

**Universidad de Chile**  
Facultad de Ciencias

# **POLIFOSFATOS NORGÁNICOS EN EL DOMINIO ARCHAEA: ESTUDIO EN EL GÉNERO SULFOLOBUS**

Tesis Entregada a la Universidad de Chile En cumplimiento parcial de los requisitos Para optar al  
grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología Facultad de Ciencias

Por

**Silvia Teresa Cardona**

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez

**Octubre de 2001**



INFORME DE APROBACIÓN .	1
..	3
Agradecimientos .	5
Lista de abreviaturas .	7
Resumen .	9
Abstract . .	11
Introducción .	13
1. La existencia del dominio <i>Archaea</i> . .	13
1.1 Características del dominio <i>Archaea</i> . .	15
1.2 El género <i>Sulfolobus</i> . .	16
1.3 Estrés en <i>Archaea</i> .	17
2. Los polifosfatos inorgánicos . .	18
2.1 Localización de los poliP .	19
2.2 Metabolismo de los poliP .	20
2.3 PoliP y su relación con la supervivencia ante factores de estrés .	21
3. PoliP en <i>Sulfolobus</i> . .	23
Materiales y métodos . .	25
1. Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo .	25
1.1 <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM nro. 639 .	25
1.2 <i>Sulfolobus solfataricus</i> DSM nro. 1617 . .	25
1.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plasmidios . .	26
2. Fraccionamientos subcelulares .	27
2.1 Obtención de la fracción de membranas de <i>S. acidocaldarius</i> . .	27
2.2 Obtención de extractos crudos en <i>S. solfataricus</i> . .	27
3. Purificación del complejo glicógeno-proteína que contiene a la proteína P60 .	28
4. Actividades enzimáticas . .	28
4.1 Determinación de la actividad PPK .	28

4.2 Determinación de la actividad glicosil transferasa (GT). . .	29
4.3 Determinación de la actividad PPX .	29
5. Métodos de análisis de poliP . .	29
5.1 Síntesis <i>in vitro</i> de [ <sup>32</sup> P]poliP <sub>700</sub> a expensas de PPK recombinante (PPKr) de <i>E. coli</i> . .	29
5.2 Purificación de [ <sup>32</sup> P]poliP <sub>700</sub> sintetizados <i>in vitro</i> .	30
5.3 Análisis de poliP mediante hidrólisis por PPX de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PPXSce) .	31
5.4 Extracción de poliP endógeno de <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i> . .	31
5.5 Cuantificación de poliP . .	31
5.6 Microscopía electrónica .	32
6. Análisis de proteínas .	32
6.1 Marcación de proteínas <i>in vivo</i> con H <sub>3</sub> <sup>32</sup> PO <sub>4</sub> . .	32
6.2 Preparación de las fracciones para electroforesis en geles de poliacrilamida . .	32
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS .	33
6.4 Electroforesis bidimensional de proteínas . .	33
6.5 Preparación de las proteínas para microsecuenciación del extremo amino terminal y de péptidos internos .	33
6.6 Digestión enzimática para la obtención de péptidos internos y separación de los mismos .	34
6.7 Microsecuenciación del extremo amino terminal de proteínas y péptidos internos . .	34
6.8 Determinación cuantitativa de proteínas .	34
7. Técnicas de Biología Molecular . .	34
7.1 Purificación de DNA .	34
7.2 Cuantificación de DNA .	35
7.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa .	36
7.4 Partidores y determinaciones de PCR . .	36
7.5 Digestiones de DNA con enzimas de restricción . .	38
7.6 Ensayo de Southern blot .	38
7.7 Ligaciones de DNA .	38

7.8 Transformaciones . . . . .	39
7.9 Secuenciación de DNA . . . . .	40
8. Expresión y purificación de proteínas recombinantes . . . . .	40
8.1 P60 recombinante (P60r) . . . . .	40
8.2 PPX recombinante de <i>S. solfataricus</i> (PPXrSso) . . . . .	41
9. Métodos Bioinformáticos . . . . .	41
10. Números de acceso a base de datos de las secuencias nucleotídicas . . . . .	42
Resultados . . . . .	43
1. PoliP en <i>S. acidocaldarius</i> y <i>S. solfataricus</i> . . . . .	43
1.1 PoliP durante el crecimiento en medio rico . . . . .	43
1.2 Niveles de PoliP durante carencias nutricionales en <i>S. solfataricus</i> . . . . .	44
2. Caracterización de la proteína P60 en relación con su posible actividad PPK en <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	47
2.1 Purificación de la P60 asociada al glicógeno y ensayos de actividad PPK y GT . . . . .	48
2.2 Análisis de los productos de reacción del ensayo de actividad PPK . . . . .	50
2.3 Caracterización de los polipéptidos presentes en el complejo glicógeno-proteína correspondiente a la fracción F2 . . . . .	52
2.4 Identificación y caracterización del gen <i>p60</i> . . . . .	53
2.5. Clonamiento y expresión del gen <i>p60</i> . . . . .	63
2.6 Análisis funcional de la P60r . . . . .	63
3. Actividad PPK en <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	65
4. Búsqueda de genes involucrados en la síntesis de poliP en <i>Archaea</i> mediante métodos bioinformáticos . . . . .	66
5. Identificación y caracterización del gen <i>ppx</i> en <i>S. solfataricus</i> ( <i>ppxSso</i> ) . . . . .	66
5.1 Clonamiento y secuenciación del fragmento genómico que comprende los ORF c50 004-c50 003 . . . . .	67
5.2 Clonamiento del gen <i>ppxSso</i> de <i>S. solfataricus</i> en el sistema de expresión pET . . . . .	70
5.3 Análisis funcional del gen <i>ppxrSso</i> . . . . .	70
6. Actividad PPX y niveles de poliP en <i>S. solfataricus</i> . . . . .	76
Discusión . . . . .	77

1. Niveles de PoliP en <i>S. acidocaldarius</i> y en <i>S. solfataricus</i> . .	77
2. La supuesta PPK, asociada al glicógeno de <i>S. acidocaldarius</i> resultó ser una glicógeno sintasa .	79
3 ¿Existe un gen responsable de la síntesis de poliP en <i>Sulfolobus</i> ? .	80
4. El gen ppx de <i>S. solfataricus</i> . .	80
Conclusiones .	83
Bibliografía .	85
Anexo 1: Resultados de métodos bioinformáticos . .	93

---

# INFORME DE APROBACIÓN

## TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Silvia Teresa Cardona

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día-----

Director de tesis: Dr. Carlos A. Jerez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr.....

.....

Dr.....

.....

Dr.....

.....

Dr.....

.....





---

*A mi esposo*



## Agradecimientos

Deseo dar las gracias a las siguientes instituciones y personas:

a la Universidad de Chile y a los profesores del comité de Doctorado, por la formación académica adquirida en estos años.

a CONICYT, por el financiamiento recibido a través de los proyectos FONDECYT 1000679 y 2990035.

al DAAD, por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar estudios de postgrado.

al Dr. Mario Luxoro, Director de la Escuela de Postgrado, por su disposición para atender y escuchar a los estudiantes.

al Dr. Carlos Jerez, director de esta tesis, por su ejemplo de amor al conocimiento, entusiasmo e incansable capacidad de trabajo.

al Dr. Nicolás Guiliani, por su rigurosidad científica y su generosidad al transmitir conocimientos.

a mis compañeros de tesis, Sergio Alvarez, Francisco Chavez, Pablo Ramírez y Mario Vera, por el clima de trabajo y las valiosas discusiones en el laboratorio.

al Sr Juan Araos, por su bondad y su desinteresada colaboración.

a Ricardo Blanco, mi esposo, por su amor y comprensión.

a mis padres, Lucía y Jorge, y a mi hermana Adriana, por su cariño y apoyo constante.



---

## Lista de abreviaturas

Amp. Ampicilina

**BSA.** Seroalbúmina bovina

**CKI.** Caseína quinasa I

**CKII.** Caseína quinasa II

**Cm.** Cloranfenicol

**DMSO.** Dimetil sulfóxido

**DO<sub>600</sub>** .Densidad óptica a 600 nm

**DOPS.** Partidores degenerados para DOP-PCR

**EDTA.** Ácido etilendiaminotetraacético

**GITC.** Isotiocianato de guanidina

**GppA.** Guanosina pentafofato fosfohidrolasa

**GT.** Glicosil transferasa

**HPLC.** Cromatografía líquida de alta presión

**IEF.** Iso electro enfoque

**IPTG.** Iso propil tio- $\beta$ -D-galactósido

**LGT.** Lateral gene transfer (transferencia horizontal de genes)

**NEPHGE.** Electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio

**ORF.** Open reading frame (marco abierto de lectura)

**PDVF.** Difloruro de polivinilideno

**PHB.** Poli- $\beta$ -hidroxibutirato

**PMSF.** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**poliP.** Polifosfatos inorgánicos

**ppGpp.** Guanosina tetra fosfato

**PPK.** Polifosfato kinasa

**PPK<sub>r</sub>.** PPK recombinante de *Escherichia coli*

**pppGpp.** Guanosina pentafofato

**PPX.** Exopolifosfatasa

**SDS.** Dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE.** Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida.

**TAE.** Tris-acetato EDTA

**TLC.** Cromatografía ascendente en capa delgada

**ufc.** unidades formadoras de colonias

**X-Gal.** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Resumen

El Dominio *Archaea* es uno de las tres divisiones fundamentales en los que se agrupan los seres vivos. Incluye microorganismos conocidos como extremófilos, como los termoacidófilos *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfataricus* y *S. metallicus* capaces de crecer a pH 1.5-3 y a temperaturas de 70 a 80°C. Como modelo del dominio *Archaea* y debido a sus potenciales usos en biotecnología, existe un gran interés por dilucidar los mecanismos por los cuales estos microorganismos se adaptan y responden a su medio ambiente.

Cuando los microorganismos son sometidos a condiciones estresantes, acumulan polifosfatos inorgánicos (poliP). La única vía actualmente establecida para la biosíntesis de poliP es la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa (PPK) mientras que la enzima exopolifosfatasa (PPX) es responsable de su hidrólisis. Actualmente, existen fuertes evidencias sobre el rol de los poliP en la regulación de la respuesta de *Escherichia coli* frente a cambios ambientales y durante la fase estacionaria de crecimiento.

En nuestro laboratorio, se han analizado las respuestas moleculares globales de *S. acidocaldarius* frente al shock térmico y la falta de fosfato y se han observado gránulos clásicamente descritos como poliP. Esta observación y la descripción por otro laboratorio de una proteína con actividad PPK y glicosil transferasa (GT) en *S. acidocaldarius* sugerían la existencia de poliP en este microorganismo, por lo que se propuso caracterizar los componentes genéticos del metabolismo de los poliP en el género *Sulfolobus* en relación con la respuesta a factores ambientales.

Durante el desarrollo de esta tesis se detectó la presencia de poliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* mediante un método cuantitativo y se caracterizaron el gen responsable de la supuesta actividad PPK y un gen *ppx* presente en el genoma de *S. solfataricus*. Se encontró que los niveles de poliP aumentan hacia la fase estacionaria de crecimiento y en carencia de ciertos nutrientes como los aminoácidos. La proteína de 60 kDa (P60) asociada al glicógeno cuyas actividades PPK y GT se habían descrito, resultó tener una alta similitud con glicógeno sintasas de arqueas y bacterias y mostró actividad GT. Sin embargo, no presentó ninguna similitud con PPKs conocidas y la actividad PPK fue muy baja. Se procedió a caracterizar los supuestos poliP sintetizados por el complejo glicógeno-proteína mediante extracción por gradientes de CsCl, hidrólisis mediada por PPX y análisis de los productos de reacción en cromatografía en capa delgada (TLC). Las especies radiactivas aisladas más bien correspondieron a ATP unido inespecíficamente al complejo glicógeno-proteína y no a una real actividad PPK. La P60 recombinante (P60r) mostró actividad GT. Sin embargo, no presentó actividad PPK en ausencia o presencia de glicógeno. Se concluyó que la P60 es una glicógeno sintasa, no siendo responsable de la actividad PPK presente en extractos crudos de *S. acidocaldarius*. Esta glicógeno sintasa resultó fosforilada *in vivo*.

La presencia de poliP y la actividad PPK detectada en membranas de *S. acidocaldarius* sugerían que existe una proteína responsable de actividad PPK, por lo que se realizó una búsqueda mediante métodos bioinformáticos en el genoma disponible vía Internet de *S. solfataricus*, con resultados negativos.

Para continuar con la identificación de los genes involucrados en el metabolismo de poliP en *Sulfolobus* se caracterizó un fragmento del gen *ppx* presente en el genoma de *S. solfataricus*. Este fragmento correspondió a un gen *ppx* con similitud al gen *ppx* de *E. coli*. La PPX recombinante de *S. solfataricus* resultó funcional. Se midió la actividad PPX durante el crecimiento en *S.*

*solfataricus* siendo menor hacia la fase estacionaria que en la fase exponencial, de acuerdo con los niveles de poliP en estos estadíos.

En conclusión, el aumento de los niveles de poliP ante condiciones de carencia de nutrientes en *S. solfataricus*, la actividad PPK detectada y la existencia de un gen *ppx* funcional sugieren que los poliP están sujetos a una regulación que depende de componentes genéticos y que responde a factores del ambiente.



---

## Abstract

The domain Archaea is the third domain of life and it comprises extremophile microorganisms. Among them, the thermoacidophiles *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfataricus* and *S. metallicus* grow at pH 1.5-3.0 and 70-80°C. At present, there is a great interest to know how these microorganisms manage to survive in their environments.

In response to nutrient limitation and during stationary phase, bacteria dynamically accumulate inorganic polyphosphates (polyP). The only pathway for the synthesis of polyP that has been established in *Bacteria* is the polymerization of the terminal phosphate of ATP through the action of the enzyme polyphosphate kinase (PPK). Also, the enzyme exopolyphosphatase (PPX) is responsible for the hydrolysis of polyP to render Pi. There are strong evidences that polyP has a role in the physiological adjustments of *Escherichia coli* to environmental changes and during the stationary phase of growth.

We have analyzed the global response of *S. acidocaldarius* to heat shock and phosphate starvation. During these experiments we observed the presence of electron dense bodies, that are typically described as polyP. This observation and the reported purification of a glycogen-bound protein of 60 kDa (P60) with PPK and glycosyl transferase (GT) activities from *S. acidocaldarius* suggested the presence of polyP in this microorganism. Therefore, our objective was to characterize the genetic components of the metabolism of polyP in *Sulfolobus* genera and their relation to the stress response.

During this thesis, we detected polyP in *S. acidocaldarius* and *S. solfataricus* using a quantitative enzymatic method. The gene for the alleged PPK and a *ppx* gene from the genome of *S. solfataricus* were characterized. We found that polyP levels increase in the stationary phase of growth and in response to certain nutritional deficiencies as amino acid starvation. The previously reported PPK (P60) turned out to be highly similar to glycogen synthases from *Archaea* and *Bacteria* and also showed GT activity. However the protein did not show similarity with the known PPKs and the PPK activity was very low. With the objective to characterize the supposed synthesized polyP, the <sup>32</sup>P-labeled material was extracted by CsCl gradient and analyzed by treatment with PPX and thin layer chromatography (TLC). We found that the isolated labeled material corresponded most probably to a nonspecifically ATP bound to the glycogen-protein complex and not to a real PPK activity. The recombinant P60 (P60r) did not show PPK activity even in the presence of glycogen, showing GT activity instead. We concluded that P60 is a glycogen synthase that is not responsible for the PPK activity detected in crude extracts from *S. acidocaldarius*. This glycogen synthase was phosphorylated *in vivo*.

The presence of polyP and the PPK activity detected in membrane fractions from *S. acidocaldarius* suggested the existence of a PPK-like protein. Therefore, by using bioinformatic tools, we searched for this protein in the available genome sequence of *S. solfataricus*. However, we could not find an homologous *ppk* gene.

To further identify genes involved in polyP metabolism in *Sulfolobus*, we characterized a *ppx* gene fragment from the genome of *S. solfataricus*. This fragment corresponded to an entire *ppx* gene similar to the *ppx* gene from *E. coli*. The recombinant PPX from *S. solfataricus* was functional in *E. coli*.

The PPX activity of crude extracts from *S. solfataricus* was higher during the exponential phase of growth than during the stationary phase in accordance with the observed levels of

polyP.

In conclusion, the increase of polyP levels in response to nutrient limitations, the detected PPK activity and the existence of a *ppx* gene in *S. solfataricus* suggest that polyP metabolism is regulated by genetic components that are responsive to the environment.

# Introducción

## 1. La existencia del 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). Desde entonces, la ubicación del dominio *Archaea* como equivalente a *Bacteria* y *Eukarya*, destruyó el paradigma procarionte/eucarionte y subrayó la necesidad de avanzar en su estudio, no solamente por las características de adaptación a la vida en condiciones extremas que presentan muchos de sus representantes (Rajagopal y col., 1998), sino porque de este árbol filogenético universal se podía inferir un mayor parentesco entre *Archaea* y *Eukarya* (Fig. 1).

Esta visión tripartita del mundo viviente ha sido objetada principalmente por Ernst Mayr, profesor emérito de la Universidad de Harvard (Mayr, 1990; Mayr 1998). Su propuesta es retornar a la clasificación procarionte (*Archaea* y *Bacteria*) vs. eucarionte (*Eukarya*) basándose en las semejanzas fenotípicas de *Archaea* y *Bacteria* y en el mayor porcentaje en el número de proteínas similares (aproximadamente 42%) entre *Archaea* y *Bacteria* comparado con *Archaea* y *Eukarya* (13%).

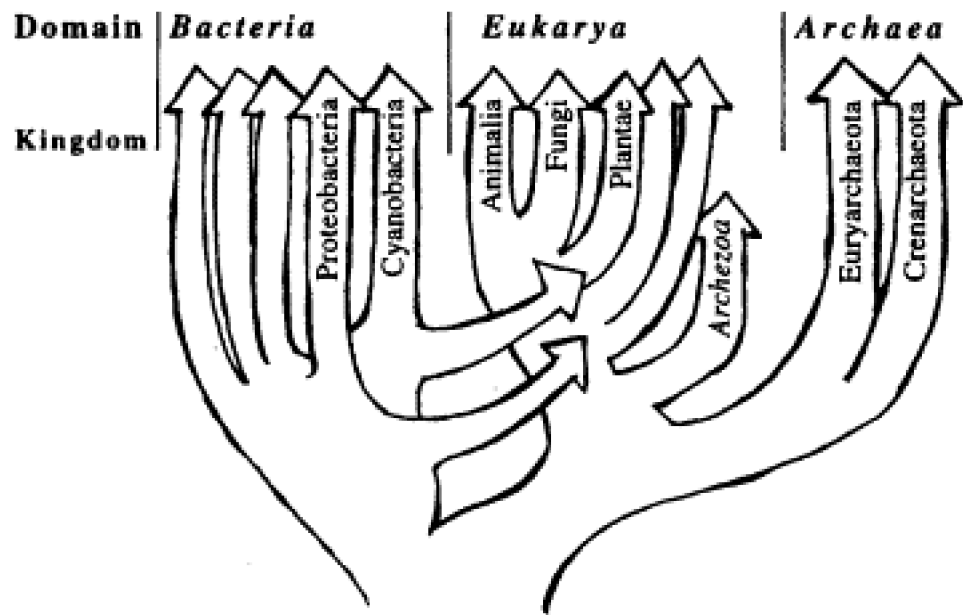


Figura 1. Arbol filogenético universal de los seres vivos (Doolittle, 1999).

El explosivo aumento de secuencias disponibles gracias a la secuenciación de genomas microbianos (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html>) ha dado lugar a la construcción de árboles filogenéticos basados en otras secuencias de genes diferentes al rRNA 16S pero universalmente conservados como por ejemplo la proteína de estrés térmico de 70 kDa (HSP70) (Gupta 1998a; 1998b). Según esta filogenia *Archaea* sería un grupo polifilético dentro de las bacterias Gram positivas. Otros árboles universales contruidos con diferentes genes muestran una variedad de posibles relaciones filogenéticas (Brown y Doolittle, 1997). Este aparente desmoronamiento del nuevo paradigma de los tres dominios ha permitido una nueva visión: por un lado muestran que los fenómenos de transferencia horizontal de genes (LGT) que explican las aparentes inconsistencias entre distintos árboles universales, han ocurrido y son una fuerza importante 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. 2).

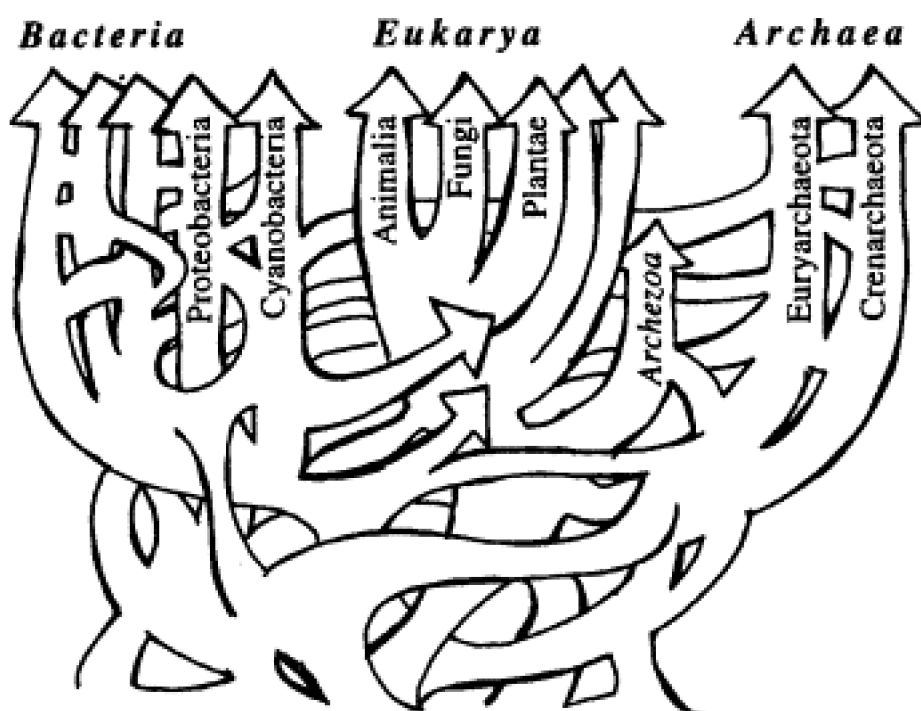


Figura 2. El árbol de la vida visto como una red (Doolittle, 1999).

Recientemente, se han desarrollado métodos bioinformáticos que permiten construir árboles universales utilizando un gran número de secuencias homólogas (Tekaia y col., 1999; Brown y col., 2001). Estos árboles “genómicos” han mostrado ser sustancialmente congruentes con el árbol filogenético universal de Woese. También la secuenciación de nuevos genomas arqueanos ha revelado que la mayor parte de los sistemas de procesamiento de la información como replicación, transcripción y traducción que mantienen y expresan el genoma en *Archaea*, son claramente de tipo eucarionte (Baumann y col., 1995; Rowlands y col., 1994; Dennis, 1997), mientras que los genes relativos al metabolismo están más relacionados con las bacterias (Olsen y Woese, 1997; Gaasterland, 1999). Esto explicaría por que los árboles basados en secuencias génicas relacionadas con estos procesos sugieren un origen común entre *Archaea* y *Eukarya* y apoya la interesante teoría del origen de la célula eucarionte por simbiosis de *Archaea* en *Bacteria* (Horiike y col., 2001).

En conclusión, el dominio *Archaea* es un taxón claramente distinto a *Bacteria* que presenta un gran desafío a la investigación. Su importancia radica en su categoría de tercer dominio de la vida y en sus intrigantes relaciones filogenéticas con *Eukarya*. Los enfoques comparativos que incluyen al dominio *Archaea* y no sólo a bacterias y eucariontes en el estudio de los fenómenos biológicos presentan una visión completa y representativa del fenómeno de la evolución biológica.

## 1.1 Características del dominio *Archaea*

Entre los aspectos más sobresalientes que definen al dominio *Archaea* se puede destacar la estructura de sus envolturas celulares, formadas por una capa S o “S-layer” de

glicoproteínas y una membrana plasmática que contiene una gran proporción de tetra-éteres lipídicos (Rajagopal y col., 1998). También se han caracterizado clásicamente por su adaptación a la vida en condiciones extremas por lo que muchos de sus representantes pertenecen a la categoría de extremófilos. Sólo recientemente, mediante técnicas de hibridación *in situ*, se han detectado representantes del dominio *Archaea* en ambientes mesófilos (Rajagopal y col., 1998).

El dominio *Archaea* se divide en los reinos *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Korarchaeota*. Estos reinos comprenden microorganismos extremófilos. Los *Euryarchaeota* incluyen a las arqueas halófilas, capaces de tolerar concentraciones muy altas de sal y a los metanógenos, que generan metano bajo condiciones anaeróbicas. Los *Crenarchaeota* incluyen a los termoacidófilos extremos, que crecen a pH entre 1 y 3 y a temperaturas de 80°C a 102° C o más (Brown and Doolittle, 1997) y los *Korarchaeota* comprenden microorganismos de ambientes termófilos aún no cultivados, identificados en base al análisis del 16S RNA (Barns y col., 1996).

## **1.2 El género *Sulfolobus***

---

Perteneiente al reino *Crenarchaeota*, el género *Sulfolobus* comprende especies termoacidófilas aisladas de hábitats geotermales como las fuentes solfatáricas (Fig. 3). Estos hábitats extremos se caracterizan por las altas temperaturas de sus aguas circulantes, la presencia de minerales como hierro y azufre y una gran acidez (Stetter, 1995).

Debido a su carácter aerobio, *Sulfolobus* vive en las capas superiores de las fuentes solfatáricas. Esta condición y la existencia de especies heterótroficas (Tabla 1) con alta producción de biomasa, han permitido que el microorganismo pueda cultivarse fácilmente en medio líquido y sólido erigiéndose como modelo de estudios bioquímicos y genéticos.

