently available genome of the type strain revealed that they are highly related but different strains. The derivative *nrcN::kat* mutant of this strain was also used (Cava *et al.*, 2004). *T. thermophilus* HB27 is a wild-type aerobic strain provided by Dr Koyama. *T. thermophilus* HB27c is a facultative anaerobe derived from HB27 to which the NCE was transferred by conjugation (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b).

Aerobic growth of *T. thermophilus* was routinely carried out on TB at 60°C or 70°C under mild stirring (150 r.p.m.) in one-fifth of the volume of the flask (Ramirez-Arcos *et al.*, 1998b). Induction by nitrate and anoxia (nitrate/anoxia conditions) was achieved by arresting the shaker and the simultaneous addition of potassium nitrate (40 mM) to aerobic cultures grown to an OD₅₅₀ of 0.3. Under these conditions, rapid consumption of O₂, along its low solubility at high temperature, makes the culture anoxic in a very short time. Completely anaerobic growth was carried out in screw-capped tubes containing 10 ml of TB and potassium nitrate (40 mM), overlaid by mineral oil (Cava *et al.*, 2004). Agar (1.5% w/v) was added to the TB medium for growth on plates. When required for selection, Kanamycin (30 mg l⁻¹), Bleomycin (15 mg l⁻¹) or Hygromycin B (100 mg l⁻¹) were added to the growth medium.

Escherichia coli was grown at 37°C on liquid or solid LB medium. Kanamycin (30 mg l⁻¹), Ampicillin (100 mg l⁻¹), Bleomycin (3 mg l⁻¹) and/or Hygromycin B (100 mg l⁻¹) were also used when needed.

DNA and RNA methods

DNA and RNA isolation, plasmid purification, restriction analysis, plasmid construction and DNA sequencing were carried out by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). PCR was performed with the DNA polymerase from *T. thermophilus* as described by the manufacturer (BIOTOOLS B & M, Madrid, Spain). For semi-quantitative RT-PCR the Ready-To-Go™ kit (Amersham Biosciences) was used. Directed mutagenesis was carried out by PCR. The primers used are described in Table S1.

Gene cloning, plasmids and transformation

The *dnrS* and *dnrT* genes were identified within the sequence of plasmid pUP1B, a pUC119 derivative from a gene library

(Fernández-Herrero *et al.*, 1997) selected by colony blot with a 3' probe of the *nar* operon. *E. coli*-*Thermus* sp. shuttle vectors pMK184 (this work), pWUR112/77-1 (Brouns *et al.*, 2005) and pMH184 (this work) are derivatives of pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) encoding compatible thermostable resistances to Kanamycin, Bleomycin and Hygromycin B (Nakamura *et al.*, 2005) respectively. Plasmids pMHnrbgaA, pMHnrcbgaA, pMHdnrbgaA and pMHnqobgaA are derivatives of pMH184 in which the thermostable beta-galactosidase reporter gene *bgaA* (Moreno *et al.*, 2003) is expressed under the control of DNA fragments containing the promoter regions of the *nar*, *nrc*, *dnr* and *nqo* operons respectively. The sizes of the promoters included in these plasmids with respect to the translation start codon of their respective first genes are: -784 to +6 (*nar*), -249 to +3 (*dnr*), -343 to +315 (*nrc*) and -448 to +3 (*nqo*). In all the constructs, the *bgaA* gene was preceded by a Shine-Dalgarno sequence (GGAGG).

Plasmids pWURdnrT, pWURdnrSR and pWURdnrS are derivatives of pWUR112/77-1 used for constitutive expression of the wild-type DnrT, its S185A/R186L mutant and the DnrS protein respectively. For this purpose, the respective genes were amplified by PCR (Table S1) and cloned between the NdeI and the EcoRI sites of plasmid pET22b (Novagen) to further proceed to their isolation by XbaI and EcoRI digestion and cloning in the same sites of pWUR112/77-1. In these constructs, transcription from the constitutive PslpA promoter of the Bleomycin resistance cassette continues through the cloned genes, allowing their constitutive expression.

Transformation of *T. thermophilus* with linear or circular DNA was achieved by natural competence (Cava *et al.*, 2004), whereas standard protocols were used to transform *E. coli*.

