

UCH=FC
R387
Biotecnología
C.1

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular

**“Polifosfatos inorgánicos en el arqueón
Sulfolobus solfataricus. Posible rol en la
tolerancia a metales pesados”**

Francisco Remonsellez Fuentes



Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al título profesional de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Director de Tesis
Dr. Carlos A. Jerez**

Junio 2004



“Polifosfatos inorgánicos en el arqueón *Sulfolobus solfataricus*. Posible rol en la tolerancia a metales pesados”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FRANCISCO REMONSELLEZ FUENTES

Director de Memoria de Título
Dr. Carlos Jerez Guevara

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Carlos Jerez Guevara.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Héctor Toledo Araya
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Héctor Toledo Araya.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Profesor corrector

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Marcelo Baeza Cancino.



Santiago de Chile, 6 Julio 2004

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta memoria de título deseo agradecer a las siguientes personas:

Al Dr. Carlos Jerez por haber permitido desarrollarme a nivel profesional y personal en su laboratorio y además por transmitirme su gran entusiasmo que tiene por la ciencia.

A Juan Araos por ser una gran persona y por su incondicional dedicación en las tareas de nuestro laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Nicolás Guiliani, Sergio Álvarez, Francisco Chávez, Álvaro Orell, Mauricio Acosta, Lissette Valenzuela, Silvia Cardona y Mario Vera, por su apoyo, amistad, discusiones y los buenos momentos compartidos durante este proceso.

A mis padres, Nelly y Ramón, por su incondicional apoyo, a pesar de que la ciencia es una área desconocida para ellos.

A mi abuela María, sin ella este proceso no tendría inicio ni fin.

A Pablo y Adrienne, por tantas oraciones en beneficio de mi vida, y si existe ese Dios, también gracias.

A Emma, por haber nacido e iluminar mi vida.

A Marly, por su gran amor e incentivo entregado para que esta tesis terminara de buena forma.

A mis profesores y amigos.

Finalmente, a la vida, por sus buenos y malos momentos.





INDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE MATERIAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. RESUMEN.....	viii
2. SUMMARY.....	x
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. Metabolismo de los poliP.....	1
3.1.1. Aspectos generales.....	1
3.1.2. Funciones de los poliP.....	2
3.2. Los poliP como una aplicación biotecnológica.....	4
3.2.1. PoliP y la descontaminación de aguas.....	4
3.2.2. Descontaminación de metales pesados.....	5
3.3. Transporte de fosfato.....	7
3.3.1. Sistema de transporte de fosfato en <i>Escherichia coli</i> a través de <i>Pit</i>	8
3.3.2. Sistema de transporte de fosfato en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.4. El dominio <i>Archaea</i>	9
3.4.1. Características del dominio <i>Archaea</i>	10
3.4.2. El género <i>Sulfolobus</i>	11
3.5. PoliP en el género <i>Sulfolobus</i>	13
3.6. Hipótesis de trabajo.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	15
4.2. Métodos de análisis de poliP.....	16
4.2.1. Extracción de poliP endógeno de <i>S. solfataricus</i>	16
4.2.2. Purificación de la PPK recombinante de <i>E. coli</i>	17
4.2.3. Cuantificación de poliP.....	18
4.2.4. Análisis de los poliP por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	18

4.3. Síntesis y purificación de poliP <i>in vitro</i>	19
4.3.1. Síntesis <i>in vitro</i> de [γ -P ³³]poliP ₇₅₀ catalizada por PPK recombinante de <i>E. coli</i>	19
4.3.2. Purificación de [γ - ³³]poliP ₇₅₀ sintetizado <i>in vitro</i>	19
4.4. Actividad PPX.....	20
4.4.1. Preparación de extractos crudos de <i>S. solfataricus</i>	20
4.4.2. Determinación de la actividad PPX.....	20
4.5. Microscopía electrónica.....	21
4.6. Análisis <i>in silico</i> de secuencias y comparación con base de datos.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Presencia de gránulos densos a los electrones en <i>S. solfataricus</i>	23
5.2. PoliP en <i>S. solfataricus</i>	24
5.3. Tolerancia de <i>S. solfataricus</i> a CuSO ₄	24
5.4. Niveles y tamaños de los poliP sintetizados por <i>S. solfataricus</i> adaptado a crecer en presencia de CuSO ₄	27
5.5. Efecto de Cu ⁺² en los niveles de poliP en <i>S. solfataricus</i> no adaptado a crecer en presencia del metal.....	28
5.6. Efecto de Cu ⁺² en la actividad PPX en <i>S. solfataricus</i>	30
5.7. Búsqueda de genes homólogos al transportador de fosfato PitA de <i>E. coli</i> y Pho84 de <i>S. cerevisiae</i> en el dominio <i>Archaea</i>	32
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	42
8. REFERENCIAS.....	43



LISTA DE FIGURAS



Figura 1. Polifosfatos inorgánicos.....	1
Figura 2. Esquema de la destoxificación de metales con la participación de poliP.....	7
Figura 3. El árbol de la vida visto como una red.....	10
Figura 4. Gránulos densos a los electrones en <i>S. solfataricus</i>	23
Figura 5. Crecimiento de <i>S. solfataricus</i> en condiciones suficientes o limitantes de nutrientes.....	25
Figura 6. Niveles de poliP de <i>S. solfataricus</i> crecido en CSN y CLN.....	25
Figura 7. Efecto del cobre en el crecimiento de <i>S. solfataricus</i> en CSN.....	26
Figura 8. Efecto del cobre en el crecimiento de <i>S. solfataricus</i> en CLN.....	26
Figura 9. Niveles de poliP de <i>S. solfataricus</i> crecido en CLN.....	27
Figura 10. Electroforesis de muestras de poliP de <i>S. solfataricus</i>	28
Figura 11. Efecto de Cu ⁺² en los niveles de poliP en <i>S. solfataricus</i>	29
Figura 12. Análisis de la actividad PPX en extractos crudos de <i>S. solfataricus</i> por TLC.....	31
Figura 13. Alineamiento de secuencias aminoacídicas ortólogas a Pho84.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de tres especies del género <i>Sulfolobus</i>	12
Tabla 2. Cuantificación de la actividad PPX en extractos crudos de <i>S. solfataricus</i>	30
Tabla 3. Transportadores de fosfato de tipo bacteriano y eucarionte presentes en los genomas secuenciados del dominio Archaea.....	33
Tabla 4. Comparación de la proteína Pho84 de <i>S. cerevisiae</i> con sus posibles ortólogos en el dominio Archaea.....	34



LISTA DE ABREVIATURAS

- Amp:** ampicilina
- CPK:** creatina fosfoquinasa
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- GITC:** isotiocianato de guanidina
- IPTG:** iso propil tio- β -D-galactosido
- LB:** medio de cultivo Luria-Bertani
- MFS:** Mayor Facilitator Superfamily
- Pi:** ortofosfato
- Pit:** transportador de fosfato inorgánico
- PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PolIP:** polifosfatos inorgánicos
- PPK:** polifosfato kinasa
- PPKr:** PPK recombinante de *Escherichia coli*
- PPX:** exopolifosfatasa
- SDS:** dodecil sulfato de sodio
- TBE:** solución amortiguadora tris-borato EDTA
- TLC:** cromatografía ascendente en capa fina

1. RESUMEN

Algunos microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* se caracterizan por su adaptación a la vida en condiciones extremas. Existe un gran interés por dilucidar los mecanismos por los cuales estos microorganismos se adaptan y responden a su medio.

Una de las moléculas posiblemente involucradas en la supervivencia frente a distintos factores ambientales son los polifosfatos inorgánicos (poliP), los cuales se han encontrado en todos los seres vivos. Su biosíntesis es realizada por la enzima polifosfato quinasa (PPK), mientras que la enzima exopolifosfatasa (PPX) es la responsable de su degradación.

Estos polímeros inorgánicos tienen diversas funciones, dentro de las cuales destacan el servir como fuente de energía y reserva de fosfato, modular ciertas respuestas de estrés y adaptaciones a la fase estacionaria, y participar en posibles mecanismos de tolerancia a iones metálicos. Se ha propuesto en bacterias un modelo para la función de los poliP en la tolerancia a metales pesados. Este modelo se basa en que los poliP pueden secuestrar a los iones metálicos. La concentración intracelular de estos iones regularía la actividad PPX y el fosfato hidrolizado a partir del poliP sería transportado fuera de la célula acompañado de los cationes metálicos.

En esta tesis planteamos como hipótesis que los niveles de poliP en el arqueón *Sulfolobus solfataricus* varían cuando las células se someten a una condición de estrés, y que estos polímeros tendrían un rol en la tolerancia a metales pesados. En el desarrollo de esta tesis determinamos que los niveles de poliP son mayores cuando *S. solfataricus*



se creció en condiciones limitantes de nutrientes, a pesar que el crecimiento del microorganismo fue menor en esta condición. La tolerancia a cobre fue mayor (100 veces) cuando el microorganismo se creció en condiciones limitantes de nutrientes, tolerando hasta 100 mM CuSO₄. Por otro lado, los niveles y tamaños de los poliP intracelulares de *S. solfataricus*, crecido en condiciones limitantes de nutrientes, disminuyeron en relación al aumento de la concentración del metal en el medio de cultivo. Cuando se realizó un traspaso de *S. solfataricus* desde un medio sin cobre a un medio que contiene el ion metálico en concentraciones de 50 ó 100 mM, los niveles de poliP disminuyeron bruscamente en la primera hora y la actividad PPX aumentó aproximadamente 10 veces con respecto al cultivo control sin el metal. Estos resultados sugieren claramente que los poliP tienen una relación con la tolerancia al metal pesado.

El modelo propuesto en bacterias para destoxificar metales pesados requiere de transportadores de fosfato del tipo Pit. Por lo tanto, realizamos una búsqueda mediante métodos bioinformáticos para determinar la presencia de transportadores de la familia Pit en los genomas secuenciados del dominio *Archaea*. Interesantemente, solo las arqueas acidófilas *S. solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium* y *Ferroplasma acidarmanus*, no presentaron homólogos a PitA de *Escherichia coli*, pero en cambio sí presentaron homólogos a Pho84 de *Saccharomyces cerevisiae*. La predicción de los dominios de transmembrana indicaron ubicaciones similares entre Pho84 de *S. cerevisiae* y sus homólogos en arqueas. Es posible que el transporte de fosfato en las arqueas acidófilas se realice a través de transportadores ancestrales de tipo eucarionte.

2. SUMMARY

Some microorganisms belonging to the domain *Archaea* are characterized for their adaptation to life in extreme conditions. There is a great interest to understand the mechanisms by which these microorganisms adapt and respond to their environment.

Molecules possibly involved in microbial survival to changes in their environment are the inorganic polyphosphates (polyP), which have been found in all living organisms. The main enzyme involved in polyP synthesis is the polyphosphate kinase (PPK), while the exopolyphosphatase (PPX) is the enzyme responsible for its degradation.

PolyP has several functions, among them energy source, phosphate reservoir, modulator of certain stress responses, adaptations to stationary phase and participation in metal-tolerance mechanisms. A model for the participation of polyP in the tolerance to heavy metals has been proposed in bacteria. This model is based on the ability of polyP to sequester metal ions. The intracellular concentrations of these ions would stimulate the PPX activity and the hydrolyzed phosphate obtained from polyP could be transported out of the cell along with the metallic cations.

In this thesis it was postulated that when cells of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* are subjected to a stressing condition such as the presence of a heavy metal, its polyP levels change and that this polymer could have some role in tolerance to heavy metals. When *S. solfataricus* was grown in a nutrient-limited condition, despite of its growth limitation we found that polyP levels were increased. Under these nutrient-limited conditions, *S. solfataricus* increased its copper tolerance 100 fold,

tolerating up to 100 mM CuSO₄. On the other hand, when *S. solfataricus* cells grown in nutrient-limited condition was previously adapted to the presence of copper, both intracellular polyP levels and the length of the polymer decreased when the metal concentration increased in the culture medium. When we shifted *S. solfataricus* cells from a medium without copper to one with 50 or 100 mM copper, polyP levels decreased roughly in the first hour and PPX activity increased nearly 10 fold respect to the control culture without the metal. These results clearly indicate that polyp might have a relationship with tolerance to copper.

The proposed model for heavy metals detoxification in bacteria requires Pit-like phosphate transporters. Therefore, we searched through bioinformatic methods the presence of transporters of the Pit family in all available archaeal genomes. Interestingly, only the five acidophilic archaea *S. solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium* and *Ferroplasma acidarmanus*, did not present *Escherichia coli* PitA homologs, but instead they presented phosphate transporters homologs of *Saccharomyces cerevisiae* Pho84. The transmembrane domains prediction indicated identical locations for these domains both in *S. cerevisiae* Pho84 and the archaeal ortologs. It is therefore possible that phosphate transport in acidophilic archaea takes place through this eukaryal ancestral transporter.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Metabolismo de los poliP.

3.1.1. Aspectos generales.

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son polímeros lineales formados por decenas o cientos de residuos ortofosfato (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía (Fig. 1) (Kornberg, 1995; Kornberg y col., 1999). Estos polímeros se han encontrado en todos los seres vivos en los que se ha estudiado: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Wood y Clarck, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990; Cardona y col., 2001). Además, se ha postulado que son una de las macromoléculas más antiguas en la evolución prebiótica (Wächterhäuser, 1992).

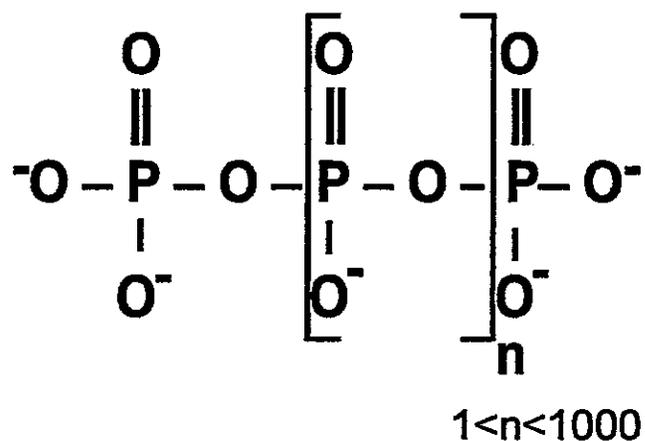
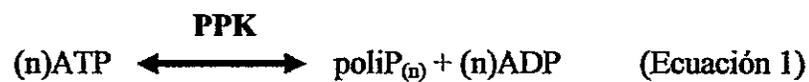
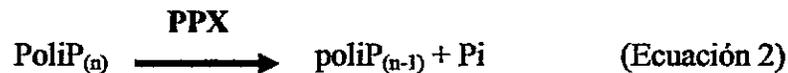


Figura 1. Polifosfatos inorgánicos. n representa el número de residuos de fosfato.

La única vía establecida para la biosíntesis de poliP es la polimerización del fosfato y del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa (PPK) codificada por el gen *ppk* (Ecuación 1) (Ahn y Kornberg, 1990). No obstante, la presencia de poliP de cadena corta en un mutante *ppk* de *E. coli* sugiere que en este microorganismo existirían otras enzimas involucradas en la síntesis de poliP (Kornberg y col., 1999).



La principal enzima responsable de la degradación de poliP en *E. coli* es la exopolifosfatasa (PPX) codificada por el gen *ppx* (Ecuación 2) (Kornberg y col., 1999).



3.1.2. Funciones de los poliP.

Considerados clásicamente como componentes con función de reserva energética, la regulación y función de los poliP en los seres vivos permaneció desconocida por muchos años. Recientemente se ha estudiado sus posibles funciones fisiológicas y potenciales aplicaciones industriales. Entre las funciones propuestas se ha postulado que el poliP actúa como sustituyente de ATP en reacciones de proteínas quinasas (Kornberg y col., 1999). También es una reserva de fosfato, debido a que el poliP puede ser convertido a Pi por la acción de polifosfatasas, lo que asegura una

mantención de niveles estables de este ión (Kornberg y col., 1999), y además colabora con la mantención del pH intracelular al presentar acción amortiguadora (Kornberg y col., 1999). Su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace lo convierte en un buen quelante de iones metálicos tales como Mn^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} , lo que sugiere su posible participación en mecanismos celulares de destoxificación (Keasling, 1997). Existen otras funciones del poliP, como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, factor sigma de fase estacionaria (Shiba y col., 1997) y de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Tsutsumi y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que la proteasa Lon de *E. coli* forma un complejo con poliP, el cual es responsable de la degradación de proteínas ribosomales en respuesta a la carencia de aminoácidos (Kuroda y col., 2001).

La dinámica de acumulación y utilización del poliP muestra sin duda que la mayor utilización de esta molécula debe ser como fuente de energía y reserva de Pi. Además, la asociación de la acumulación de poliP con la limitación de algunos nutrientes e incluso con condiciones de estrés, como carencia de aminoácidos y fosfato, sugiere que probablemente el poliP sea un enlace entre estas situaciones y los sistemas globales de respuesta (Kornberg y col., 1999).