Desde el punto de vista básico, se ha avanzado mucho en el estudio de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*. El genoma de éste último ha sido secuenciado y anotado recientemente (She y col., 2001) y se encuentran en desarrollo las herramientas genéticas necesarias para la expresión homóloga y la mutagénesis (Aravalli y Garrett, 1997; Cannio y col., 1998).



Figura 3. Fuente solfatárica del parque Yellowstone, EE. UU.

Tabla 1. Características de tres especies de *Sulfolobus*

Características <sup>a</sup>	<i>S. acidocaldarius</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>S. metallicus</i>
Temperatura óptima de crecimiento	75°C	80°C	65
PH óptimo de crecimiento	3-3.5	2-4	2-3
%G+C	37	37	38
Capacidad para oxidar azufre	-/+	+	+
Capacidad para oxidar hierro	-	-	+
Capacidad para crecer heterotróficamente	+	+	-

<sup>a</sup> (Stetter, 1998; Blake y Johnson, 2000)

Menos estudiado es *S. metallicus* aunque más interesante desde el punto de vista biotecnológico ya que su capacidad para oxidar hierro lo ubica como un candidato para su utilización en biolixiviación de metales en reactores a alta temperatura (Brierley y Brierley, 1986; Lindström y col., 1992; Aguilar, 1996). Por ser modelo de estudio del dominio Archaea, por su carácter termoacidófilo y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas es que existe un gran interés por dilucidar los mecanismos por los cuales *Sulfolobus* es capaz de adaptarse y responder a cambios en su ambiente.

### 1.3 Estrés en *Archaea*

Un cambio abrupto en las condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, oxígeno, nutrientes) induce una condición de estrés en una célula y una respuesta (Macario y col., 1999). En los hábitats geotermales la constante circulación de aguas genera gradientes de temperaturas y de nutrientes (Howland, 2000) por lo que las arqueas termoacidófilas que colonizan estos ambientes deben ser capaces de detectar y responder a las nuevas condiciones. En bacterias, los sistemas sensoriales que coordinan la relación estímulo respuesta están formados típicamente por dos componentes, un sensor o histidina quinasa que fosforila a un regulador de respuesta que en general es un activador de la transcripción (Bourret y col., 1991). A pesar de que el genoma de *S. solfataricus* y otros genomas de *Archaea* no presentan este tipo de sistemas los *Archaea* son capaces de poseer una respuesta adaptativa. Por ejemplo, *S. acidocaldarius* cambia su expresión génica global en carencia de fosfato (Osorio y Jerez, 1996; Osorio, 1998). También en el laboratorio se describió por primera vez la respuesta al estrés térmico en un termófilo como *S. metallicus* (Jerez, 1988) y posteriormente se demostró un aumento en la expresión de chaperonas moleculares DnaK (HSP70) y GroEL (HSP60) ante estrés térmico (Macario y col., 1999). Estos ajustes mejoran la supervivencia ante la nueva condición. En los genomas arqueanos se ha encontrado una gran diversidad con respecto a la existencia de genes de estrés. La HSP70 está ausente de los genomas de *Methanococcus jannaschii* y *S. solfataricus*, pero presente en los genomas de *Thermoplasma acidophilum* y *Methanosarcina mazei*. Resulta interesante el hecho de que el complejo HSP60 en *Archaea* sea de tipo eucarionte (Trent y col., 1991). Con respecto a los mecanismos de regulación de la expresión génica en *Archaea* durante la fase estacionaria si bien se conoce que ésta sufre variaciones (Sandman y col., 1994; Nolling y col., 1995), no se han descrito factores de transcripción específicos de fase estacionaria como el factor sigma RpoS de bacterias.

## **2. Los polifosfatos inorgánicos**

Una de las moléculas que recientemente se ha involucrado en la supervivencia ante distintos factores ambientales son los polifosfatos inorgánicos (poliP). Estos polímeros lineales están formados por decenas a cientos de ortofosfatos (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía (Kornberg, 1995; Kornberg, 1999) (Fig. 4).



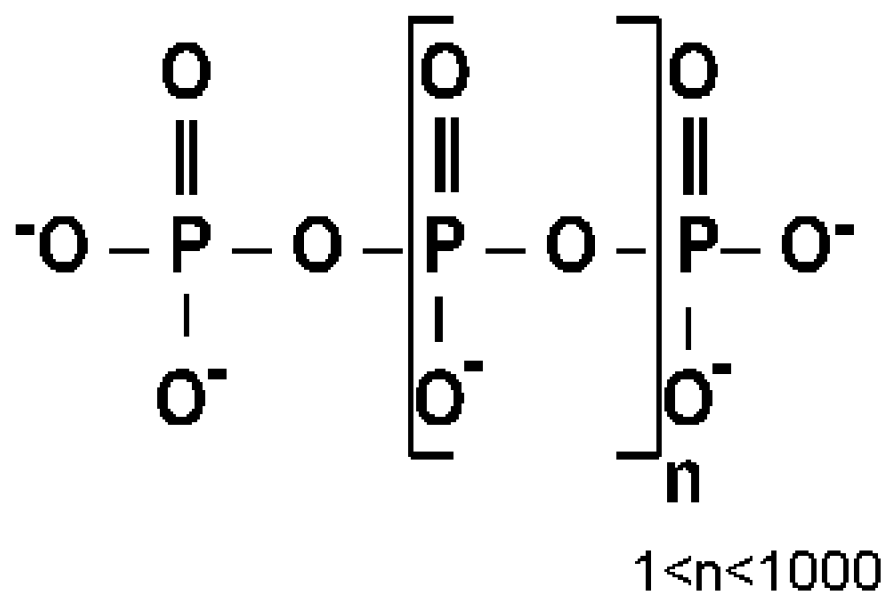


Figura 4. Polifosfatos inorgánicos.  $n$  representa el número de residuos de fosfato.

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 debido a la falta de métodos analíticos específicos. Las primeras descripciones de poliP dan cuenta de la presencia de gránulos metacromáticos en microorganismos. Estas partículas teñidas de rosa con colorantes básicos fueron llamadas “volutina” (Meyer, 1904) y se los confundía con ácidos nucleicos. Luego, con el advenimiento de la microscopía electrónica los poliP se observaron como gránulos electrodensos que desaparecían rápidamente bajo el haz de electrones, diferenciándose de la cromatina (Wiame, 1947). Utilizando estos métodos, los poliP se han encontrado en todos los seres vivos en los que se los ha buscado: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Wood y Clarck 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990). De especial interés es el hecho de que los poliP podrían ser componentes prebióticos ya que se han obtenido en condiciones experimentales que simulan la actividad volcánica (Yamagata y col., 1991). Su carga negativa sugiere que podrían haberse adherido a las superficies de pirita donde se cree que se originaron los primeros metabolizadores quimioautotróficos en un ambiente no reductor y de altas temperaturas (Wächtershäuser, 1992). Según esta teoría los poliP habrían cumplido un rol en la activación de grupos como dadores de Pi en reacciones de fosforilación.

El posible origen prebiótico y el carácter ubicuo de los poliP sugieren una multiplicidad de funciones dependiendo del organismo o de la localización subcelular. Entre las funciones propuestas se encuentran la de sustituto de ATP en reacciones de fosforilación, reserva de fosfato, quelante de metales y tampón para álcalis (Kornberg, 1995). Como se tratará más adelante, los poliP cumplen un rol importante en la respuesta ante ciertos factores de estrés (Ault-Riché y col., 1998).

## 2.1 Localización de los poliP

En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble (Rao y col., 1998). También existen pequeñas cantidades de poliP en las membranas plasmáticas, en complejo con poli-β-hidroxibutirato (PHB) y calcio (Reusch y Sadoff, 1988). En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y col., 1999).

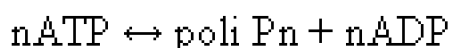
## **2.2 Metabolismo de los poliP**

---

Ya sea en forma soluble o formando gránulos, con localización citoplasmática o compartimentalizada, las variaciones fisiológicas que registran los niveles de poliP en los organismos sugieren la existencia de enzimas responsables de su síntesis y degradación y de cuya actividad dependen las fluctuaciones observadas en diferentes condiciones.

### **2.2.1 Enzimas del metabolismo de los poliP en *Bacteria***

La única vía bien establecida hasta el momento para la biosíntesis de poliP en bacterias es la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa (PPK) según la reacción reversible:



La PPK de *E. coli* ha sido purificada, su gen clonado y secuenciado (Ahn y Kornberg, 1990; Akiyama y col., 1992). La enzima es un homotetrámero con subunidades de 80 kDa, asociado a membranas. El gen codificante de la PPK, que está presente en varios genomas bacterianos (Tzeng y Kornberg, 1998), contiene dos histidinas fosforilables *in vitro* altamente conservadas (His 441 y His 460) que forman parte del sitio activo (Kumble y col., 1996).

En *E. coli*, el gen *ppk* es parte de un operón en el cual se encuentra río abajo un segundo gen cuyo producto es una exopolifosfatasa (PPX) que hidroliza los residuos terminales de poliP procesivamente liberando Pi (Akiyama y col., 1993). Este ordenamiento del operón *ppk-ppx* no es una característica común en otros genomas bacterianos. Por ejemplo, en *Acinetobacter sp.* el gen *ppk* es una unidad transcripcional (Geißdörfer y col., 1998) mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* los genes *ppk* y *ppx* se encuentran contiguos pero en orientación opuesta y su transcripción no está corregulada (Zago y col., 1999).

Aparte de la PPK y la PPX, otras enzimas podrían contribuir a la síntesis y degradación de poliP en bacterias. Por ejemplo, se ha detectado actividad 1,3-difosfoglicerato-poliP fosfotransferasa (Kulaev y col., 1999) y se ha caracterizado una enzima, la polifosfato glucoquinasa que es capaz de utilizar el poliP como sustituto de ATP en reacciones de fosforilación de glucosa en algunas bacterias (Hsieh y col., 1993).

### **2.2.2 Enzimas del metabolismo de los poliP en *Eukarya***

Aún no se conoce bien si existe una o más enzimas responsables de la síntesis de poliP en *Eukarya*. Se ha descrito una actividad dolicol pirofosfato:polifosfato fosfotransferasa

asociada a la síntesis de glicoproteínas de pared celular en las membranas de vesículas de transporte en levadura. Esta enzima cataliza la transferencia de fosfato desde el dolicol fosfato hacia el poliP (Kulaev y col., 1999). Recientemente y gracias a la metodología de los micro arreglos de DNA se han identificado cuatro genes homólogos *PHM1* (YFL004w), *PHM2* (YPL019c), *PHM3* (YJL012c) y *PHM4* (YER072w) que codifican para proteínas de la membrana vacuolar en *Saccharomyces cerevisiae* y cuyos mutantes son deficientes en acumulación de poliP (Ogawa y col., 2000). Mejor estudiados están los genes que codifican polifosfatasas. Varias polifosfatasas han sido caracterizadas a nivel genético en levadura. Una es la exopolifosfatasa citosólica codificada por el gen *ppx1* (YHR201c) (Wurst y Kornberg, 1994; Wurst y col., 1995) que no presenta ninguna similitud con las exopolifosfatasas bacterianas. También se ha descrito una endopolifosfatasa vacuolar (Ppn1) (Sethuraman y col., 2001).

## 2.3 PoliP y su relación con la supervivencia ante factores de estrés

Recientemente, la investigación en poliP tuvo un gran avance cuando en el laboratorio del premio Nobel Arthur Kornberg se desarrollaron métodos de síntesis de poliP *in vitro*, extracción, purificación y análisis enzimático (Ault-Riché y Kornberg, 1999). Estos métodos permitieron la obtención de [<sup>32</sup>P]poliP que puede usarse como marcador o como sustrato y la extracción de poliP. Éste último puede cuantificarse mediante tratamiento con PPK o PPX y posterior análisis de los productos de reacción (ATP o fosfato, respectivamente). Así se han obtenido fuertes evidencias con respecto al papel desempeñado por los poliP en la regulación de la respuesta a deficiencias nutricionales, estrés ambiental y supervivencia en fase estacionaria en *E. coli* (Rao y Kornberg, 1999).

### 2.3.1 Carencias nutricionales

Las fluctuaciones en los niveles de poliP que se observan en respuesta a estrés nutricional de aminoácidos y fosfato en *E. coli* pueden explicarse según el modelo de regulación propuesto por Kornberg que se esquematiza en la figura 5. Según este modelo, bajas concentraciones de fosfato y de aminoácidos inducen la acumulación de poliP por un mecanismo desconocido que involucra en forma conjunta al regulador de respuesta PhoB y a los inductores de la respuesta a carencia de aminoácidos, guanosina tetrafosfato (ppGpp) y penta fosfato (pppGpp) (Ault-Riché y col., 1998). Se ha demostrado que ppGpp y pppGpp son potentes inhibidores de la hidrólisis de los poliP mediada por PPX (Kuroda y col., 1997) por lo que esta inhibición podría resultar en una acumulación de los poliP (Ault-Riché y col., 1998).

Otras carencias nutricionales también desencadenan la acumulación de poliP (Fig. 5). Por ejemplo el regulador del metabolismo del nitrógeno NtrC, el factor sigma de fase estacionaria RpoS y el regulador de la respuesta a carencia de fosfato PhoB son necesarios para la acumulación de poliP en carencia de nitrógeno. La participación de RpoS implica la activación de un factor adicional "X" que podría llevar a la acumulación de poliP por directa interacción con poliP, inhibición de PPX, activación de PPK o una combinación de las tres. Además el estrés osmótico también desencadena una acumulación de poliP que es independiente de EnvZ, el sensor osmótico (Ault-Riché y

col., 1998). En todos los casos mencionados la acumulación de poliP no se debería a un aumento de la síntesis de poliP sino a una disminución de su degradación, ya que la actividad PPK varía muy poco en estas condiciones. Otro caso es el de *Acinetobacter sp.*, bacteria capaz de acumular grandes cantidades de poliP donde la transcripción del gen *ppk* se induce en carencia de fosfato sugiriendo una regulación de los niveles de poliP sobre la base de su síntesis (Geißdörfer y col., 1998).

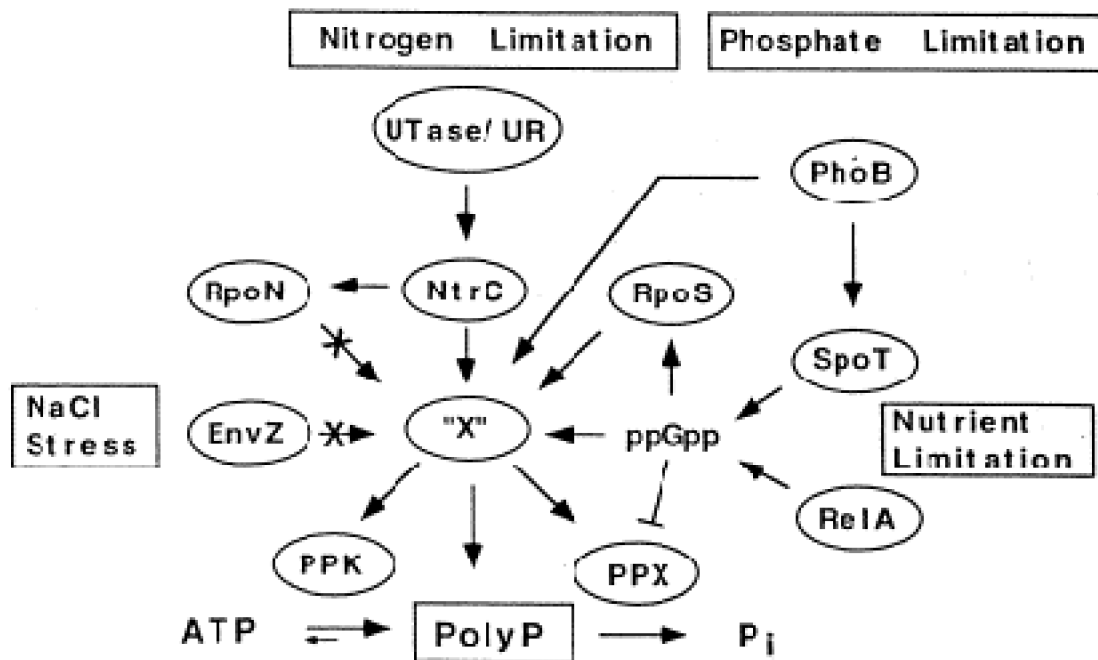


Figura 5. Modelo de la acumulación de poli P inducida por estrés en *Escherichia coli*. (Ault-Riché y col., 1998).

### 2.3.2 Fase estacionaria

Los poliP también se acumulan durante la fase estacionaria en *E. coli*. Mutantes carentes del gen *ppk* son deficientes en las funciones que se expresan durante este período, pierden su viabilidad en menos tiempo y son más sensibles a estrés oxidativo y térmico (Rao y Kornberg, 1996). Una posibilidad es que los poliP regulen la expresión de genes de la fase estacionaria a través de la inducción de la transcripción de *rpoS* (Shiba y col., 1997).

### 2.3.3 Motilidad, desarrollo de biopelículas y virulencia

El estudio de las características fenotípicas de bacterias mutantes del gen *ppk* ha llevado a establecer una relación entre la presencia de poliP y factores de virulencia. Por ejemplo, mutantes *ppk* de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae* mostraron una reducida motilidad a pesar de la presencia del flagelo intacto (Rashid y col., 2000a). Además en *P. aeruginosa* mutante *ppk* es defectuosa en la formación de biopelículas y en el fenómeno de “quorum sensing” (Rashid y col., 2000b).

### 2.3.4 Función de los poliP en la degradación de proteínas ribosomales

Que los niveles de poliP aumentan en respuesta a la carencia de aminoácidos está bien establecido (Ault-Riché y col., 1998). Sin embargo, sólo recientemente se dilucidó la función de los poliP en la respuesta adaptativa ante esta condición. Los poliP forman un complejo con la proteasa Lon que lleva a la degradación de varias proteínas ribosomales, proveyendo así los aminoácidos necesarios para responder a la condición de carencia (Kuroda y col., 2001). Esta es la primera evidencia experimental directa sobre un rol de los poliP en la respuesta adaptativa a condiciones de estrés.

Resumiendo, el estudio de los poliP abarca, entre otros, dos aspectos interesantes: su posible carácter prebiótico y su ubicuidad permite realizar un estudio comparativo a nivel de dominio, mientras que su relación con la respuesta ante cambios ambientales y de fase estacionaria de crecimiento brinda la interesante posibilidad de estudiar un factor nuevo involucrado en la capacidad de supervivencia de los microorganismos.

## 3. PoliP en *Sulfolobus*

En nuestro laboratorio se han estudiado los mecanismos de adaptación a cambios en el ambiente en *S. acidocaldarius*. Entre ellos, se ha investigado 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 detectó la presencia de gránulos electrodensos probablemente compuestos por poliP (Osorio, 1998). Hasta ese momento no había estudios cuantitativos realizados sobre poliP en microorganismos del dominio *Archaea*. La bibliografía daba cuenta de un aumento de poliP ante estrés térmico y en carencia total de nutrientes en el arqueón halófilo *Halobacterium volcanii* (Scoarughi y col., 1995). Estas observaciones, y la descripción de una proteína asociada al glicógeno en *S. acidocaldarius* con actividad PPK (Skórko y col., 1989) sugerían la existencia de poliP en este microorganismo. Aunque la secuencia -hasta ese momento parcial- del genoma de *S. solfataricus* no mostraba la existencia de un gen *ppk*, las características inusuales de la PPK descrita de *S. acidocaldarius* (Skórko y col., 1989) sugerían que podría tratarse de una proteína no homóloga a las PPKs bacterianas.

Por lo tanto se propuso como objetivo general de esta tesis doctoral caracterizar genética y funcionalmente los componentes involucrados en el metabolismo de los poliP en el género *Sulfolobus* en relación con la respuesta ante factores de estrés ambiental.

Durante el desarrollo de esta tesis se determinó la presencia de poliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*, y sus variaciones ante distintos cambios ambientales. La búsqueda de componentes genéticos involucrados en el metabolismo de los poliP se inició con la caracterización de la proteína de 60 kDa (P60) cuya actividad PPK y GT se había descrito (König y col., 1982; Skórko y col., 1989). El acceso via Internet al genoma completo de *Sulfolobus solfataricus* (<http://niji.imb.nrc.ca/sulfolobus/>) dio un nuevo giro a nuestra investigación ya que se encontró un fragmento homólogo al gen *ppx* de *E. coli* el cual también se caracterizó.



# Materiales y métodos

## 1. Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo

### 1.1 *Sulfolobus acidocaldarius* DSM nro. 639

---

Esta cepa se cultivó en medio 88 (Brock y col., 1972; <http://www.dsmz.de/media/med88.htm>) ajustado a pH 2 y suplementado con 2 g/l de sacarosa y 1 g/l de extracto de levadura. La cepa se inoculó a partir de un cultivo en fase estacionaria al 1% (v/v). Las condiciones de temperatura y agitación fueron 70°C y 180 rpm (agitación orbital) respectivamente. Para el crecimiento a gran escala se utilizaron 12 l de medio de cultivo y un sistema de burbujeo de aire por vacío.

### 1.2 *Sulfolobus solfataricus* DSM nro. 1617

---

*S. solfataricus* se creció a 75°C y 180 rpm en medio 182 (<http://www.dsmz.de/media/med182.htm>) suplementado con 1 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de casaminoácidos. Para el crecimiento en un medio definido, el extracto de levadura se reemplazó por 2 g/l de sacarosa y 0.05 g/l de cada uno de los siguientes

amino ácidos: alanina, asparragina, leucina, glutamina, glutamato, aspartato, histidina, arginina, glicina (Haseltine y col., 1999). El preinóculo consistió en 1 ml de un cultivo crecido hasta fase exponencial media de crecimiento ( $DO_{600}$  0.25) y mantenido en 8% DMSO a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El mismo se inoculó en 50 ml de medio de cultivo y cuando llegó a una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.25 se utilizó como inóculo al 5% (v/v).

### **1.3 Cepas de *Escherichia coli* plasmidios**

---

#### **1.3.1 Cepas de Promega®**

BL21(DE3). Genotipo  $F^{-}$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3),  $Cm^r$  *thi*, *supE*,  $\Delta$  (*lac-proAB*), [*mutS*::Tn10], [ $F'$ , *proAB*, *laqI*<sup>Q</sup> $\Delta$ M15].

JM109. Genotipo *endA1*, *recA1* *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*rk<sup>-</sup>*, *mk<sup>+</sup>*), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$  (*lac-proAB*), [ $F'$ , *traD36*, *proAB*, *laqI*<sup>Q</sup> $\Delta$ M15].

Los medios de cultivo utilizados fueron LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l). En algunos casos el LB se suplementó con 1 mM de iso propil tio- $\beta$ -D-galactósido (IPTG), 80  $\mu\text{g/ml}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactopiranósido (X-Gal), 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (Amp) o 34  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol (Cm).

#### **1.3.2 Plasmidios**

pGEM<sup>®</sup>-T(Promega): pGEM<sup>®</sup>-5ZF(+) linearizado con *EcoRV* y agregado de timidina en los extremos 3' (Robles y col., 1994). Posee alto número de copias (300-700). El tamaño es de 3000 pb. Contiene los promotores de la RNA Polimerasa T7y SP6 flanqueando un sitio de clonamiento múltiple que se encuentra dentro de la región codificante de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Contiene el gen de la  $\beta$ -lactamasa que provee resistencia a Amp.

pGEM<sup>®</sup>-T easy vector (Promega): similar a pGEM<sup>®</sup>-T pero tiene 2 sitios de restricción adicionales en el sitio de clonamiento múltiple. Tamaño: 3015 pb.

pLysS: pACYC184 (Chang y Cohen, 1978) que contiene el gen de la lisozima del fago T7 bajo el control del promotor  $\phi$ 3.8 para la RNA Polimerasa T7. El plasmidio provee resistencia a Cm.

pET-21b(+): los vectores pET (Novagen) son derivados de pBR322. Poseen más de 25 copias por célula. El tamaño es de 5443pb. El pET-21b(+) contiene un promotor T7, el sitio de unión al ribosoma de la proteína mayor de la cápside del fago T7, un sitio de múltiple clonamiento seguido de una secuencia que codifica para seis histidinas, un codón de término y un sitio de terminación de la transcripción del fago T7. El plasmidio provee resistencia a Amp.

pET-21b(+)*p60r*: pET-21b(+) que contiene como inserto el gen *p60* de *S. acidocaldarius* seguida de una secuencia codificante para seis histidinas en su extremo carboxilo terminal.

pGEM<sup>®</sup>-T*ppxSso*: plasmidio pGEM<sup>®</sup>-T que contiene como inserto el gen *ppx* de *S.*



*solfatarius* con su propio codón de término flanqueado por los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I.

pGEM<sup>®</sup>-T<sub>ppxssSso</sub>: plasmidio pGEM<sup>®</sup>-T que contiene como inserto el gen *ppx* de *S. solfataricus* sin su propio codón de término flanqueado por los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I.

pET-21b(+)<sub>ppxSso</sub>: plasmidio pET-21b(+) que contiene como inserto el gen *ppx* de *S. solfataricus* con su propio codón de término.

pET-21b(+)<sub>ppxrSso</sub>: contiene como inserto el gen *ppx* de *S. acidocaldarius* seguido de una secuencia codificante para seis histidinas en su extremo carboxilo terminal.