Isolation and complementation of mutants

Plasmid pK18 is a derivative of pUC18 used as integrative vector in *T. thermophilus* because of the presence of the *kat* gene (Laptenko *et al.*, 2006). Null *dnrT* mutants were isolated by recombinative insertion of a pK18 derivative (pK18 Δ NtCt-dnrT) carrying a central fragment of *dnrT* (positions +101 to +548) obtained by PCR with the primers dnrTEcoRI and dnrTBamHI (Table S1). The S185A/R186L-directed mutant was obtained by standard PCR protocols by using primers dnrTmutSR, dnrTEcoR1rev and dnrTNde1 (Table S1). The replacement of the wild-type *dnrT* gene by its derivative encoding the S185A/R186L double mutant was carried out by using a construct in which the mutant gene was cloned into pK18 from positions +101 to the final stop codon of the *dnrT* sequence to direct its integration by homologous recombination. Insertional *dnrS::kat* mutants were obtained by transformation with a linear DNA fragment carrying the *dnrS* gene interrupted by the *kat* gene at a PstI site at position +1255 with respect to its translation start, and flanked by appropriate upstream and downstream homologous regions for recombination. In this *dnrS::kat* mutant, the PslpA promoter of the *kat* gene provides constitutive transcription to *dnrT* because of the absence of a transcription terminator. In all instances, the nature of the isolated mutants was checked by PCR and by immunodetection with anti-DnrT or anti-DnrS. Complementation experiments of these mutants were carried

out by transformation with the pWUR derivatives described above.

Promoter induction assays

Quantitative measurements of the transcription of the *nar*, *nrc*, *dnr* and *nqo* operons were tested in cultures of wild-type or mutant strains of *T. thermophilus* transformed with promoter-probe plasmids pMHnarbgaA, pMHnrcbgaA, pMHdnrbgaA or pMHnqobgaA respectively. The effect of the absence or of the constitutive expression of DnrS or DnrT on these promoters was assayed on *dnrT* or *dnrS* null mutants transformed with the control pWUR plasmids or its corresponding derivatives.

For aerobic expression, cells were grown for 8 h to the exponential phase (OD_{550} between 0.3 and 0.6) under stirring (150 r.p.m.) in a 1/10 volume of the flasks to allow maximum oxygen diffusion. For anaerobic induction, aliquots of these cultures were subsequently transferred to complete the total volume of 2 ml screw-capped tubes, which were incubated for 16 more hours. Nitrate effect was assayed by providing potassium nitrate at 40 mM to the TB medium. All these experiments were performed at 60°C to limit the putative toxicity of the constitutive expression of DnrS or DnrT.

The beta-galactosidase activities of soluble cell extracts were assayed in triplicate experiments on the chromogenic substrate ONPG (ortho-nitrophenyl-galactopyranoside) at 70°C. The activities were expressed in arbitrary units as described by Miller (1992).

Sensitivity to trypsin

Cultures of the NAR1 wild-type strain bearing the pWURdnrS or pWURdnrT plasmids were grown at 70°C on nitrate-free TB medium, either under aerobic conditions (180 r.p.m.) in one-fifth volume of the flask to reach an OD_{550} of 0.5, or in static bath overnight to limit oxygen diffusion. Then cells were harvested, and subsequently disrupted by sonication (Braun Labsonic; 1 min in 0.5 s pulses, maximum power) in TS buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.5), before separation of soluble and particulate fractions by ultracentrifugation (150 000 g, 15 min at 4°C).

Sensitivity to trypsin was assayed in 80 µl of cell fraction samples containing 2 mg ml⁻¹ of protein. Then, 2 µl of trypsin solution (5 mg ml⁻¹ in HCl 1 mM) was added to the samples, which were incubated at room temperature for the indicated times. Digestion was stopped by boiling in Laemmli loading buffer, and the proteins were separated by SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989). DnrS and DnrT were identified by Western blot with specific rabbit antisera and detected by chemiluminescence with the ECL detection kit (Amersham).

Purification of DnrT, DnrS and thRNAP

The genes encoding DnrT, its S185A/R186L mutant, and DnrS, were amplified with appropriate primers (Table S1) and cloned between the NdeI and EcoRI sites of pET22b and

pET28b (Novagen) to allow their expression in *E. coli* BL21DE3, either as the native protein sequences or with N-terminal 6x-Histidine-tag fusions. Specific rabbit anti-DnrT and anti-DnrS antisera were prepared by a private company (Charles River Laboratories, Chalaronne, France) from the respective proteins purified by SDS-PAGE for their further use in immunodetection assays.