3.2. Los poliP como una aplicación biotecnológica.

3.2.1. PoliP y la descontaminación de aguas.

La contaminación por fosfato en las aguas debido a descargas de procesos industriales y residuos de actividades humanas es un problema global (Kortstee y col., 2000). La necesidad de remover el fosfato de las aguas contaminadas ha derivado en el desarrollo de distintos procesos de tipo químico y biológico. El principio de los procesos biológicos de remoción de fosfato, denominados EBPR “Enhanced Biological Phosphorus Removal”, constan de dos grandes etapas, una anaerobia y otra aerobia. En la primera, los microorganismos se encuentran en un ambiente rico en fuentes de carbono, pero pobre en aceptores de electrones, por lo tanto el poliP es degradado a Pi, con lo que se incrementa el gradiente de protones a través de la membrana. Las fuentes de carbono se guardan como polímeros de poli-hidroxialcanoatos (PHA). En la siguiente etapa, el sistema se hace rico en aceptores de electrones pero pobre en fuentes de carbono, lo cual provoca la degradación de los PHA y la síntesis de poliP a expensas del ATP generado en el proceso anterior. Como en esta fase se consume más Pi del que es secretado en la fase anaerobia, el resultado neto consiste en la remoción de Pi de las aguas contaminadas (Keasling y col., 2000; Kortstee y col., 2000). Se ha intentado mejorar este proceso, por un lado mediante el estudio de las bacterias acumuladoras de poliP que habitan los sitios contaminados, como *Acinetobacter* sp., *Microtholunatus phosphovorius*, *Lamproedia* spp. y *Rhodocyclus* spp. (Mino, 2000), y por otra parte mediante el uso de manipulación genética de estas bacterias (Kornberg y col., 1999).

3.2.2. Descontaminación de metales pesados.

Un proceso de gran importancia ecológica consiste en la remoción de iones metálicos contaminantes (Keasling y col., 2000). Uno de los mecanismos por los cuales las células pueden tolerar amplias concentraciones de metales pesados, es el secuestro de estos debido a la interacción con los poliP, disminuyendo su concentración intracelular (Keasling, 1997). Por lo tanto, la relación existente entre el poliP y la resistencia a metales sugiere una posible aplicación de organismos con metabolismo de poliP genéticamente mejorados para la biorremediación de aguas contaminadas con estos iones metálicos (Keasling y col., 2000).

Los poliP en hongos, algas, vacuolas de levaduras, y en gránulos de bacterias están a menudo asociados con compuestos de bajo peso molecular cargados positivamente (aminoácidos y cationes bivalentes). Los cationes más comúnmente asociados son Ca^{+2} , K^{+} y Mg^{+2} . Adicionalmente, se ha encontrado metales pesados en gránulos de poliP en bacterias, levaduras y hongos (Keasling, 1997; Keasling y col., 2000).

Los trabajos de Aiking y col. (1984), en que se demostró que *Klebsiella aerogenes* acumula gránulos de poliP para destoxificar cadmio, y de Petterson y col. (1985), en donde se observó que *Anabaena cylindrica* acumula más aluminio durante el crecimiento con alta concentración de fosfato, condición en la que se forman gránulos de poliP, apoyan la idea que las células usan los poliP para destoxificar los metales pesados que han entrado a ellas (Keasling, 1997). Por otro lado, también hay evidencias que los poliP se degradan durante el crecimiento de los microorganismos en presencia de

metales pesados (Aiking y col., 1985; Keasling y Hupf, 1996). Basados en los datos anteriores, Keasling (1997) planteó un modelo (Fig. 2) para explicar el fenómeno de la interacción del metal con el poliP. Este modelo plantea que la concentración intracelular de cationes regula la actividad polifosfatasa. La liberación *in vitro* de fosfato a partir de polifosfato por la enzima PPX es afectada por la concentración de cationes (Keasling, 1997), ya que incrementos en la concentración de NaCl, NaF, o MgCl₂ inducen un aumento de la actividad PPX, mientras que la disminución de la concentración de los iones, inhibe la actividad PPX (Keasling y col., 1993). Posteriormente, el fosfato liberado es transportado fuera de la célula. El fosfato transportado es acompañado por cationes, como se demostró en los sistemas transportadores de fosfato inorgánico (Pit) de *E. coli* y *Acinetobacter johnsonii*, los cuales transportan reversiblemente complejos metal-fosfatos (van Veen y col., 1994 a y b).

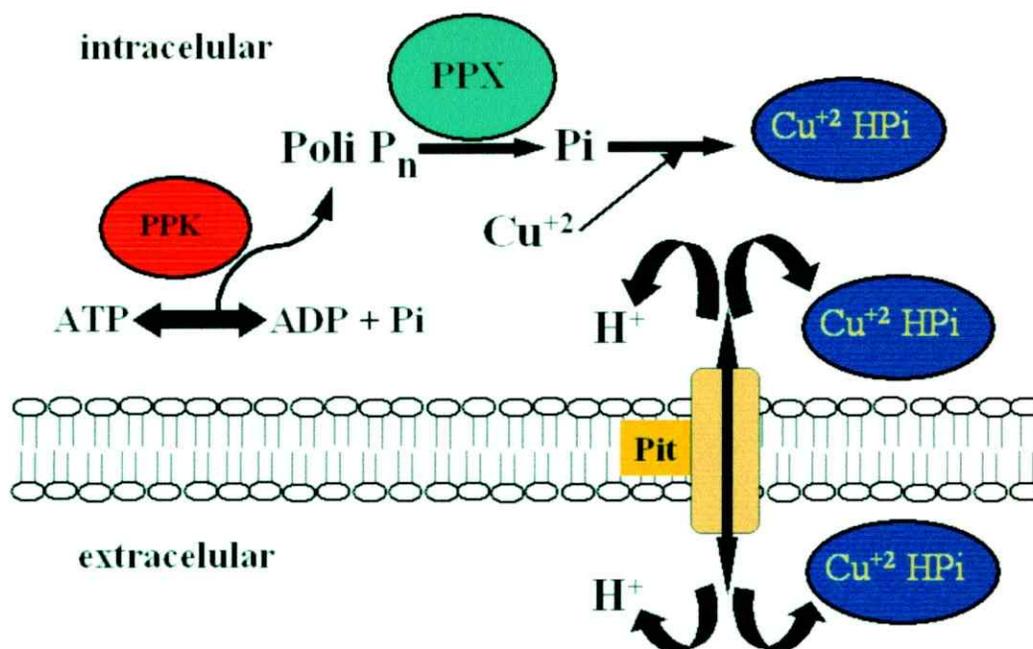


Figura 2. Esquema de la detoxificación de metales con la participación de poliP. La concentración intracelular del metal regula la actividad exopolifosfatasa, afectando directamente los niveles de poliP. El fosfato liberado desde el poliP es transportado fuera de la célula con el ión metálico a través del transportador de fosfato Pit. (Kearling y col., 1997).

3.3. Transporte de fosfato.

El transporte de fosfato se realiza por la familia de transportadores Pit (phosphate inorganic transporter) que se encuentran en bacterias, hongos, levaduras, animales y plantas. Su función de permeasa puede ser por simporte de tipo Pi:H^+ , o menos recurrentemente como Pi:Na^+ . Las proteínas que pertenecen a esta familia tienen un tamaño entre 297 y 681 aminoácidos, y presentan entre 10 y 12 dominios de transmembrana (Saier y col., 1999). Se han caracterizado solo tres miembros de esta

familia: Pit A de *E. coli*, Pho 4 de *N. crassa* y Pho89 de *S. cerevisiae* (Persson y col. 1999; Saier y col., 1999).

Algunos microorganismos, dentro de los cuales se incluye *E. coli*, presentan sistemas genéticos que permiten captar trazas de Pi desde el medio frente a la carencia de fosfato. En *E. coli* existe un sistema conocido como el regulón Pho, cuyo conjunto de genes aumenta su expresión más de cien veces en carencia de fosfato, mientras que se inhibe cuando hay un exceso de este compuesto. En *E. coli* se han descrito 38 genes que forman parte del regulón Pho, dentro de los cuales se encuentra el sistema de transporte específico para fosfato Pst (phosphate specific transport) (Wanner, 1996).

3.3.1. Sistema de transporte de fosfato en Escherichia coli a través de Pit.

En *E. coli* el fosfato entra al citoplasma a través del sistema de transporte de fosfato inorgánico Pit, el cual se encuentra en la membrana citoplasmática. El sistema Pit consta de 2 proteínas, codificadas por los genes *pitA* y *pitB*, de expresión constitutiva. Tiene baja afinidad por el fosfato con una Km de 38.2 μM (Van Veen, 1997).

3.3.2. Sistema de transporte de fosfato en Saccharomyces cerevisiae.

En la levadura *S. cerevisiae* el transporte de fosfato se realiza por dos sistemas de alta afinidad que dependen de la concentración de fosfato extracelular. Uno de ellos es Pho 89 (ortólogo a Pit A de *E. coli*), cuyo peso molecular es de 63 kDa. Este se acopla al

transporte de Na^+ y tiene una K_m de $0.5 \mu\text{M}$. El otro transportador es Pho 84, cuyo peso molecular es de 65 kDa, se acopla al transporte de H^+ y tiene una K_m entre 1 y $15 \mu\text{M}$, y tiene una alta homología con los transportadores de azúcares de mamíferos y levaduras, siendo miembro de la superfamilia de facilitadores MFS (Persson y col., 1999).

3.4. El dominio *Archaea*.

La comparación de secuencias nucleotídicas del RNA ribosomal 16S/18S ha permitido, en los últimos años, la construcción de un árbol filogenético universal que agrupa a los seres vivos en tres categorías o dominios, llamados *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Woese y col., 1990).

Es interesante la necesidad de avanzar en el estudio del dominio *Archaea* debido a las características de adaptación a la vida en condiciones extremas que presentan muchos de sus representantes (Rajagopal y col., 1998).

Se ha obtenido otra visión que aparentemente desmorona el paradigma de la existencia de los tres dominios: los fenómenos de transferencia horizontal de genes que explican las aparentes inconsistencias entre distintos árboles universales, han ocurrido y son importantes en la evolución biológica; por otro lado ponen en evidencia que los árboles filogenéticos universales basados en un único gen muestran la historia de ese gen y no necesariamente del organismo que lo contiene (Doolittle, 1999; Woese, 2000). Desde este punto de vista, para muchos genes el árbol de la vida se transforma en una red (Fig. 3) (Doolittle, 1999).

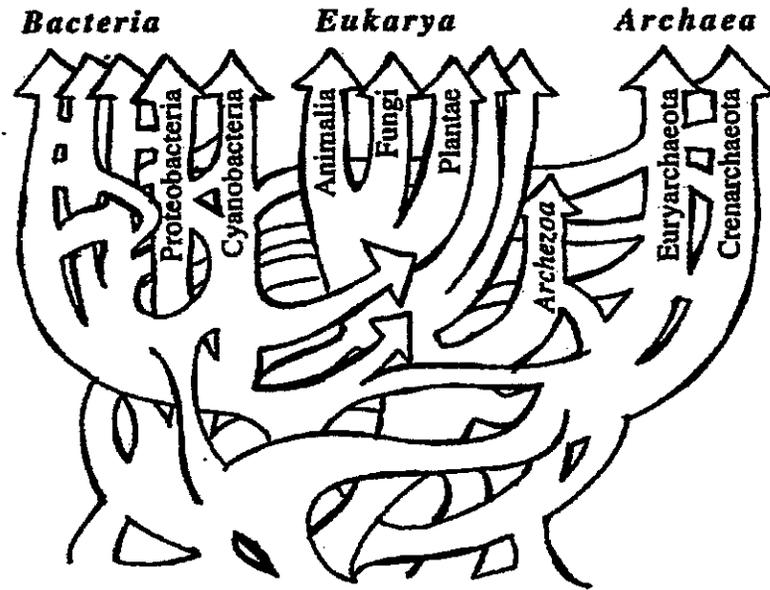


Fig. 3. El árbol de la vida visto como una red (Doolittle, 1999).

3.4.1. Características del dominio *Archaea*

La secuenciación de nuevos genomas del dominio *Archaea* ha revelado que la mayor parte de los sistemas de procesamiento de la información, como la replicación, transcripción y traducción, que mantienen y expresan los genomas, son claramente de tipo eucarionte (Baumann y col., 1995; Rowlands y col., 1994; Dennis, 1997). En cambio, los genes relacionados con el metabolismo son más del tipo bacteriano (Olsen y Woese, 1997; Gaasterland, 1999). Otras similitudes con bacterias son sus tamaños celulares, ausencia de membrana nuclear y organelos, y la presencia de un cromosoma

circular acompañado de plásmidos circulares más pequeños (Brown y Doolittle, 1997). Esto explicaría porqué los árboles basados en secuencias génicas relacionadas con estos procesos sugieren un origen común entre *Archaea* y *Eukarya* (Horiike y col., 2001).

El dominio *Archaea* se caracteriza por las estructuras de la envoltura celular, la mayoría formadas por una capa S de glicoproteínas y una membrana plasmática que contiene una gran proporción de tetra-éteres lipídicos (Brown y Doolittle, 1997; Rajagopal y col., 1998). Además, muchos de sus representantes se caracterizan por su adaptación a la vida en condiciones extremas (Rajagopal y col., 1998). Este dominio se divide en dos reinos: *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. Ambos comprenden microorganismos extremófilos: los *Euryarchaeota* incluyen a las arqueas halófilas, capaces de tolerar altas concentraciones de sal y a los metanógenos, que generan metano bajo condiciones anaeróbicas, mientras que los *Crenarchaeota* incluyen a los termoacidófilos extremos, que crecen a pH entre 1 y 3, y a temperaturas de 80°C a 102°C (Brown y Doolittle, 1997).

3.4.2. El género *Sulfolobus*.

El género *Sulfolobus*, perteneciente al reino *Crenarchaeota*, comprende especies termoacidófilas aisladas de hábitats geotermales como las fuentes solfatáricas (Ciaramella y col., 2002). Estos sitios se caracterizan por las altas temperaturas de sus aguas circulantes, la presencia de minerales como hierro y azufre, y una gran acidez (Stetter, 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de tres especies del género *Sulfolobus*.

Características	<i>S. acidocaldarius</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>S. metallicus</i>
Temperatura óptima de crecimiento	75°C	75°C	65°C
pH óptimo de crecimiento	3-3.5	2-4	2-3
Oxidación de azufre	-/+	-	+
Oxidación de hierro	-	-	+
Crecimiento heterotrófico	+	+	-

Debido a su carácter aerobio, *Sulfolobus* vive en las capas superiores de las fuentes solfatáricas. Se ha avanzado en el estudio de las especies de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*. El genoma de este último se secuenció y anotó recientemente (She y col., 2001); contiene alrededor de 3×10^6 pares de bases, codificando sobre 2900 proteínas, 33% de las cuales sólo se encuentran en *S. solfataricus*, mientras que el 40% tiene homólogos en *Archaea*, 12% tiene homólogos en Bacteria pero no en Eucaria y 2.3% en Eucaria pero no en Bacteria. Además el 25% de las proteínas se encuentra en ambos dominios (She y col., 2001; Ciaramella y col., 2002). Menos estudiado es *S. metallicus*, aunque más interesante desde el punto de vista biotecnológico ya que su capacidad de oxidar hierro lo hace candidato para su utilización en biolixiviación de metales a altas temperaturas (Lindström y col., 1992; Aguilar, 1996).

3.5. PoliP en el género *Sulfolobus*.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la respuesta global de *S. acidocaldarius*, ante condiciones de estrés tales como el aumento de temperatura y la carencia de fosfato (Osorio y Jerez, 1996). Durante estos experimentos, mediante microscopía electrónica de transmisión, se pudieron detectar gránulos densos a los electrones, probablemente compuestos por poliP (Osorio, 1998). Además, hemos determinado los niveles de poliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*, y sus variaciones frente a distintos cambios ambientales (Cardona, 2001). Con respecto a la enzimología del metabolismo de los poliP en el dominio *Archaea*, no se tenía conocimiento hasta que en nuestro laboratorio se encontró un gen *ppx* funcional en *S. solfataricus*, con similitud al gen *ppx* de *E. coli* (Cardona y col., 2002).

3.6. Hipótesis de trabajo

Se plantea como hipótesis que en *S. solfataricus* los niveles de poliP varían en condiciones limitantes de crecimiento y estos polímeros tendrían un rol en la tolerancia a metales pesados.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo de investigación son:

1. Determinar los niveles de poliP de *S. solfataricus* crecido en condiciones suficientes y limitantes de nutrientes.
2. determinar los niveles de poliP frente al ión cobre y el efecto que tiene este metal en la actividad PPX.
3. Identificar posibles transportadores de fosfato en el dominio *Archaea* mediante análisis bioinformático.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa DSM nro 1617 de *S. solfataricus*.

S. solfataricus se creció a 75°C y 160 rpm en medio 182 (3,1 g/L KH_2PO_4 , 2,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,8 mg/L $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg/L $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/L $\text{VO}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ y 0,01 mg/L $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) suplementado con 0,1 % de extracto de levadura y 0,1 % de casaminoácidos. Esta condición de crecimiento se denominó condición suficiente en nutrientes (CSN). El inóculo se realizó al 5%.

Cuando el medio se suplementó con 0,02 % de extracto de levadura y no se adicionó casaminoácidos, se denominó condición limitante de nutrientes (CLN). El inóculo se realizó al 10%.

El crecimiento en presencia de sulfato de cobre se realizó tanto en medio CSN como CLN, con la única diferencia que se agregó 5 ó 10 mM CuSO_4 al medio suficiente y 10, 20, 50 ó 100 mM CuSO_4 al medio limitante.