### 1.3.3 Cepas generadas durante esta Tesis

SC1. BL21(DE3)pLysS pET-21b(+)<sub>p60r</sub>

SC3. BL21(DE3)pLysS pET-21b(+)

SC5. JM109 pET-21b(+)<sub>p60r</sub>

SC13. JM109 pGEM<sup>®</sup>-T<sub>ppxSso</sub>

SC16. JM109 pGEM<sup>®</sup>-T<sub>ppxssSso</sub>

SC19. JM109 pET-21b(+)<sub>ppxrSso</sub>

SC21. BL21(DE3)pLysS pET-21b(+)<sub>ppxrSso</sub>

## 2. Fraccionamientos subcelulares

### 2.1 Obtención de la fracción de membranas de *S. acidocaldarius*

A los tiempos correspondientes, alícuotas de 1 ml de cultivo se centrifugaron a 15000 g durante 5 min, se resuspendieron en igual volumen de tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% sacarosa y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras descongeladas se sometieron a sonicación (8 intervalos de 30 s en hielo) y se centrifugaron a 2200 g durante 5 min. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación (40000 rpm rotor BeckmanTi 50) durante 2 h. La fracción soluble obtenida se llamó fracción citoplasmática y el sedimento fracción membranas. La fracción membranas se trató para electroforesis en geles de poliácilamida (SDS-PAGE) o se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de 50 mM Tris-acetato pH 7.0 y se agregó 5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 10  $\mu\text{g/ml}$  DNasa y RNasa. Ambas fracciones se utilizaron para determinar actividad PFK y proteínas.

### 2.2 Obtención de extractos crudos en *S. solfataricus*

Veinte ml de cultivo se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4500 g. Los sedimentos se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de tampón 50 mM Tris-acetato pH 7.0 y se

sonicaron durante 3 min en hielo, a intervalos de 30 s cada vez. Las suspensiones se centrifugaron a 3000 g durante 5 min para eliminar debris y células enteras y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad PPX.

### **3. Purificación del complejo glicógeno-proteína que contiene a la proteína P60**

Se realizó según lo publicado por Skórko y col., (1989). Se partió de 12 l de cultivo colectado a las 48 h ( $DO_{600}$  0.4-0.6). El mismo se centrifugó 30 min a 7000 g y los sedimentos se lavaron una vez en 50 mM Tris-acetato pH 7.0 y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Luego los sedimentos se resuspendieron en tampón D: 50 mM Tris-acetato pH 7.0, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en la relación 1 g de células (peso húmedo): 1 ml de tampón D y se sometieron a sonicación durante 5 intervalos de 30 s en hielo. El lisado de células se sometió a centrifugación por 10 min a 10700 g y el sobrenadante obtenido se llamó F1. Para obtener el complejo glicógeno-proteína alícuotas de 4 ml correspondientes a la F1 se sometieron a ultracentrifugación (2 h a 37000 rpm, rotor Sorvall 647.5) en gradientes de CsCl. El gradiente se preparó en un volumen total de 60 ml utilizando 15 ml de soluciones de CsCl de densidades 1.79, 1.52, 1.30 y 1.11. Luego de la ultracentrifugación la banda blanquecina correspondiente al glicógeno con densidad de 1.62, se succionó con una pipeta y se sometió a diálisis contra 1000 ml de tampón D durante 20 h, cambiando una vez el tampón. El dializado se diluyó en 10 ml en tampón D y se sedimentó por ultracentrifugación (2 h a 37500 rpm, rotor Sorvall T880). El sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de tampón 50 mM Tris-acetato pH 7.0 y esta muestra, llamada F2 se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para obtener el complejo glicógeno-P60, 4 ml correspondientes a la F2 se aplicaron en un segundo gradiente de CsCl idéntico al anterior. La ultracentrifugación se llevó a cabo a 37500 rpm, en rotor Sorvall T880 durante 48 h. Luego el glicógeno se extrajo y se procedió a dializarlo y sedimentarlo en la forma ya descrita. El sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de tampón 50 mM Tris-acetato pH 7.0 y esta muestra, llamada F3 se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **4. Actividades enzimáticas**

### **4.1 Determinación de la actividad PPK**

---

La actividad enzimática de la PPK de *S. acidocaldarius* se determinó en las condiciones de pH, sales y temperatura establecidos por Skórko y col. (1989) pero siguiendo el

método de Ahn y Kornberg (1990). El ensayo mide la síntesis de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP a partir de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. La reacción se realizó en un volumen final de 250  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía 50 mM Tris-acetato pH 7.0, 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM KCl, 1 mM [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (2000 cpm/nmol). Luego de una hora de incubación a 70°C, la reacción se enfrió 5 min en baño de hielo y se detuvo agregando de 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{HClO}_4$  al 7% y 50 ml de una solución de 20 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). El [ $^{32}\text{P}$ ]poliP se cuantificó en un contador de centelleo líquido luego de su recolección en filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman y lavado con 0.1 M pirofosfato de sodio en 1 M HCl 2 veces y etanol 1 vez. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de incorporar 1 pmol de Pi en poliP por minuto a 70°C.

#### 4.2 Determinación de la actividad glicosil transferasa (GT).

El ensayo de actividad GT se realizó de acuerdo con König y col. (1982). La reacción se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  de una solución conteniendo 50 mM Tris-acetato pH 7.0, 1 mM EDTA, 22 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 mM UDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]glucosa (0.8 mCi/mol). La reacción se detuvo con 117  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto. El glicógeno se cuantificó en un contador de centelleo líquido luego de su recolección en filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman y lavado con etanol 70% 2 veces. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de glucosa en glicógeno por minuto a 70°C.

#### 4.3 Determinación de la actividad PPX

La actividad PPX se determinó midiendo la hidrólisis de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP (Akiyama y col., 1993). La mezcla de reacción (50  $\mu\text{l}$ ) contenía 50 mM Tris-acetato pH 7, 100 mM KCl 10 mM  $\text{MnCl}_2$  y 250  $\mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ]poliP. El  $\text{MnCl}_2$  se agregó al final para evitar la precipitación del poliP. Luego de incubar 15 min a 50°C, la mezcla de reacción se enfrió 5 min en baño de hielo y se inactivó agregando 50  $\mu\text{l}$  de 7%  $\text{HClO}_4$  y 5  $\mu\text{l}$  de 20 mg/ml BSA para precipitar el [ $^{32}\text{P}$ ]poliP remanente, el que se cuantificó en un contador de centelleo líquido luego de su recolección en filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman y lavado con 0.1 M pirofosfato de sodio en 1 M HCl 2 veces y etanol 1 vez. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 pmol de Pi del poliP por minuto a 50°C.

### 5. Métodos de análisis de poliP

#### 5.1 Síntesis *in vitro* de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP<sub>700</sub> a expensas de PPK recombinante (PPKr) de *E. coli*

##### 5.1.1 Síntesis de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP<sub>700</sub> como marcador

Se realizó según Ault-Riché y col., (1998) en un volumen de 0.35 ml de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 40 mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM creatina-fosfato, 20  $\mu\text{g/ml}$  creatina fosfoquinasa (CPK), 1 mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (0.142  $\mu\text{Ci/nmol}$ ), 35000 U de PPKr de *E. coli* (Kumble y col., 1996). La reacción se incubó 30 min a 37°C y se detuvo agregando 35  $\mu\text{l}$  de 0.5 M EDTA. La cinética de reacción se siguió mediante cromatografía ascendente en capa delgada (TLC) en placas de polietilenimidacelulosa (Merck) utilizando como solvente una solución 0.75 M de  $\text{KHPO}_4$  a pH 3.5.

### **5.1.2 Síntesis de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}_{700}$ como sustrato**

Se realizó en forma similar a la sección anterior, según Ault Riché y col., (1998) pero aumentando el volumen de reacción a 10 ml y reduciendo 14 veces la actividad específica del  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Se utilizaron 90000 U de PPKr de *E. coli* y la reacción se incubó por 3 h a 37°C

## **5.2 Purificación de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}_{700}$ sintetizados *in vitro***

---

### **5.2.1 A pequeña escala**

Se realizó según Ault-Riché y col. (1998). La reacción de síntesis *in vitro* de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}_{700}$  (0.35 ml) se aplicó en un colchón formado por 1.9 ml de 2.5 M CsCl en 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA. Luego de 4 h de centrifugación a 45000 rpm, rotor Sorvall AH-650, el gradiente se dividió en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ . Para precipitar el poliP, se agregó a cada una de estas alícuotas 140  $\mu\text{l}$  de isopropanol y las mismas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, seguido de centrifugación por 30 min en centrífuga Eppendorf a 13000 rpm. Los sedimentos se lavaron con 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, se secaron durante la noche por vacío y se resuspendieron en 25  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril. Para determinar la presencia y cantidad de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}$  se analizó la radiactividad de alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  de estas fracciones. La presencia de radiactividad fue detectada en la alícuota correspondiente a la fracción inferior del gradiente. La identidad y pureza del poliP obtenido se confirmó según se explica en la sección 5.3 de este capítulo. Típicamente se obtuvo una solución 4 mM de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}$  con una actividad específica de 200 cpm/pmol.

### **5.2.2 A gran escala**

La reacción de síntesis (10 ml) se aplicó en un colchón de 55 ml de 2.5 M CsCl en 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA. La centrifugación se realizó durante 16 h a 30000 rpm (rotor Sorvall 647.5). El gradiente se dividió en alícuotas de 5 ml, y a cada una se agregó 3.5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente 30 min, seguido de centrifugación 30 min a 11500 rpm (rotor Beckman AJ-20). Los sedimentos se lavaron con 3.5 ml de etanol al 70%, se secaron durante la noche por vacío y se resuspendieron en 600  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril. La presencia y cantidad de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}$  se estimaron según se indicó anteriormente. Típicamente se obtuvo una solución 8 mM de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{poliP}$  con una actividad específica de 13 cpm/pmol.

---

### 5.3 Análisis de poliP mediante hidrólisis por PPX de *Saccharomyces cerevisiae* (PPXSce)

---

Se realizó según Wurst y col. (1995) en un volumen de 20  $\mu$ l conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 50 mM  $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 200  $\mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ]poliP<sub>700</sub> y 6000 U de PPXSce (Wurst y col., 1995). La reacción se incubó a 37°C y la cinética de reacción se siguió mediante TLC en placas de polietilenimidacelulosa (Merck) utilizando como solvente 0.75 M  $\text{KHPO}_4$ , pH 3.5.

---

### 5.4 Extracción de poliP endógeno de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*

---

A los tiempos correspondientes, alícuotas de 1 ml de cultivo se centrifugaron durante 2 min en centrífuga eppendorf y los sedimentos se resuspendieron en 0.3 ml de 4 M isotiocianato de guanidina (GITC), 50 mM Tris-HCl pH 7.0 precalentado a 95°C. La suspensión se mezcló por vortex, se incubó a 95°C por 3 min y se sonicó 30 s 3 veces. Se reservó una alícuota de 10  $\mu$ l de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30  $\mu$ l de 10% SDS y luego de incubación a 95°C durante 2 min, se agregó 300  $\mu$ l de 50% etanol y 5  $\mu$ l de microperlas de vidrio Glassmilk® (Bio 101). Luego de agitación por vortex y de incubar 30 s a 95°C, los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 1 min y el sedimento de Glassmilk® se resuspendió por vortex en 0.5 ml de "buffer New Wash" frío (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50% etanol) y se centrifugó a 13000 g durante 30 s. El sedimento que contenía el poliP, DNA y RNA unido a Glassmilk, se resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNasa y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNasa y se incubó a 37°C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200  $\mu$ l de "buffer New Wash" para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos. El poliP unido al Glassmilk® se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 25  $\mu$ l de agua cada vez, incubando 2 min a 95°C y centrifugando a 13000 rpm para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (50  $\mu$ l) se congeló a -20°C hasta su cuantificación.

---

### 5.5 Cuantificación de poliP

---

La reacción se realizó según Ault-Riché y col. (1998) en base a la actividad reversa de la PPK (en exceso de ADP) de la PPKr de *E. coli* (Kumble y col., 1996). El ensayo se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l en tampón 50 mM Hepes-KOH pH 7.2, 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM ADP, 5000 unidades de PPKr y 5  $\mu$ l solución conteniendo el poliP. La incubación se realizó 45 min a 37°C. La reacción se interrumpió por calentamiento (2 min a 95°C) y luego la mezcla se diluyó 1:5, 1:25 y 1:50. Alícuotas de 50  $\mu$ l de estas diluciones se ensayaron con 50  $\mu$ l de luciferasa (Boehringer). El ATP generado por la PPK se cuantificó midiendo la luz emitida en un luminómetro Lumi/96 de Bioscan.

## 5.6 Microscopía electrónica

---

Se realizó según Gonzalez y Jensen (1998). Diez  $\mu\text{l}$  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 por vacío. Las células se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 a 80 kV.

## 6. Análisis de proteínas

### 6.1 Marcación de proteínas *in vivo* con $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$

---

Se realizó según Skórko (1984) con las siguientes modificaciones: 200 ml de un cultivo que había alcanzado una  $\text{DO}_{600}$  de 0.8 por centrifugación (15 min a 5500 g) se resuspendió en 40 ml de medio 88 conteniendo 0.2% de sacarosa y con una reducción de fosfato de 1/100. Inmediatamente se agregó 5 mCi de  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  y el cultivo se incubó por 36 h más a 140 rpm y 70°C.

### 6.2 Preparación de las fracciones para electroforesis en geles de poliacrilamida

---

#### 6.2.1 Muestras para electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

##### 6.2.1.1 Proteínas totales

Diez mg de células (peso húmedo) se resuspendieron en 100 ml de agua destilada y se trataron con 50  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 3X: 0.187 M Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glicerol, 15%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.06% azul de bromofenol (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min, se centrifugaron brevemente para eliminar debris y 3 a 5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se aplicaron en los pocillos de los geles.

##### 6.2.1.2 Fracciones correspondientes a la purificación del complejo glicógeno-proteína

Alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  correspondientes a las tres fracciones se trataron con 5  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 3X: 0.187 M Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glicerol, 15%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.06% azul de bromofenol (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y se centrifugaron brevemente para tomar el sobrenadante.

### 6.2.2 Muestras para electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio (NEPHGE)

Se trataron como lo describe O'Farrell y col. (1977). Alícuotas de 50 µl correspondientes a la F2 se secaron durante una hora por centrifugación al vacío y se guardaron a -20°C. Luego se resuspendieron en 20 µl de tampón de lisis (9.5 M urea; 2% Nonidet; 1.6% anfolitos 5-7; 0.4% anfolitos 3-10; 5% β-mercaptoetanol) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente.

## 6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los geles de poliacrilamida en presencia de SDS para electroforesis en placa (SDS PAGE) se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970). El gel concentrador se preparó al 3% y el gel separador al 12%. Las electroforesis se corrieron a 200 V, hasta que el colorante indicador alcanzara el borde inferior del gel. Para la tinción se empleó 0.2% de Azul de Coomassie en 25% de metanol y 7.5% de ácido acético por 1 h. Luego los geles se destiñeron mediante lavados sucesivos con una solución de 25% metanol y 7.5% de ácido acético y se secaron por vacío a 80°C.

## 6.4 Electroforesis bidimensional de proteínas

Se utilizó la técnica descrita por O'Farrell (1975) y O'Farrell y col. (1977) en condiciones de no-equilibrio (NEPHGE). La primera dimensión consistió en una electroforesis en gradiente de pH de 3-10 durante 5.5 h a 400 V. Para la segunda dimensión se utilizó un gel de SDS-poliacrilamida al 11.5%. El método de tinción fue el mismo que se utilizó para SDS-PAGE. En los casos en que se emplearon proteínas marcadas radiactivamente con <sup>32</sup>P los geles una vez secos, se expusieron a películas autorradiográficas y se revelaron a los 7 días.

## 6.5 Preparación de las proteínas para microsecuenciación del extremo amino terminal y de péptidos internos

Las manchas proteicas se escindieron de los geles secos sobre papel de filtro con bisturí y se hidrataron en 500 µl de 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1% SDS durante 2 h a temperatura ambiente. Luego los fragmentos hidratados se aplicaron a los pocillos de un gel de poliacrilamida desnaturante al 12 % y se agregó 25 µl de tampón de carga 1X y se corrieron a 40 V hasta que la muestra atravesó el gel concentrador y luego a 100 V. El gel se trató de la siguiente forma: para microsecuenciación del extremo amino terminal, las proteínas se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinilideno (PDVF) (Matsudaira, 1989). La transferencia se realizó durante 0.8 h a 0.8 A y la visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con 0.1% de Azul de Coomassie en 50% de metanol por 5 min. La membrana se destiñó con una solución de 50% de metanol y 10% de ácido acético.

Para la digestión enzimática y secuenciación del extremo amino terminal de péptidos internos, el gel se fijó con una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético durante 10 min, se tiñó con una solución de 3% amidoblack-10B en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante la noche y se destiñó con agua bidestilada. La mancha proteica se escindió del gel húmedo y se secó por centrifugación al vacío.

## **6.6 Digestión enzimática para la obtención de péptidos internos y separación de los mismos**

---

Se realizó en el Laboratorio de Microsecuenciación de Proteínas del Instituto Pasteur, París. La digestión se realizó con endolisina C y la separación de los péptidos obtenidos se realizó por HPLC.

## **6.7 Microsecuenciación del extremo amino terminal de proteínas y péptidos internos**

---

La microsecuenciación se realizó por degradación de Edman (Matsudaira, 1989) en el Laboratorio de Microsecuenciación de Proteínas del Instituto Pasteur, París. La comparación de las secuencias obtenidas con proteínas en bases de datos se realizó utilizando el algoritmo BLAST versión 2.0 (Altschul y col., 1997).

## **6.8 Determinación cuantitativa de proteínas**

---

Se realizó según el método de Bradford (Coomassie Plus Protein Assay Reagent; Pierce).

# **7. Técnicas de Biología Molecular**

## **7.1 Purificación de DNA**

---

### **7.1.1 Extracción de DNA genómico de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus***

El DNA genómico se obtuvo a partir de cultivos de 48 h mediante Wizard® genomic DNA purification kit (Promega). El mismo se basa en una lisis celular seguida de digestión enzimática del RNA, precipitación de las proteínas y posteriormente precipitación del DNA genómico con isopropanol y redisolución en agua. El rendimiento fue de 7 µg DNA/mg células (peso húmedo).

### **7.1.2 Purificación de amplificadores de PCR y otros DNAs desde geles de agarosa**



Se realizó con Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). El método se basa en la escisión de la banda desde el gel de agarosa con bisturí y fundido de la agarosa a 37°C en presencia de una resina que une el DNA. La resina se aplica a una mini columna y luego de dos lavados con isopropanol, el DNA se eluye con agua mediante centrifugación. Para fragmentos de entre 200 -3200 pb el método tiene una recuperación de por lo menos 60%.

### **7.1.3 Extracción de plasmidios desde cultivos de *E. coli***

#### **7.1.3.1 A pequeña escala**

Se utilizó Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) basado en una lisis celular alcalina, seguida de neutralización y centrifugación. El sobrenadante se aplica en una mini columna que contiene una resina que une el DNA plasmidial. La resina se lava con isopropanol y el DNA plasmidial se eluye con agua por centrifugación. Típicamente, el método tiene un rendimiento de 1.8-4.1 µg/ml de cultivo para un plasmidio de alto número de copias como el pGEM<sup>®</sup>-T.

#### **7.1.3.2 A gran escala**

Se utilizó Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification system (Promega) también basado en el método de lisis alcalina clásico y purificación del ADN por medio de resinas de unión.

### **7.1.4 Purificación de productos de digestión mediante fenol-cloroformo**

Se realizó de acuerdo con Sambrook y col. (1989). Brevemente, se partió de un volumen de 80 µl de la solución de DNA y se le agregaron 100 µl de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en la relación 25:24:1. En estas condiciones, las proteínas pasan a la fase fenólica mientras que el DNA permanece en la fase acuosa. Luego se realizó una segunda extracción con 100 µl de cloroformo-alcohol isoamílico en la relación 24:1. Para extraer la fase acuosa residual, se agregaron 100 µl de agua siguiendo los mismos pasos de extracción. El DNA obtenido en las 2 fracciones (aproximadamente 200 µl) se precipitó con 1.5 µl de una solución de 20 µg/µl de glicógeno y 8 µl de 5 M NaCl (agitando por vortex) y se agregaron 800 µl de 90% de etanol. Se mezcló por inversión y se incubó 30 min en hielo (o toda la noche a -20°C). Luego el DNA se centrifugó 30 min a 14500 g (4°C) y se recuperó como un sedimento blanquecino. El sedimento se lavó con 500 µl de 70% de etanol, agitando por inversión y centrifugando 10 min a 14500 g y se secó a 37°C por 5 a 15 min. Finalmente, el DNA se resuspendió en 35 µl de agua bidestilada estéril.

## **7.2 Cuantificación de DNA**

La cuantificación del DNA genómico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) de una dilución 1:50 de la solución de DNA obtenida (Sambrook y col., 1989). Una  $A_{260}$

igual a 1 corresponde a una solución de DNA de 50 mg/ml. La pureza del DNA obtenido se estimó mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ .

### **7.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

---

Para visualizar la calidad y el tamaño del DNA cromosomal, plasmidial o los fragmentos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% en tampón TAE 0.5X (20 mM Tris-acetato pH 8.0, 0.5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con tampón de carga 10X (20% Ficoll 400, 0.1 M EDTA 1% SDS, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% xilen cianol). La tinción se realizó durante 10 min a una concentración de bromuro de etidio de 0.2 µg/ml en TAE 0.5X. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm.

### **7.4 Partidores y determinaciones de PCR**

---

#### **7.4.1 DOP-PCR (“degenerate oligonucleotide primer polymerase chain reaction”)**

Los partidores degenerados (DOPs) para DOP-PCR se diseñaron a partir de las secuencias de los extremos amino terminal de la proteína P60 y de extremos amino terminal de péptidos internos y se sintetizaron por Genset Corporation®. La Taq polimerasa utilizada fue de Promega y se siguieron las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 80 ng de DNA genómico, 60 pmoles de cada partidor, 0.1 mM dNTPs, 5% DMSO en un volumen de reacción de 50 µl. Las condiciones de reacción se ajustaron de acuerdo con los pares de partidores utilizados y el tamaño esperado del fragmento a amplificar. Típicamente, los pasos fueron los siguientes: 3 min a 95°C seguidos de 30 ciclos a 95°C por 30 s, 40°C por 30 s, 72°C 30 s y luego 3 min a 72°C. Luego se agregó 3 µl de tampón de carga 10X y 14 µl de esta muestra se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TAE 0.5X. El gel se tiñó con la solución de bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados se escindieron del gel y se purificaron según lo descrito anteriormente.

Los DOPs utilizados fueron los siguientes:

P60NH2DD (5'-YTNAARCAYGTNTGGATGAT-3'),

P6021DD (5'-ATHATHGAYWSNTGGAAYAT-3'),

P6021DR (5'-ATRTTCCANSWRTCWATWAT-3'),

P6027DD (5'-ACNGARGAYMGNGCNGARAT-3'),

P6027DR (5'-ARNACYTCNARYTCRTCRAA- 3').

R (A,G); Y (C,T); M (A,C); S (G,C); W (A,T); H (A,T,C) N (A,C,G;T)

#### **7.4.2 PCR inversa**

Se realizó de acuerdo con Ochman et al. (1990), utilizando Elongasa (GIBCO BRL) y de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se usaron 45 pmol de los partidores no

degenerados P60ND3R (5'-AGACTAGCTACTTTCTCTAC-3') y P60ND5D (5'-CTTCTCTTCTGGTTCCATAG-3') y 30 ng de DNA total de *S. acidocaldarius* digerido con *XhoI* y religado en un volumen de 50 µl. Las concentraciones de dNTPs y DMSO fueron 0.1 mM y 5% respectivamente. Las condiciones de reacción fueron 3 min at 95°C seguidos de 30 ciclos a 95°C por 30 s, 52°C por 30 s y 68°C por 4 min, y luego 5 min a 68°C.

#### 7.4.3 Amplificación del gen *p60* de *S. acidocaldarius*

El gen *p60* se obtuvo por PCR a partir del DNA genómico de *S. acidocaldarius* utilizando los partidores no degenerados P60NNdel y P60CAval2 correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen y que contenían los sitios de restricción para las enzimas *Ndel* y *Aval*. Las secuencias de los partidores son:

P60NNdel: 5'TTAACATATGAAGAGATATGAAAGCCT3'

P60Caval2: AATACTCGAGAAATGATGCTAACAGTCTAT3'

La *Pwo* DNA Polimerasa utilizada fue de Boehringer Mannheim y se siguieron las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 80 ng de DNA genómico, 400 ng de cada partidador, y 0.1 mM dNTPs en un volumen de reacción de 50 µl. Los pasos fueron los siguientes: 3 min a 95°C seguidos de 22 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s, 72°C 2 min, y luego 3 min a 72°C. Luego se agregó 3 µl de tampón de carga 10X y 14 µl de esta muestra se corrieron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0.5X. El gel se tiñó con la solución de bromuro de etidio y los fragmentos amplificados se escindieron del gel y se purificaron según lo descrito anteriormente.

#### 7.4.4 Amplificación del fragmento genómico que comprende los ORFs c50 004 y c50 003 de *S. solfataricus*

La región c50 004-c50 003, que compone el gen *ppx* de *S. solfataricus* se obtuvo por PCR a partir del DNA genómico utilizando los pares de partidores no degenerados C5004NNdel y C5003CXhoIH correspondientes a los extremos 5' del ORF c50 004 y 3' del ORF c50 003, sin su propio codón de término (*ppxssSso*) y C5004NNdel y C5003CXhoI correspondientes a los extremos 5' del ORF c50 004 y 3' del ORF c50 003, con su propio codón de término (*ppxSso*). Los partidores contenían los sitios de restricción para las enzimas *Ndel* y *XhoI* según se indica por su denominación *Ndel* o *XhoI*, respectivamente. Las secuencias de los partidores son:

C5004NNdel: 5' TTCATATGATATCGGCAGTTATAG 3'

C5003CXhoIH: 5' GCCTCGAGTACTCTTACACCGACAACGTACT 3'

C50003CXhoI: 5' TACTCGAGTCATACTCTTACACCGACAACG 3'

La reacción de PCR se realizó en las mismas condiciones que la sección anterior. Los pasos fueron los siguientes: 3 min a 95°C seguidos de 20 ciclos a 95°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C 2 min, y luego 3 min a 72°C.