Both proteins were purified by affinity chromatography on Ni-NTA agarose (Qiagen) followed by thermal denaturation (70°C, 15 min) of remaining *E. coli* proteins. DnrT was further purified through a size-exclusion chromatography on Superdex-200 and stored in aliquots at -20°C with glycerol (40%) until use. The thRNAPc was purified from *T. thermophilus* as in (Vassilyeva *et al.*, 2002). Quantitative *in vitro* transcription assays (Vassilyeva *et al.*, 2002; Laptenko and Borukhov, 2003) revealed that the thRNAPc preparation contained 80% of catalytically active molecules. Reconstituted thRNAPh (holoenzyme) was obtained by combining 0.5 mg of thRNAPc with purified 0.15 mg of recombinant SigA (σ^A) (Nishiyama *et al.*, 1999) or SigE (σ^E) factors followed by holoenzyme purification by size-exclusion chromatography using Superose 6 column (Vassilyeva *et al.*, 2002). Recombinant SigE was a generous gift from Dr Jookyung Lee.

ThRNAP recruitment

A scheme of the recruitment experiment is shown in Fig. 6A. Biotine-labelled Pnc (positions -207 to +28, 235 bp) was bound to ImmunoPure Immobilized Streptavidin Gel (Pierce) in binding buffer (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mg ml⁻¹ Bovine seroalbumin, 5 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.9). Then, the DnrT protein or its SR/AL mutant (1 µg) was incubated for 15 min at 50°C with 0.2 µg of Pnc-resine in 20 µl samples containing 2 µg of salmon sperm DNA. ThRNAPc or thRNAPh (4.7 pmol) was then added and incubated for 15 more minutes at the same temperature. After three washing steps with 300 µl of binding buffer, the bound proteins were eluted with 1% SDS, separated in a 4–20% NuPAGE Bis-Tris gradient gel (Invitrogen), and Coomassie blue stained. Samples without DnrT were used as negative controls.

In vitro transcription

In vitro transcription was carried out in 10 µl samples of transcription buffer (50 mM MOPS, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol, pH. 6.5) containing 0.3 pmol of the promoter DNA (Pnar, PT7A1, Pnc or Pnqo), 1.75 pmol of thRNAPh, bearing either σ^A or σ^E , and the specified amounts of wild-type DnrT or its SR/AL mutant. Transcription started at 60°C by adding a NTP mix (0.8 mM GTP, 0.8 mM ATP, 0.1 mM CTP, 0.2 mM UTP and [α -³²P]-CTP) and continued for different times before analysis. The sizes for the promoter regions amplified by PCR (Table S1) used in these assays were: -207 to +28 for Pnc (235 bp), -784 to +6 (790 bp) and -211 to +1 (212 bp) for Pnar, and -448 to +3 for Pnqo (458 bp). The 270 bp T7A1 promoter was used as positive transcription control in different experiments (Nudler *et al.*, 1997).

Amino acid sequence alignment and molecular modeling of DnrT

The domain identification on DnrS and DnrT was carried out through the InterPro Scan Sequence search program at the EMBL-EBI. DnrT homologues obtained with BLAST (Altschul *et al.*, 1995) were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) and T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000) algorithms. The structural model of DnrT was built on CRP–DNA complex structure (PDB entry 1O3R; Chen *et al.*, 2001) by using the SWISS-MODEL server facilities (Schwede *et al.*, 2003) and its quality examined with WHAT-CHECK procedure (Hooft *et al.*, 1996) of the WHAT IF program (Vriend, 1990). The model was further refined by subjecting it to three steps of 50 cycles of the steepest descent minimization method of the DEEVIEW program (Guex and Peitsch, 1997). The model for interaction of thRNAP α -C-terminal domain with AR2 of DnrT was built using the protein–protein rigid docking method implemented in HEX program (Ritchie and Kemp, 2000), setting the initial position of the putative complex on the CRP- α -ecoRNAP C-domain structure (PDB entry 1LB2; Benoff *et al.*, 2002). The model for DnrT–sigma A interaction was carried out by the same method using the deduced DnrT model structure and the co-ordinates of thRNAP structure, which includes the position of σ^A in the complex (PDB 1SMY; Artsimovitch *et al.*, 2004). To reduce the translational-rotational search, the initial positioning of the putative complex was set by an initial generation of 5×10^3 different docking solutions for the complex, using the low-resolution docking algorithm GRAMM (Vakser, 1995), and by selecting solution that minimizes the average distance between the DnrT AR3 site and its binding site on σ^A , as described (D’Autreaux *et al.*, 2005).

Data deposition

The sequence of the *dnr* operon was deposited to EMBL GenBank with the identification No. AM161043.