El traspaso de cultivos a medio con Cu^{+2} se realizó de la siguiente manera: cultivos de *S. solfataricus* (800 ml) se crecieron en CLN hasta la fase estacionaria temprana, que corresponde a 10^8 células/ml. A la mitad de los microorganismos se les agregó CuSO_4 50 mM o 100 mM, y la otra mitad del cultivo se utilizó como control manteniéndose en las condiciones iniciales. Los cultivos se dejaron crecer, y se tomaron

alícuotas de 50 ml en tiempos 0, 1, 3, 6 y 9 h después del traspaso para la extracción de poliP.

4.2. Métodos de análisis de poliP.

4.2.1. Extracción de poliP endógeno de *S. solfataricus*.

A los tiempos correspondientes, alícuotas de 10 ml de cultivos crecidos en medio completo y 100 ml de cultivos crecidos en condiciones limitantes se centrifugaron durante 10 min a 9.800 g. Los sedimentos se resuspendieron en 0,3 ml de 4 M isotiocianato de guanidina, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 calentado previamente a 95⁰C. La suspensión se mezcló por vortex, se incubó a 95⁰C por 3 min. Se reservó una alícuota de 15 µl de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30 µl de 10 % SDS y luego de incubación a 95⁰C durante 2 min, se agregó 300 µl de 96 % etanol y 5 µl de una suspensión de microperlas de vidrio Glassmilk® (Bio 101). Luego de agitación por vortex y de incubar 30 s a 95⁰C, los tubos se centrifugaron a 13.000 g durante 1 min y el sedimento de Glassmilk se resuspendió por vortex en 0,5 ml de “buffer New Wash” (5 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 % etanol) frío en hielo y se centrifugó a 13.000 g durante 30 s. El sedimento que contenía el poliP, DNA y RNA unido a Glassmilk, se resuspendió en 100 µl de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 5 µg/ml de DNasa y 5 µg/ml de RNasa y se incubó a 37⁰C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 µl de “buffer New Wash” frío para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos.

El poliP unido a Glassmilk se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 50 µl de agua cada vez, incubando 2 min a 95°C y centrifugando a 13.000 rpm para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 µl) se congeló a -20°C hasta su cuantificación.

4.2.2. Purificación de la PPK recombinante de *E. coli*.

La PPKr de *E. coli* se purificó desde la cepa NR100 por afinidad a Ni⁺², de acuerdo a lo descrito por Tzeng y Konberg (2000). La cepa se cultivó en 1 L de medio LB suplementado con 100 µg/ml de Amp. El inóculo se incubó a 37°C y 200 rpm y cuando alcanzó una A₆₀₀ de 0,6 se agregó IPTG a una concentración 1 mM final. Luego de 2 h de la inducción, las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4.500 g y el sedimento se resuspendió en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM MgCl₂ a una proporción de 3 ml/g de células (peso húmedo). Se realizó una ruptura celular mediante tratamiento con lisozima (250 µg/ml), seguido de 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento en hielo seco, más 1 min de sonicación (Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®). Se agregó secuencialmente y en concentraciones finales los siguientes compuestos: 1 M KCl, 100 mM Na₂CO₃ y 0,05 % Triton X-100. Luego se incubó durante 2 h a 4°C, para así liberar a la PPK de las membranas. Se centrifugó 20 min a 40.000 g y el sobrenadante se aplicó a His Bind Resin (Novagen) cargada con NiSO₄, equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Triton X-100 y 100 mM imidazol. La elusión se realizó en la misma

solución con 1 M EDTA. La muestra se dializó contra 50 mM Tris pH 7,4, 1 mM DTT, 10 % glicerol y se almacenó a -80°C.

4.2.3. Cuantificación de poliP.

La reacción se realizó según Ault-Riché y col. (1998) utilizando la actividad reversa de la PPKr de *E. coli* en exceso de ADP (Kumbe y col., 1996). El ensayo se realizó en un volumen final de 50 µl en amortiguador 50 mM Hepes-KOH pH 7,2, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 0,1 mM ADP, 2.500 unidades de PPKr y 5 µl de solución conteniendo el poliP. La incubación se realizó por 45 min a 37°C. La reacción se interrumpió por calentamiento (2 min a 95°C) y luego la mezcla se diluyó 1:20, 1:50, 1:200 y 1:500. Alícuotas de 50 µl de estas diluciones se ensayaron con 50 µl de luciferasa (Roche®). El ATP generado por la PPK se cuantificó midiendo la luz emitida en un luminómetro Lumi/96 de Bioscan®.

4.2.4. Análisis de los poliP por electroforesis en geles de poliacrilamida.

A las muestras de poliP obtenidas en la extracción se les agregó amortiguador Tris-borato pH 8,3 y amortiguador de carga (0,25 % azul de bromofenol, 40 % sacarosa) antes de la corrida. La electroforesis se realizó según lo descrito por Kumbe y Kornberg (1995). Se utilizaron geles de poliacrilamida (20%)-urea 7 M en amortiguador TBE a pH 8,3 (90 mM Tris-borato y 2 mM EDTA). Los geles se corrieron en el sistema Protean® II (Bio-Rad) a 400 V hasta que el frente de corrida se desplazó 10 cm desde el

punto de carga. Los geles se tiñeron con 0,05% azul de toluidina en 25 % metanol y 5 % glicerol durante 30 min. Se destiñeron en la misma solución sin azul de toluidina durante 1 h. El rango de tamaño estimado para los poliP se determinó por la comparación con estándares de poliP (cadenas de largo P5, P15, P75; Sigma) y poliP₇₅₀ (cadena de largo aproximado de 750), sintetizados *in vitro* en nuestro laboratorio según Ault-Riché y col. (1998).

4.3. Síntesis y purificación de poliP *in vitro*.

4.3.1. Síntesis *in vitro* de [γ -P³³]poliP₇₅₀ catalizada por PPK recombinante de *E. coli*.

Se realizó según Ault-Riché y col. (1998) en un volumen de 10 ml de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 40 mM creatina-fosfato, 20 µg/ml creatina fosfokinasa (CPK), 1 mM [γ -P³³]ATP (14 µCi/nmol) y 90.000 unidades de PPKr de *E. coli* (Kumble y col., 1996). La reacción se incubó 3 h a 37⁰C y se detuvo agregando 1 ml de EDTA 0,5 M. La cinética de reacción se siguió mediante TLC ascendente en placas de polietilenimidacelulosa (SIGMA-ALDRICH[®]) utilizando como solvente una solución de KH₂PO₄ 0,75 M, pH 3,5.

4.3.2. Purificación de [γ -³³]poliP₇₅₀ sintetizado *in vitro*.

La reacción de síntesis de 10 ml se cargó en un colchón de 55 ml de CsCl 2,5 M en 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA. La centrifugación se realizó durante 16 h a 100.000 g (rotor Sorval[®] 647.5). El gradiente se dividió en alícuotas de 5 ml, se agregó

3,5 ml de isopropanol a cada una y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, seguido de centrifugación por 30 min a 16.000 g (rotor Beckman® AJ-20). El pellet se lavó con 3,5 ml de etanol al 70 %, se secó durante la noche al vacío a temperatura ambiente y se resuspendió en 600 µl de agua bidestilada estéril. La concentración de poliP se determinó en alícuotas de 1 µl en un contador de centelleo líquido.

4.4 Actividad PPX

4.4.1. Preparación de extractos crudos de *S. solfataricus*

Para determinar la actividad PPX en extractos crudos, las células se obtuvieron de igual forma a lo descrito en el traspaso de cultivos a medio con cobre, excepto que las células se colectaron 30 min después del traspaso. Las células se colectaron por centrifugación durante 15 min a 9.800 g. Luego se resuspendieron en amortiguador 50 mM Tris-acetato pH 7,0, 10 % sacarosa (razón 20 µl de tampón por 1 mg de peso húmedo de células), se congelaron y se sonicaron (Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®) durante 4 min en hielo, en intervalos de 30 s cada vez. Las suspensiones finales se centrifugaron a 9.800 g durante 5 min para eliminar las células enteras y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad PPX.

4.4.2. Determinación de la actividad PPX

La actividad PPX se determinó midiendo el fosfato que se obtiene debido a la hidrólisis del $[\gamma\text{-P}^{33}]$ poliP₇₅₀. La mezcla de reacción (50 µl) contenía 50 mM Tris-acetato

pH 7,0, 100 mM KCl, 10 mM MnCl₂ y 250 μM [γ -P³³]poliP. El MnCl₂ se agregó al final para evitar la precipitación del poliP. Luego de incubar 30 o 60 min a 70⁰C, se tomaron 4 μl de cada reacción, los que se aplicaron en una TLC en placas de polietilenimidacelulosa (SIGMA-ALDRICH[®]) utilizando como solvente una solución de KH₂PO₄ 0,75 M, pH 3,5. El fosfato producido se cuantificó en el Phosphorimager Molecular Imagen FX[™] (Bio-Rad). Una unidad se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 pmol de Pi por min a 70⁰C.

4.5. Microscopía electrónica.

Alicuotas de 10 μl de las suspensiones celulares se montaron sobre grillas cubiertas con Formvar durante 2 min, dos veces. El exceso de líquido se absorbió con papel de filtro y las grillas se secaron al vacío a temperatura ambiente. Las células se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 a 80 kV.

4.6. Análisis *in silico* de secuencias y comparación con bases de datos.

Las secuencias aminoacídicas de PitA de *E. coli*, Pho89 y Pho84 de *S. cerevisiae* se obtuvieron de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La comparación con la base de datos de las secuencias proteicas obtenidas en Genbank se realizó mediante BLAST utilizando el programa BLASTp con todos los genomas del dominio *Archaea* disponibles (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las posibles Pho84 se realizó mediante el programa CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y posteriormente se identificaron cajas de acuerdo a su identidad y similitud mediante el uso del programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Algunas de las propiedades fisicoquímicas de las posibles proteínas obtenidas se analizaron mediante el programa ProtParam en EXPASY Proteomics tools (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Las posibles regiones de transmembrana se determinaron mediante el programa Tmpred en EXPASY (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

5. RESULTADOS

5.1. Presencia de gránulos densos a los electrones en *S. solfataricus*.

El primer indicio sobre la presencia de poliP en *S. solfataricus* se obtuvo mediante la observación de gránulos densos a los electrones por microscopía electrónica. Se observó que los gránulos de *S. solfataricus* crecido en CLN tienen mayor tamaño que los gránulos que presenta este microorganismo cuando se creció en CSN (Fig. 4).

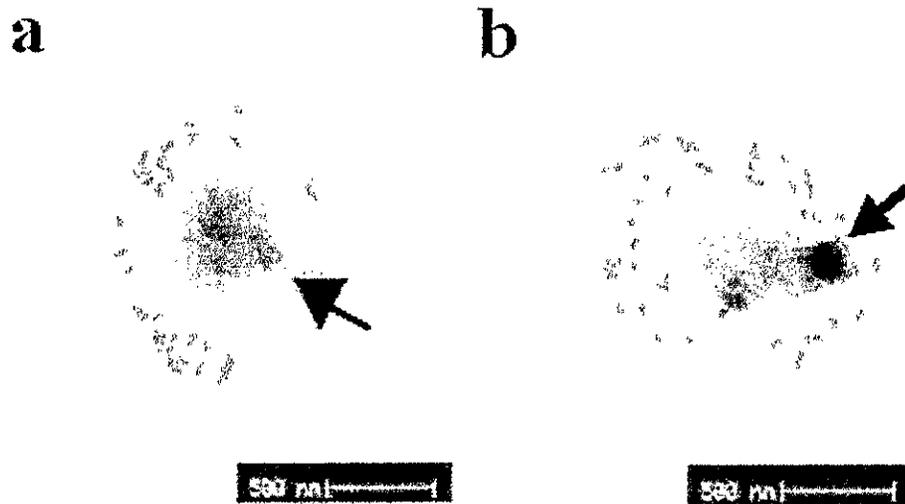


Figura 4. Gránulos densos a los electrones en *S. solfataricus*. a) crecimiento del microorganismo en condiciones suficientes de nutrientes. b) crecimiento del microorganismo en condiciones limitantes de nutrientes.

5.2. PoliP en *S. solfataricus*

Para determinar los niveles de poliP se utilizó el método cuantitativo desarrollado por Ault-Riché y col. (1998), que se basa en una extracción de los poliP por unión a microperlas de vidrio (Glassmilk) y análisis mediante el tratamiento con PPKr de *E. coli* en exceso de ADP. El fosfato liberado se cuantificó por la reacción de la luciferasa.

Se determinaron los niveles de poliP en distintas etapas del crecimiento de *S. solfataricus* en CSN y en CLN. El crecimiento del microorganismo en ambas condiciones se obtuvo por conteo de células en una cámara Petroff-Hausser. El crecimiento de *S. solfataricus* en CSN alcanzó un número de 10^9 células/ml con respecto al crecimiento en CLN que alcanzó un número de 10^8 células/ml (Fig. 5). Sin embargo los niveles de poliP alcanzados en esta última condición son 10 veces mayores que los niveles alcanzados en CSN (Fig. 6).

5.3. Tolerancia de *S. solfataricus* a CuSO_4 .

Para determinar la respuesta de *S. solfataricus* frente a distintas concentraciones de CuSO_4 en CSN y CLN, se creció el microorganismo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se observó que en CSN el crecimiento se inhibió con concentraciones de 5 y 10 mM de CuSO_4 , con respecto al crecimiento del cultivo control sin cobre (Fig. 7). En cambio el crecimiento del microorganismo en CLN no fue afectado por la presencia del ión metálico, incluso cuando la concentración de este fue 100 mM (Fig. 8).

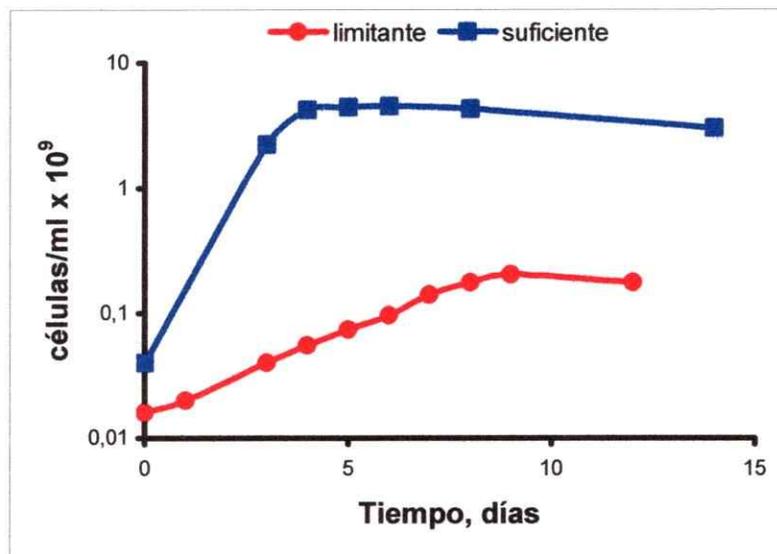


Figura 5. Crecimiento de *S. solfataricus* en condiciones suficientes o limitantes de nutrientes (CSN y CLN respectivamente).

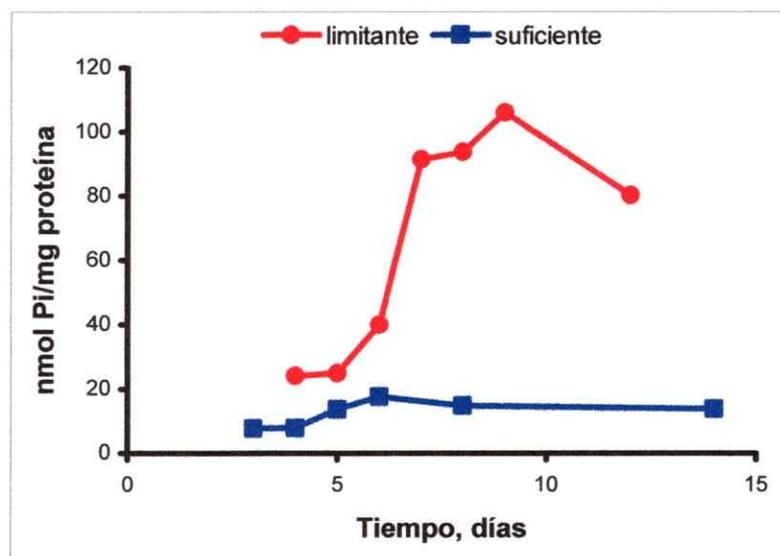


Figura 6. Niveles de poliP de *S. solfataricus* crecido en CSN y CLN. Las muestras para la extracción de poliP se tomaron de los cultivos de la Figura 5 a los tiempos que se indican. Las concentraciones de proteínas obtenidas en todos los puntos varió entre 0,4 y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

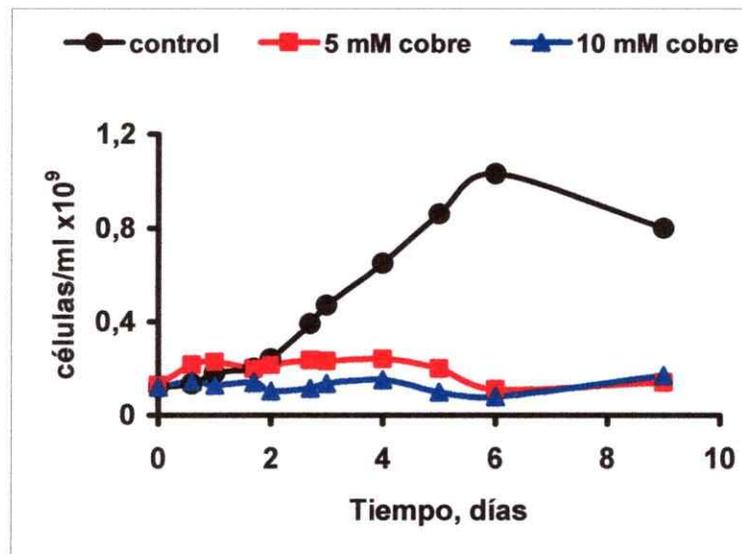


Figura 7. Efecto de Cu^{+2} en el crecimiento de *S. solfataricus* en CSN. El microorganismo se creció en condiciones suficientes de nutrientes (control) o en el mismo medio pero en presencia de las concentraciones de CuSO_4 indicadas.