#### 7.4.5 PCR en colonias

Se utilizó como templado 2 µl de una suspensión celular obtenida picando cada colonia con una punta estéril y resuspendiéndola en 100 µl de agua destilada estéril. La reacción se realizó en un volumen de 10 µl conteniendo 15 pmol de partidores, 0.1 mM dNTP y 0.2 unidades de Taq polimerasa.

## **7.5 Digestiones de DNA con enzimas de restricción**

---

### **7.5.1 Digestión de DNA total de *S. acidocaldarius***

El DNA genómico de *S. acidocaldarius* fue digerido con distintas enzimas de restricción de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Típicamente, 5 µg de DNA se digirieron con 10 unidades enzimáticas en un volumen de 50 µl. El tiempo de reacción fue de 4 h y la temperatura de 37°C. La reacción se detuvo agregando de 4 µl de tampón de carga 10X.

### **7.5.2 Digestión de productos de PCR**

100 ng de amplificado se digirieron con 10 unidades enzimáticas de la enzima de restricción correspondiente en un volumen de 50 µl durante 2 h a 37°C.

### **7.5.3 Digestión de pET21-b(+) y de pGEM<sup>®</sup>-TppxssSso**

1 µg de plasmidio se digirió con 10 unidades enzimáticas de la enzima de restricción correspondiente en un volumen de 50 µl durante 2 h a 37°C.

## **7.6 Ensayo de Southern blot**

---

El DNA de *S. acidocaldarius* digerido con distintas enzimas de restricción se separó mediante electroforesis en 0.9% de agarosa en TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) durante 12 h a 20 V. Luego de la electroforesis el DNA se desnaturó y se transfirió a una membrana de Nylon (Hybond-N+, Amersham<sup>®</sup>) según el método de capilaridad. La prehibridación e hibridación se realizaron a 42°C con "DIG Easy buffer" (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>). La sonda de 500 pb marcada con digoxigenina se obtuvo por PCR utilizando el PCR dig Probe System (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>) utilizando partidores diseñados a partir de la secuencia de los fragmentos amplificados por DOP-PCR. Las secuencias de los partidores P60ND2D y P60ND2R son 5'TTAAAGGACTGGATTACAAC3' y 5'TATTTTCAGCCCTATCCTCAGT3' respectivamente. La detección de los fragmentos de DNA marcados con digoxigenina se realizó por quimioluminiscencia con DIG Luminiscent Detection Kit for Nucleic Acids (Boehringer Mannheim).

## **7.7 Ligaciones de DNA**

---

### 7.7.1 Ligación de DNA genómico para PCR inversa

200 ng de DNA genómico de *S. acidocaldarius* digerido con *Xho*I se incubaron en un volumen de reacción de 100 µl con 3 unidades de T4 DNA ligasa (Promega) a 15°C durante la noche. En estas condiciones se favorece la circularización de los fragmentos de DNA lineal.

### 7.7.2 Ligaciones de vectores con fragmentos de PCR

#### 7.7.2.1 Fragmento del gen *p60* obtenido por DOP-PCR

Se utilizaron 50 ng del vector pGEM<sup>®</sup>-T y 30 ng de fragmento de PCR (o lo necesario para alcanzar una relación molar inserto-vector entre 1:1 a 3:1) 3 unidades de T4 DNA ligasa (Promega) en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a 4°C durante la noche.

#### 7.7.2.2 Gen *p60*

Se utilizaron 25 ng del vector pET-21b(+), y 20 ng del gen amplificado por PCR (o lo necesario para alcanzar una relación molar inserto-vector entre 1:1 a 3:1) 3 unidades de T4 DNA ligasa (Promega) en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a 4°C durante la noche.

#### 7.7.2.3 Genes *ppxssSso* y *ppxSso*

Previamente a la ligación de los amplificados por PCR se les realizó un tratamiento de "A-Tailing". Brevemente, se incubaron 140 ng del fragmento con 1 unidad de Taq Polimerasa y 0.2 mM ATP en un volumen final de 20 µl durante 20 min a 70°C.

Para la ligación, se utilizó el sistema pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega). 25 ng de vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector y 14 ng del amplificado de PCR se incubaron con 3 unidades de T4DNA ligasa en un volumen final de 10 µl a 4°C durante la noche.

Para la ligación del fragmento *ppxssSo* con el vector pET-21b(+), ambos digeridos con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I, se utilizaron 25 ng del vector y 20 ng del fragmento y se trataron según la sección anterior.

## 7.8 Transformaciones

### 7.8.1 Con reacciones de ligación

Las células competentes de *E. coli* JM109 (Promega) poseen una eficiencia de transformación de más de  $1 \times 10^8$  ufc/µg de DNA por lo que son adecuadas para transformar productos de ligación. Se utilizaron 25 µl de células y 5 µl de la reacción de ligación. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 1 min a 42°C, retornando el tubo inmediatamente al hielo. Luego se agregó 950 µl de medio SOC (Promega), se incubó 45

min a 37°C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200 µl en placas de Petri con agar LB Amp/IPTG/X-Gal. El catastro de colonias recombinantes se realizó visualmente (colonias blancas) y por PCR de las colonias).

### **7.8.2 Con vectores**

Se utilizaron 50 µl de células de *E. coli* JM109 o de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y 50 ng de vector. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 1 min a 42°C, retornando el tubo inmediatamente al hielo. Luego se agregó 950 µl de medio SOC (Promega), se incubó 45 min a 37°C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200 µl en placas de Petri con agar LB Amp/Cm. El catastro de las colonias transformantes se realizó por PCR.

## **7.9 Secuenciación de DNA**

---

### **7.9.1 Templados utilizados**

Para obtener suficiente cantidad de fragmento de DNA obtenido por PCR se realizaron 3 reacciones de PCR y los amplificados se purificaron como se describió en la sección 7.1.2 y se concentraron utilizando Microcon 10 (Millipore) hasta una concentración de 10 ng/µl.

### **7.9.2 Métodos de secuenciación**

En el laboratorio se utilizó el dsDNA Cycle Sequencing System de GIBCO BRL. El método se basa en sucesivos ciclos de síntesis de DNA complementario a la hebra de DNA que se quiere secuenciar (Sanger y col., 1977; Murray 1989). En otros casos la secuenciación se realizó en forma automatizada utilizando un secuenciador ABI PRISM modelo 377 del servicio de secuenciación de la Universidad Católica de Chile o de Lankenau Medical Research Center, Wynnewood, USA.

Las secuencias obtenidas se compilaron y analizaron con el sistema computacional UWGCG (Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.

## **8. Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

### **8.1 P60 recombinante (P60r)**

---

Se crecieron 5 ml de cultivo de la cepa SC1 de *E. coli* durante la noche. Cuatro ml de este cultivo se colectaron por centrifugación durante 5 min a 9000 g. Las células se resuspendieron en 1 ml de LB fresco y se utilizaron como inóculo para 400 ml de cultivo.

El cultivo se incubó a 37°C a 200 rpm y cuando alcanzó una  $DO_{600}$  de 0.6 se agregó 2 mM IPTG. Luego de 3 h las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4500 g y el sedimento se resuspendió en 40 ml de tampón de unión (5mM imidazol, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7.9).

La purificación de la P60r se realizó en condiciones desnaturantes. Primero se realizó una ruptura celular por sonicación durante 1 min 30 s (en intervalos de 30 s). Luego de una centrifugación a 20000 g durante 15 min, el sedimento o fracción de membranas (FM) se resuspendió en 10 ml de tampón de unión 6 M urea y se incubó durante 1 h en hielo. La muestra se centrifugó a 24000 rpm en rotor T880 durante 20 min y el sobrenadante se filtró con filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m para ser aplicado en una columna conteniendo 1.5 ml de resina His Bind Resin (Novagen) equilibrada con 50 mM  $NiSO_4$ . La elución se realizó con 9 ml de tampón de elución (300 mM imidazol, 0.25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 M urea). Las fracciones recolectadas (0.5 ml) fueron analizadas por SDS-PAGE. La renaturación se llevó a cabo por diálisis en Tris-acetato 50 mM pH 7.0 disminuyendo en cada cambio de tampón la concentración de urea a 4 M, 2 M para finalmente eliminarla.

## 8.2 PPX recombinante de *S. solfataricus* (PPXrSso)

Se crecieron 5 ml de cultivo de la cepa SC21 de *E. coli* durante la noche y se colectaron por centrifugación durante 5 min a 9000 g. Las células se resuspendieron en 1 ml de LB fresco y se utilizaron como inóculo para 500 ml de cultivo. El cultivo se incubó a 37°C a 200 rpm y cuando alcanzó una  $DO_{600}$  de 0.5 se agregó 1 mM IPTG. Luego de 2 h las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4500 g y el sedimento se resuspendió en 5 ml de "1X Ni-NTA bind buffer" (10 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8.0) y se agregó lisozima 250  $\mu$ g/ml. Se incubó 10 min en baño de hielo seguido de sonicación durante 1min 30 s (en intervalos de 30 s) y se centrifugó durante 30 min a 20000 g. El sedimento o fracción de membranas (FM) se resuspendió en 5 ml de "1X Ni-NTA bind buffer" 8 M urea y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego se centrifugó durante 30 min a 10000 g (temperatura ambiente) y al sobrenadante se le agregó 1 ml de resina Ni-NTA His Bind resin (Novagen). Luego de incubar durante 1 h con agitación la suspensión se aplicó en una columna. La resina se lavó dos veces con 4 ml de "1X Ni-NTA Wash buffer" (20 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8.0, 8 M urea) y la proteína se eluyó con 4 ml de "1X Ni-NTA Elute buffer" (250 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8.0, 8 M urea). Las fracciones recolectadas (0.5 ml) se analizaron por SDS-PAGE. La renaturación se llevó a cabo por diálisis en 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 15% glicerol disminuyendo la concentración de urea sucesivamente a 2 M, 500 mM y 100 mM para finalmente eliminarla.

## 9. Métodos Bioinformáticos

Los análisis de búsqueda de similitud entre secuencias proteicas se realizaron con el programa BLASTP y PSI BLAST (Altschul y col., 1997) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del sitio Web del genoma de *S. solfataricus* (<http://niji.imb.nrc.ca/sulfolobus/>).

Los alineamientos múltiples se realizaron con ClustalW 1.8 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) y se editaron con BOXSHADE 3.21 ([http://www.isrec.isbsib.ch:8080/software/BOX\\_form.html](http://www.isrec.isbsib.ch:8080/software/BOX_form.html)).

La búsqueda de dominios conservados se realizó con el programa RPS-BLAST 2.1.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>).

La identificación de sitios potenciales de fosforilación de la P60 se realizó con el programa de búsqueda de sitios consenso de fosforilación Phosphobase (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/index.html>; Kreegipuu y col., 1999).

## **10. Números de acceso a base de datos de las secuencias nucleotídicas**

Las secuencias nucleotídicas de los genes p60 (*glgA*) de *S. acidocaldarius* y *ppx* de *S. solfataricus* están disponibles en GenBank bajo los nros. AJ294724 y CAC39441 respectivamente.



# Resultados

## 1. PoliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*

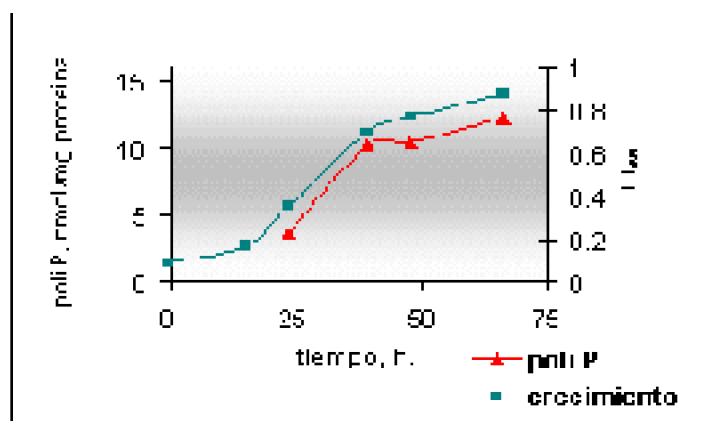
El primer indicio sobre la presencia de poliP en *S. acidocaldarius* se tuvo mediante la observación de gránulos electrodensos por microscopía electrónica (Cardona y col., 2001 a; anexo 2). Sin embargo, estos gránulos no son una prueba concluyente de la presencia de poliP ya que estos cuerpos electrodensos pueden corresponder a otros compuestos como la glucosa pentakis (difosfato) (Hensgens y col., 1996). Para confirmar la presencia de poliP se decidió utilizar el método cuantitativo desarrollado por Kornberg (Ault-Riché y col., 1998), que se basa en una extracción de los poliP por unión a microperlas de vidrio (glassmilk) y análisis mediante tratamiento con la PPKr de *E. coli* en exceso de ADP. El ATP liberado es cuantificado con la reacción de la luciferasa. De esta forma se puede confirmar la presencia de poliP en una forma más específica.

### 1.1 PoliP durante el crecimiento en medio rico

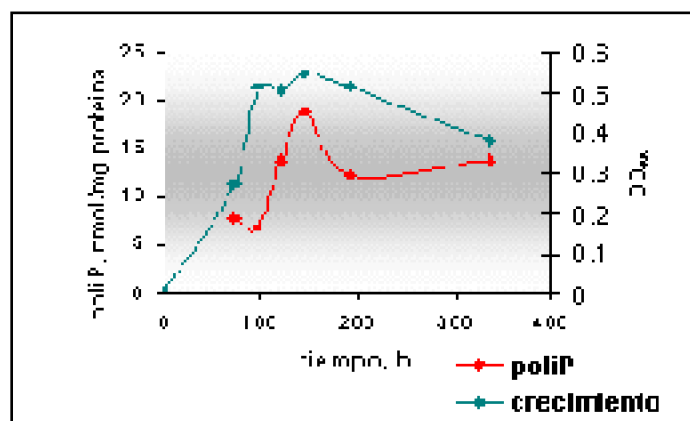
---

Los poliP se midieron durante el crecimiento de *S. acidocaldarius* (Fig. 6a) y en *S. solfataricus* (Fig. 6b). Además de confirmarse la presencia de poliP en ambos microorganismos se observó que los niveles de poliP relativos a los niveles de proteína

fueron más altos en la fase estacionaria que en la fase exponencial.



a) *S. acidocaldarius*



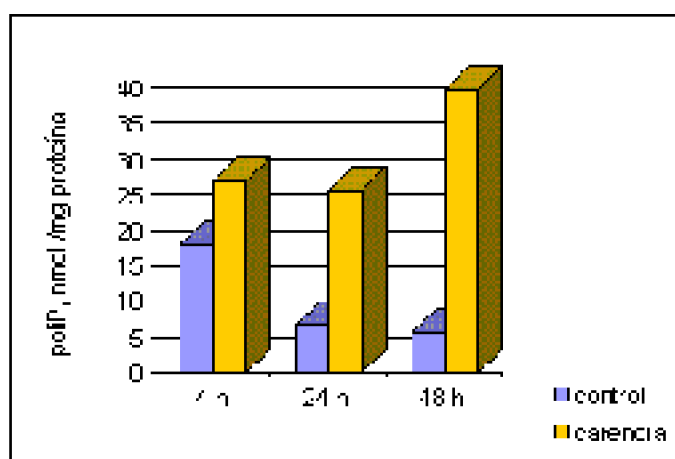
b) *S. solfataricus*

Figura 6. Niveles de PoliP durante el crecimiento. Los cultivos de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* se crecieron en medio 88 con extracto de levadura y medio 182 con extracto de levadura y casaminoácidos, respectivamente. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 1 ml para medir la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) y para la extracción de poliP. Los niveles de poliP se determinaron por tratamiento con PPKr y cuantificación del ATP liberado por el método de la luciferasa.

## 1.2 Niveles de PoliP durante carencias nutricionales en *S. solfataricus*

Para determinar si los niveles de poliP aumentan ante factores de estrés se crecieron cultivos de *S. solfataricus* en medio rico hasta la fase exponencial ( $DO_{600}$  correspondiente a 0.25), se colectaron las células y se resuspendieron en el mismo medio o en un medio sin fuente de carbono ni aminoácidos, continuándose el crecimiento por 48 h más. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se determinaron la  $DO_{600}$  y los

niveles de poliP (Fig. 7a). El crecimiento continuó hasta una  $DO_{600}$  de 0.6 a las 48 h. en el cultivo control mientras que en el cultivo sometido a la condición de carencia el crecimiento se detuvo. Los niveles de poliP relativos a los niveles de proteínas disminuyeron con el tiempo en las células control, mientras que en las células sometidas a la carencia, los niveles de poliP relativos a los niveles de proteínas aumentaron en todos los tiempos analizados con respecto a las células control, incrementándose hasta 8 veces a las 48 h. Además en las células sometidas a la carencia se observó la presencia de 1 ó 2 gránulos electrodensos aumentados de tamaño (Fig.7b, carencia) mientras que en las células control se observaron a lo sumo un gránulo de muy pequeño tamaño (Fig. 7b, control).



b)

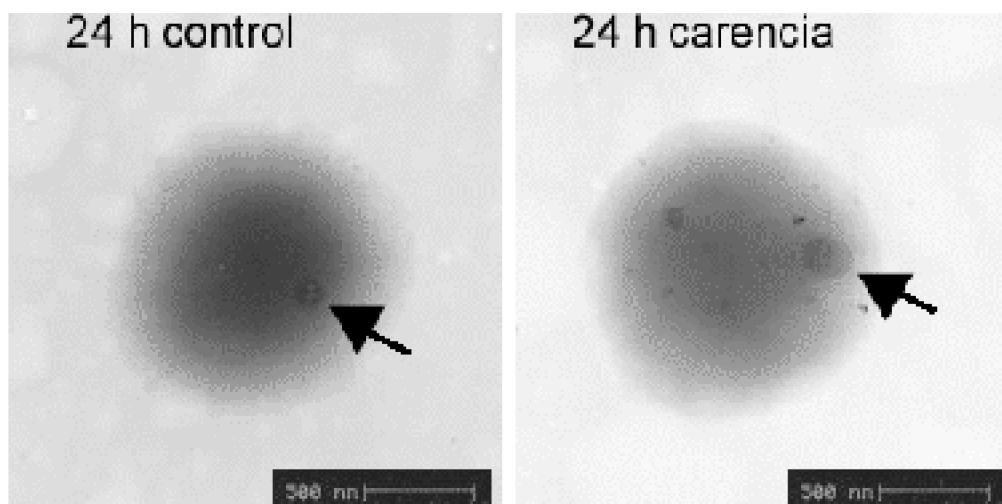


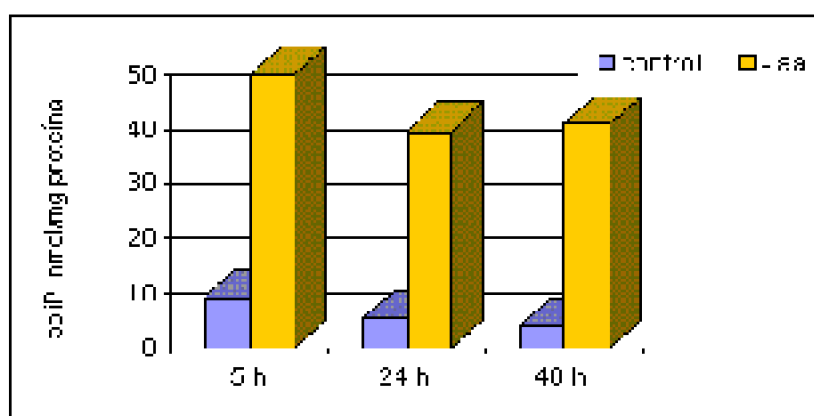
Figura 7. PoliP durante carencias nutricionales en *S. solfataricus*. Los microorganismos se crecieron en medio 182 suplementado con extracto de levadura (1 g/l) y casaminoácidos (1 g/l). Las células se colectaron al llegar a fase exponencial media ( $DO_{600}$  0.3) y se resuspendieron en igual volumen de medio 182 suplementado con extracto de levadura y casaminoácidos (control) o medio 182 (carencia). A los tiempos indicados se tomaron

*alícuotas para la determinación de poliP (a) y para microscopía electrónica (b). Las flechas indican la posición de los gránulos observados.*

Para indagar cual era la carencia que causaba la acumulación de los poliP, *S. solfataricus* se creció en el mismo medio 182 pero reemplazando el extracto de levadura por sacarosa y los casaminoácidos por una solución de aminoácidos. Luego del crecimiento hasta la fase exponencial, las células se colectaron y se resuspendieron en el mismo medio omitiendo los aminoácidos (Fig. 8). Cuando las células se sometieron a la carencia de aminoácidos los niveles de poliP relativos a la cantidad de proteínas aumentaron significativamente en todos los tiempos analizados (Fig. 8a) y además las células mostraron gránulos electrodensos aumentados de tamaño que burbujaban bajo el haz de electrones, lo cual es característico de gránulos de poliP (Fig. 8b, -aa). En cambio en las células control, los gránulos eran casi imperceptibles (Fig. 8b, control).

Cuando las células se sometieron a una carencia de fosfato los niveles de poliP aumentaron levemente a las 5 h pero luego no presentaron variaciones con respecto al control (datos no mostrados).

a)



b)

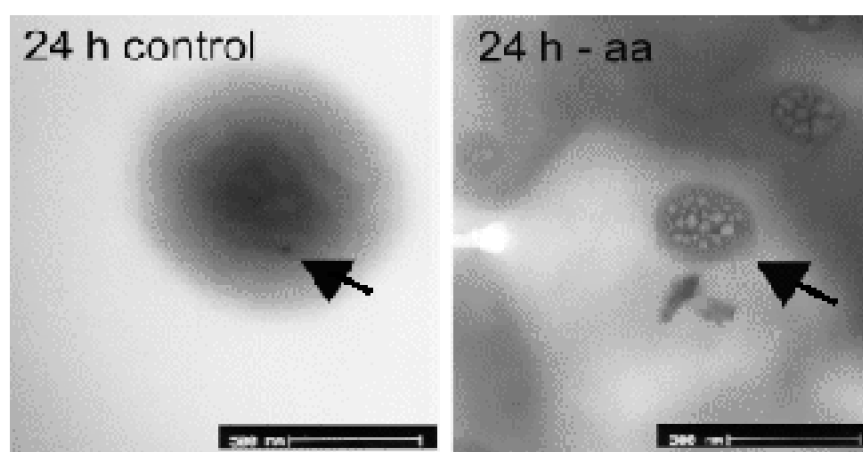


Figura 8. PoliP durante carencia de aminoácidos en *S. solfataricus*. Los microorganismos se crecieron en medio 182 suplementado con sacarosa (2 g/l), aminoácidos (0.05 g/l) y fosfato (3 g/l). Las células se colectaron al llegar a fase exponencial media ( $DO_{600} 0.3$ ) y se resuspendieron en el mismo medio (control) u omitiendo los aminoácidos (-aa). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para la determinación de poliP (a) y para microscopía electrónica (b). Las flechas indican la posición de los gránulos observados.

## 2. Caracterización de la proteína P60 en relación con su posible actividad PPK en *S. acidocaldarius*

Para identificar componentes genéticos involucrados en el metabolismo de los poliP en *S. acidocaldarius*, se procedió a purificar la proteína cuyas actividades PPK y GT se habían

descrito (Skórko y col., 1989; König y col., 1982), para luego mediante genética reversa, identificar el gen correspondiente. Según lo descrito, al separar el glicógeno de *S. acidocaldarius* de un extracto crudo mediante un gradiente de CsCl se observaban 3 proteínas asociadas al glicógeno de 61, 57 y 46.5 kDa. Luego de someter a este complejo a un segundo gradiente durante 48 h sólo permanecía asociada al glicógeno una banda de 57 kDa con actividad PPK y GT.

## **2.1 Purificación de la P60 asociada al glicógeno y ensayos de actividad PPK y GT**

---

Al realizar esta purificación en nuestro laboratorio, el complejo glicógeno-proteína obtenido del primer gradiente de CsCl mostró 3 bandas proteicas de aproximadamente 65, 60 y 50 kDa (Fig. 9, F2), similares a las descritas por Skórko y col. (1989) y König y col. (1982). La proteína de 60 kDa (P60) permaneció asociada al glicógeno luego del segundo gradiente (Fig. 9, F3) por lo que se asumió que se trataba de la proteína de 57 kDa con actividad PPK. Según lo descrito, esta banda estaba formada por polipéptidos de distinto punto isoeléctrico. Esta observación y las dos actividades PPK y GT, descritas para esta proteína (Skórko y col., 1989; König y col., 1982), sugerían la presencia de dos enzimas con el mismo peso molecular, una con actividad PPK y otra con actividad GT. Por lo tanto se midieron estas dos actividades simultáneamente en las fracciones obtenidas (Tabla 2). Las fracciones de la purificación mostraron actividad GT y PPK (medida como material radiactivo precipitable por ácido). Sin embargo los rendimientos fueron muy bajos especialmente para la actividad PPK (0.2%). La actividad específica de la PPK fue 11 veces más alta en la F2 y 5 veces más alta en la F3 que en los extractos crudos por lo que un 50% de la actividad PPK se estaba perdiendo en la F3. Por otro lado, la actividad específica GT aumentó 644 veces durante la purificación. Cuando se calculó el cociente GT/PPK éste no se mantuvo constante indicando claramente que se estaba purificando la actividad GT pero no la actividad PPK. Esto podría deberse a algún tipo de inactivación de la actividad PPK o a la pérdida de la enzima en la fracción F3. Además la presencia en pequeñas cantidades de la P65 en la F3 (Fig. 9), sugería que esta proteína podría ser la responsable de la actividad PPK.