Acknowledgements

This work has been supported by grants of code BIO2004-02671 co-funded by the ‘Ministerio de Educación y Ciencia’ and the European Union to J. Berenguer, SAF2004-06843 to P. Gómez-Puertas, and NIH Grant GM54098 to S. Borukhov. Financial support of ‘Fundación Ramón Areces’ to CBMSO is also acknowledged. We want to thank Dr Stan Brouns for providing the pWUR112/77-1 plasmid, and to Dr Nakamura for giving us the thermostable resistance to Hygromycin used to construct pMH184.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1995) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**: 458–459.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., *et al.* (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**: 299–310.
- Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., *et al.* (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD–DNA complex. *Science* **297**: 1562–1566.
- Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005) Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* **280**: 11422–11431.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199–213.
- 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.
- Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., and Berenguer, J. (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **279**: 45369–45378.
- Chen, S., Vojtechovsky, J., Parkinson, G.N., Ebright, R.H., and Berman, H.M. (2001) Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP–DNA complex: DNA binding specificity based on energetics of DNA kinking. *J Mol Biol* **314**: 63–74.
- Crack, J., Green, J., and Thomson, A.J. (2004) Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**: 9278–9286.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome *bc1* and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 18093–18098.
- D’Autreaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**: 769–772.
- Fernández-Herrero, L.A., Olabarria, G., and Berenguer, J. (1997) Surface proteins and a novel transcription factor regulate the expression of the S-layer gene in *Thermus thermophilus* HB8. *Mol Microbiol* **24**: 61–72.
- Galperin, M.Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552–567.
- de Grado, M., Castan, P., and Berenguer, J. (1999) A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**: 241–245.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714–2723.
- Hartmann, R.K., Wolters, B., Kroger, B., Shultze, S., Spetch, T., and Erdmann, V.A. (1989) Does *Thermus* represent another deep eubacterial branching? *Syst Appl Microbiol* **11**: 243–249.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E.E. (1996) Errors in protein structures. *Nature* **381**: 272.
- Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp–Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling

- alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559–592.
- Laptenko, O., and Borukhov, S. (2003) Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*. *Methods Enzymol* **371**: 219–232.
- Laptenko, O., Kim, S.S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., *et al.* (2006) pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J* **25**: 2131–2141.
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., and Ebricht, R.H. (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10–20.
- Megehee, J.A., Hosler, J.P., and Lundrigan, M.D. (2006) Evidence for a cytochrome *bcc-aa3* interaction in the respiratory chain of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **152**: 823–829.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., and 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.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H., and Hoshino, T. (2005) In vivo directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* **100**: 158–163.
- Nishiyama, M., Kobashi, N., Tanaka, K., Takahashi, H., and Tanokura, M. (1999) Cloning and characterization in *Escherichia coli* of the gene encoding the principal sigma factor of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **172**: 179–186.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205–217.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., and Goldfarb, A. (1997) The RNA–DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**: 33–41.
- Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 355–376.
- Rainey, F.A., and da Costa, M.S. (2001) The genus *Thermus*. In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Garrity, G.M., Boone, D.R., and Catenholz, R.W. (eds). New York: Springer, pp. 393–404.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., and Berenguer, J. (1998a) 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., Fernandez-Herrero, L.A., Marin, I., and Berenguer, J. (1998b) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J Bacteriol* **180**: 3137–3143.
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S., and Taylor, C.J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 165–178.
- Ritchie, D.W., and Kemp, G.J. (2000) Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins* **39**: 178–194.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardiwal, S., Kendall, S.L., Movahedzadeh, F., Rison, S.C., Stoker, N.G., and Djordjevic, S. (2005) A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS protein binds haem. *J Mol Biol* **353**: 929–936.
- Schroder, I., Darie, S., and Gunsalus, R.P. (1993) Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJ*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J Biol Chem* **268**: 771–774.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381–3385.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**: 425–434.
- Stewart, V. (2003) Biochemical society special lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans* **31**: 1–10.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Uندن, G., and Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217–234.
- Vakser, I.A. (1995) Protein docking for low-resolution structures. *Protein Eng* **8**: 371–273.
- Vassilyeva, M.N., Lee, J., Sekine, S.I., Laptenko, O., Kuramitsu, S., Shibata, T., *et al.* (2002) Purification, crystallization and initial crystallographic analysis of RNA polymerase holoenzyme from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1497–1500.
- Vollack, K.U., Hartig, E., Korner, H., and Zumft, W.G. (1999) Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol Microbiol* **31**: 1681–1694.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**: 52–56.
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S.J., Richardson, D.J., and Moir, J.W. (2001) Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. *J Bacteriol* **183**: 3606–3613.
- Yeats, C., Bentley, S., and Bateman, A. (2003) New knowledge from old: *in silico* discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol* **3**: 3.
- Zafra, O., Cava, F., Blasco, F., Magalon, A., and Berenguer, J. (2005) Membrane-associated maturation of the heterotetrameric nitrate reductase of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* **187**: 3990–3996.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533–616.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. DnrT amino acid sequence alignment. Sequences of DnrT and other members of the CRP family were compared and aligned using CLUSTALW program. Identical residues are shaded in grey, and residues subjected to site-directed mutagenesis in DnrT are marked with asterisks. Secondary structure elements (H, alpha helix; E, beta strand) of *E. coli* CRP (CRP-Eco, PDB entry 1O3R), as well as two structural motifs, the dimerization helix and the helix-turn-helix DNA-binding motif are shown in the lower row (CRP-Eco (ss)). Known sites of CRP interaction with RNAP (activation regions AR1, AR2 and AR3) are shown as coloured boxes above the DnrT sequence. Schematic diagram showing the spatial relationship of AR1-AR3 regions of CRP and RNAP subunits is presented at the bottom. Protein accession numbers: THET2-TtheH – TTC1072 from *T. thermophilus* HB27; FLP-Llac – Q9S393 from *Lactococcus lactis*; NarR-Ppan – Q93PW2 from *Paracoccus pantotrophus*; DnrE-Pst – Q9X7J7, DnrD-Pst – Q9X7J4, and FnrA-Pst – P7200 from *Pseudomonas stutzerii*; Dnr-Pae – Q51441 and ANR-Pae – P23926 from *P. aeruginosa*; FNR-Eco – P0A9E6 and CRP-Eco – P0ACJ8 and from *E. coli*.