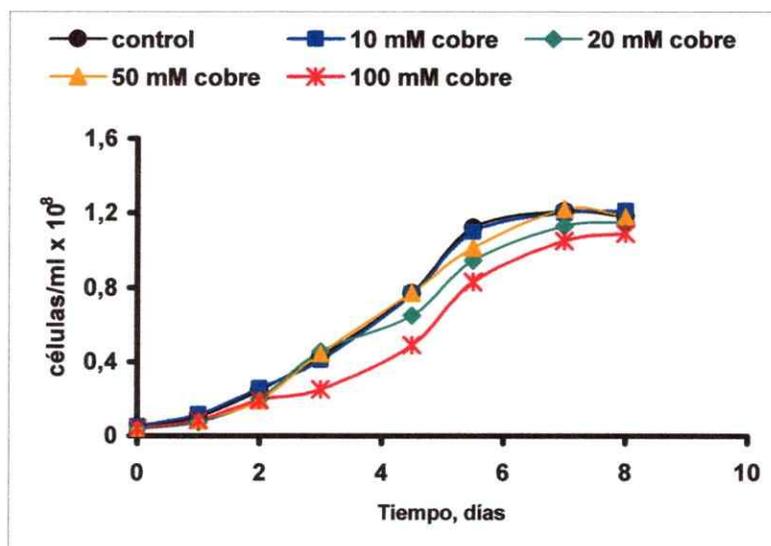


Figura 8. Efecto de Cu^{+2} en el crecimiento de *S. solfataricus* en CLN. El microorganismo se creció en condiciones limitantes de nutrientes (control) o en el mismo medio pero en presencia de las concentraciones de CuSO_4 indicadas.

5.4. Niveles y tamaños de los poliP sintetizados por *S. solfataricus* adaptado a crecer en presencia de CuSO_4 .

Para determinar los niveles y tamaños del poliP de *S. solfataricus*, se creció el microorganismo en CLN y en presencia de cuatro concentraciones de sulfato de cobre (10, 20, 50 o 100 mM) hasta una densidad de 10^8 células/ml y se extrajeron los poliP. Los niveles de poliP disminuyeron al aumentar las concentraciones de Cu^{+2} comparados con el cultivo control que no contiene el ión metálico en el medio (Fig. 9). Esta disminución alcanzó casi un 40 % a niveles de CuSO_4 mayores a 50 mM. También se observó que el tamaño de los poliP disminuyó debido a la presencia de Cu^{+2} , y el efecto más notorio fue a la concentración de 100 mM de CuSO_4 (Fig. 10).

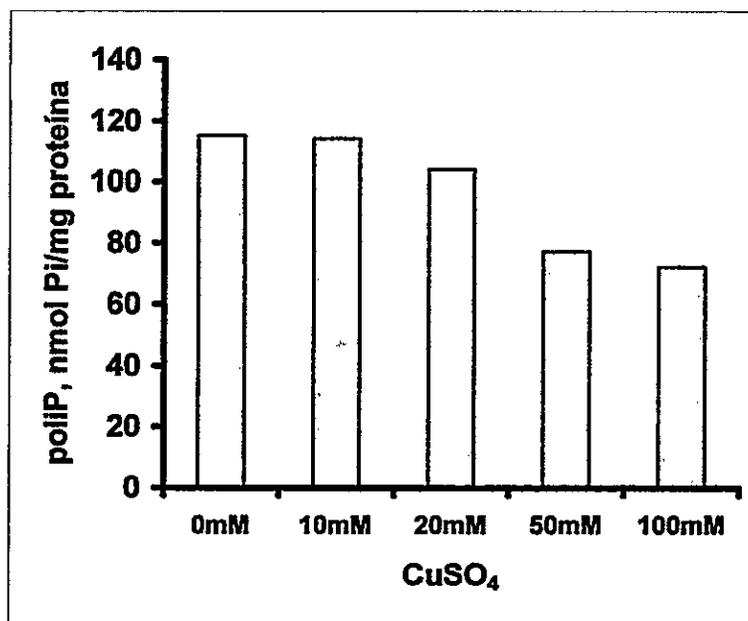


Figura 9. Niveles de poliP en *S. solfataricus* crecido en CLN y adaptado a diferentes concentraciones de CuSO_4 . En el gráfico se indican las concentraciones de CuSO_4 utilizadas para adaptar al microorganismo.

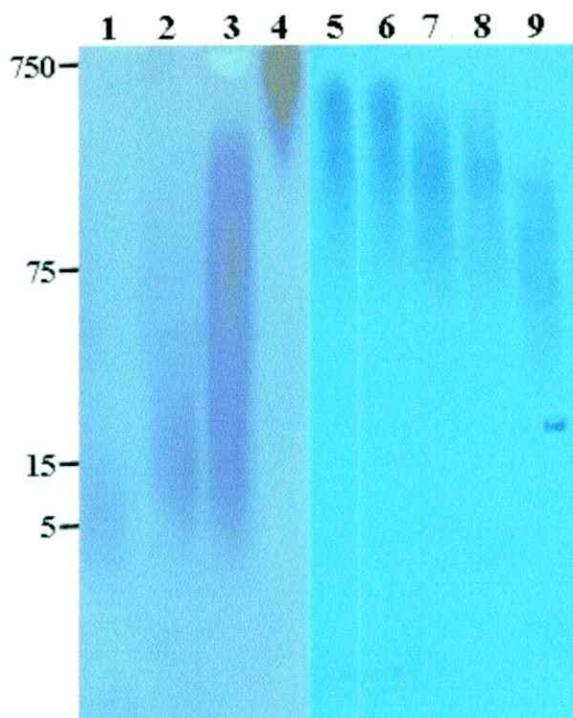


Figura 10. Electroforesis de muestras de poliP de *S. solfataricus* en un gel urea-poliacrilamida. El microorganismo se creció en condiciones limitantes sin CuSO_4 (carril 5) y con 10 mM (carril 6), 20 mM (carril 7), 50 mM (carril 8) o 100 mM (carril 9) de CuSO_4 . Los carriles 1, 2, 3 y 4 muestran los estándares P5, P15, P75 y P750 respectivamente. El gel se tiñó en presencia de azul de toluidina.

5.5. Efecto de Cu^{+2} en los niveles de poliP en *S. solfataricus* no adaptado a crecer en presencia del metal.

Para determinar el efecto que tiene el ión metálico en los niveles de poliP de *S. solfataricus* crecido en CLN y no adaptado a la presencia de Cu^{+2} , se creció el microorganismo hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml. A esta densidad se traspararon a medio fresco suplementado con 50 o 100 mM de CuSO_4 . Posteriormente se continuó la incubación y a distintos tiempos se extrajeron y cuantificaron los poliP.

Claramente se observó que en los dos cultivos traspasados a sulfato de cobre, los niveles de poliP disminuyeron bruscamente después de 1 h de incubación. Aunque la disminución de los niveles de poliP fue rápida en presencia de Cu^{+2} , el traspaso a 100 mM CuSO_4 provocó la mayor disminución de los niveles de poliP (Fig. 11). Luego de esta rápida disminución, los niveles de poliP se mantuvieron constantes en el tiempo. El control, en cambio, no mostró variaciones durante el experimento (Fig. 11).

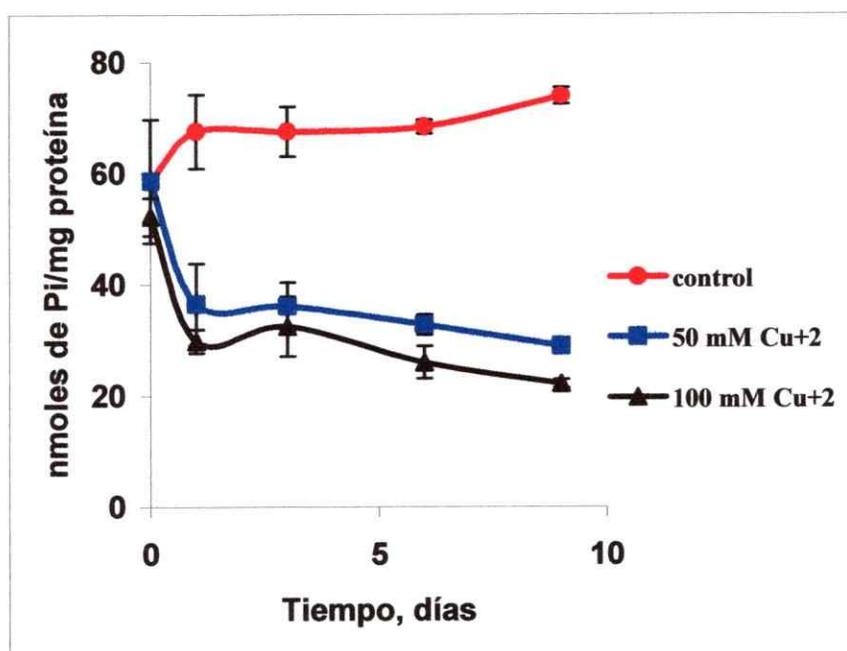


Figura 11. Efecto del Cu^{+2} en los niveles de poliP de *S. solfataricus* no adaptado a sulfato de cobre. El microorganismo se creció hasta la fase exponencial en CLN en ausencia de Cu^{+2} . A tiempo cero las células se traspararon al medio suplementado con 50 o 100 mM de CuSO_4 .

5.6. Efecto de Cu^{+2} en la actividad PPX de *S. solfataricus*.

Para determinar el efecto que tiene el ión metálico en la actividad PPX de *S. solfataricus* crecido en CLN, se cultivó el microorganismo hasta una densidad de 10^8 células/ml, y luego se traspasaron a medios frescos suplementados con 50 ó 100 mM CuSO_4 . Después de 30 min de incubación en estas condiciones, se colectaron las células y se prepararon extractos que se utilizaron para medir la actividad PPX. Mediante TLC (Fig. 12) se observó que la hidrólisis de poliP medida por la generación de Pi en los cultivos tratados con 50 ó 100 mM CuSO_4 fue mayor que en el cultivo sin traspasar a Cu^{+2} . Al cuantificar esta hidrólisis, en un Phosphorimager, obtuvimos que la actividad PPX del cultivo que se traspasó a 50 mM CuSO_4 es 10 veces mayor que la obtenida en el cultivo sin Cu^{+2} y la actividad PPX a 100 mM CuSO_4 es aproximadamente 20 veces mayor (Tabla 2). Esto sugiere que el aumento de la actividad PPX tiene una relación directa con la disminución de los niveles de PoliP y posiblemente con la tolerancia al cobre.

Tabla 2. Cuantificación de la actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus*

Condición	Unidades (pmoles de Pi totales/min)	Unidades/mg proteína
Control	9	170
50 mM CuSO_4	77	1.544
100 mM CuSO_4	169	3.378

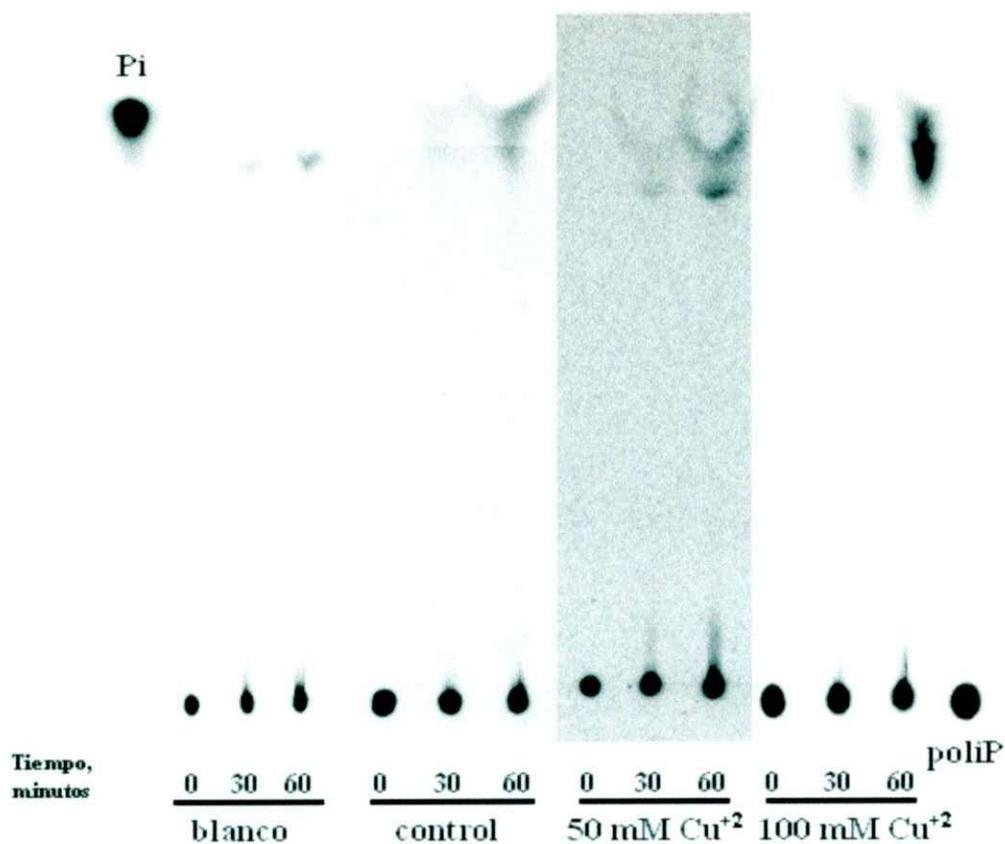


Figura 12. Análisis de la actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus* por TLC. La actividad PPX se midió a 70⁰C en cultivos control (sin Cu⁺²), y en cultivos en presencia de 50 mM ó 100 mM CuSO₄. El blanco representa la hidrólisis de poliP en ausencia del extracto enzimático durante los mismos tiempos de incubación. Se muestran como marcadores Pi (extremo izquierdo superior) y poliP (extremo derecho inferior).

5.7. Búsqueda de genes homólogos al transportador de fosfato PitA de *E. coli* y Pho84 de *S. cerevisiae* en el dominio *Archaea*.

El modelo planteado por Keasling (1997) en donde las células usan los poliP para destoxificarse de los metales pesados, es apoyado por evidencias experimentales en que el sistema transportador de fosfato inorgánico (Pit) en *E. coli* y *A. johnsonii* puede transportar reversiblemente metal-fosfatos. Basado en esto, se realizó una búsqueda de transportadores de fosfato en el dominio *Archaea* tanto de tipo bacteriano como eucarionte. Para esto se utilizaron las secuencias completas de las proteínas PitA de *E. coli*, Pho89 y Pho84 de *S. cerevisiae*. En la tabla 3 se muestra que *S. solfataricus*, *S. tokodaii*, *Thermoplasma acidophilum*, *T. volcanium* y *Ferroplasma acidarmanus*, siendo todos ellos los únicos acidófilos cuyos genomas están secuenciados, presentaron proteínas ortólogas a Pho84 de *S. cerevisiae*. Además se observó que el resto de las arqueas presentó ortólogos a PitA de *E. coli* a excepción de *Aeropyrum pernix*, *Pyrobaculum aerophilum* y *Methanosarcina barkeri*, los cuales no presentaron ortólogos de los transportadores de fosfato, ya sea bacterianos o de levadura.

Tabla 3. Posibles transportadores de fosfato de tipo bacteriano y de levaduras presentes en los genomas secuenciados del dominio *Archaea*. +, presencia; -, ausencia.

<i>Archaea</i>	PitA/B	Pho89	Pho84
<i>Aeropyrum pernix</i>	-	-	-
<i>Methanosarcina barkeri</i>	-	-	-
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	-	-	-
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	-	+	-
<i>Methanopyrus kandleri AV19</i>	-	+	-
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	+	+	-
<i>Methanococcus jannaschii</i>	+	+	-
<i>Methanosarcina acetivorans str. CA2</i>	+	+	-
<i>Methanosarcina mazei Goe1</i>	+	+	-
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H</i>	+	+	-
<i>Pyrococcus abyssi</i>	+	+	-
<i>Pyrococcus furiosus DSM 3638</i>	+	+	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	+	+	-
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	-	-	+
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-	-	+
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	-	-	+
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	-	-	+
<i>Thermoplasma volcanium</i>	-	-	+

Las teóricas proteínas transportadoras de fosfato de las arqueas acidófilas se alinearon con Pho84 de *S. cerevisiae*, la cual presenta 12 dominios de transmembrana (Persson y col., 1999). En la Figura 13 se muestra que las posibles proteínas de arqueas tienen un tamaño similar entre ellas, presentan entre 11 y 12 dominios de transmembrana identificados por el programa TMpred, y además estos dominios se localizaron en posiciones similares a los que presenta Pho84. Para cada una de las posibles proteínas se calculó su peso molecular, su punto isoeléctrico y su nivel de identidad con su ortólogo de *S. cerevisiae* (Tabla 4). En esta tabla también se indica el número de posibles dominios de transmembrana, como la función anotada para cada uno de las proteínas homólogas.