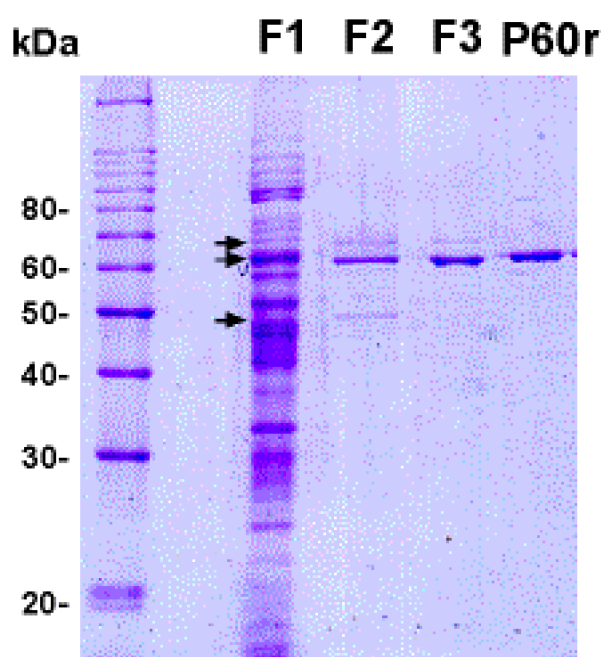


Figura 9. Purificación de la P60 asociada al glicógeno. Las fracciones obtenidas en la purificación se analizaron por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie. F1, extracto crudo (20 $\mu$ g); F2, primer gradiente de CsCl (1 mg); F3, segundo gradiente de CsCl (1  $\mu$ g); P60r (0.5  $\mu$ g). Las flechas indican las bandas de 65, 60 y 50 kDa.

Tabla 2. Actividades enzimáticas medidas durante la purificación de la P60.

Fracción	Proteínas totales mg	PPK Unidades totales	PPK actividad específica (Unidades/mg)	GT Unidades totales	GT actividad específica unidades/mg	Razón GT/PPK
F1 (extracto crudo)	116	44660	385	208916	1801	4.7
F2(2h. CsCl)	0.02	84,46	4223	10054	502700	119
F3 (48 h CsCl)	0.01	18.43	1843	11600	1160000	629

Skórko y col. (1989) le habían atribuido la actividad PPK y GT a la banda de 60 kDa con una actividad PPK de 2.34 nmol de fosfato incorporados por hora. Según las condiciones de su ensayo nosotros calculamos que su fracción F3 poseía una actividad específica para la PPK de 19500 U/mg de proteína, un valor mucho más alto que el observado en nuestros ensayos. Esta falta de congruencia entre nuestros resultados y los publicados nos llevó a investigar en más detalle el método usado por Skórko y col. (1989) para medir actividad PPK y compararlo con el nuestro. Brevemente, para medir el poliP sintetizado, ellos trataban la mezcla de reacción (21  $\mu$ l) que contenía el complejo glicógeno-proteína y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (0.9  $\mu$ Ci) en tampón de carga (Laemmli, 1970) durante 3 min a 100°C y lo sometían a un SDS-PAGE al 10%. El supuesto poliP se detectaba como la radiactividad que permanecía en el origen del gel por autoradiografía ya que según

ellos, el poliP no entraba en el gel. Por el contrario, nosotros empleamos el mismo tampón y condiciones para medir la actividad PPK, excepto que se usó una actividad específica más baja de ATP (2000 cpm/nmol). El producto radiactivo se precipitó en condiciones ácidas y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio. Una vez lavado, se determinó la radiactividad retenida por centelleo líquido.

Para demostrar la migración del poliP en las condiciones electroforéticas descritas por Skórko y col. (1989), empleamos 2 nmoles de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP<sub>700</sub> (0.007 mCi/nmol) que se aplicaron al gel para su separación. Sin embargo, no encontramos radiactividad en la posición descrita para los poliP.

## **2.2 Análisis de los productos de reacción del ensayo de actividad PPK**

---

Aunque el método empleado en esta Tesis para medir actividad PPK se ha usado previamente (Akiyama y col., 1992; Ault-Riché y Kornberg, 1999; Kumble y col., 1996), es necesario confirmar que el  $^{32}\text{P}$  precipitado en condiciones ácidas corresponde a poliP. La PPK recombinante de *E. coli*(PPKr) (Kumble y col., 1996) y la PPX de *S. cerevisiae* (PPXSce) (Wurst y col., 1995) se han usado en estos casos para analizar los poliP (Ault-Riché y Kornberg, 1999). La PPKr permite la síntesis de [ $^{32}\text{P}$ ]polyP<sub>700</sub> el cual se puede usar como marcador, mientras que la identidad de poliP del compuesto sintetizado *in vitro* puede ser confirmada por tratamiento con PPXSce y análisis de los productos de reacción por TLC (Ault-Riché y Kornberg, 1999). Típicamente, la naturaleza de poliP se confirmaba por hidrólisis ácida del compuesto. Sin embargo el uso de enzimas como la PPX para hidrolizar el poliP es mucho más específico.

Para acumular el material radiactivo sintetizado realizamos el ensayo de PPK con la fracción F2, que es la de más alta actividad específica PPK (Tabla 2), en las mismas condiciones descritas pero en una forma preparativa como la descrita para la síntesis *in vitro* de [ $^{32}\text{P}$ ]poliP<sub>700</sub> (ver Materiales y Métodos). Se utilizó 9 mg de proteínas asociadas a glicogeno (F2) en una mezcla de reacción de 0.35 ml incubada por 30 min a 70°C. Como control, se realizó en paralelo la misma reacción a 37°C usando 35000 U de PPKr (Kumble y col., 1996). Para extraer el poliP formado en cada caso, las mezclas de reacción se aplicaron sobre un colchón de CsCl. Luego de la centrifugación, el gradiente se dividió en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , las que se precipitaron con isopropanol. Los sedimentos obtenidos se lavaron con etanol y luego se resuspendieron en 20 ml de agua destilada y se cuantificaron por centelleo líquido. El compuesto marcado con  $^{32}\text{P}$  se encontró en las fracciones correspondientes al fondo del gradiente de CsCl tal como se espera para el poliP (Ault-Riché y col., 1998). Estas fracciones se usaron como sustrato para el análisis con PPXSce. La hidrólisis del supuesto poliP a Pi se siguió por TLC (Fig. 10).



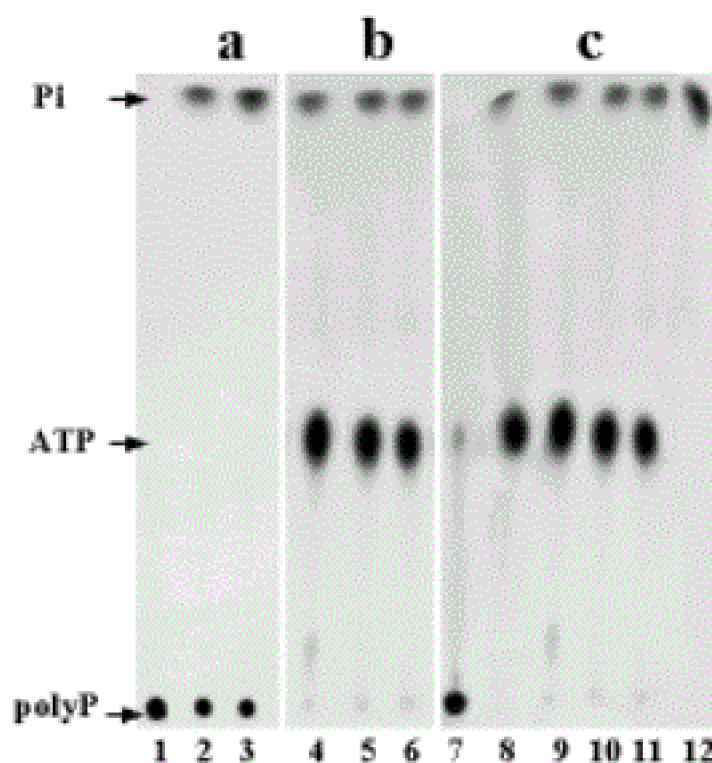


Figura 10. Análisis de los productos de reacción obtenidos durante el ensayo de actividad PPK. [ $^{32}\text{P}$ ]PoliP<sub>700</sub> (a, carriles 1, 2 y 3), el material marcado con  $^{32}\text{P}$  obtenido en el ensayo de actividad PPK usando la fracción F2 (b, carriles 4, 5 y 6 y c, carriles 9, 10 y 11) se incubaron en presencia (a y b) o en ausencia (c) de PPXSce a los tiempos 0 (carriles 1, 4 y 9), a los 5 min (carriles 2, 5 y 10) o a los 15 min (carriles 3, 6 y 11). Marcadores: [ $^{32}\text{P}$ ] poliP<sub>700</sub> (carril 7), [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (carril 8) y  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (carril 12).

Cuando se analizó el poliP que provenía del ensayo de PPK usando PPKr, (Fig. 10a), la mancha de poliP, situada en el origen de la TLC claramente disminuyó por la acción de la PPX mientras que el Pi apareció simultáneamente confirmando la identidad de poliP (Fig. 10, carriles 1, 2 y 3).

Sin embargo, no se observó ninguna mancha en la posición correspondiente a los poliP cuando el supuesto poliP provenía de la reacción con la fracción F2 (Fig. 10b). En cambio, se encontraron manchas radiactivas migrando como ATP y Pi en todos los tiempos analizados (carriles 4, 5 y 6). El Pi observado correspondió a la hidrólisis parcial del ATP tal como se muestra en un tubo control sin PPXSce (Fig. 10c, carriles 9, 10 y 11) y ATP corrido como marcador (Fig. 10c, carril 8). La presencia de ATP (que había sido usado como sustrato en el ensayo de actividad PPK) en estas fracciones sugiere una unión inespecífica del mismo a algún compuesto presente en las fracciones inferiores del gradiente de CsCl, por ejemplo y debido a su densidad y a sus propiedades de ser precipitado por isopropanol, el complejo glicógeno-proteína de la fracción F2. Por lo tanto el supuesto poliP sintetizado a partir de la F2 probablemente corresponde a esta unión no específica del ATP al complejo glicógeno-proteína y no al producto de una actividad PPK real.

### 2.3 Caracterización de los polipéptidos presentes en el complejo glicógeno-proteína correspondiente a la fracción F2

El complejo glicógeno-proteína (F2) fue analizado por NEPHGE (Fig. 11). Se observaron tres manchas proteicas, P65, P60 y P50 (Fig. 11), de igual migración que las observadas anteriormente (Fig. 9). La P60 estaba compuesta por al menos 3 manchas del mismo peso molecular P60.1, P60.2 y P60.3. Esto está de acuerdo con los resultados de Skórko y col. (1989) quienes habían descrito que la proteína P60 mostraba varias bandas proteicas por isoelectroenfoque (IEF). Los manchas observadas (P65, P60.1, P60.2, P60.3 y P50) se escindieron del gel y se secuenció el extremo amino terminal de cada una de ellas. La secuencia amino terminal de la P60.1 fue MKRYESLWFEDELKHVWMI. Las secuencias amino terminales de la P60.2 y P60.3 fueron en ambos casos MKRYESLWF (Fig. 11, inserto). Esto indicaba que la P60 estaba compuesta por formas con puntos isoeléctricos ligeramente distintos lo cual es típico de proteínas modificadas como por ejemplo la fosforilación.

Para confirmar esta hipótesis, obtuvimos la fracción F2 desde un cultivo de *S. acidocaldarius* marcado *in vivo* con  $^{32}\text{P}$  y analizamos estas proteínas por NEPGHE (Fig. 12).

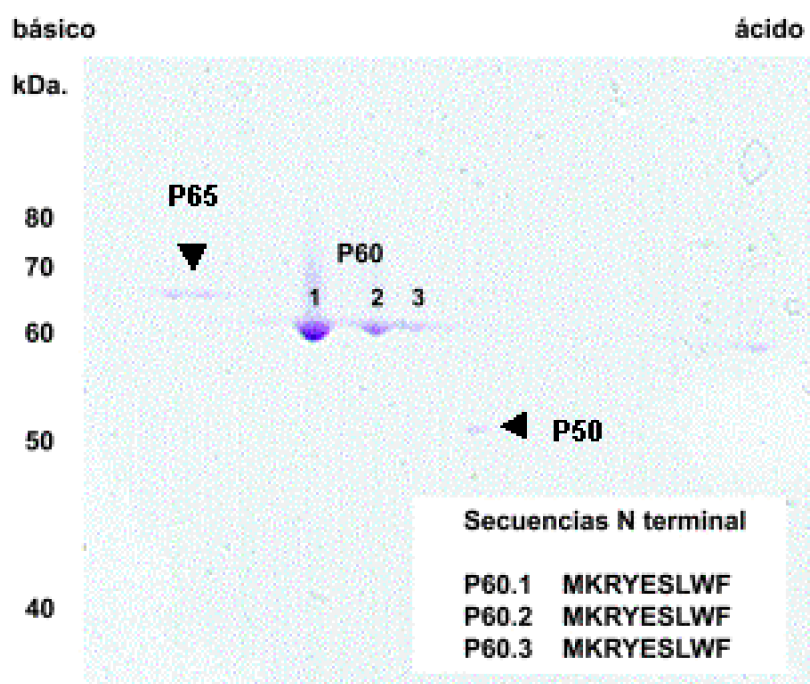


Figura 11. Análisis de la fracción F2 por NEPHGE. Una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  correspondiente a la fracción F2 se analizó por NEPHGE. Las manchas proteicas fueron visualizadas por tinción con Azul de Coomassie.

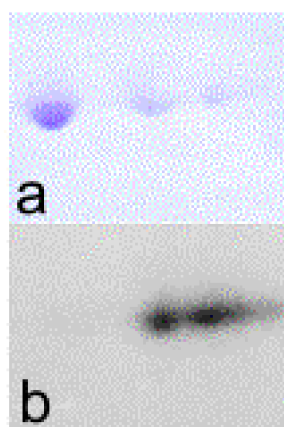


Figura 12. Fosforilación de la P60. Los cultivos se marcaron in vivo con  $^{32}\text{P}$  y el glicógeno se purificó por gradiente de CsCl. Las proteínas asociadas se resolvieron por NEPHGE. a, tinción con Azul de Coomassie. b, revelado por autorradiografía.

El análisis autorradiográfico mostró claramente que las dos manchas más ácidas (P60.2 y P60.3) estaban marcadas probablemente debido a fosforilación (Fig. 12 b).

En resumen, estas observaciones demuestran que la P60 descrita por Skórko y col. (1989) como una PPK y por König y col. (1982) como una GT está compuesta por un solo polipéptido y es una proteína fosforilable.

No se obtuvo una secuencia amino terminal para la P65 debido a la escasa cantidad de la misma o a un bloqueo del extremo amino terminal de la proteína. La secuencia amino terminal de la P50 fue RNVILGFVH. Las secuencias obtenidas para la P60 y la P50 no se encontraron en las bases de datos disponibles en ese momento. Una búsqueda realizada posteriormente en la base de datos del genoma de *S. solfataricus* mostró que la P50 y la P60 correspondían a los marcos abiertos de lectura (ORF) bac04\_023 y bac04\_024 que codifican para una  $\alpha$ -amilasa (*amyA*) de 447 aa (53.6 kDa; pI 4.47) y para una glicógeno sintasa (*glgA*) de 566 aminoácidos (65.6 kDa; pI 6.73), respectivamente. Estos valores de pI y peso molecular son similares a los de las proteínas observadas, asociadas al glicógeno *S. acidocaldarius*. Además estos ORFs son consecutivos en el genoma y probablemente forman parte del mismo operón relacionado con el metabolismo del glicógeno, situado en el contig b07c12-b04 (anexo 1.1). Adyacentes a *amyA* pero orientados en la dirección opuesta se encuentran otros genes involucrados en el metabolismo del glicógeno como *glgX* que codifica para la enzima desramificante, y *glgC* que codifica para la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa.

Resumiendo, si bien nuestros resultados sugerían que ninguna de las proteínas asociadas al glicógeno de *S. acidocaldarius* era responsable de actividad PPK, una posibilidad es que nuestras preparaciones contuviesen algún tipo de inhibidor de la actividad enzimática, por lo que decidimos caracterizar funcionalmente el gen codificante de la P60.

## 2.4 Identificación y caracterización del gen *p60*

### **2.4.1 Obtención de un fragmento del gen p60 por DOP-PCR**

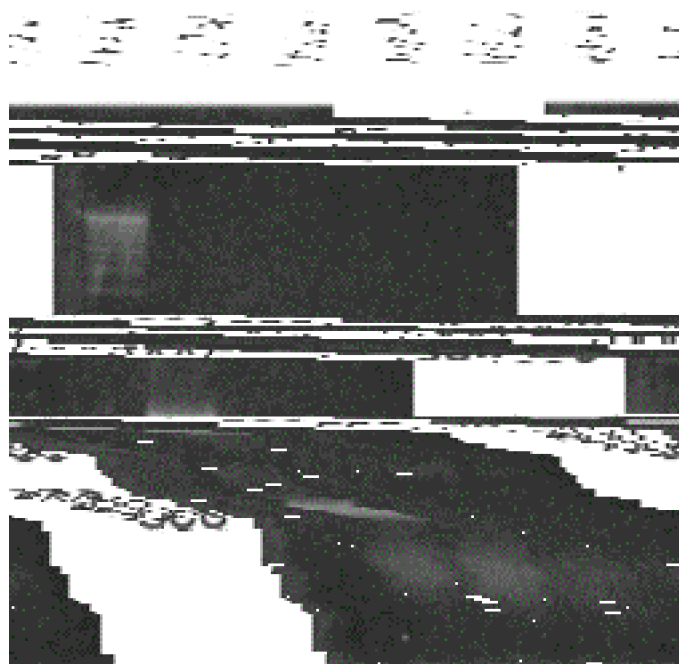
Con el objetivo de diseñar partidores degenerados para la identificación del gen por DOP-PCR se secuenció el extremo amino terminal de la P60 y de péptidos internos obtenidos por degradación enzimática de la misma. Las secuencias de estos péptidos son las siguientes:

N-terminal de P60: MKRYESLWFEDELKHVWMISAELEKVASL

péptido 21: GLDYNTGRIIDSWNI

péptido 27: TEDRAEIRKRLFDELEVL

Con estas secuencias se diseñaron los partidores degenerados NH2DD, P21DR, P27DR P21DD y P27DD. La amplificación de los fragmentos génicos se realizó por DOP-PCR utilizando como templado el DNA genómico de *S. acidocaldarius* y distintas combinaciones de los partidores. (Fig. 13). Se observaron 2 fragmentos intensos de 300 y 800 pb correspondientes a amplificados a partir de los pares de partidores NH2DD/P21DR y NH2DD/P27DR respectivamente y un fragmento muy débil de aproximadamente 500 pb que correspondía a los partidores P21DD-P27DR. Con el par P27DD/P21DR no se obtuvo amplificado. Posteriormente, debido a la posición de los péptidos P21 y P27 en la secuencia proteica de la P60, se comprobó que estos partidores eran divergentes. Los fragmentos de 300 y 800 pb se escindieron del gel, se purificaron y se ligaron al vector pGEM<sup>®</sup>-T. El vector se usó para transformar la cepa JM109. Las colonias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a Amp y por presentar fenotipo lac<sup>-</sup> (colonias blancas). Además se verificó la presencia de los insertos mediante PCR en colonias. Los fragmentos clonados se amplificaron utilizando los partidores T7 y SP6 que son homólogos al vector y estos amplificados se utilizaron como templado para la reacción de secuenciación. La secuencia nucleotídica obtenida y el marco de lectura predicho se observan en la figura 14.



*Figura 13. Amplificación por DOP-PCR de fragmentos del gen p60. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1, Standard de peso molecular; 2, partidores NH2DD/P21DR; 3, NH2DD/P27DR; 4, P21DD / P27DR; 5, P27DD /P21DR.*

**POLIFOSFATOS NORGÁNICOS EN EL DOMINIO ARCHAEA: ESTUDIO EN EL GÉNERO SULFOLOBUS**

```

1   VINAATACG TqTGGATGAT CAGTGGUAG UAGAGAGAGG TACTAGTCT
51  AGCCGZATTC DGLCCACTAC TACTAATCT TCGTAAAGAA TTACTTAAGT
101 AGGATATAAA AGTAAGTGTG ATCAATGAAA GUAATGCTGG TCAATTTAAI
151 CACTAATATA DCTCACTCCCT TAAATCAAC CAAATATCTT TACTCCACA
201 AGGAGATAGA ATAGGTACTG ATGCTAAATC TTACTACTAC AAGCTAGGGT
251 TTGAACATCG AAAITTTGAT GAAATGAAAG TGCTTTTAAI TAAAGGACTG
301 GATTAACAAG DGGGAAAGAT AATTCATTCG TGAAACATTT ACGATAACCG
351 CATGGAGAAA TCTTCACTTC TGGCTAGGGC TGTCGAGAAG TATGCAAGT
401 TCTCAATACC TAAATGATA CTCTTCAATA TATACCTACA TGATTCGCAI
451 TCTGTAATIG DAGCTGTGAC TCTAAATTT ACATTIGAGG CTAGGAGAGT
501 AATAGTTCCT TACTAATTA CACTTCACTT CTAAACAAG CTCACTGCAI
551 CTGGGATTA DGGCTCAGAA GATTCGAGTG GATTCATGAA ITATCCACAI
601 TACATTCGA TAAATATAA ACATGACTTC TACTCAACTA CAGAACCTG
651 GGATTCCTIC TCTTCTGGT CCAATAGAAA GTTTCGCTCT TATGAGCTG
701 ATCTAATLAC ATCACTTACT AAAACCTACC TAACTATCA TATATTTAAI
751 TFLATAGAA AUTGATAGA GAAAGAGAGT TGATATCAAT ATAAUGTAAI
801 TCATTCGAA ATACACTACA CTAATAACTA CCTTACACC AACTTTCCA
851 CTGAGGATAG GCTGAAATA AAAAAAGT TATTCAGAA GUTUGAATTC

```

```

1   KKHGMMTSAE LRKVASTSEL GPWYNTGKE IWKJGTEWTV TPDSHGRTLN
51  DYYEELDKLE EISLVAEDR DGIDGSSYIF HDGPEKGNLD GHWVLLHSL
101 DYNIGRTIDG WNTYTNAMKE SLLALAMKE YAKRSTENDT PSTHWHTMH
151 SYIAGVTAKE TFEAEVIVP LVFTVELLKE VSAPORHASE DUSGLHNTPH
201 YIMETTKNDI YTDREMDFF SSSSTKRFSS YRADLITSSS ESYLTYDTEW
251 FIGMWIENKE CIHYNGTDUE VEETHETAYS KFGTEFAEI RFRLFDEIEF

```

Figura 14. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del fragmento de 800 pb amplificado por PCR. Las secuencias aminoacídicas amino terminal y de los péptidos 21 y 27 obtenidas por degradación de Edman se muestran en azul.

La presencia de las secuencias amino terminal de la P60 y de péptidos internos presentes en la secuencia peptídica predicha a partir de la secuencia nucleotídica mostró que se había clonado un fragmento del gen *p60*. Esta secuencia se comparó en base de datos mediante el programa BLASTP (Altschul y col., 1997). Los resultados mostraron una similitud altamente significativa con glicógeno sintasas de arqueas, bacterias y con regiones hacia el extremo carboxilo terminal de glicógeno sintasas de plantas (Tabla 3). Estos resultados concordaron con nuestros ensayos de actividad enzimática (Tabla 2) y con la actividad GT descrita para esta proteína (König y col., 1982), pero no con la actividad PPK (Skórko y col., 1989).

Tabla 3. Secuencias proteicas similares al fragmento de la P60 amplificado por DOP-PCR.

Número de acceso	descripción	Score	Expect
------------------	-------------	-------	--------

		(bits)	
dbj BAA29138.1	long hypothetical protein <i>Pyrococcus horikoshii</i>	75	8e-13
AE000704	glycogen synthase <i>Aquifex aeolicus</i>	56	4e-07
emb CAA16796	starch synthase-like protein <i>Arabidopsis thaliana</i>	50	2e-05
AE001674	Glycogen Synthase <i>Chlamydia pneumoniae</i>	49	4e-05
emb CAB40375.1	starch synthase, isoform V <i>Vigna unguiculata</i>	49	6e-05
sp P08323	<i>E. coli</i> glycogen synthase glgA	48	7e-05

#### 2.4.2 Obtención de los extremos 5' y 3' del gen p60 por PCR inversa

Para obtener la secuencia completa del gen *p60*, la secuencia nucleotídica del fragmento obtenido se usó para diseñar partidores no degenerados y sintetizar una sonda marcada con digoxigenina. Esta sonda se usó en un ensayo de Southern blot utilizando DNA digerido con distintas enzimas de restricción. En todos los casos la sonda hibridó con un fragmento de DNA, indicando la existencia de sólo una copia del gen (datos no mostrados). Las enzimas *Ava*I y *Xho*I generaron fragmentos de 4.4 y 4.3 kb, respectivamente. Por el tamaño de estos fragmentos era probable que contuvieran el gen entero, por lo que se eligieron estas enzimas de restricción para los experimentos de PCR inversa. Para preparar el templado para la PCR inversa, se realizaron las digestiones de DNA genómico y los fragmentos se ligaron en un volumen grande de manera de favorecer su circularización y no su religación. Este producto de ligación fue usado en una reacción de PCR utilizando partidores divergentes al fragmento del gen *p60* amplificado por DOP-PCR. Al hibridar con los fragmentos de DNA circularizados estos partidores resultan convergentes. Así se obtuvieron los extremos 5' y 3' del gen.

La secuencia nucleotídica de 1800 pb reveló la presencia de un ORF de 1698 pb (566 aminoácidos) y que contenía un probable promotor y una probable secuencia Shine Dalgarno o de unión al ribosoma (Fig. 15).



Figura 15: Secuencia completa del gen p60 y secuencia aminoacídica deducida. Verde claro, posible promotor; azul, posible Shine Dalgarno; rojo, codón de inicio; verde oscuro, codón de término, aminoácidos subrayados: marcos de lectura deducidos que coinciden con el extremo amino terminal y péptidos internos secuenciados a partir de la P60.