Fig. S2. A) Immuno-detection of the indicated amounts (ng) of DnrS and DnrT purified from over-expressing strains of *E. coli*. B) Western blot of total protein extracts from *T. thermophilus* showing the DnrS and DnrT proteins expressed in the facultative wild type strain (NAR1) grown aerobically (A) or treated for 4 hours under anoxia with nitrate (An), and in its *dnrS::kat* mutant grown aerobically before (–) or after transformation with pWUR (pW) or with pWURdnrS (pWdnrS). The aerobic strain HB27 (27) is shown as control. Note that constitutive expression of DnrT in the *dnrS::kat* mutant during aerobic growth is independent of the presence of pWURdnrS.

Fig. S3. DNase I footprinting analysis on triplicate samples of the Pnrc promoter with (+DnrT) or without (-DnrT) the DnrT protein. Samples (20 μ l) of Pnrc (7 pmol), labelled in the template strand by PCR with primers [³²P]-FPpncRev and FPpnc47rev, were incubated for 5 min at 50°C with DnrT (5,

10, 50 pmol) in the presence of 2 μ g of [dl-dC], and digested with DNase I for 1 min at 50°C in reaction buffer (8 mM HEPES, 6 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA, pH 7.5). Samples were analyzed by denaturing PAGE and visualized by autoradiography. The sequence protected by DnrT is shown.

Fig. S4. Structural model for DnrT. A) Ribbon plot of the proposed structure for DnrT dimer interacting to a DNA molecule, represented as a surface coloured according to electrostatic properties. Atoms of residues located in the interaction areas AR1 (yellow), AR2 (blue) and AR3 (green) are depicted as spheres. Model shows the location of the large dimerization helices of both molecules in the dimer interface, as well as the HTH motif in close contact to the major groove of DNA. The location of the cAMP molecules in the CRP structure is shown for clarity. B) Detail of modeled AR3- σ^A – DNA interaction. Position of residues in AR3 domain, represented as ‘sticks’, indicates the location of side chains of R63 and K64 (blue) pointing to the negatively charged surface of DNA phosphate backbone. Acidic chains of D59 and E61 (red) are faced to the positive residues of K403, R406, and K407 of σ^A . Residues R396, and R398 appear to bind phosphate groups in the backbone of DnrT-bound DNA. C) Modelled interaction of DnrT to α -thRNAP. Proteins, as well as DNA bound to DnrT, are represented as atomic surfaces. AR2 site in DnrT and its proposed recognition site in α -thRNAP have been highlighted. D) Model for the interaction of the C-terminal domain of the α -thRNAP (green ribbon) with DnrT through the AR1 domain. Atoms of residues in contact in both proteins are illustrated as spheres. DNA surface has been omitted for clarity. Plots were generated using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

Table S1. Oligonucleotides used in this work and their purpose.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.