Tabla 4. Comparación de la proteína Pho84 de *S. cerevisiae* con sus posibles ortólogos en el dominio *Archaea*.

Microorganismo	PM (kDa)	P _I	Identidad (%)	DTM	Posible función
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64.4	5.98	100	12	Transportador de fosfato
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	50.7	9.11	33	11	Transportador de fosfato
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	53.4	8.66	29	11	Transportador hipotético
<i>Thermoplasma acidophilum 1</i>	50.9	9.22	31	11	Transportador de fosfato
<i>Thermoplasma acidophilum 2</i>	51.7	9.5	33	11	Fosfato permeasa
<i>Thermoplasma volcanium 1</i>	50.9	9.17	32	11	Fosfato permeasa
<i>Thermoplasma volcanium 2</i>	52.2	9.39	34	11	Fosfato permeasa
<i>Ferroplasma acidarmanus 1</i>	51.1	9.47	33	11	Proteína hipotética
<i>Ferroplasma acidarmanus 2</i>	51.2	9.39	31	12	Proteína hipotética

PM, peso molecular; P_I, punto isoeléctrico; DTM, dominio transmembrana.

```

S.cerevisiae      1  MSSVNKDTHVAERSLHKEHLTEGGNMAFHNLNDFAHIEDPLERRRLALES DDEGFGW
S.solfataricus   1  -----MDKGI SKT PFGS DSLKLT F
S.tokodaii       1  -----MSN NPFKS DSLKLS F
T.acidophilum1   1  -----MTENNGGLDAINEA NTS-HGS
T.acidophilum2   1  -----MAQGLLQQ D NAKV GK
T.volcanium1     1  -----MTTESKPELIES NDAKTSG
T.volcanium2     1  -----MAKGI IEE DNSKINS
F.acidarmanus1   1  -----MSSAI DRS DEAKTSK
F.acidarmanus2   1  -----MDNKNEGNISAINQA DNA-TGK
    
```

I **II**

```

S.cerevisiae      61  QQV TISIA V L S F A NLGITM SYV -----Y HGS PGPS----Q L I
S.solfataricus   21  NHI VWYTS V F A F I SAILDV LQLHD-----P N P L N VTE----R L I
S.tokodaii       17  NHI TWYTA V F A F I GYIIAT EYAHTYAGII IPG TEY IGHNAAFW T L I
T.acidophilum1   22  FHL T V L I S V F A F I GVVVSL SLA-----G TTV T F Y----K L I
T.acidophilum2   17  FHL A W V I S V F A F I GTVVSL PLA-----G N S L T A D----I L I
T.volcanium1     21  FHY T W I V S V F A F I GVVTSI VLS-----G N K F T L Q----S L I
T.volcanium2     17  FHL T W L I A V F A F I FV GTV I S I PLA-----G D K L T Y D----I L I
F.acidarmanus1   17  FHY V L F I S V F A F I GVVILL P Y A-----G H N I T I F Y----K L V
F.acidarmanus2   23  FHF T F L T A V F A F I GTV L A I P M I-----G H L T T E I----A L I
    
```

II **III** **IV**

```

S.cerevisiae      108  KVSTSVGT V I O E G T A I V K F M L L I I V C T I L O T T V A H S P A I N E V A V T E Y
S.solfataricus   69  ASSALWAA V I Q L V F G I I K V V A I L I V G A L L S A L S P -----N I T W I F
S.tokodaii       77  ASSAIWTA V I Q L L Y G L I K V I A M L T L G A F L S A L A W -----N L P A A F
T.acidophilum1   68  SSTALISA V I A I I R I L L A K V L L A I I V G A L G S A F L T P ---Y N N V I A A W
T.acidophilum2   63  SSVALLAS V I A F T R I L L S F L M L I I G A V G S A F L V P ---V N G V L Y I W
T.volcanium1     67  DSTALLSA V I A L I R I L L K V L L I I I V G A L G S A F L T P ---L N G V Y V I W
T.volcanium2     63  SSISLLAS V I A V I R I L L K V F L M L I L G A L G S A F V V P ---V N G I N Y A W
F.acidarmanus1   63  FSTALLAA V I S V V R I L L S K F E L V A I A G S L G S A F L T P ---V N N I E M E F
F.acidarmanus2   68  GSVSLIAA V I A L A R I L L K V I L L V L I V I G A L G S A F L S ---E G P Y A M A W
    
```

IV **V**

```

S.cerevisiae      168  I V I I P L S I T S F A T T K W A I G A V A N A W Q S G G I A I L V A A Y K E E
S.solfataricus   123  S P I L P I A T M S V A N V K D K L A L A N S I S P I N V S S S V E R I
S.tokodaii       131  M M F P I S T M S V A N V K D K L S L A N G I S I V A A V G V S A L T L ---
T.acidophilum1   125  F F L I A T S T I A S N T K S K L G S S M S F L V A G P L A A F M L H G ---
T.acidophilum2   120  F F I L A G S T M A S N A K N Q L G M S M G F L V F G P V A V M L R Y I P ---
T.volcanium1     124  F F I I A T S T M A S N T A H K L G M S M S L L A G P L I T G L L Y S G ---
T.volcanium2     120  F F I L A G S T M T S N T K N Q L G M S L G V L A G P L I T G L L S F I H ---
F.acidarmanus1   120  F F I V A T S T M T S S T M N K F Y G M S M S F L A G P L I S A F L S N Y ---
F.acidarmanus2   124  F F I V A T S V M A S N M K T K Y G M S M S I L V S S L A T F L L S T K ---
    
```

VI

```

S.cerevisiae      228  LEYANSGAEC D A R C Q K A C D M F I I G L T L L A C E E L T P S Q L D V N K L E L
S.solfataricus   180  -----P L D S V V A A I A P A T V L R K P T S M L V K N V Q E
S.tokodaii       188  -----P P D A F V A G I A P A T V L R K V T S L L A K E N I E E
T.acidophilum1   182  -----I P P A T K A L A I A P A I V F L K M P T T A A A K D V H K
T.acidophilum2   178  -----S I D V R L L F L A P A I V G R T I E T S I N V S D I S S
T.volcanium1     181  -----M S L S V K L L A F A P L I V F R K M P T L L R V K D A E A
T.volcanium2     178  -----N L D V R V L F F I A P F I V G R A I E T A L R V K D A S S
F.acidarmanus1   177  -----V S P Y T R L L A I A P I I V F R T M P P T A D V R G D Y K L
F.acidarmanus2   182  -----I I P L A K I L S V A P A I V Y R K M P P T V A K R A A E
    
```

```

S.cerevisiae      288  AA-AQEQD E K K I H D T S E D M A I N G L E R A S T A V E S L D N H P P K A S F K D F C H F G Q W Y K G I
S.solfataricus   224  KK-AAEFL -----AKIE-EKRA-----YSKPLSLSEFLS--YWLI-----
S.tokodaii       232  KK-AAELL -----TKLDVDRKRV-----ISKRLSIEFFA--YGLL-----
T.acidophilum1   227  AKDLKEYT -----IHVEVSSKDKY-----VVKAKWTALFKD--TFLLT-----
T.acidophilum2   222  KKAIQEIS K-----STVQANPDELI-----GEHISWKMFPTD--PYFLMT-----
T.volcanium1     226  VKNWEKYT -----IEASAD-AQAE-----VIKKSWTQIIKQ--KEFLIT-----
T.volcanium2     222  MQSVEKIS D-----SKVSVSREDLE-----MSNIKWTDLFKN--PYFMLS-----
F.acidarmanus1   222  AKNLKTF A-----LDSTGS-KGK-----TINAPWYVLF RD--KFLLT-----
F.acidarmanus2   227  SKNLKSYT -----IDVAVS-KNKE-----EVNAPWYTLFKD--KFLLT-----
    
```

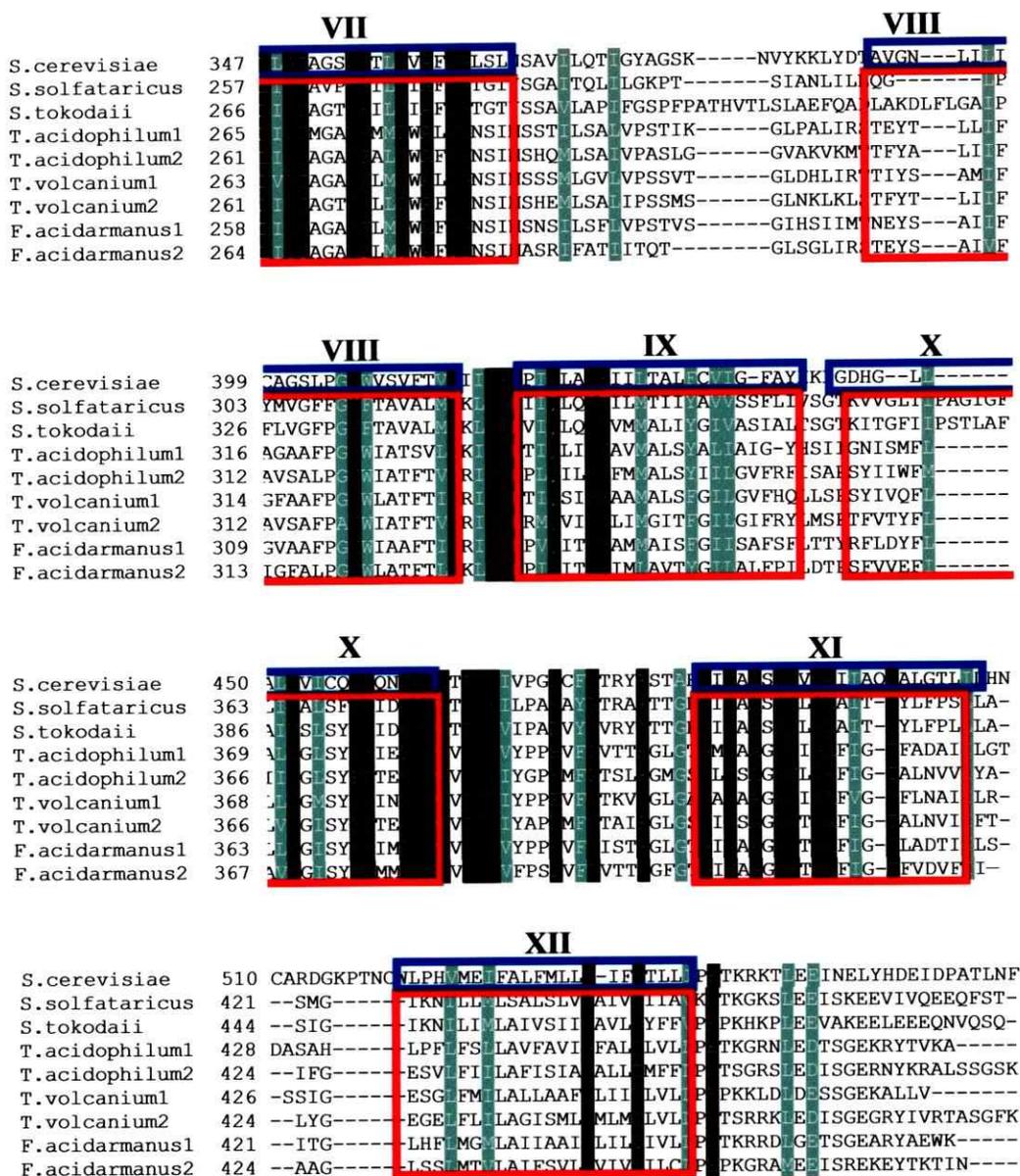


Figura 13. Alineamiento de secuencias aminoacídicas ortólogas a Pho84. Las secuencias de *Saccharomyces cerevisiae* (Pho84), *Sulfolobus solfataricus* (NP_344489), *Sulfolobus tokodaii* (NP_378364), *Thermoplasma acidophilum* 1 (NP_394834) y 2 (NP_393527), *Thermoplasma volcanium* 1 (NP_110642) y 2 (NP_110524), y *Ferroplasma adidarmanus* 1 (ZP_00001253) y 2 (ZP_00001268) se alinearon con el programa CLUSTAL W y se pintaron en cajas de acuerdo a su conservación mediante el programa BOXSHADE. En negro se muestran los residuos idénticos, mientras que en gris se muestran los residuos similares. Las cajas azules representan los dominios de transmembrana de Pho84 enumerados de I hasta XII, y las cajas rojas los posibles dominios de transmembrana de las proteínas del dominio *Archaea*.

6. DISCUSIÓN

Aunque los poliP están considerados como componentes ubicuos en los seres vivos (Kornberg, 1995; Kornberg, 1999) sólo se han estudiado en forma cuantitativa en pocos organismos. Los trabajos en relación a los poliP en el dominio *Archaea*, eran escasos antes de que en nuestro laboratorio se comenzara con esta línea de investigación. (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990).

En nuestro laboratorio detectamos gránulos densos a los electrones muy pequeños en *S. solfataricus* crecido en CSN, lo cual se confirmó en esta tesis. Sin embargo, cuando *S. solfataricus* se creció en CLN, los gránulos densos a los electrones aumentaron de tamaño (Fig. 4). Este es el primer indicio que una condición estresante como lo es la falta de nutrientes, induce la síntesis de poliP. Este fenómeno ha sido observado en otros microorganismos como *E. coli*, en respuesta a la carencia de aminoácidos (Rao y col., 1998).

La presencia de poliP en estas condiciones se confirmó mediante la extracción de este polímero y su cuantificación. De esta forma se determinaron los niveles de poliP durante el crecimiento en ambos medios. En las dos condiciones, los niveles de poliP fueron más altos en la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 5 y 6). Esto podría significar una adaptación a la supervivencia en esta fase del crecimiento, en donde se deberían acumular reservas, por una posterior falta de nutrientes o una acumulación de metabolitos tóxicos para la célula.

Como una de las funciones atribuidas a los poliP es la de acomplejar iones metálicos (Kornberg, 1999), se determinó la tolerancia de *S. solfataricus* al metal pesado cobre. Se observó que *S. solfataricus* crecido en CSN no es tolerante a CuSO_4 (Fig. 7), lo cual está descrito para esta condición (Dopson y col., 2003); en cambio al crecerlo en CLN, el microorganismo toleró hasta 100 mM de CuSO_4 (Fig. 8). Esto sugiere que podría existir una relación entre los niveles de poliP y la tolerancia a los metales pesados.

El paso siguiente fue determinar los niveles de poliP cuando *S. solfataricus* se adapta a crecer en presencia de CuSO_4 . Los resultados mostraron que los niveles de poliP y su tamaño disminuyeron al aumentar la concentración del metal, siendo más notorios estos efectos a 100 mM de CuSO_4 (Fig. 9 y 10). Esto concuerda con el modelo planteado para bacterias por Keasling (1997) en las que se degradan los poliP en presencia de metales pesados. Sin embargo, estos resultados pueden ser efecto de la adaptación del microorganismo a estas concentraciones del metal, ya que la extracción de los poliP se realizó en la fase exponencial tardía (10^8 células/ml). Por lo tanto, para observar el efecto inmediato que tiene Cu^{+2} sobre el nivel de los poliP, se traspasó un cultivo de *S. solfataricus* crecido hasta una densidad de 10^8 células/ml en CLN a medios con 50 ó 100 mM de CuSO_4 . Se observó una disminución muy pronunciada de los niveles de poliP en la primera hora después del traspaso al medio que contenía el ión metálico, tanto para 50 mM como para 100 mM de CuSO_4 . (Fig. 11). De esta manera, podemos sugerir que los niveles de poliP disminuyeron debido al efecto del metal pesado.

La disminución de los niveles de poliP tendrían una relación directa con la actividad degradadora (PPX) de estos polímeros, lo que se planteó en el modelo de Keasling (1997). Por lo tanto, se midió la actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus* crecido en CLN después de traspararlo a un medio con 50 ó 100 mM CuSO₄. Los resultados mostraron que la actividad PPX aumentó en los cultivos que se traspararon a los medios con Cu⁺². Esto indica que la disminución de los niveles de poliP en las células tratadas se relaciona directamente con un aumento de la actividad PPX, lo que concuerda con el modelo planteado por Keasling (1997). Una segunda posibilidad que explicaría la caída en los niveles de poliP, es una disminución de la actividad PPK en vez de un aumento de la actividad PPX, ya que los niveles de poliP son el resultado neto entre su síntesis y su degradación.