660 + GGCAT AACGGTCAGAAAGATGGAGTGGATGGAAGAAATATCCAGATACATTTGAGAA 710  
 CCGTAATCCGACGCTCTTCTAAAGTCAGGTCAGTACTTAAATAGCTGTAACTGAAAGCTCTT  
 H V A S E D K S G I M N Y P F Y I W R I

720 + TAATAAAATATGACTTTGTACAGCAACTAGGTAAGTGTGGATTTCCTCTCTCTGTCTGTA  
 770  
 ATTAATTGTACTGAAACAGTGTTCATCTCTTCAACAGCTAAGGAGAGAGAGCTAAGGT  
 I K H D I Y T I R I V W D P I S S G S I

780 + TAGAAAAGTTCGTTCTATGAGGCTCACTAAATAACATCAGTTAGTAAAAGCTAAGCTAA 830  
 ATCTTTCAAAACCAAGAACTAGGCTAGATTAATGTAAGTCAACATTTTCAGTCAAT  
 E K F G S Y E A D I I T S V E K S Y L I

840 + CAATAGAATAATTAAGTCAATAGAAALIGATAGAAALPPLPPIGTAATLAAATATA 890  
 GTATGCTATATTAATGAGGATACTTTGAGCTATCTCTTTCTTCAAGAAAGGTTAGAT  
 Y I I F H F I G N W I E K K E C I H Y P

900 + ACGTACTGATGGGAGTAGAGAGACAAAAGTACGCTTACAGCAAGTTTGGACATG 950  
 TCCCAAGACTAACCTTCACTCTCTGATTTTCAAGCAAGTCTCTTCAAGCTTCAAGCTTAC  
 G T D W S V E R I V K V A V S K P G I F

960 + ACGTACGGCTGAAATAAGAAAAGGTTATTGAGCAACTAGGAGTCCAGAGTAAAGC 1019  
 TCCATCCCGGCTTTATCTTTTCCAAATACAGCTTGTATCTTCAAGTCTTCAATGAG  
 D F A E C R K R L I D E C E V L R V T I

1020 + CTGAGGAATAGCTAGAGTAAGAACTTTGAAATAGCATTCAATAAGATAAAGG 1079  
 GACTCCAAAGTAGTGCCATGTATCAAGCTTAATGCTAGGTAATAAGATTTTCC  
 E L Y I G M I L W N N R F M I G . K D

1090 + ATGACTGGGCAATAGTAGGCTAGAAAAGGTCCTCTAATCTAATTTGAGAGGAGATGG 1109  
 TAGTGAGCTGTATATCACTCTCACTTTTGGAGAGAAATAGCAAAAGCTCTCTTACC  
 D P T V J R L E N G F L I L I A G S M Y

1110 + TTATAGAAAGCAATAGCACTACTACTCTAGGATTCAGTCAAGTACTTAAGAGCTTA 1199  
 AAATAGCTTCCCTTAATCGAGTAAAGTACTATCTTAACACTTCAAGCAATCTCTAAT  
 V C K G T D S C L I A P T R V L K I T F

1200 + ACAAAGCCGCTCAATATAATAGCATTAAGCTTCCAGCTATGCAATAGTACAAAGT 1259  
 TGTAAAGGCAATTAATAAAGCTTAAGAGGCTCTAAGCAATCAAGTCTTAC  
 N A R L I I L G L I S S D Y C L L Q N V



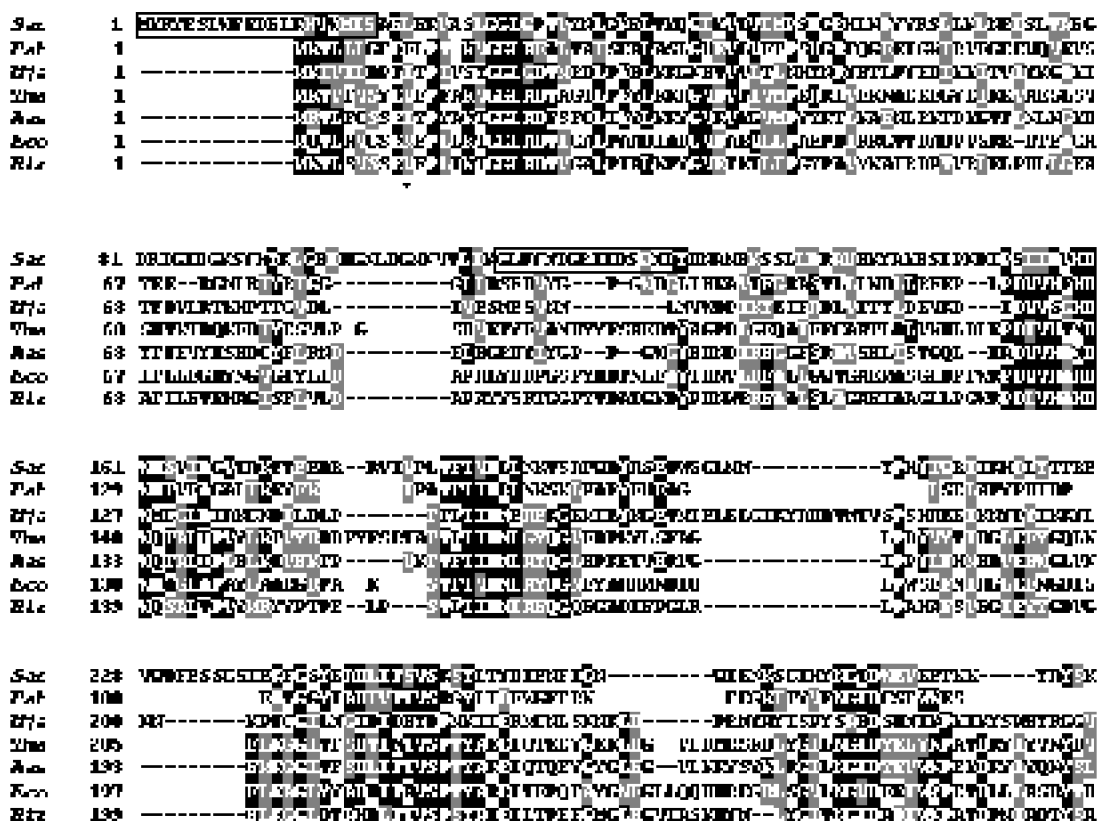


Figura 16. Alineamiento múltiple de glicógenos sintasas bacterianas y de arqueas. La secuencia aminoacídica de la P60 de *S. acidocaldarius* (Sac) se alineó con otras glicógeno sintasas arqueanas (números de acceso entre paréntesis) (Pab, *Pyrococcus abyssi* [CAB49000]; Mja, *Methanococcus jannaschii* [E64500]) y bacterianas (Tma, *Thermotoga maritima* [AAD35976]; Aae, *Aquifex aeolicus* [AAC06894]; Eco, *Escherichia coli* [AAC76454]; Rtr, *Rhizobium tropici* [CAC17472]). Se indican los aminoácidos idénticos (sombreados en negro) y similares (sombreados en gris). Los péptidos que permitieron aislar el gen p60 por genética reversa se indican con un recuadro. Se señalan las Lys 15 y 277 (\*). La barra negra sobre parte de la secuencia de la P60 representa el dominio de glicosil transferasa 1. Los sitios putativos de fosforilación se muestran con líneas punteadas (CKI) y círculos (CKII).



potenciales de fosforilación en Ser/Thr en la base de datos PhosphoBase (Kreegipuu y col. 1999; anexo 1.4). Se encontró un potencial sitio para caseína quinasa II (CKII) que estaba muy bien conservado en todas las glicógeno sintasas analizadas y un potencial sitio caseína quinasa I (CKI), que también estaba conservado con la excepción de glicógeno sintasas de *M. jannaschii* and *Thermotoga maritima* (Fig. 16).

## 2.5. Clonamiento y expresión del gen *p60*

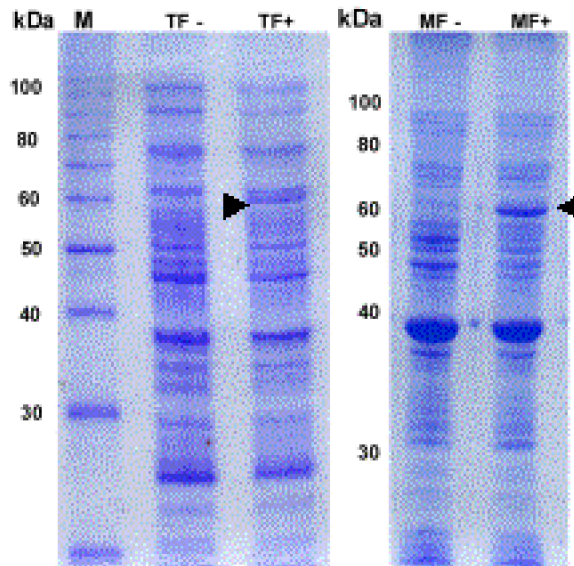
Para poder dilucidar definitivamente las propiedades funcionales de la P60 decidimos clonarla en un vector de expresión. Para ello empleamos el sistema pET de Novagen. El gen *p60*, amplificado por PCR con los sitios de restricción *NdeI* y *AvaI* en los extremos 5' y 3' respectivamente fue digerido con *NdeI* y *AvaI* y fue ligado al vector pET-21b(+) digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se insertó el gen *p60* en marco con seis codones codificantes para Histidina hacia el carboxilo terminal (*p60r*). El producto de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* JM109. Luego de la selección por resistencia a Amp y de la verificación de la presencia del gen *p60r* mediante PCR en colonias, se eligió un clon positivo (SC5) y el plasmidio pET-21b(+)*p60r* se purificó y utilizó para transformar la cepa BL21(DE3)pLysS. Esta cepa tiene una copia en el cromosoma del gen *lacI* y de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. La adición de IPTG a los cultivos induce a la T7 RNA polimerasa que transcribe el gen clonado bajo el control del promotor T7. La cepa obtenida se llamó SC1.

La selección de las cepas transformantes y recombinantes se realizó por resistencia a Amp y PCR en colonias. Los cultivos se crecieron en medio LB y se indujeron con 2 mM IPTG durante 3 h. Cuando se analizaron los extractos crudos provenientes de células SC1 crecidas en ausencia o en presencia de IPTG, por SDS-PAGE, se observó la inducción de una banda proteica de peso molecular correspondiente a 60 kDa. (Fig. 17). La proteína estaba asociada a la fracción de membranas (Fig. 17) por lo que se purificó en condiciones desnaturantes por cromatografía de afinidad a níquel, seguida de renaturación. La proteína purificada (P60r) mostró tener el mismo peso molecular que la P60 proveniente del complejo glicógeno-proteína (Fig. 9). La secuencia del gen clonado se verificó mediante secuenciación de ambas hebras mostrando un 100% de identidad con la secuencia obtenida a partir del DNA genómico. Por lo tanto, la proteína recombinante expresada corresponde a la P60.

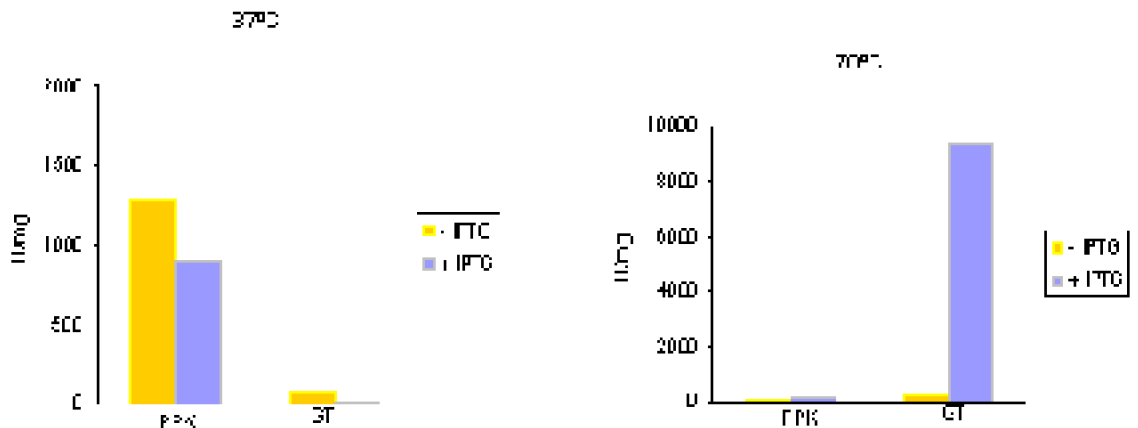
## 2.6 Análisis funcional de la P60r

Las actividades PPK y GT se ensayaron a 37°C y 70°C en la fracción de membranas provenientes de células de la cepa SC1 crecidas en ausencia o en presencia de IPTG (Fig. 18). La actividad PPK y GT, medida a 37°C, no aumentó en las fracciones correspondientes a células inducidas. Por el contrario, las actividades específicas fueron mayores en las fracciones provenientes de células no inducidas (Fig. 18). Sin embargo, a 70°C, claramente se observó un aumento de la actividad GT en las fracciones provenientes de células inducidas aunque no se observó aumento de actividad PPK. Los mismos ensayos se realizaron utilizando la P60r purificada. Esta mostró actividad GT a

70°C, sólo en presencia de glicógeno. Esto último está en concordancia con lo descrito para otras glicógeno sintasas que utilizan glicógeno como partidor para la reacción (Ozbun y col., 1972). La actividad específica de la P60r ensayada a 70°C y en presencia de 10 mM UDP-glucosa y 2% de glicógeno fue de  $10^6$  U/mg de proteína. Otras comunicaciones de actividad específica para glicógeno sintasa varían en el rango de  $10^6$  a  $10^8$  U/mg de proteína dependiendo de la fuente y las condiciones experimentales (Fox y col., 1976; Pollock y Preiss, 1980).



*Figura 17. Expresión del gen p60r en E. coli. Las células de la cepa SC1 se crecieron durante 3 h en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG. Las proteínas totales (TF) y de membranas (MF) se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con Azul de Coomassie. Las flechas indican la posición de la banda de 60 kDa (P60).*



*Figura 18. Actividades PPK y GT medidas en la fracción de membranas. Las actividades enzimáticas correspondientes se ensayaron a 37°C o a 70°C en la fracción membranas (FM) de células correspondientes a la cepa SC1 crecidas en ausencia (-IPTG) o en presencia de IPTG (+IPTG). Notar la diferencia de escala entre los ejes.*

Finalmente, la actividad PPK de la P60r fue medida en presencia de 2% de glicógeno

ya que según lo descrito por Skórko y col. (1989), la actividad PPK de esta proteína de *S. acidocaldarius* requería de la presencia de glicógeno. Tampoco en este caso la P60r mostró tener actividad PPK.

Resumiendo, la P60 de *S. acidocaldarius* es una glicógeno sintasa termoestable y no tiene relación con la síntesis de poliP. Tampoco las otras proteínas asociadas al glicógeno son responsables de la actividad PPK según se demostró en la sección 2.2 de este capítulo. La ausencia de una actividad PPK asociada al glicógeno en *S. acidocaldarius* plantearon el interrogante de cómo se sintetizan los poliP en este arqueón.

### 3. Actividad PPK en *S. acidocaldarius*

Si bien se determinó una actividad PPK medida en extractos crudos (Tabla 2, F1) sus niveles eran bajos comparando con otros microorganismos (Rao y col., 1998; Trestald y col., 1999) y no fue confirmada la naturaleza de poliP del material radiactivo precipitado por ácido. Como la actividad PPK en *E. coli* está asociada a membranas (Rao y col., 1998), se realizó un fraccionamiento subcelular de células de *S. acidocaldarius* colectadas en distintos estadios del crecimiento y se midió la actividad PPK en la fracción membranas y en la fracción soluble. Se encontró que la actividad PPK estaba principalmente asociada a la fracción membranas y variaba durante el crecimiento, siendo mayor en la fase exponencial que en la fase estacionaria (Fig. 19). Para analizar el compuesto radiactivo formado, se intentó recuperar el material radiactivo mediante extracción con "glassmilk" sin éxito, debido probablemente a la poca cantidad del material formado.

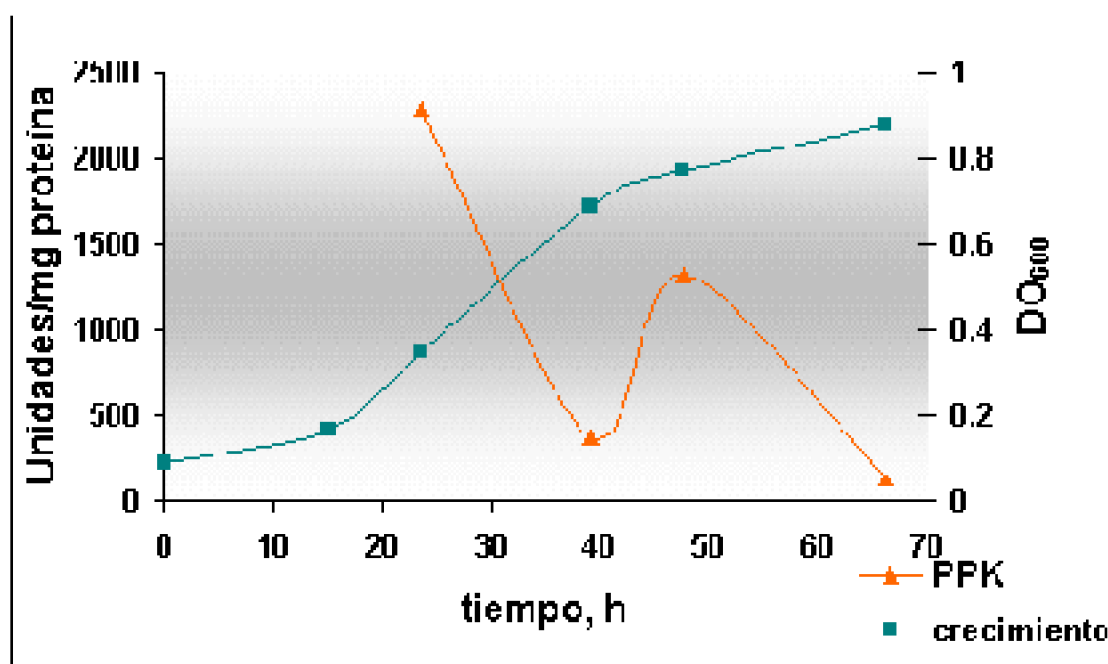


Figura 19. Actividad PPK asociada a membranas en *S. acidocaldarius*. Las células se

cultivaron en medio 88 con sacarosa 0.2% y extracto de levadura 0.1%. A los tiempos indicados se colectaron alícuotas de 1 ml y se determinó la  $DO_{600}$ . La obtención de la fracción membranas y la determinación de actividad PPK se determinó según se indica en *Materiales y Métodos*.

## 4. Búsqueda de genes involucrados en la síntesis de poliP en *Archaea* mediante métodos bioinformáticos

La actividad PPK, detectada en fracciones de membrana en *S. acidocaldarius* y la presencia de poliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* sugerían que existe al menos un gen codificante para una enzima con actividad para sintetizar poliP. La búsqueda en los genomas de *Archaea* y especialmente en el genoma de *S. solfataricus* y el recientemente disponible *Sulfolobus tokodaii* se realizó por BLASTP y PSI-BLAST utilizando como gen modelo las secuencias proteicas de la PPK de *E. coli* y de los genes *PHM1-PHM4* de *S. cerevisiae* (Ogawa y col., 2000). En todos los casos los resultados fueron negativos (Anexo 1.5).

## 5. Identificación y caracterización del gen *ppx* en *S. solfataricus* (*ppxSso*)

La disponibilidad vía Internet de la base de datos del genoma completo de *S. solfataricus* dio un nuevo giro a nuestra investigación cuando mediante el acceso al mismo se detectó en el contig sh03g1150 la presencia del ORF c50 004 de 133 aminoácidos descrito como un fragmento del gen *ppx* (Fig. 20 y anexo 1.6). Este fragmento tenía un 50 % de similitud con el extremo amino terminal de las PPX de tipo bacteriano.

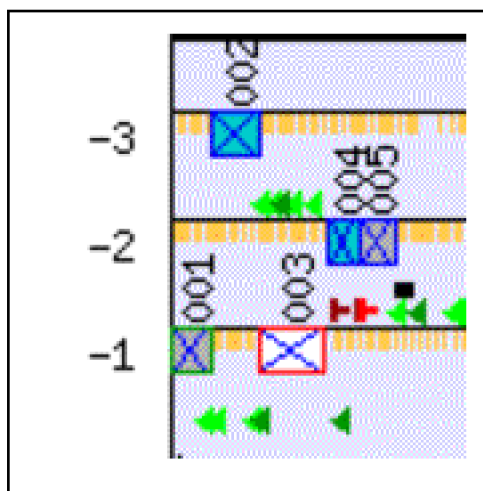




Figura 20. Detalle del contig sh03g1150 de *S. solfataricus*. Los recuadros numerados representan los siguientes ORFs: 001, timidilato quinasa; 002, timidilato quinasa; 003, proteína putativa; 004, fragmento de PPX; 005 fosfohistidina fosfatasa. Triángulos verdes: promotores putativos. Rectángulo negro: Shine Dalgarno putativa. Símbolos rojos: codones de término.

El ORF c50 003, de 279 aminoácidos, se encontraba consecutivo al ORF c50 004, y descrito como putativo debido al codón de inicio poco frecuente TTG (Fig. 21). Un análisis mediante BLASTP de este ORF mostró un 47 % de similitud con la enzima guanosina pentafofato fosfohidrolasa (GppA), de *Helicobacter pylori* y con otras GppA y PPXs (Fig. 21 y anexo 1.7). Cabe mencionar que la GppA y la PPX de *E. coli* son proteínas parálogas que tienen entre sí un 59 % de similitud. Además la GppA de *E. coli* tiene actividad PPX (Keasling y col., 1993).

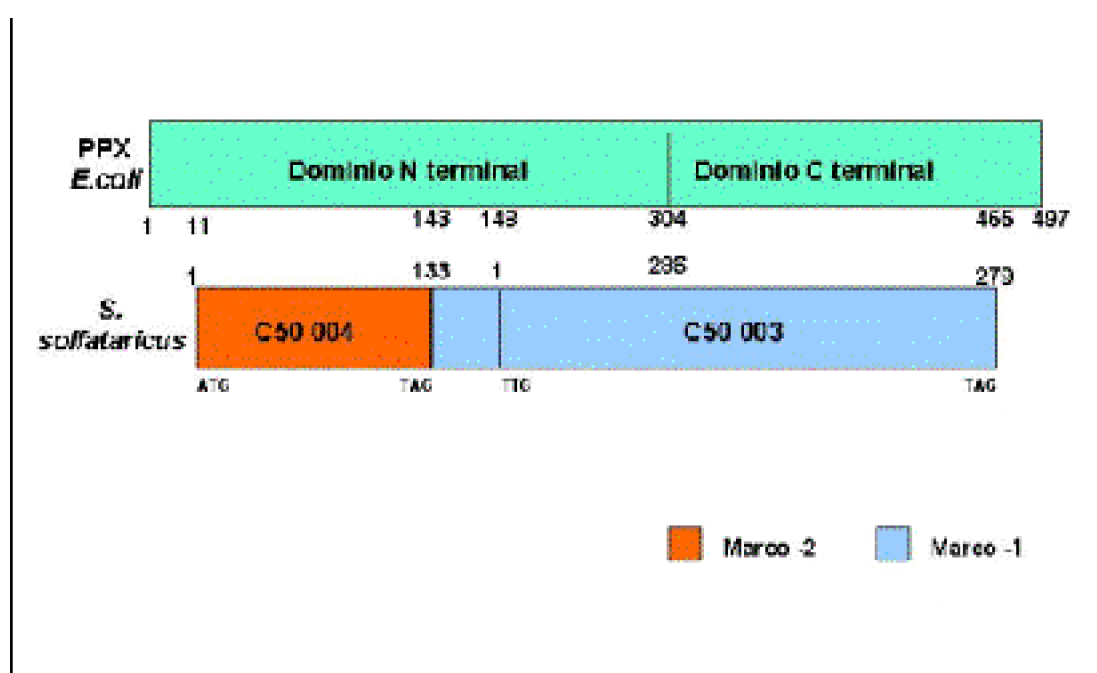


Figura 21. Esquema del alineamiento entre la PPK de *E. coli* y los ORFs c50 004 y c50 003. Los números indican las posiciones de aminoácidos equivalentes en el alineamiento. Se muestran los dominios N terminal y C terminal de la PPX según Bolesch y col. (2000).

## 5.1 Clonamiento y secuenciación del fragmento genómico que comprende los ORF c50 004-c50 003

Con el objetivo de confirmar la presencia de un gen *ppx/gppA* en *S. solfataricus*, la región genómica que comprendía los ORFs c50 004 y c50 003 se amplificó por PCR agregando los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' del fragmento amplificado, respectivamente. El amplificado fue ligado al vector pGEM<sup>®</sup>-T y este vector se usó para transformar la cepa de *E. coli* JM109. De las colonias transformantes y recombinantes se seleccionaron dos clones (SC13 y SC16), se purificaron los plasmidios y se secuenció una región de 876 pb que contenía el extremo 3' de c50 004 y el extremo

5' de c50 003. La secuencia arrojó un 99 % de identidad con las secuencias de los ORF c50 004 y c50 003 del genoma ya que en nuestra secuencia, el agregado de una citosina corría el marco de lectura eliminando el codón de término TAG anotado para el ORF c50 004 (Fig. 21). Cuando se secuenció el inserto completo, este resultó contener un ORF de 1251 pb (417 aminoácidos) similar a las PPX/GppA bacterianas (anexo 1.8). La secuencia fue registrada en la Base de Datos EMBL bajo el nro. CAC39441. Casi simultáneamente, este error fue corregido en el genoma ya que la secuencia del genoma completo de *S. solfataricus* fue ingresada al GenBank y con ésta una exopolifosfatasa (metafosfatasa) putativa (AE006735). Esta secuencia resultó 100% idéntica a la ingresada por nosotros. La secuencia de la PPX de *S. solfataricus* fue alineada con otras PPXs bacterianas (Fig. 22). El alineamiento mostró varios aminoácidos conservados que corresponden al dominio de unión a ATP descrito para la PPX de *E. coli* (Koonin, 1994).

Figura 22. Alineamiento múltiple de la PPX de *S. solfataricus* con PPXs bacterianas. La secuencia aminoacídica de la PPX de *S. solfataricus* (Sso) se alineó (números de acceso entre paréntesis) con PPXs bacterianas. *Eco*, *E. coli* [AAC75555]; *Sty*, *Salmonella typhimurium* [AAC34891]; *Vch*, *Vibrio cholerae*. [AAC32884]; *Ssp*, *Synechocystis sp.*[BAA18781]; *Dra* *Deinococcus radiodurans* (strain R1)[C75615]; *Hpy*, *H. pylori* (strain 26695)[F64554]; *Cje*, *Campylobacter jejuni* [CAB74190]; *Cre*, *Caulobacter crescentus* [AAK23684]; *Mlo*, *Mesorhizobium loti* [BAB53778]. Los motivos del dominio de unión aATP(Koonin, 1994)se indican con un recuadro en color rojo sobre la secuencia de *E. coli*.





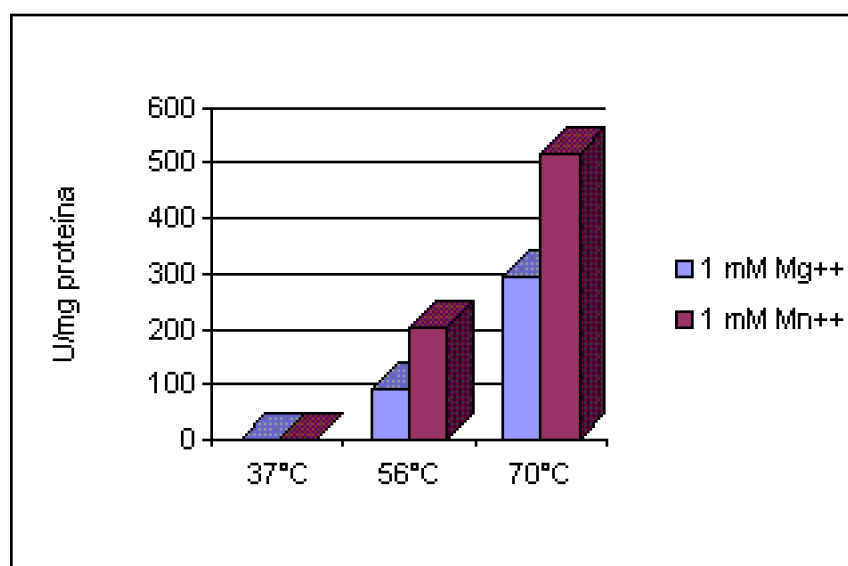


Figura 23. Actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus*. Los extractos crudos se prepararon a partir de un cultivo de 5 días. La actividad PPX se determinó como se indica en Materiales y Métodos utilizando 50  $\mu$ g de proteínas totales.

### 5.3.2 Expresión del gen *ppxrSso* en *E. coli* y ensayo de actividad PPX

Las células de las cepas SC3, que contienen el vector sin inserto y SC21 que contienen el vector con el gen *ppxrSso* se crecieron hasta fase exponencial media y se indujeron con IPTG durante 2 h. Al analizar los extractos crudos de estas células por SDS-PAGE se observó una débil banda proteica en las fracciones provenientes de la cepa SC21 (Fig. 24a). Esta banda proteica migró a una altura de 46 kDa, de acuerdo con el peso molecular deducido a partir del gen *ppxrSso*. Los extractos crudos de las cepas SC3 y SC21 inducidas con IPTG (aproximadamente 1  $\mu$ g de proteínas) se utilizaron para medir actividad PPX (Fig. 24b). Cuando la actividad PPX se ensayó a 37°C las dos cepas presentaron actividad pero la actividad de la cepa SC21 fue mucho mayor. En cambio a 70°C, la cepa SC3 no presentó actividad PPX mientras que la actividad PPX en la cepa SC21 aumentó hasta 28000 U/mg proteína. La hidrólisis del sustrato poliP a Pi fue confirmada mediante análisis por TLC (Fig. 25). A 70°C no se observó hidrólisis de poliP en extractos provenientes de la cepa control, mientras los de la cepa SC21 presentaron una hidrólisis casi total de los poliP. Un tubo control incubado a 70°C sin extractos celulares no presentó hidrólisis (no mostrado). Por lo tanto el gen *ppxrSso* codifica para una proteína funcional con actividad PPX a 70°C.

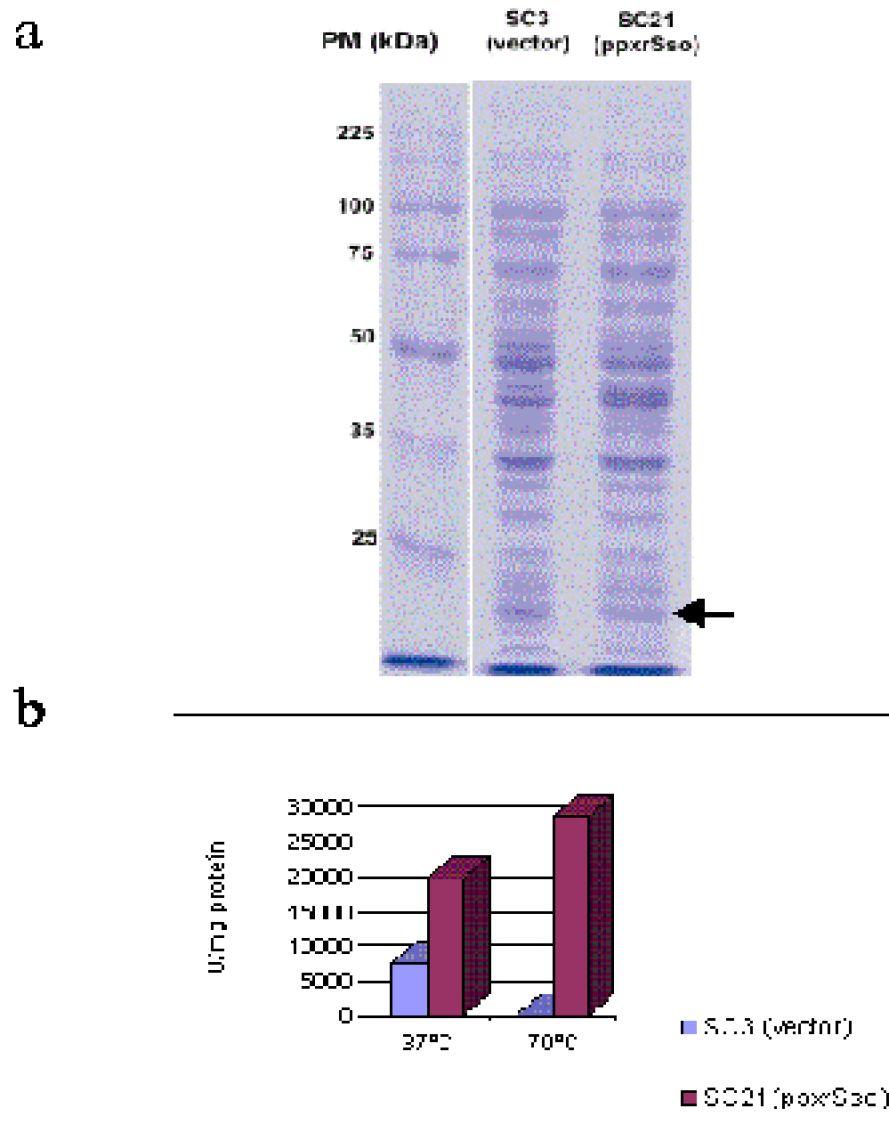


Figura 24. Análisis funcional del gen *ppxrSso* de *S. solfataricus*. Las células SC3 (vector) y SC21 (*ppxrSso*) se crecieron hasta fase exponencial y se indujeron 2 h con 1 mM IPTG. a, análisis de la expresión de proteínas por SDS-PAGE. La flecha indica la posición de la banda de 46 kDa. b, determinación de la actividad PPX en extractos crudos.

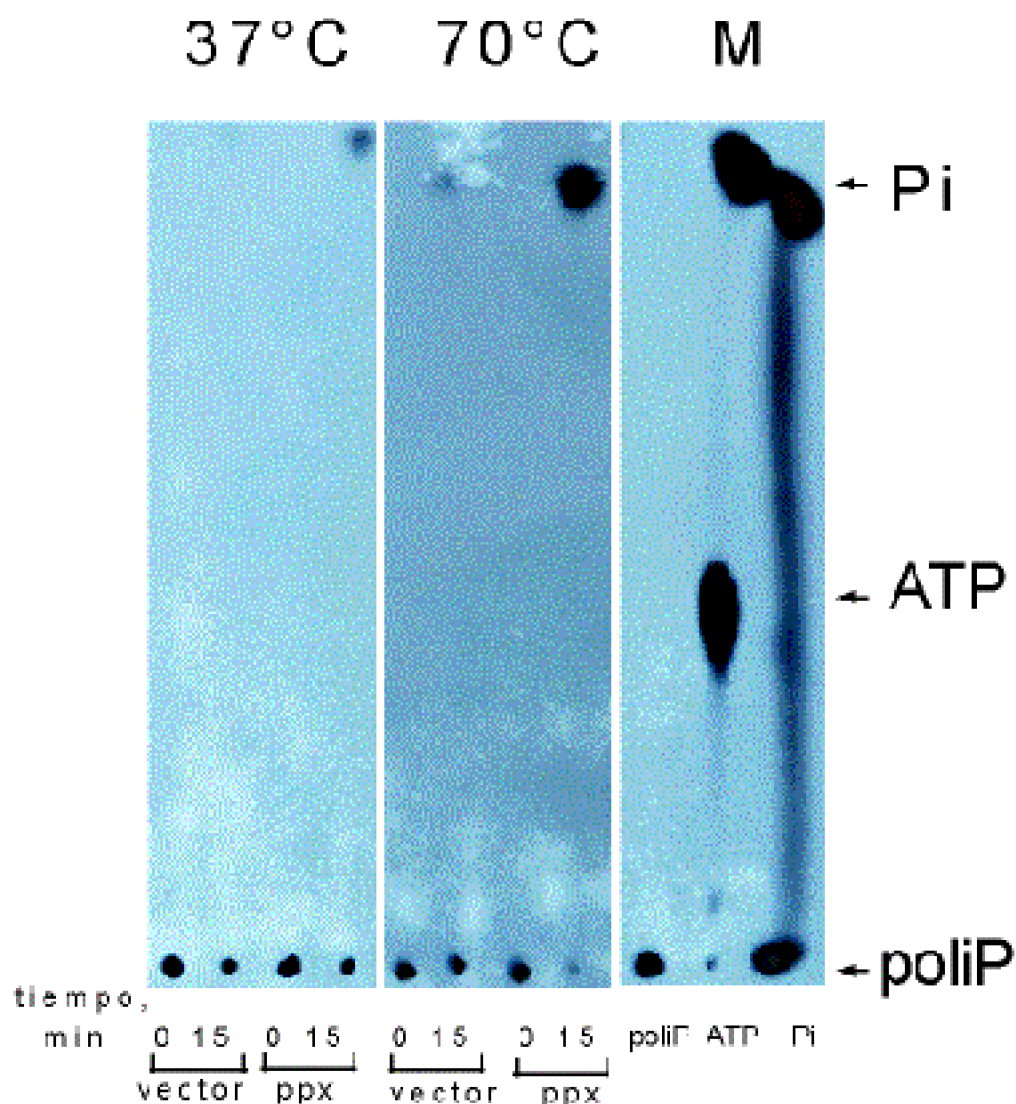
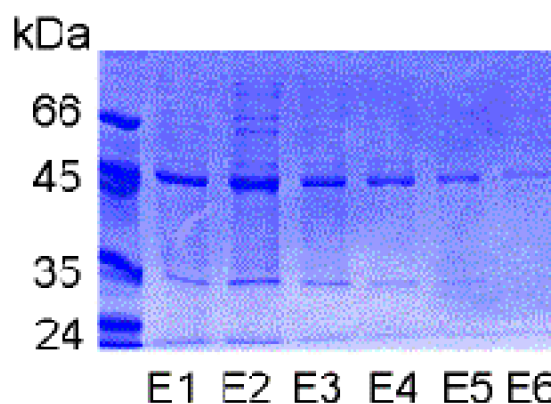


Figura 25. Análisis de la actividad PPX por TLC en las cepas SC3 y SC21. La actividad PPX se midió a 37°C y a 70°C en las cepas SC3 (vector) y SC21 (ppx). M, marcadores, poliP, ATP y Pi.

### 5.3.3 Purificación de la PPXr de *S. solfataricus*

La PPXr de *S. solfataricus* resultó estar asociada a la fracción membranas por lo que se purificó en condiciones desnaturalantes por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Sin embargo la purificación no fue total ya que la proteína eluyó con otras proteínas contaminantes especialmente una proteína de 35 kDa. (Fig. 26a). Las fracciones E2 y E3 se purificaron por segunda vez por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Si bien muchas proteínas contaminantes se eliminaron, la cantidad relativa de la proteína de 35 kDa aumentó con respecto a la PPXr (Fig. 26b) lo que sugiere que probablemente sea un producto de degradación de la misma. La renaturación se realizó por diálisis disminuyendo paulatinamente la urea hasta eliminarla y en presencia de 15 % de glicerol.

a



b

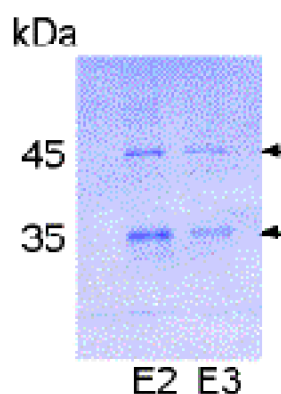


Figura 26. Purificación de la PPXr de *S. solfataricus* por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La PPXr se purificó a partir de la fracción membranas proveniente de 500 ml de cultivo de la cepa SC21 inducida con IPTG, en condiciones desnaturalantes por afinidad en columnas de níquel. La elución se realizó en presencia de 250 mM imidazol.

Fracciones de 0.5 ml se recuperaron de la columna (E1-E6) y se analizaron por SDS-PAGE, seguido con tinción con Azul de Coomassie. a) primer pasaje por la columna de níquel. b) segundo pasaje por la columna de níquel. Las flechas indican las posiciones de las proteínas de 46 kDa y 35 kDa.

#### 5.3.4 Caracterización bioquímica de la PPXr de *S. solfataricus*

Para determinar las condiciones óptimas de reacción de la PPXr de *S. solfataricus* se ensayó la influencia de factores como el pH, la temperatura, y la concentración de cationes bivalentes ( $Mn^{++}$ ) y monovalentes ( $K^+$ ) sobre la actividad enzimática de la PPXr purificada por cromatografía de afinidad al níquel (Fig. 27). La temperatura óptima para la actividad PPX fue de 50-60°C (Fig. 27a). Si bien la temperatura óptima de crecimiento de



*S. solfataricus* es de 75°C a 80°C, a estas temperaturas la actividad PPX mostró más de un 50% de inhibición. El pH óptimo de reacción fue 7.0 (Fig. 27b), a diferencia de la PPX de *E. coli* cuyo pH óptimo para la actividad es 8.5 (Akiyama y col., 1993). A pHs más extremos, la actividad específica de la PPXr de *S. solfataricus* se vió fuertemente inhibida (Fig. 27b). La concentración de KCl requerida para la actividad máxima de la PPXr de *S. solfataricus* fue de 100-300 mM, un valor comparable a la concentración de KCl requerida por la PPX de *E. coli* (200 mM) (Akiyama y col., 1993). Al agregar  $Mn^{++}$  se estimuló la actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus* en un 80% con respecto al  $Mg^{++}$  (Fig. 23). Se determinaron entonces las concentraciones óptimas de  $Mn^{++}$ , para la actividad PPX de la proteína recombinante. La PPXr no mostró actividad en ausencia de  $Mn^{++}$  mientras que la máxima actividad específica se alcanzó a 10 mM de  $MnCl_2$ . Estos resultados también marcan una diferencia con la PPX de *E. coli* que prefiere  $Mg^{++}$  a  $Mn^{++}$  y requiere una concentración óptima de 1mM (Akiyama y col., 1993). Medida en las condiciones óptimas, la actividad específica de la PPXr de *S. solfataricus* fue de aproximadamente 600000 U/mg de proteína, un valor que es aproximadamente 2 órdenes de magnitud menor que la actividad específica alcanzada por la PPX nativa de *E. coli* (Akiyama y col., 1993).

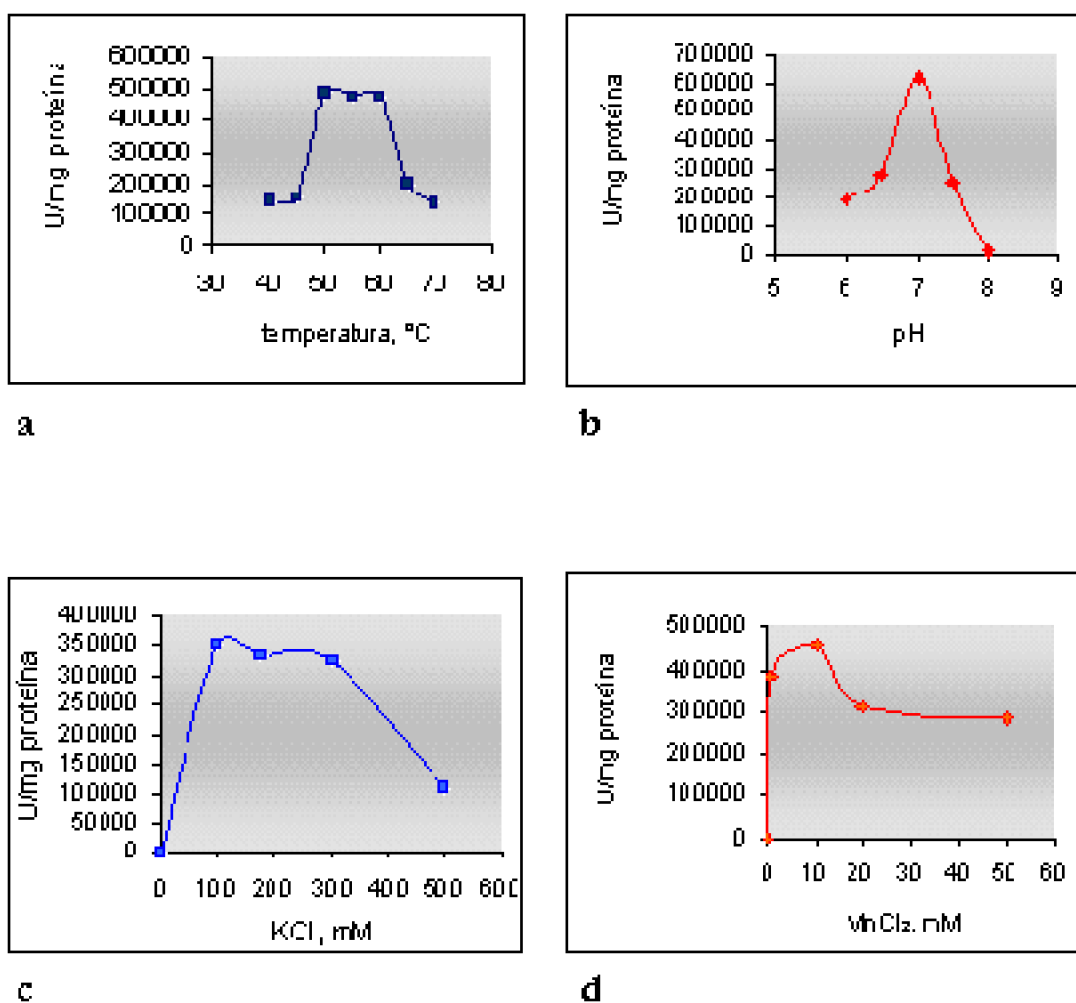


Figura 27. Efecto de la temperatura, pH y sales sobre la actividad de la PPXr de *S.*

*solfatarius*. Se utilizaron 350 ng de PPXr en un volumen de 50  $\mu$ l, conteniendo 50 mM Tris-acetato y 250  $\mu$ M [ $^{32}$ P]poliP. Salvo en los casos indicados las concentraciones de  $MnCl_2$  y KCl fueron 10 mM y 100 mM respectivamente, la temperatura de incubación fue de 50°C y el pH 7.0.

## 6. Actividad PPX y niveles de poliP en *S. solfataricus*

Una vez establecidas las condiciones óptimas de reacción para la PPXr de *S. solfataricus* y con el objetivo de indagar si las variaciones en los niveles de poliP observados durante el crecimiento en *S. solfataricus* responden a variaciones en la actividad PPX, se determinó esta actividad enzimática durante el crecimiento en medio rico para compararla con los niveles de poliP (Fig. 28). La actividad PPX mostró valores más altos en fase exponencial que en fase estacionaria. Esta observación está de acuerdo con los niveles de poliP observados que son más bajos en la fase exponencial que en la fase estacionaria. Sin embargo, cuando se determinó la actividad PPX en los extractos crudos de células control y de células sometidas a una carencia nutricional, ésta se mantuvo aproximadamente constante (datos no mostrados) no observándose ninguna relación entre el aumento de los niveles de poliP (Fig. 7) y la actividad PPX (no mostrado).

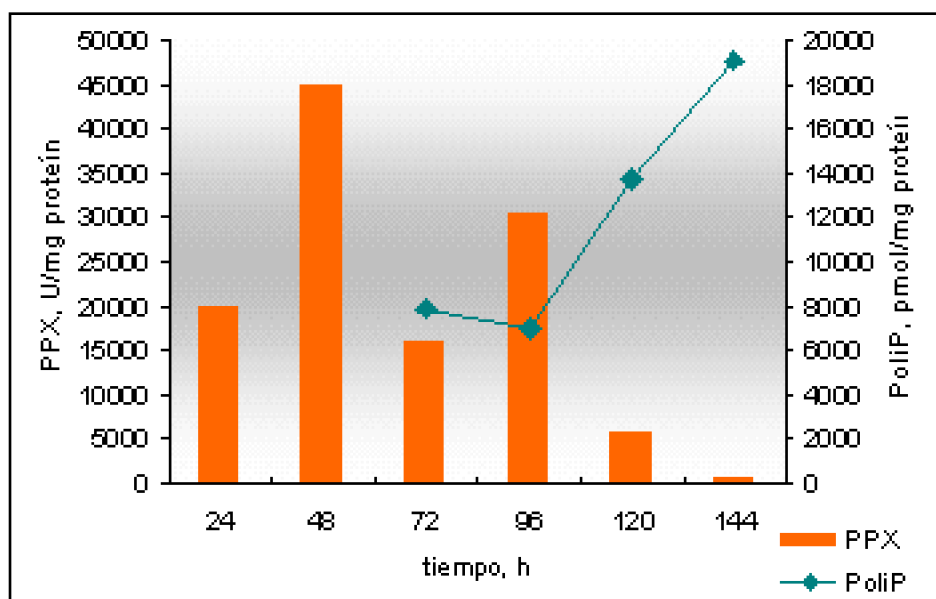


Figura 28. Actividad PPX y niveles de poliP durante el crecimiento de *S. solfataricus*. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos y se determinaron la actividad PPX y los niveles de poliP en los extractos crudos obtenidos.

---

# Discusión

## 1. Niveles de PoliP en *S. acidocaldarius* y en *S. solfataricus*

Aunque los poliP se consideran como componentes ubicuos en los seres vivos (Kornberg, 1995; Kornberg 1999), sólo se han estudiado en forma cuantitativa en unos pocos organismos. Al comenzar esta tesis la única evidencia sobre la existencia de poliP en el dominio *Archaea* era en *Methanosarcina sp.* (Scherer y col., 1983; Rudnick y col., 1990). También mediante experimentos de fosforilación *in vivo* en *Halobacterium volcanii* se habían detectado compuestos que migraban en TLC como poliP de cadena corta (Scoarughi y col., 1995). En ninguno de estos casos se utilizaron métodos analíticos específicos.

En nuestro laboratorio detectamos gránulos electrodensos en *S. acidocaldarius* durante el crecimiento a expensas de azufre (Cardona y col., 2001a; anexo 2). Sin embargo, en medio rico tanto *S. acidocaldarius* como *S. solfataricus* mostraron gránulos muy pequeños, casi imperceptibles (Fig. 7b, control y 8b, control). Pero la presencia de poliP en esta condición pudo cuantificarse mediante extracción de los poliP y degradación enzimática mediante la actividad reversa de la PPKr de *E. coli*, generando ATP (Fig. 7a y 8a). Los niveles de poliP relativos al contenido de proteínas también se determinaron

durante el crecimiento en el medio rico. En los dos microorganismos los niveles de poliP relativos a los niveles de proteínas fueron más altos en la fase estacionaria (Fig. 6). Esto podría significar una adaptación a la supervivencia en esta fase del crecimiento, donde muchos nutrientes podrían faltar o donde se pudieran acumular metabolitos tóxicos. Cualquiera sea la función específica de los poliP durante la fase estacionaria en *Sulfolobus*, estas determinaciones constituyen a nuestro entender los primeros estudios cuantitativos de poliP en *Archaea*.