Aunque no se han encontrado genes *ppk* en *S. solfataricus* y otros miembros del dominio *Archaea*, debe existir una enzima capaz de sintetizar poliP en ellos. Es posible que el gen responsable de la síntesis de los poliP en *S. solfataricus* tenga una similitud muy baja con sus homólogos y que no sea posible identificarlo con métodos bioinformáticos (BLASTP y PSI-BLAST). Una posibilidad sería identificar dominios funcionales o estructurales en las PPKs conocidas. Otra posibilidad es que la síntesis de los poliP se deba a otra actividad enzimática como por ejemplo una PPK2 descrita en *Pseudomonas aeruginosa* (Ishige y col., 2002), la cual convierte el GTP en poliP. Una estrategia para poder identificar los genes responsables de la síntesis de poliP es la de microarreglos de DNA. Para esto necesitaríamos un microarreglo con todo el genoma de *S. solfataricus*, con el que se podrían identificar los genes que se inducen ante

condiciones que determinan un aumento de los poliP. El análisis funcional de estos genes nos llevaría al descubrimiento de las proteínas responsables de la síntesis de los poliP.

La etapa final del proceso de destoxificación de metales pesados planteada en el modelo de Keasling (1997) es que el ion metálico se transporta fuera de la célula, acompañado con el fosfato degradado a partir del poliP a través de un transportador de tipo Pit. Por lo tanto, fue de nuestro interés identificar posibles transportadores pertenecientes a esta familia en el dominio *Archaea*. Se ha descrito solo un transportador de este tipo, en la arquea *Methanococcus jannaschii* (Saier Jr. y col., 1999). Como muestran nuestros resultados, por medio del análisis bioinformático detectamos los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, cuyos genomas están completamente secuenciados, que presentaron transportadores de fosfato del tipo Pit A de *E. coli* y Pho84 de *S. cerevisiae*. Lo interesante es que las arqueas acidófilas, *S. solfataricus*, *S. tokodaii*, *T. acidophilum*, *T. volcanium* y *F. acidarmanus*, no presentan un transportador de fosfato del tipo Pit, pero en cambio presentan ortólogos al transportador Pho84 de *S. cerevisiae* con valores de identidad sobre el 30% (Tabla 3). Se describió que el transportador de fosfato Pho84 tiene una actividad máxima a pH 4.5, lo cual podría tener una relación con que las arqueas acidófilas presenten este tipo de transportador. En cambio el transportador de fosfato Pho89 tiene su máxima actividad a pH 9.5 (Persson y col., 1999). Por otro lado, los posibles transportadores de estos acidófilos presentaron un punto isoeléctrico cercano a 9, en cambio Pho84 tiene un punto isoeléctrico de 6, lo que se puede deber a la mayor cantidad de residuos básicos

que presentan los posibles transportadores del dominio *Archaea* en sus extremos amino y carboxilo terminal, y en el lazo hifrofilico que se encuentra entre las regiones VI y VII de transmembrana, todos ellos expuestos hacia el exterior de la célula que tendrían contacto con el medio ambiente ácido en donde crecen. Con los datos anteriores nosotros especulamos la posibilidad de que este tipo de transportadores sean ancestrales de tipo eucarionte, los cuales se han mantenido en arqueas acidófilas pero se perdieron en otras arqueas y bacterias.

Por último, será de gran interés biotecnológico estudiar los mecanismos de adaptación en otros arqueones como *S. metallicus*, el cual está involucrado en procesos de biolixiviación de minerales a altas temperaturas y en presencia de altas concentraciones de metales pesados.

7. CONCLUSIONES

Los niveles de poliP fueron mayores cuando *S. solfataricus* se creció en condiciones limitantes de nutrientes que en condiciones óptimas de nutrientes.

S. solfataricus toleró altas concentraciones de Cu^{+2} cuando el microorganismo se creció en condiciones limitantes de nutrientes.

Los niveles y tamaños de poliP disminuyeron, en *S. solfataricus*, debido a la presencia de Cu^{+2} , en cambio la actividad PPX aumentó.

El transporte de fosfato en arqueas acidófilas podría deberse a transportadores homólogos a Pho84 de *S. cerevisiae*.

7. REFERENCIAS

- Aguilar, A. 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 89-92.
- Ahn, K. y Kornberg, A. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* **265**: 11734-11739.
- Aiking, H., Stijnman, A., van Garderen, C., van Heerikhuizen, H. y van't Riet, J. 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 374-377.
- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M. y Kornberg, A. 1998. A novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1841-1847.
- Baumann, P., Qureshi, S. A. y Jackson, S. P. 1995. Transcription: new insights from studies on *Archaea*. *Trends Genet.* **11**: 279-283.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. y Weiss, R. L. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**: 54-68.
- Brown, J. R. y Doolittle, W. F. 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 456-502.
- Cardona, S. T., Remonsellez, F., Guiliani, N. y Jerez, C. A. 2001 a. Polyphosphate metabolism in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. En V.S.T. Ciminelli y O.Jr. Garcia (Eds.), *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development*. Part A. Elsevier. pp. 345-354.
- Cardona, S. T. 2001. Polifosfatos inorgánicos en el dominio *Archaea*: estudio en el género *Sulfolobus*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Cardona, S. T., Chávez, F. P. y Jerez, C. A. 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4812-4819.
- Ciaramella, M., Pisani, F. M. y Rossi, M. 2002. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 85-97.

- Dennis, P. P. 1997. Ancient ciphers: translation in *Archaea*. *Cell*. **89**: 1007-1010.
- Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the Universal Tree. *Science*. **284**: 2124-2128.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R. y Bond, P. L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance in acidophilic micro-organisms. *Microbiol.* **149**: 1959-1970.
- Gaasterland, T. 1999. Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 542-547.
- Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S. y Shinozawa, T. 2001. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of *Archaea* in *Bacteria* is revealed by homology-hit analysis. *Nat. Cell Biol.* **3**: 210-214.
- Ishige, K., Zhang, H. y Kornberg, A. 2002. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 16684-16688.
- Keasling, J. D., Bertsch, L. y Kornberg, A. 1993. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7029-7033.
- Keasling, J. D. y Hupf, G. A. 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 743-746.
- Keasling, J. D. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **829**: 242-249.
- Keasling, J., Van Dien, S., Trelstad, P., Renninger, N. y McMahon, K. 2000. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)*. **65**: 324-331.
- Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**: 491-496.
- Kornberg, A., Rao, N. y Ault-Riché, D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 89-125.
- Kortstee, G. J. J., Appeldoorn, K. J., Bonting, C. F. C, van Niel, E. W. J. y van Veen, H. W. 2000. Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. *Biochemistry (Moscow)*. **65**: 394-404.

- Kumble, K. D. y Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J. Biol. Chem.* **270**: 5818-5822.
- Kumble, K. D., Ahn, K. y Kornberg, A. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14391-14395.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. y Kornberg, A. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science.* **293**: 705-708.
- Lindtröm, E. B., Gunneriusson, E. y Tuovinen, O. H. 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for ores gold recovery. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**: 133-155.
- Mino, T. 2000. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Moscow).* **65**: 341-348.
- Olsen, G. J. y Woese, C. R. 1997. Archaeal genomics: an overview. *Cell.* **89**: 991-994.
- Osorio, G. y Jerez, C. A. 1996. Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiol.* **142**: 1531-1536.
- Osorio, G. 1998. Caracterización de la respuesta del arqueón *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 frente a la hambruna de fosfato. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- Persson, B. L., Peterson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A. y Pattison, J. 1999. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1422**: 255-272.
- Petterson, A., Kunst, L., Bergman, B. y Rooman G. M. 1985. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrical* into polyphosphate granules and cell walls: An X-ray energy-dispersive microanalysis study. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2545-2548.
- Rajagopal, N., Aravalli, Q. S. y Garrett, A. 1998. *Archaea* and the new age of microorganisms. *Tree.* **13**: 190-194.
- Rao, N. N., Liu, S. y Kornberg, A. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* **180**: 2186-2193.
- Rowlands, T., Baumann, P. y Jackson, S. P. 1994. The TATA-binding protein: A General Transcription Factor in Eukaryotes and Archaeobacteria. *Science.* **264**: 1326-1329.

- Rudnick, H., Hendrich, S., Pilatus, U. y Blotevogel, K.H. 1990. Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphate and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. Arch. Microbiol. **154**: 584-588.
- Saier Jr., M. H., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T-T., Wachi, S. y Young, G. B. 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. Biochim. Biophys. Acta. **1422**: 1-56.
- Scherer, P. A. y Bochem, H. P. 1983. Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusion. Can. J. Microbiol. **29**: 1190-1199.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. y Van der Oost, J. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 7835-7840.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Mukenata, M., Rao, N. y Kornberg, A. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 11210-11215.
- Stetter, K. O. 1995. Microbial life in hyperthermal environments. ASM News. **61**: 285-290.
- Tsutsumi, K., Munekata, M. y Shiba, T. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expresión of SOS genes. Biochim. Biophys. Acta. **1493**: 73-81.
- Tzeng, C. y Kornberg, A. 2000. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. J. Biol. Chem. **275**: 3977-3983.
- Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Pereira, H., Konings, W. N. y Zehnder, A. J. B. 1994a. Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. J. Biol. Chem. **269**: 29509-29514.

- Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N. y Zehnder, A. J. B. 1994b. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **33**: 1766-1770.
- Van Veen, H. W. 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antoine van Leeuwenhoek*. **72**: 299-315.
- Wächtershäuser, G. 1992. Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **28**: 85-201.
- Wanner, B. 1996. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. En *E. coli and Salmonella*, molecular and cellular biology. Ed. Neidhardt, ASM press, New York. Pp. 1357-1381.
- Woese, C. R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 8392-8396.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 4576-4579.
- Wood, H. G. y Clark, J. E. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 235-260.
- Zhang, H., Ishige, K. y Kornberg, A. 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 16678-16683.

Anexo 1
Búsqueda de ortólogos a PitA de *E. coli* en los
genomas del dominio *Archaea* mediante BLASTp

BLASTP 2.2.6 [Apr-09-2003]

RID: 1062103542-3101-1938024.BLASTQ3

Query= pita
(499 letters)

Sequences producing significant alignments:	Score	E	(bits) Value
<u>ref NP_070626.1 </u> phosphate permease, putative [Archaeoglobu...	76	3e-14	
<u>ref NP_635234.1 </u> Phosphate permease [Methanosarcina mazei G...	67	2e-11	
<u>ref NP_142596.1 </u> phosphate permease [Pyrococcus horikoshii]	66	5e-11	
<u>ref NP_617829.1 </u> phosphate permease [Methanosarcina acetivo...	65	6e-11	
<u>ref NP_127076.1 </u> phosphate permease [Pyrococcus abyssi]	65	8e-11	
<u>ref NP_578749.1 </u> putative phosphate transport protein pitb ...	65	8e-11	
<u>ref NP_276991.1 </u> sodium-dependent phosphate transporter [Me...	64	2e-10	
<u>ref NP_126783.1 </u> sodium-dependent phosphate transporter [Py...	59	7e-09	
<u>ref NP_143035.1 </u> sodium dependent phosphate transporter [Py...	57	2e-08	
<u>ref NP_578907.1 </u> putative na-dependant transporter [Pyrococ...	48	1e-05	
<u>ref NP_069623.1 </u> phosphate permease, putative [Archaeoglobu...	41	0.002	
<u>ref NP_613646.1 </u> Phosphate permease [Methanopyrus kandleri ...	39	0.008	
<u>ref NP_395765.1 </u> sodium-dependent phosphate transporter; Ph...	37	0.023	
<u>ref NP_247614.1 </u> putative phosphate permease [Methanococcus...	37	0.030	
<u>ref NP_280933.1 </u> Vng2307c [Halobacterium sp. NRC-1]	34	0.15	

Alignments

>ref|NP_070626.1| phosphate permease, putative [Archaeoglobus fulgidus DSM 4304]
Length = 333

Score = 76.3 bits (186), Expect = 3e-14
Identities = 41/118 (34%), Positives = 65/118 (55%), Gaps = 3/118 (2%)

Query: 383 PVWIIIMAVLALGIGTMIGWRRVATTIGEKGKGMTYAQGMSAQMTAAVSIGLASYTGM 442
P W++ L + +G RV T+G++I + +TY +G SA+ A ++ LAS GM
Sbjct: 218 PFWVLFPGGLGIAVGIATWGYRVIETVVKQITE--LTYTRGFSAEFATATTVLLASNFGM 275

Query: 443 PVSTTHVLSSSVAGTMVVDG-GGLQRKTVTSILMAWVFTLPAAVLLSGGLYWLSLQFL 499
PVSTTH L SV G + G + K V I+ +W+ T+P A ++ LY + + F+
Sbjct: 276 PVSTTHTLVGSVIGVGLAGGLASVNLKIVQKIIFSWIVTVPVAAAMTISLYTMMVVFV 333

Score = 52.4 bits (124), Expect = 5e-07
Identities = 58/251 (23%), Positives = 105/251 (41%), Gaps = 45/251 (17%)

Query: 31 GFHDTANAVATVIYTRAMRSQLAVVMAAVFNFXXXXXXXXXXSVAYAI VH-MLPTDLLLNMG 89
G +D AN++AT +RA+ + +++A+V F V + I ++P +LL
Sbjct: 20 GANDAANSMATSYGSRALTLKQIIIIASVLEFTGAVFFGKKVTHTI AKGIVPIELL---- 75

Query: 90 SSHGLAM--VFSMLLAIIWNLGTWYFGLPASSSHTLXXXXXXXXXLTNALMTGTSVVDAL 147
H L + + LL+A W + Y+ LP S++H++ L A+ +D +
Sbjct: 76 -DHNLVVYGALALLSAGFWIFISTYYHLP ISTHHSIVGAMVGFGLA-AVSNHLTLDQI 133

Query: 148 NIPKVL SIFGSLIVSPIVG-----LVFAGGLIFLLRRYWSGTTKRARIHLTPAEREKKDG 202
+ I S ++SP+ G +VF+ + LL R+ S + + +L
Sbjct: 134 KWDVLARIALSWVISPLFGAALAFVVFSLIRVLLLD RFASESIEHVFRYLQ----- 184

Query: 203 KKKPPFWTRIALILSAIGVAFSHGANDGQKGIGLVMLVL--IGVAP-----AGFVVN 252
+L+A +AF+HG+ND G + ++ G P G V
Sbjct: 185 -----VLTACYMAFAHGSNDVANATGPIAAIMGYSGGVFVWVLF FFGGLGI AVG 232

Query: 253 MNATGYEITRF 263
+ GY + T
Sbjct: 233 IATWGYRVIET 243

>ref!NP 635254.1| Phosphate permease [Methanosarcina mazei Goel]
Length = 341

Score = 67.0 bits (162), Expect = 2e-11
Identities = 38/112 (33%), Positives = 60/112 (53%), Gaps = 3/112 (2%)

Query: 382 APVWIIMAVALALGIGTMIGWRRVATTIGE KIGKKGMTYAQGMSAQMTAAV SIGLAS YTG 441
AP+W+++ L + IG +V TIG KI + +T +G SAQ A + L SY+
Sbjct: 225 APIWVLMGGLGMVIGMATWGYKVVE TIGSKITE--LTPTRGFSAQFATASVLLHSYSS 282

Query: 442 MPVSTTHVLSSSVAGTMVVDG--GGLQRKTVTSILMAWVFTLPAAVLLSGGLY 492
+P+STTH L SV G + G + + I+ +W+ T+P A L S ++
Sbjct: 283 LPISTHTLTVGSVIGVGLAGGLAAVDLGV IWR IISSWIATVP IAAALTS A IIF 334

Score = 63.2 bits (152), Expect = 3e-10
Identities = 59/249 (23%), Positives = 104/249 (41%), Gaps = 33/249 (13%)

Query: 31 GFHDTANAVATVIYTRAMRSQLAVVMAAVFNFXXXXXXXXXXSVAYAI VH-MLPTDLLLNMG 89
G +D ANA+ T + T A+ + +++AAVF F V I ++P D++ ++
Sbjct: 20 GANDLANAMGTSVGTGALTIKQVIIIAAVFEFLGAVVFGNRVTSTIAKGIVPIDMISSIH 79

Query: 90 SSHGLAMVFSMLLAIIWNLGTWYFGLPASSSHTLXXXXXXXXXLTNALMTGTSVVDALNI 149
+ + + +LAA W ++ LP S+SH++ L A G ++
Sbjct: 80 PDIVVLGMLASILAASFVVTLATFYNLPVSTSHSIVGSVVLGFGLI-AAYNGIISFSDIHW 138

Query: 150 PKVLSIFGSLIVSPIVGLVFAGGLIFLLRRYWSGTTKRARIHLTPAEREKKDGKKKPPFW 209
+L I S +SP +G + A + ++R + R PA +K
Sbjct: 139 TVLLKIIASWFISPALGAILAFLIFS IIRSLY-----LHRASDMPAVEKK----- 183

Query: 210 TRIALILSAIGVAFSHGAND-----GQKGIGLVMLVLIGVAPAGFVVNMN 254
I++ +AF+HG+ND G G G + VL+ + G V+ M
Sbjct: 184 FLFLQIITGCYIAFAHGSNDVANAVGPLSAALNVLGV TGTGAPIWV LV-MGGLGMVIGMA 242

Query: 255 ATGYEITRT 263
GY++ T
Sbjct: 243 TWGYKVVET 251

Score = 30.3 bits (66), Expect = 2.8
Identities = 24/79 (30%), Positives = 40/79 (50%), Gaps = 8/79 (10%)

Query: 386 IIMAVLALGIGTMIGWRRVATTIGEKIGKKGMTYA-----QGMSAQMTAAVS-IGLA 437
+I+ A+ +G ++ RV +TI + I M + GM A + AA + LA
Sbjct: 42 VIIIIAAVFEELGAVVFNVTSTIAKGIVPIDMISSIHDPDIVVLGMLASILAASFVWTLA 101