El siguiente paso fue indagar si los poliP sufren variaciones ante distintas condiciones ambientales. En estos experimentos, células de *S. solfataricus* se sometieron a una carencia general de nutrientes y también a carencias específicas como aminoácidos y fosfato. Durante la carencia general de nutrientes, en ausencia de fuente de carbono y de aminoácidos, no sólo se observó un aumento de tamaño de los gránulos electrodensos (Fig. 7b, carencia) sino que el aumento de poliP relativo al contenido de proteínas ante la condición ambiental de carencia fue confirmado mediante el método cuantitativo (Fig. 7a). Cabe mencionar que el omitir el extracto de levadura implica también reducir las concentraciones de fosfato en el medio de cultivo. Sin embargo, *Sulfolobus* fue capaz de acumular poliP en estas condiciones lo que implicaría que el medio de cultivo contenía la suficiente cantidad de fosfato como para permitir la acumulación de poliP en respuesta a alguna señal específica de carencia.

La acumulación de poliP en ausencia o exceso de fosfato es un fenómeno complejo. En un microorganismo acumulador de poliP como *Acinetobacter sp.*, el exceso de fosfato en el medio causa una acumulación de poliP (Trelstad y col., 1999) pero la transcripción del gen *ppk* es inducida ante la carencia de fosfato, siendo ésta una señal específica para la regulación de los poliP. En *E. coli*, un mutante *pho*, que no responde a la carencia de fosfato, no acumula poliP (Rao y col., 1998). Estas observaciones sugieren que los poliP pueden constituir una reserva de fosfato, pero en ciertas condiciones de carencia se acumulan cumpliendo un rol regulatorio.

Cuando se sometieron células de *S. solfataricus* a una carencia de fosfato en un medio definido en presencia de sacarosa y aminoácidos, se registró una leve acumulación de poliP a las 5 h para luego caer a niveles iguales al control (datos no mostrados). Esto sugiere que la carencia de fosfato sería una señal específica para el aumento de poliP pero no hay suficiente fosfato en el medio como para permitir la acumulación a tiempos mayores.

Las células de *S. solfataricus* mostraron un gran aumento en los niveles de poliP relativo al contenido de proteínas cuando se sometieron a una carencia específica de aminoácidos. En *E. coli*, el aumento de poliP debido a carencia de aminoácidos se explica por el fenómeno de la respuesta estricta o "stringent response". En efecto, al aumentar los niveles de (p)ppGpp se inhibe la PPX resultando en una acumulación de los poliP (Rao y col., 1998). Sin embargo en *Archaea*, hasta el momento no se han encontrado estos nucleótidos penta y tetrafosfatos (Scaorughi y col., 1995) ni están presentes los genes responsables de su síntesis (*relA/spoT*) en los genomas de *Archaea* hasta el momento secuenciados incluido *S. solfataricus* (anexo 1.9). Esto sugiere una conservación en la función de los poliP (si es que el aumento en sus niveles significa una respuesta adaptativa ante la condición de carencia) pero no una conservación del

mecanismo regulatorio que conlleva a la acumulación de poliP. Recientemente se ha demostrado que en *E. coli*, en carencia de aminoácidos, los poliP regulan la actividad de la proteasa Lon induciendo la degradación de proteínas ribosomales (Kuroda y col., 2001). En *Archaea*, la regulación de la degradación de proteínas ribosomales es absolutamente desconocida.

## 2. La supuesta PPK, asociada al glicógeno de *S. acidocaldarius* resultó ser una glicógeno sintasa

Al comenzar esta Tesis, nos preguntamos que función podría tener una PPK asociada al glicógeno. Una posible explicación podría atribuirse a una actividad de nucleósido difosfato quinasa (NDK) tal como se ha descrito para la PPK de *E. coli* (Tzeng y col., 2000). Se especuló entonces que la PPK actuando como una NDK, podría formar parte en el metabolismo del glicógeno regenerando el ATP consumido en la síntesis de ADP-glucosa, el precursor de la síntesis de glicógeno. En este sentido, se ha descrito un rol similar de regeneración de ATP para la PPK de *E. coli* asociada al degradosoma (Blum y col., 1997). Pensamos entonces, que era razonable que la PPK formara parte de otros complejos macromoleculares como el complejo glicógeno-proteína. Aunque este modelo resultaba muy atractivo, nuestros resultados demostraron que ni el complejo glicógeno-proteína de *S. acidocaldarius* ni una de sus proteínas asociadas, (P60) cuya actividad PPK se había descrito (Skórko y col., 1989), son responsables de la actividad PPK en este microorganismo. Más atractiva aún resultaba la posibilidad de estar en presencia de una enzima bifuncional (Perham, 2000) que catalizara dos reacciones consecutivas, la de síntesis de glicógeno con liberación de ADP y la de regeneración del ADP a ATP a expensas del poliP. Skórko y col. (1989) habían descrito que la banda de 57 kDa estaba compuesta por varios polipéptidos de distinto punto isoeléctrico y habían comunicado dos actividades enzimáticas, GT y PPK, especulando sobre la existencia de dos proteínas, una con actividad GT y otra con actividad PPK o una sola proteína con las dos actividades. Nosotros demostramos que esta banda proteica es un solo polipéptido (P60) que comprende formas fosforiladas y es homóloga a glicógeno sintasas bacterianas. La secuencia proteica no presenta ninguna similitud con PPKs conocidas. Mas aún la P60 nativa purificada y recombinante (P60r) sólo mostró actividad GT.

En resumen nuestros resultados demuestran que la supuesta PPK de *S. acidocaldarius* es en realidad una glicógeno sintasa (Cardona y col., 2001b; anexo 2). Al caracterizar la P60 como una glicógeno sintasa descubrimos dos propiedades que merecen destacarse. Primero, la lisina 15 que está muy conservada en otras glicógeno sintasas y pertenece al sitio de unión de la ADP-glucosa (Furukawa y col., 1993) está ausente en la glicógeno sintasa de *S. acidocaldarius* (P60). Segundo, la P60 se marcó *in vivo* con  $H_3^{32}PO_4$  sugiriendo que es fosforilable. La presencia de dos sitios de fosforilación altamente conservados para la CKI y CKII sugiere una regulación por algún tipo de Ser/Thr proteína quinasa, un fenómeno probable dada la presencia de este tipo de quinasas en los genomas bacterianos y arqueanos (Leonard y col., 1998; Shi y col.,

1998).

### 3 ¿Existe un gen responsable de la síntesis de poliP en *Sulfolobus*?

Dada la presencia de poliP en las células de *Sulfolobus* y la actividad PPK detectada en las membranas, la ausencia de genes *ppk* o *PHM* en los genomas de *S. solfataricus* y *S. tokodaii* (anexo 1.5) y otros *Archaea* resulta controversial. Sin embargo este gen responsable de la síntesis de poliP, podría ser no homólogo o un homólogo muy lejano cuya similitud sea tan baja que no haya sido posible identificarlo con los métodos bioinformáticos que parten de la secuencia primaria de una proteína (BLASTP y PSI-BLAST). Durante esta Tesis se intentó la purificación, al menos parcial, de una actividad PPK pero ésta fue bastante inestable y no pudo continuarse. Dos estrategias asoman como promisorias en la identificación de un gen *ppk* en *Archaea*. Si es posible identificar dominios funcionales en las PPKs conocidas, lo que hasta el momento no ha tenido éxito (Tzeng y col., 2000) o dominios estructurales, entonces se podría detectar una proteína PPK si es que existe, por similitud estructural con las descritas. La otra estrategia es la recientemente desarrollada metodología de los microarreglos de DNA. Si contáramos con un microarreglo de DNA correspondiente al genoma de *S. solfataricus* se podrían identificar cuales son los genes que se inducen ante condiciones que determinan un aumento de poliP (por ejemplo, carencia de aminoácidos). La identificación, clonamiento, expresión y análisis funcional de estos genes podrían llevarnos al descubrimiento de un gen responsable de la síntesis de poliP en *Archaea*.

### 4. El gen *ppx* de *S. solfataricus*

La descripción de un fragmento del gen *ppx* en el genoma de *S. solfataricus* nos condujo a la identificación de un marco abierto de lectura de 417 aminoácidos que corresponde a un gen *ppx*. El mismo se encuentra río abajo y probablemente formando un operón con otro gen (*sixA*) que codifica para una fosfohistidina fosfatasa (Fig. 20). Esta proteína ha sido descrita sólo en *E. coli* como una fosfatasa de los dominios HPt de los sensores híbridos en los sistemas de dos componentes (Matsubara y col., 2000). El hecho de que una proteína reguladora de un sistema de dos componentes se encuentre formando parte de un operón con el gen *ppx* en *S. solfataricus* sugiere una relación entre este operón y la transducción de señales. Sin embargo no se han identificado ni histidina quinasa híbridas ni sistemas de dos componentes en *Sulfolobus*, por lo que el rol de la proteína SixA en este microorganismo no se conoce.

La secuencia de la PPX de *S. solfataricus* resultó similar a las PPX de *E. coli* y muchas otras bacterias (Fig. 22). En los únicos genomas de *Archaea* en los que se ha encontrado exopolifosfatasas son los de *Methanococcus jannashii* y de *Archaeoglobus*

*fulgidus*. Sin embargo, estos ORFs MJ0606 y AF1002 son similares al gen *ppx1* de *S. cerevisiae* que también tiene homólogos entre algunas bacterias. Estos genes *ppx1* no presentan ninguna similitud con las *ppxs* tipo "*E. coli*". Esto nos lleva a las preguntas: ¿cuál es el gen *ppx* ancestral en *Archaea*? ¿es el gen *ppx* de *S. solfataricus* el ancestro de las PPXs bacterianas que se ha perdido en los otros genomas de *Archaea*? o alternativamente ¿son las PPXs arqueanas ancestrales de tipo "*S. cerevisiae*" y *S. solfataricus* adquirió secundariamente el gen *ppx* "bacteriano" por transferencia horizontal? Los dos fenómenos son teóricamente posibles. Un análisis de cómo el flujo de genes afecta la evolución de los genomas clasifica los genes según sean o no seleccionables para mantener el estado saludable de la célula o "fitness". Según esta clasificación los genes se agrupan en esenciales, importantes, útiles, marginales y neutrales (Lawrence y Roth, 1999). Los genes marginales y neutrales son más proclives a ser eliminados de los genomas. Si los genes *ppx* contribuyen a la regulación de los niveles de poliP, que a su vez están relacionados con la supervivencia ante factores de estrés estos genes serían dispensables en ciertas condiciones ecológicas favorables, pero su adquisición generaría una ventaja adaptativa que permitiría al microorganismo ampliar su nicho ecológico. Esto explicaría la diversidad con respecto a la presencia o ausencia de genes *ppx* en los genomas microbianos y en especial en *Archaea*.

Independientemente de su historia evolutiva, el gen *ppx* de *S. solfataricus* codifica para una proteína funcional con actividad PPX. Esto fue demostrado mediante el ensayo de la actividad PPX en extractos crudos de la cepa SC21, que sobreexpresa esta proteína. La presencia de actividad PPX a 70°C confirma que ésta se debe a la PPX de *S. solfataricus* (Fig. 24 y 25). Mas aún, la PPXr purificada mostró actividad PPX (Fig. 27). La disminución en dos órdenes de magnitud con respecto a la PPX de *E. coli*, podría deberse a varios factores. Por ejemplo, la presencia de la proteína de 30kDa en las fracciones ensayadas, que probablemente es un producto de degradación, podría disminuir la actividad específica. También las condiciones de renaturación podrían no haber sido las óptimas para lograr la máxima actividad enzimática o la presencia de las 6 histidinas hacia el carboxilo terminal de la proteína podrían provocar alguna alteración en la estructura proteica que disminuya la actividad.

Inicialmente los ensayos de actividad PPX se realizaron a 70°C pero al determinar la temperatura óptima para la actividad, se vio que ésta no supera los 50-60°C (Fig. 27a). La disminución de la actividad PPX a temperaturas más altas podría deberse a una hidrólisis espontánea del sustrato poliP a Pi que llevaría a una inhibición por producto. Alternativamente, la PPX de *S. solfataricus* podría no ser intrínsecamente termoestable como se ha demostrado para otras enzimas de termófilos (Vielle y col., 2001).

Finalmente se intentó correlacionar los niveles de actividad PPX con los niveles de poliP en distintas condiciones. Durante el crecimiento en medio rico los niveles más bajos de actividad PPX parecieron coincidir con los niveles más altos de poliP que se presentaron en la fase estacionaria (Fig. 28), lo que indicaría que los poliP aumentan debido a la ausencia de actividad PPX. Sin embargo cuando se determinó la actividad PPX en extractos crudos de las células sometidas a carencia nutricional ésta no varió con respecto al control (no mostrado) aunque los poliP sí aumentaron (Fig. 7). Es probable, entonces que la regulación de niveles de poliP en *S. acidocaldarius* implique a otros

factores adicionales a la actividad PPX. De todas maneras, el aumento de los niveles de poliP ante condiciones de carencia de nutrientes en *S. solfataricus*, la actividad PPK detectada y la existencia de un gen *ppx* funcional sugieren que los poliP están sujetos a una regulación que depende de componentes genéticos y que responde a factores del ambiente.



## Conclusiones

*S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* contienen poliP. Los niveles de poliP relativos al contenido de proteínas se acumulan durante la fase estacionaria de crecimiento.

En *S. solfataricus* los niveles de poliP relativos al contenido de proteínas aumentan ante carencia de ciertos nutrientes como los aminoácidos.

La proteína asociada a glicógeno en *S. acidocaldarius*, cuya actividad PPK se había descrito resultó ser una glicógeno sintasa.

La glicógeno sintasa de *S. acidocaldarius* es termoestable, y probablemente fosforilable por serina-treonina quinasas y a pesar de ser funcional no presenta la lisina en la posición 15 descrita como parte del sitio de unión a ADP-glucosa.

Hasta el momento no existen genes *ppk* en ningún representante del dominio *Archaea* con la suficiente similitud como para ser detectados con los métodos bioinformáticos disponibles. Otro(s) gen(es) homólogo(s) lejano(s) o no homólogo(s) podría(n) estar involucrado(s) en la síntesis de poliP.

*S. solfataricus* posee un gen *ppx* funcional, codificante para una exopolifosfatasa.

Las variaciones en la actividad PPX en relación con la acumulación de poliP sugieren la existencia de otra(s) enzima(s) involucrada(s) en su metabolismo.



---

## Bibliografía

- 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.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. 1992. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267:22556-22561.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633-639.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Aravalli, R.N. y Garrett, R.A. 1997. Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles* 1:183-191.
- Ault-Riché, D. y Kornberg, A. 1999. Definitive enzymatic assays in polyphosphate analysis. *En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 23 pp 241-252. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*

- 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.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. y Pace, N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:9188-9193.
- Baumann, P., Qureshi, S.A. y Jackson, S.P. 1995. Transcription: new insights from studies on *Archaea*. Trends Genet. 11:279-283.
- Blake, R.II y Johnson, D.B. 2000. Phylogenetic and biochemical diversity among acidophilic bacteria that respire on iron. En D.R. Lovely (ed.), Environmental microbe-metal interactions. ASM Press, Washington D.C.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J. y Higgins, C.F. 1997. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. Mol. Microbiol. 26:387-398.
- Bolesch, D.G. y Keasling, J.D. 2000. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. J. Biol. Chem. 275:33814-33819.
- Bourret, R.B., Borkovich, K.A. y Simon, M.I. 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. 60:401-441.
- Brierley, J.A. y Brierley, C.L. 1986. Microbial mining using thermophilic microorganisms. En T.D. Brock (ed.), Thermophiles: general, molecular and applied microbiology. pp 280-305. John Wiley & sons, Inc.
- Brock, T.D. 1992. Biology of Microorganisms. Seventh edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- 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.
- Brown, J.R., Dousady, C.J., Italia, M.J., Marshall, W.E. y Stanhope, M.J. 2001. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. Nat Genet. 28:281-285.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M. y Bartolucci, S. 1998. An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. J. Bacteriol. 180:3237-3240.
- Cardona S., 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. Elsevier.
- Cardona S., Remonsellez F., Guiliani N. y Jerez C.A. 2001 b. The glycogen-bound polyphosphate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* is actually a glycogen synthase. Appl. Environ. Microbiol. 67:4773-4780.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. 1978. Construction and Characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134:1141-1156.
- 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.
  - Fox, J., Kawaguchi, K., Greenberg, E. y Preiss J. 1976. Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *Escherichia coli* B ADPglucose:1,4-alpha-D-glucan 4-alpha-glucosyltransferase. *Biochemistry* 15:849-856.
  - Furukawa, K., Tagaya, M., Tanizawa, K. y Fukui, T. 1993. Role of the conserved Lys-X-Gly-Gly sequence at the ADP-glucose-binding site in *Escherichia coli* glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 268:23837-23842.
  - Furukawa, K., Tagaya, M., Tanizawa, K. y Fukui, T. 1994. Identification of Lys 277 at the active site of *Escherichia coli* glycogen synthase. Application of affinity labeling combined with site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269:868-871.
  - Gaasterland T. 1999. Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:542-547.
  - Geibdörfer, W., Raatajczak, A. y Hillen, W. 1998. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter sp* strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:896-901.
  - Gonzalez, H. y Jensen, T.E. 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios.*93:179-185.
  - Gupta, R.S. 1998a. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol. Microbiol.* 29:695-707.
  - Gupta, R.S. 1998b. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among *Archaeobacteria*, *Eubacteria* and *Eukaryotes*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435-1491.
  - Hardy, T.A., y Roach, P.J. 1993. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268:23799-23805.
  - Haseltine, C., Montalvo-Rodriguez, R., Bini, E., Carl, A. y Blum P. 1999. Coordinate transcriptional control in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 181:3920-3927.
  - Hensgens, C.M., Santos, H., Zhang, C., Kruizinga, W.H. y Hansen, T.A. 1996. Electron-dense granules in *Desulfovibrio gigas* do not consist of inorganic triphosphate but of a glucose pentakis(diphosphate). *Eur. J. Biochem.* 242:327-331.
  - 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.
  - Howland, J.L. 2000. Where they live (and how they manage). *En* J.L. Howland (ed.), *The surprising Archaea. Discovering another domain of life.* pp 89-108. Oxford University Press. New York.
  - Hsieh, P-C., Shenoy, B.C., Jentoft, J.E. y Phillips, N.F.B. 1993. Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37RA: Evidence that polyP and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Exp. Purif.* 4:76-84.
  - Jerez, C.A. 1988. The heat shock response in meso- and thermoacidophilic

- chemolithotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:289-294.
- Keasling, J.D., Bertsch, L. y Kornberg, A. 1993. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:7029-7033.
  - König, H., Skórko, R., Zillig, W. y Reiter, W. 1982. Glycogen in thermoacidophilic archaeobacteria for the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Arch. Microbiol.* 132:297-303.
  - Koonin, E.V. 1994. Yeast protein controlling inter-organelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp 70 type ATP-binding domain. *TIBS* 19:156-157.
  - Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177:491-496.
  - Kornberg, A. 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 23*, pp 1-17. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
  - Kreegipuu, A., Blom, N. y Brunak, S. 1999. PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res.* 27:237-239.
  - Kulaev, I.S., Kulakovskaya, T.V., Andreeva N.A. y Lichko L.P. 1999. Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. *En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 23*, pp 27-43. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
  - Kumble, K.D., Ahn, K. y Kornberg, A. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 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.
  - Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. y Kornberg, A. 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:21240-21243.
  - Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
  - Lawrence, J.G. y Roth, J.R. 1999. Genomic flux: genome evolution by gene loss and acquisition. *En R.L. Charlebois, (ed.), Organization of the prokaryotic genome.* pp 263-289. American society of Microbiology. Washington DC.
  - Leonard, C.J., Aravind, L. y Koonin, E.V. 1998. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res.* 8:1038-1047.
  - Lindström, E.B., Gunneriusson, E. y Tuovinen, O.H. 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:133-155.
  - Macario, A.J.L, Lange, M., Ahring, B.K. y Conway de Macario, E. 1999. Stress genes and proteins in the *Archaea*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:923-967.
  - Matsubara, M. y Mizuno T. 2000. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*

---

470:118-124.

- Matsudaira, P.T. 1989. A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Inc.
- Mayr, E. 1990. A natural system of organisms. *Nature* 348:491.
- Mayr, E. 1998. Two empires or three. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:9720-9723.
- Meyer, A. 1904. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie, und Chemie des Volutins. *Bot Z.* 62:113-152.
- Murray, V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids. Res.* 17:8889.
- Nolling, J., Pihl, T.D., Vriesema, A. y Reeve, J.N. 1995. Organization and growth phase-dependent transcription of methane genes in two regions of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* genome. *J. Bacteriol.* 177:2460-2468.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D. y Hartl, D.L. 1990. Amplification of flanking sequences by inverse PCR.. *En M.A. Innis, D. Gelfand, J.J. Sninsky y T. White, (eds.), PCR protocols, a guide to methods and applications.* pp.219-227. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. y O'Farrell, P.H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- Ogawa, N., DeRisi, J. y Brown, P.O. 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.* 11:4309-4321.
- Olsen, G.J. y Woese, C.R. 1997. Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89: 991-994.
- Osorio, C. 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.
- Osorio, C. y Jerez, C.A. 1996. Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology.* 142:1531-1536.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. 1972. Soluble adenosine diphosphate glucose-1,4-glucan -4-glucosyltransferases from spinach leaves. *Biochem. J.* 126:953-963.
- Perham, R. 2000. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 69:961-1004.
- Pollock, C. y Preiss, J. 1980. The citrate-stimulated starch synthase of starchy maize kernels: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 204:578-588.
- Rajagopal, N., Aravalli, Q.S. y Garrett, A. 1998. *Archaea* and the new age of microorganisms. *Tree.* 13: 190-194.
- Rao, N.N. y Kornberg, A. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:1394-1400.
- Rao, N.N. y Kornberg, A. 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the

- stationary phase. *En* H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 23 pp 183-195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 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.
  - Rashid, M.H., Rao, N.N. y Kornberg, A. 2000a. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225-227.
  - Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. y Kornberg A. 2000b. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9636-9641.
  - Reusch, R.N. y Sadoff, H.L. 1988. Putative structures y functions of poly-beta-hydroxybutirate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4176-4180.
  - Robles, J. y Doers, M. 1994. pGEM<sup>®</sup>-T vector systems troubleshooting guide. *Promega notes* 45:19.
  - 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.
  - Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  - Sandman, K., Grayling, R.A., Dobrinski, B., Lurz, R. y Reeve, J.N. 1994. Growth-phase-dependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fervidus* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. 91:12624-12628
  - Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
  - Scoarughi, G.L., Cimmino, C. y Donini, P. 1995. Lack of production of (p)ppGpp in *Halobacterium volcanii* under conditions that are effective in the eubacteria. *J. Bacteriol.* 177:82-85.
  - 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.
  - Sethuraman, A., Rao, N.N. y Kornberg, A. 2001. The endopolyphosphatase gene: Essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:8542-8547.
  - 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.* 98:7835-7840.



- 
- Shi, L., Potts, M. y Kennelly, P.J. 1998. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms. A family portrait. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:229-253.
  - Shiba, T., Tsutsumi, K., Yan, O.H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N. y Kornberg, A. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:11210-11215.
  - Skórko, R. 1984. Protein phosphorylation in the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* 145:617-622.
  - Skórko, R., Osipiuk, J. y Stetter, K.O. 1989. Glycogen-bound polyphosphate kinase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 171:5162-5164.
  - Skurat, A.V., Wang, Y. y Roach, P.J. 1994. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 269:2534-2542.
  - Stetter K.O. 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. *En K. Horikoshi y W.D. Grant (eds.), Extremophiles. Microbial life in extreme environments.* pp 19-24. Wiley-Liss, New York.
  - Stetter, K.O. 1995. Microbial life in hyperthermal environments. *ASM News* 61:285-290.
- Tekaia, F., Lazcano, A. y Dujon, B. 1999. The genomic tree as revealed from whole proteome comparisons. *Genome Res.* 9:550-557.
- Trelstad, P.L., Purdhani, P., Geibdörfer W., Hillen, W. y Keasling, J.D. 1999. Polyphosphate kinase of *Acinetobacter sp* Strain ADP1: purification and characterization of the enzyme and its role during changes in extracellular phosphate levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3780-3786.
  - Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl F.U. y Horwich, A.L. 1991. A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide -1. *Nature* 354:490-493.
  - 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.
  - Tzeng, C.M. y Kornberg, A. 1998. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 29:381-382.
  - Vielle, C. y Zeikus G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:1-43.
  - Wächtershäuser, G. 1992. Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 58:85-201.
  - Wiame J-M. 1947. Yeast metaphosphate. *Federation Proc.* 6:302.
- Woese, C.R. 1998. Default taxonomy: Ernst Mayr's view of the microbial world. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:11043-11046.
- Woese, C.R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 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. 87:4576-4579.
- Wood, H.G. y Clark, J.E. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. Annu. Rev. Biochem. 57:235-260.
  - Wurst, H. y Kornberg, A. 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 269:10996-11001.
  - Wurst, H., Shiba, T. y Kornberg, A. 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 177:898-906.
  - Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M. y Namba, T. 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. Nature 352:516-519.
  - Zago, A., Chugani, S. y Chakrabarty, A.M. 1999. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. Appl. Environ. Microbiol. 65:2065-2071.

# Anexo 1: Resultados de métodos bioinformáticos

1.1 Contig b07c12-b04 del genoma de *S. Solfataricus*

1.2 Análisis de la secuencia proteica de la P60 de *S. acidocaldarius* mediante el programa BLASTP

1.3 Análisis de la secuencia proteica de la P60 de *S. acidocaldarius* mediante el programa RPS-BLAST

1.4 Predicción de sitios de fosforilación de la P60 de *S. Acidocaldarius* mediante el programa Phosphobase

1.5 Búsqueda de genes *ppk* y *PHM* en los genomas de *S. solfataricus* y *S. tokodaii* mediante el programa BLASTP

1.6 Contig sh03g1150 del genoma de *S. Solfataricus*

1.7 Análisis del ORF c50 003 de *S. solfataricus* mediante el programa BLASTP

1.8 Análisis del ORF c50 004-c50 003 de *S. solfataricus* mediante el programa BLASTP

1.9 Búsqueda de genes *spoT* y *relA* en el genoma de *S. solfataricus* y en la base de datos COG (Cluster de genes ortólogos)