Query: 438 SYTGMPVSTTHVLSSSVAG 456
+- +PVST+H + SV G
Sbjct: 102 TFYNLPVSTSHSIVGSVLG 120

>ref|NP_142598.1_phosphate permease [Pyrococcus horikoshii]
Length = 406

Score = 65.9 bits (159), Expect = 5e-11
Identities = 35/111 (31%), Positives = 62/111 (55%), Gaps = 3/111 (2%)

Query: 383 PVWIIMAVLALGIGTMIGWRRVATTIGEKIGKKGMTYAQGMSAQMTAAVSIGLASYTGM 442
P WI+ L + IG RV T+G+KI + +T +G + +AA + +AS+ GM
Sbjct: 291 PRWILALGGLGIAIGVATYGYRVMETVGKKITE--LTNTRGFTIDFSAATVVLIASWLGM 348

Query: 443 PVSTTHVLSSSVAGTMVVDG-GGLQRKTVTSILMAWVFTLPAAVLLSGGLY 492
P+STTH + +V G + G + + V I+++W T+P A +++G ++
Sbjct: 349 PISTTHTVVGAVIGVGLARGVKAINKSVVKDIIISWFVTPVAGIAGIIF 399

Score = 52.8 bits (125), Expect = 4e-07
Identities = 53/199 (26%), Positives = 89/199 (44%), Gaps = 32/199 (16%)

Query: 31 GFHDTANAVATVIYTRAMRSQAVVMAAVFNFXVAYAIHVHML--PTDL---- 84
G +D AN+++T + A+ + AV++A V F +V I + P+ +
Sbjct: 23 GANDAANSMSSTAVGAGAITPKQAVLIAGVLEFTGAYFFGKTVTETIRKGIIDPSKISDPN 82

Query: 85 LLNMGSSHGLAMVFSMLLAAI IWNLTWYFGLPASSHTLXXXXXXXXLTNALMTGTSVV 144
+L GS + LL A IW + +GLP S++H++ + + G +V
Sbjct: 83 VLIYGS-----IAALLGATIWLIIATKYGLPVSTTHSIIGGIVGYGI---IYGGIGIV 132

Query: 145 DALNIPKVLISIFGSLIVSPIVGLVFAGGLIFLLRRYWSGTTKRARIHLTPAEREKKDGKK 204
N K++ + S ++SPIVG +FA + LRR + +E K K+
Sbjct: 133 ---NWDKMRVVLSWVLSPIVGAIFAFLVFRALRR-----TVLQSEDVPKSAKR 178

Query: 205 KPPFWTRIALILSAIGVAF 223
PFW +A I+ IG F
Sbjct: 179 WSPFWIGLAFIV--IGTMF 195

Score = 32.3 bits (72), Expect = 0.56

Identities = 18/71 (25%), Positives = 38/71 (53%), Gaps = 2/71 (2%)

Query: 412 KIGKKGMTYAQGMSAQMTAAVSIGLASYTGMVSTTHVLSSSVAGTMVVDGG-GLQR-KT 469
KI + ++A + A + + +A+ G+PVSTTH + + G ++ GG G+
Sbjct: 77 KISDPNVLIYGSIAALLGATIWLIIATKYGLPVSTTHSIIGGIVGYGIIYGGIGIVNWDK 136

Query: 470 VTSILMAWVFT 480

+ ++++WV +

Sbjct: 137 MVRVVLVSWVLS 147

>ref|NP_617629.1| phosphate permease [Methanosarcina acetivorans str. C2A]
Length = 342

Score = 65.5 bits (158), Expect = 6e-11

Identities = 37/111 (33%), Positives = 59/111 (53%), Gaps = 3/111 (2%)

Query: 383 PVWIIMAVALALGIGTMIGWRRVATTIGEKIGKKGMTYAQGMSAQMTAAVSIGLASYTGM 442
P+W+++ L + IG +V TIG KI + +T +G SAQ A + L SY+ +
Sbjct: 226 PIWVLVMGGLGMVIGMATWGYKVVEITIGSKITE--LTPTRGFSAQFATASVLLHSYSSL 283

Query: 443 PVSTTHVLSSSVAGTMVVDG-GGLQRKTVTSILMAWVFTLPAAVLLSGGLY 492

P+STTH L SV G + G + + I+ +W+ T+P A L S ++

Sbjct: 284 PISTHTLVGSLVIGVGLAGGIAAVDLGVIWRIISSWIATVPAAALTSALIF 334

Score = 63.5 bits (153), Expect = 2e-10

Identities = 63/248 (25%), Positives = 109/248 (43%), Gaps = 31/248 (12%)

Query: 31 GFHDTANAVATVIYTRAMRSQAVVMAAVFNFXXXXXXXXXXSVAYAIHV-MLPTDLLLNMG 89
G +D ANA+ T + T A+ + +V+AAVF F V I ++P D++ ++
Sbjct: 20 GANDLANAMGTSVGTGALTIKQVIVIAAVFEFLGAVFFGKRVTSTIAKGIVPIDMISSIH 79

Query: 90 SSHGLAMVFSMLLAAIIWNLGTWYFGLPASSSHTLXXXXXXXXXLTNALMTGTSVVDALNI 149

+ + + +LAA W ++ LP S+SH++ L A S D ++

Sbjct: 80 PDIVVLGMLAAILAASFVWTLATFYNLVSTSHSIVGSVLGFLVAAYNGSISFSD-IHW 138

Query: 150 PKVLSIFGSLIVSPIVGLVFAGGLIFLLRRYWSGTKKRARIHLTPAEREKKGKKKPPFW 209

++ I S +SP++G F LIF + R ++L A + +KK F

Sbjct: 139 GELTRIIASWFISPVLG-AFLAFLIFTMIR-----SLYLHRAS-DLPSVEKKFIF- 186

Query: 210 TRIALILSAIGVAFSHGANDGQKIGLVMLVL--IGVAPA-----GFVVMNA 255

+++A +AF+HG+ND +G + L +GV G V+ M

Sbjct: 187 ---LQLITACIYIAFAHGSNDVANAVGPLSAALNVMGVTGTEIPIWVLVMGGLGMVIGMAT 243

Query: 256 TGYEITRT 263

GY++ T

Sbjct: 244 WGYKVVEV 251

Anexo 2

Búsqueda de ortólogos a Pho89 de *S.cerevisiae* en los
genomas del dominio *Archaea* mediante BLASTp

BLASTP 2.2.6 [Apr-09-2003]

RID: 1062105976-21250-1165824.BLASTQ3

Query= pho89
(574 letters)

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
<u>ref NP_127076.1 </u>	phosphate permease [Pyrococcus abyssi]	<u>126</u>	3e-29
<u>ref NP_142598.1 </u>	phosphate permease [Pyrococcus horikoshii]	<u>125</u>	6e-29
<u>ref NP_578749.1 </u>	putative phosphate transport protein pitb ...	<u>125</u>	8e-29
<u>ref NP_070626.1 </u>	phosphate permease, putative [Archaeoglobu...]	<u>123</u>	2e-28
<u>ref NP_617829.1 </u>	phosphate permease [Methanosarcina acetivo...]	<u>111</u>	9e-25
<u>ref NP_635254.1 </u>	Phosphate permease [Methanosarcina mazei G...]	<u>108</u>	7e-24
<u>ref NP_578907.1 </u>	putative na-dependant transporter [Pyrococ...]	<u>74</u>	2e-13
<u>ref NP_276991.1 </u>	sodium-dependent phosphate transporter [Me...]	<u>74</u>	2e-13
<u>ref NP_613846.1 </u>	Phosphate permease [Methanopyrus kandleri ...]	<u>72</u>	1e-12
<u>ref NP_126763.1 </u>	sodium-dependent phosphate transporter [Py...]	<u>71</u>	1e-12
<u>ref NP_069625.1 </u>	phosphate permease, putative [Archaeoglobu...]	<u>67</u>	3e-11
<u>ref NP_143035.1 </u>	sodium dependent phosphate transporter [Py...]	<u>66</u>	4e-11
<u>ref NP_247614.1 </u>	putative phosphate permease [Methanococcus...]	<u>59</u>	5e-09
<u>ref NP_395618.1 </u>	sodium-dependent phosphate transporter; Ph...	<u>50</u>	3e-06
<u>ref NP_395765.1 </u>	sodium-dependent phosphate transporter; Ph...	<u>49</u>	5e-06
<u>ref NP_280938.1 </u>	Vng2307c [Halobacterium sp. NRC-1]	<u>47</u>	3e-05
<u>ref NP_279748.1 </u>	anion permease; YlnA [Halobacterium sp. NR...]	<u>45</u>	1e-04
<u>ref NP_111978.1 </u>	Phosphate permease [Thermoplasma volcanium]	<u>38</u>	0.016
<u>ref NP_395726.1 </u>	sodium-dependent phosphate transporter; Ph...	<u>37</u>	0.021
<u>ref NP_559611.1 </u>	phosphate permease, conjectural [Pyrobacul...]	<u>37</u>	0.027
<u>ref NP_376557.1 </u>	478aa long hypothetical multidrug resistan...	<u>31</u>	1.5

>ref|NP_127076.1| phosphate permease [Pyrococcus abyssi]
Length = 405

Score = 126 bits (317), Expect = 3e-29
Identities = 62/147 (42%), Positives = 95/147 (64%), Gaps = 1/147 (0%)

Query: 400 EYIYSVLQAITAATMSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVA 459
E+I+ +Q IT+ ++ AHGANDVANA GP++AVY I GAK VP W+LA GG+
Sbjct: 241 EFIFRRVQVITSGYVALAHGANDVANAIGPVAAVYTIATMGMAGAKVPVPRWILALGGLG 300

Query: 460 LVIGCWTYGYNIKLNKMLQSPSRGFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIAVGGIV 519
+ IG TYGY +++ +G K+ + +RGF+I+ + A ++A+ LG+P STT VG ++
Sbjct: 301 IAIGVATYGYRVMETVGKKITELTNRGFTIDFSAATVVLIASWLGMPISTTHTVVGAVI 360

Query: 520 AVGLCNKDLKSVNWRMVAWCYSGWFLT 546
VGL + +K++N +V WF+T
Sbjct: 361 GVGLA-RGVKAINKSIVRDIISWFVT 386

Score = 78.6 bits (192), Expect = 8e-15
Identities = 52/171 (30%), Positives = 75/171 (43%), Gaps = 3/171 (1%)

Query: 12 IAMLFAFLDAFNIGANDVANXXXXXXXXXXLKYQAMVLAGLCEFLGAVLAGARVSGTIK 71
- - - A+ IGAND AN + QA+++AG+ EF GA G V+ TI+
Sbjct: 9 LTLILGLAMAWAIGANDAANSMSTAVGAGAITPKQAVLIAGILEFTGAYFFGKTVTETIR 68

Query: 72 NNIISSIFTNDPAVLMMLTMSALIGSSCWLTTFATAIGMPVSTTHXXXXXXXXXXXXXXXXXX 131
IID S -DP VL+ +AL+G++ WL AT G+PVSTTH
Sbjct: 69 KGIIEPSRI-SDPNVLVYGSILAALLGATIWLVIATKYGLPVSTTH--SIIGGIVGYGVVY 125

Query: 132 XXXXXXXXXXXXXQIIASWFXXXXXXXXXXXXVFSISRFSVLEVKSLERSIK 182
++ SW +F R +VLE + RS K
Sbjct: 126 AGLEIVNWGKMASVVLVSWILSPIVGAIFAFFIFKAIRRTVLESEDPIRSK 176

Score = 58.5 bits (140), Expect = 9e-09
Identities = 42/152 (27%), Positives = 66/152 (43%), Gaps = 23/152 (15%)

Query: 405 VLQAITAATMSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVALVIGC 464
+L I M++A GAND AN+ + +GA + P + G+ G
Sbjct: 8 LTLILGLAMAWAIGANDAANSM-----STAVGAGAITPKQAVLIAGILEFTGA 56

Query: 465 WTZGYNIKKNLGNMILQSPSR-----GFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIA 514
+ +G + + + +I PSR + L I V+AT+ G+P STT
Sbjct: 57 YFFGKTVTETIRKGI--DPSRISDPNVLVYGSILAALLGATIWLVIATKYGLPVSTTHSI 114

Query: 515 VGGIVAVGLCNKDLKSVNWRMVAVWCYSGWFLT 546
+GGIV G+ L+ VNW +A W L+
Sbjct: 115 IGGIVGYGVVYAGLEIVNWGKMASVVLVSWIL 146

Score = 28.9 bits (63), Expect = 7.4
Identities = 28/104 (26%), Positives = 39/104 (37%), Gaps = 22/104 (21%)

Query: 25 GANDVANXXXXXXXXXXLKY-----WQAMVLAGLCEFLGAVLAGARVSGTIKN 72
GANDVAN + W + L GL +G G RV T+
Sbjct: 260 GANDVANAIGPVAAVYTIATMGAGAKVPVPRW-ILALGGLGIAIGVATYGYRVMETVGK 318

Query: 73 NIIDSSIFTNDPAVLMMLTMSALIGSSCWLTTFATAIGMPVSTTH 116
I + TN + + ++ + WL GMP+STTH
Sbjct: 319 KITE---LTNTRGFTIDFSAATVVLIASWL-----GMPISTTH 353

Length = 406

Score = 125 bits (314), Expect = 6e-29

Identities = 62/147 (42%), Positives = 94/147 (63%), Gaps = 1/147 (0%)

Query: 400 EYIYSVLQAITAATMSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVA 459

E I+ +Q IT+ ++ AHGANDVANA GP++AVY I GAK VP W+LA GG+

Sbjct: 242 EVIFRKVQVITSGYVALAHGANDVANAIGPVAAVYTIATMGLAGAKVPVPRWILALGGLG 301

Query: 460 LVIGCWTYGYNIEKNLGNKMLQSPSRGFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIAVGGIV 519

+ IG TYGY +++ +G K+ + +RGF+I+ + A ++A+ LG+P STT VG ++

Sbjct: 302 IAIGVATYGYRVMETVGGKITELTNTRGFTIDFSAATVVLIASWLGMPISTHTTVVGA VI 361

Query: 520 AVGLCNKDLKSVNWRMVAWCYSGWFLT 546

VGL + +K++N +V WF+T

Sbjct: 362 GVGLA-RGVKAINKSVVKDIIISWFVT 387

Score = 78.2 bits (191), Expect = 1e-14

Identities = 43/105 (40%), Positives = 61/105 (58%), Gaps = 1/105 (0%)

Query: 12 IAMLF AFLDAFNIGANDVANXXXXXXXXXXXXLKYWQAMVLAGLCEFLGAVLAGARVSGTIK 71

+ ++ F A+ IGAND AN + QA+++AG+ EF GA G V+ TI+

Sbjct: 10 LTLILGFGMAWAIGANDAANS MSTAVGAGAITPKQAVLIAGVLEFTGAYFFGKTVTETIR 69

Query: 72 NNIIDSSIFTNDPAVLMLTMTSALIGSSCWLTFATAIGMPVSTTH 116

IID S +DP VL+ +AL+G++ WL AT G+PVSTTH

Sbjct: 70 KGIIDPSKI-SDPNVLIYGSIAALLGATIWLIIATKYGLPVSTTH 113

Score = 53.1 bits (126), Expect = 4e-07

Identities = 39/152 (25%), Positives = 64/152 (42%), Gaps = 23/152 (15%)

Query: 405 VLQAITAATMSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVALVIGC 464

+L I M++A GAND AN+ + +GA + P + GV G

Sbjct: 9 ILTLILGFGMAWAIGANDAANS M-----STAVGAGAITPKQAVLIAGVLEFTGA 57

Query: 465 WTYGYNIEKNLGNKMLQSPSR-----GFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIA 514

+ +G + + + +I PS+ + L I ++AT+ G+P STT

Sbjct: 58 YFFGKTVTETIRKGI I--DPSKISDPNVLIYGSIAALLGATIWLIIATKYGLPVSTTHSI 115

Query: 515 VGGIVAVGLCNKDLKSVNWRMVAWCYSGWFLT 546

+GGIV G+ + VNW + W L+

Sbjct: 116 IGGIVGYGIIYGGIGIVNWDKMRVVLVLSVLS 147

Score = 28.9 bits (63), Expect = 7.4

Identities = 28/104 (26%), Positives = 39/104 (37%), Gaps = 22/104 (21%)

Query: 25 GANDVANXXXXXXXXXXXXLKY-----WQAMVLAGLCEFLGAVLAGARVSGTIKN 72
GANDVAN + W + L GL +G G RV T+
Sbjct: 261 GANVANAIGPVAAVYTIATMGLAGAKVPVPRW-ILALGGLGIAIGVATYGYRVMETVVK 319

Query: 73 NIIDSSIFTNDPAVLMMLTMSALIGSSCWLTFFATAIGMPVSTTH 116
- - TN + + ++ + WL GMP+STTH
Sbjct: 320 KITE---LTNTRGFTIDFSAATVVLIASWL-----GMPISTTH 354

>ref|NP 57879.1| putative phosphate transport protein pitb [Pyrococcus furiosus
DSM

3638]
Length = 412

Score = 125 bits (313), Expect = 8e-29
Identities = 61/147 (41%), Positives = 95/147 (64%), Gaps = 1/147 (0%)

Query: 400 EYIYVQLQAITAATMSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVA 459
E ++ +Q IT+A ++ AHGANDVANA GP++AVY + GAK VP W+LA GG+
Sbjct: 247 ERVFRVQVITSAYVALAHGANDVANAIGPVAAVYTVAMFGLAGAKVPVPRWILALGGLG 306

Query: 460 LVIGCWYTYGYNIKLNKMLQSPSRGFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIAVGGIV 519
+ IG TYGY +++ +G K+ + +RGF+I+ + A ++A+ LG+P STT VG ++
Sbjct: 307 IAIGVATYGYKVMETVGGKITELTNTRGFTIDFSAATVVLIASWLGMPISTTHTTVGAVI 366

Query: 520 AVGLCNKDLKSVNWRMVAWCYSGWFLT 546
VGL + +K++N +V WF+T
Sbjct: 367 GVGLA-RGIKAINKDIVKDIISWFVT 392

Score = 87.8 bits (216), Expect = 1e-17
Identities = 49/110 (44%), Positives = 64/110 (58%), Gaps = 1/110 (0%)

Query: 7 DYIFAIAMLF AFLDAFNIGANDVANXXXXXXXXXXXXLKYWQAMVLAGLCEFLGAVLAGARV 66
D I I +L F A+ IGAND AN + QA+++AG+ EF+GA G V
Sbjct: 10 DPILLITILLGFAMAWAIGANDAANSMSSTAVGAGAITPRQAVIIAGVLEFMGAYFFGKTV 69

Query: 67 SGTIKNNIIDSSIFTNDPAVLMMLTMSALIGSSCWLTFFATAIGMPVSTTH 116
+ TI+ IID S T DP VL+ +ALIG++ WL AT G+PVSTTH
Sbjct: 70 TETIRKGIIDPSKIT-DPNVLI FGSI AALIGATIWLVIATKYGLPVSTTH 118

Score = 52.4 bits (124), Expect = 6e-07
Identities = 37/143 (25%), Positives = 62/143 (43%), Gaps = 23/143 (16%)

Query: 414 MSFAHGANDVANATGPLSAVYVIWKTNTIGAKSEVPVWVLAYGGVALVIGCWYTYGYNIK 473
M++A GAND AN+ + +GA + P + GV +G + +G + +
Sbjct: 23 MAWAIGANDAANSM-----STAVGAGAITPRQAVIIAGVLEFMGAYFFGKTVTE 71

Query: 474 NLGNKYLQSPSR-----GFSIELAVAITTVMATQLGIPTSTTQIAVGGIVAVGL 523
- -I PS+ - + I V+AT+ G+P STT +GGIV G+
Sbjct: 72 TIRKGLI---DPSKITDPNVLI FGSI AALIGATIWLVIATKYGLPVSTTHSIIGGIVGYGI 129

Query: 524 CNKDLKSVNWRMVAWCYSGWFLT 546
- VNW - W L+
Sbjct: 130 VYGCMSIVNWDAMIKVLSWLS 132

Anexo 3

Búsqueda de ortólogos a Pho84 de *S.cerevisiae* en los genomas del dominio *Archaea* mediante BLASTp

BLASTP 2.2.6 [Apr-09-2003]

RID: 1062106461-3596-2659980.BLASTQ3

Query= Pho84
(587 letters)

Score	E		(bits)	Value
		Sequences producing significant alignments:		
<u>ref NP_394834.1 </u>		phosphate transporter related protein [The...	<u>249</u>	4e-66
<u>ref NP_393527.1 </u>		phosphate permease related protein [Thermo...	<u>246</u>	3e-65
<u>ref ZP_00001253.1 </u>		hypothetical protein [Ferroplasma acidar...	<u>244</u>	7e-65
<u>ref NP_110642.1 </u>		Phosphate transport permease [Thermoplasma...	<u>241</u>	6e-64
<u>ref NP_110524.1 </u>		Phosphate transport permease [Thermoplasma...	<u>238</u>	8e-63
<u>ref ZP_00001268.1 </u>		hypothetical protein [Ferroplasma acidar...	<u>234</u>	7e-62
<u>ref NP_378364.1 </u>		494aa long hypothetical transporter [Sulfo...	<u>234</u>	9e-62
<u>ref NP_344489.1 </u>		Phosphate transporter related protein [Sul...	<u>231</u>	6e-61
<u>ref ZP_00000341.1 </u>		hypothetical protein [Ferroplasma acidar...	<u>149</u>	5e-36
<u>ref NP_393813.1 </u>		inorganic phosphate transporter related pr...	<u>147</u>	1e-35
<u>ref NP_110955.1 </u>		Permease (major facilitator superfamily) [...	<u>138</u>	7e-33
<u>ref ZP_00001175.1 </u>		hypothetical protein [Ferroplasma acidar...	<u>137</u>	1e-32
<u>ref ZP_00000190.1 </u>		hypothetical protein [Ferroplasma acidar...	<u>137</u>	2e-32
<u>ref NP_375938.1 </u>		418aa long hypothetical transporter [Sulfo...	<u>134</u>	1e-31
<u>ref NP_111562.1 </u>		Permease (major facilitator superfamily) [...	<u>132</u>	5e-31
<u>ref NP_393930.1 </u>		sugar transport protein related protein [T...	<u>129</u>	5e-30
<u>ref NP_378430.1 </u>		458aa long hypothetical phosphate transpor...	<u>128</u>	9e-30

Alignments

>ref|NP_394834.1| phosphate transporter related protein [Thermoplasma acidophilum]
Length = 476

Score = 249 bits (635), Expect = 4e-66

Identities = 162/507 (31%), Positives = 261/507 (51%), Gaps = 54/507 (10%)

Query: 49 ALESIDDEGFGWQQVKTISIAGVGF LTDSYDIFAINLGITMMSYVYWHGSMGPSQTLK 108
A+ + G +KT+ I+G+GF TD+YD+F I + ++++S W ++ + L+

Sbjct: 10 AINEAINTSHGSEFHLKTVLISGLGFFTDAYDLFIIGVVVSLLSLAGWT-TVDTFYKGLIS 68

Query: 109 VSTSVGTVIGQFGFGLADIVGRKRIYGMELIIMIVCTILQTTVAHSPAINFVAVLTFYR 168
+ + VIG FG L D +GRKR+YG+EL I+IV + + +P N +A++ +R

Sbjct: 69 STALISAVIGAIIFGRLLDYLGRKRKYGLELAILVIGALGSAFL--TPYNNVIALIA-WR 125

Query: 169 IVMGIGIGGDYPLSSIIITSEFATTKWRGAIMGAVFANQAWGQISGGIIALILVAAYKGEL 228
++GIGIGGDY SS I +E++ TK RG ++G+VF+ Q++G ++G ++AL + +

Sbjct: 126 FILGIGIGGDYATSSIIIAEYSNTKSRGKLIGSVFSMQSFGLVAGPLVALAFMLH---GI 182

Query: 229 EYANSGAECDCARQKACDQMWIRILIGLGTVLGLACLYFRLTIPESPRYQLDVNAKXXXXX 288
A + W+ L+ +G + +YFRL +PE PRY

Sbjct: 183 PPAIT-----WKALLAIGAIPAAIVYFRLKMPEPPRY----- 215

Query: 289 XXXXXDGEKKIHDTSDDEMAINGLERASTAVESLDNHPKASFKDFCRHFGQWKYKILL 348
+ +H + + G+ V S D + KA + F + L+

Sbjct: 216 ---TAAAKGDVHKAAKDLKEYTGIH---VEVSSKDKYVVKAKWTAL---FKDRTFLLTLI 266

Query: 349 GTAGSWFTLDVAFYGLSLNSAVILQFIGYAGSKNVYKKLYDTAVGNLILICAGSLPGYWV 408
 GT G+WF +D A YG S+ S+ IL + + K + + T L++ + PGYW+

Sbjct: 267 GTMGAWEMMDWALYGNSSIMSTILSALVPSTIKGLPALIRSTEY-TLLIFAGAAFPGYWI 325

Query: 409 SVFTVDIIIGRKPIQLAGFIILTALFCVIGFAYHKL-GDHGL-LALYVICQFFQNFPGPNTT 466
 + +D IGRK IQL GF ++ + +I YH + G+ + LALY + FF FGPN T

Sbjct: 326 ATSVLDKIGRKTIQLIGFAVMALSYALIAIGYHSIIIGNISMFLALYGLSYFFIEFGPNVT 385

Query: 467 TFIVPGECEFPTRYRSTAHGISAASGKVGAIQAQTALGTLIDHNCARDGKPTNCWLPHVME 526
 TF+ P E FP R G+SAA GK+GA I A ++ G + LP +

Sbjct: 386 TFVYPPEVFPVTTTRGLGTGMSAAGGKIGAFIGTFADAIL-----GTDASAHLPFLFS 438

Query: 527 IFALFMLLGIFTTL-LIPETKRKRTLEE 552
 + A+F ++G TL L+PETK + LE+

Sbjct: 439 LLAVFAVIGFALTLVLLPETKGRNLED 465

>ref|NP_393527.1| phosphate permease related protein [Thermoplasma acidophilum]
 Length = 476

Score = 246 bits (627), Expect = 3e-65
 Identities = 169/510 (33%), Positives = 261/510 (51%), Gaps = 59/510 (11%)

Query: 50 LESIDDEGFGWQQVKTISIAGVGFLLTDSYDIFAINLGITMMSYVYWHGSMGPSQTLLKV 109
 L+ +D+ G ++ I+G+GF TD+YD+F I ++++ W+ S+ +L+

Sbjct: 6 LQQLDNAKVGKFHLLRAWVISGMGFFTDAYDLFIIGTVVSLPLAGWN-SLTADISLISS 64

Query: 110 STSVGTVIGQFGFGLADIVGRKRIYGMELIIMIVCTILOTTVAHSPAINFVAVLTFYRI 169
 + +VIG F FG L D++GR R+YG EL+++I+ + + +N V L +R

Sbjct: 65 VALLASVIGAFTEGRLDLLGRSRVYGFELMLLIIGAVGSAFLV---PVNGVLYLLIWR 121

Query: 170 VMGIGIGGDYPLSSIIITSEFATTKWRGAIMGAVFANQAWQISGGIIALILVAAYKGELE 229
 ++G+GIGGDY SS I +EF+ K RG ++G VF+ Q +G + G +IAL+++

Sbjct: 122 ILGLGIGGDYAGSSTIMAEFSNAKNRGQLIGMVFSMQGFGLVFGPVIALVMI----- 173

Query: 230 YANSGAECDCARCQKACDQWRILIGLGTVLGLACLYFRLTIPESPRYQLDVNAKXXXXXX 289
 R + D +WR+L+ LG + LY R TI E+PRY ++V+

Sbjct: 174 -----RYIPSIDLVWRLLLFLGAIPAAIVLYGRRTIGETPRYSINVSG----- 216

Query: 290 XXXXDGEKKIHDTSDDEMAINGLERASTAVESLDN-HPPKASFKDFCRHFGQWKYKILL 348
 D S AI + ST + D S+K + F + L+

Sbjct: 217 -----DISSAKKAIQEISGKSTVQANPDELIGEHSWK---KMFTDRYFLMTLI 262

Query: 349 GTAGSWFTLDVAFYGLSLNSAVILQFIGYAGSKNVYKKLYDTAVGNLILICAGSLPGYWV 408
 GTAG+WF LD AFYG S+ S +L I A V K+ T LI+ +LPGYW+

Sbjct: 263 GTAGAWFALDWAFYGNSSIMSHQMLSAIVPASLGGV-AKVKMTTFYALIIFAVSALPGYWI 321

Query: 409 SVFTVDIIIGRKPIQLAGFIILTALFCVIG-FAYHKLGDH--GLLALYVICQFFQNFPGPNT 465
 + FTVD IGRKP+Q+ GF ++ + ++G F + + + +Y + FF FGPN

Sbjct: 322 ATFTVDRIGRKPLQLIGFFMALSYYIILGVFRFISAPSYIIWFMIYGLSYFFTEFGPNV 381

Query: 466 TTFIVPGECEFPTRYRSTAHGISAASGKVGAIQAQTALGTLIDHNCARDGKPTNCWLPHVM 525
 TTFI E FPT R G+S+A GK+GA I TAL +I A G+ +

Sbjct: 382 TTFIYGPEMFPTSLRGMGSLSSAGGKLGAFIG-TALNVVI---YAI FGESV-----LF 431

Query: 526 EIFALFMLLG-IFTTLLIPETKRKRTLEEIN 554
 I A + G + T +PET ++LE+I+

Sbjct: 432 IILAFISIAGALLTMFFLPETSGRSLEDIS 461

>ref|ZP_00001253.1| hypothetical protein [Ferroplasma acidarmanus]
Length = 467

Score = 244 bits (624), Expect = 7e-65
Identities = 170/506 (33%), Positives = 264/506 (52%), Gaps = 62/506 (12%)

Query: 52 SIDDEGFGWQQVKTISIAGVGLTDSYDIFAINLGITMMSYVYWHGSMGPSQTLLKVST 111
S+D+ K + I+G+GF TD+YD+F I + I ++ Y WH ++ + L+ +
Sbjct: 8 SMDEAKTSKFHYKVLFIISGLGFFTDAYDLFIIGVVILLPYAGWH-NISIFYKGLVTSTA 66

Query: 112 SVGTVIGQFGFGLADIVGRKRIYGMELIIMIVCTILQTTVAHSPAINFVAVLTFYRIVM 171
+ VIG FG L D GRK IYG EL+ +I ++ A +N + +L F+R ++
Sbjct: 67 LLAAVIGSVVFGRLLDYSGRKAIYGFELVALIAGSLGS---AFLTPVNNIFMLLFWRFL 123

Query: 172 GIGIGGDYPLSSIITSEFATTKWRGAIMGAVFANQAWGQISGGIILILVAAYKGELEYA 231
G+GIGGDY SS I +E+++T RG +G +F+ Q++G I+G +I++ ++ Y
Sbjct: 124 GVGIGGDYATSSITMTEYSSTMNRGKVFVGMIFSMQSFGLIAGPLISIAFLSNVSPY--- 180

Query: 232 NSGAECDARCQKACDQMWIRILIGLGTVLGLACLYFRLTIPESPRYQLDVNAKXXXXXXXXX 291
WR+L+ +G + + +YFR T+PE PRY DV
Sbjct: 181 -----ITWRLLAIGAIPAIIVIIYFRRTMPEPPRYTADV----- 215

Query: 292 XXDGEKKIHDTSDDEMAINGLERASTAVESLDNHPPKASFKDFCRHFGQWKYGKILLGTA 351
G+ K+ + + A GL+ + +++ N P F+D K+ L+GTA
Sbjct: 216 ---GDYKLAAKNLKTFA--GLDSTGSKGKTI-NAPWYVLFDR-----RKFLLTIGTA 262

Query: 352 GSWFTLDVAFYGLSLNSAVILQFIGYAGSKNVYKLYDTAVGNLILICAGSLPGYWVSVF 411
G+WF +D AFYG S+ S IL + + ++ + T + I+ + PGYW++ F
Sbjct: 263 GAWFLMDWAFYGNISMSNSILSFLVPSTVSGIH-SIIMTNEYSALIFGVAAFPYGWIAAF 321

Query: 412 TVDIIGRKPIQLAGFIILTALFCVI-GFAY---HKLGDHGLLALYVICQFFQNFPGNPTTT 467
T+D IGRKP+Q+ GF ++ F +I F++ ++ D+ LL LY I FF FGN TT
Sbjct: 322 TIDRIGRKPVQITGFAMMAISFGIISAFSFLTTYRFLDYFLL-LYGISYFFIMFGPNVTT 380

Query: 468 FIVPGECFPTRYRSTAHGISAASGKVGAIIAQTALGTLIDHNCARDGKPTNCWLPHVMEI 527
F+ P E FP R GISAA GK GA I GTL D + L +M +
Sbjct: 381 FVYPPEVFPISTRGLGTGISAAGGKTGAFI-----GTLADTIIL-----SITGLHFLMGM 430

Query: 528 FALFMLLG-IFTLLIPETKRKRTLEE 552
A+ +G I T +L+PETKR+ L E
Sbjct: 431 LAIIAAIGLILTIVLLPETKRRLDGE 456

>ref|NP_110642.1| Phosphate transport permease [Thermoplasma volcanium]
Length = 471

Score = 241 bits (616), Expect = 6e-64
Identities = 165/506 (32%), Positives = 254/506 (50%), Gaps = 56/506 (11%)

Query: 50 LESIDDEGFGWQQVKTISIAGVGLTDSYDIFAINLGITMMSYVYWHGSMGPSQTLLKV 109
+ESI+D KT ++G+GF TD+YD+F I + +++ W+ +LL
Sbjct: 10 IESINDAKTSGFHYKTIWIVSGLGFFTDAYDLFIIGVVTSILVLSGWN-KFTTLQSSLLDS 68

Query: 110 STSVGTVIGQFGFGLADIVGRKRIYGMELIIMIVCTILQTTVAHSPAINFVAVLTFYRI 169
+ + VIG FG L D +GRK +YG+ELII+IV + A +N V VL +R
Sbjct: 69 TALLSAVIGALIFGRLIDKLGRKTVYGLELIILIVGALGS---AFLTPLNGVYVLIWRF 125