

UCH-FC  
Doc-Microbiol.  
C268  
C.

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

Tesis

Entrega 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

Diciembre de 2001

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile



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 28 de noviembre de 2001.

Director de tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Jerez", written over a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Romilio Espejo

A handwritten signature in black ink, appearing to be "R. Espejo", written over a horizontal dotted line.

Dr. Claudio Vásquez

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Vásquez", written over a horizontal dotted line.

Dra. Margarita Carú

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Carú", written over a horizontal dotted line.

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 Guiliari, 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.



## INDICE DE MATERIAS

Agradecimientos .....	v
Indice de Materias.....	vi
Lista de Figuras .....	xivi
Lista de Tablas.....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xviii
Resumen.....	xixi
Abstract .....	xxiii

### INTRODUCCIÓN.....1

1. La existencia del dominio <i>Archaea</i> .....	1
1.1 Características del dominio <i>Archaea</i> .....	5
1.2 El género <i>Sulfolobus</i> .....	6
1.3 Estrés en <i>Archaea</i> .....	8
2. Los polifosfatos inorgánicos.....	10
2.1 Localización de los poliP .....	12
2.2 Metabolismo de los poliP .....	12
2.2.1 Enzimas del metabolismo de los poliP en <i>Bacteria</i> .....	13
2.2.2 Enzimas del metabolismo de los poliP en <i>Eukarya</i> .....	14
2.3 PoliP y su relación con la supervivencia ante factores de estrés .....	15
2.3.1 Carencias nutricionales.....	15
2.3.2 Fase estacionaria.....	17
2.3.3 Motilidad, desarrollo de biopelículas y virulencia.....	18

2.3.4 Función de los poliP en la degradación de proteínas ribosomales.....	18
3. PoliP en <i>Sulfolobus</i> .....	19
 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
 1. Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo .....	21
1.1 <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM nro. 639 .....	21
1.2 <i>Sulfolobus solfataricus</i> DSM nro. 1617 .....	21
1.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plasmidios.....	22
1.3.1 Cepas de Promega®.....	22
1.3.2 Plasmidios.....	22
1.3.3 Cepas generadas durante esta Tesis.....	24
2. Fraccionamientos subcelulares.....	25
2.1 Obtención de fracción membranas en <i>S. acidocaldarius</i> .....	25
2.2 Obtención de extractos crudos en <i>S. solfataricus</i> .....	25
3. Purificación del complejo glicógeno-proteína que contiene a la proteína P60.....	26
4. Actividades enzimáticas.....	27
4.1 Determinación de la actividad PPK.....	27
4.2 Determinación de la actividad glicosil transferasa (GT).....	28
4.3 Determinación de la actividad PPX.....	28
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 (PPK <sub>r</sub> ) de <i>E. coli</i> .....	29
5.1.1 Síntesis de [ <sup>32</sup> P]poliP <sub>700</sub> como marcador .....	29

5.1.2 Síntesis de [ <sup>32</sup> P]poliP <sub>700</sub> como sustrato.....	30
5.2 Purificación de [ <sup>32</sup> P]poliP <sub>700</sub> sintetizados <i>in vitro</i> .....	30
5.2.1 A pequeña escala.....	30
5.2.2 A gran escala.....	31
5.3 Análisis de poliP mediante hidrólisis por PPX de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PPXSc).....	32
5.4 Extracción de poliP endógeno en <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i> .....	32
5.5 Cuantificación de poliP.....	33
5.6 Microscopía electrónica.....	34
6. Análisis de proteínas.....	34
6.1 Marcación de proteínas <i>in vivo</i> con H <sub>3</sub> <sup>32</sup> PO <sub>4</sub> .....	34
6.2 Preparación de las fracciones para electroforesis en geles de poliacrilamida.....	35
6.2.1 Muestras para electroforesis desnaturalante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
6.2.1.1 proteínas totales.....	35
6.2.1.2 Fracciones correspondientes a la purificación del complejo glicógeno-proteína.....	35
6.2.2 Muestras para electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio (NEPHGE).....	36
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	36
6.4 Electroforesis bidimensional de proteínas.....	36
6.5 Preparación de las proteínas para microsecuenciación del extremo amino terminal y de péptidos internos.....	38
6.6 Digestión enzimática para la obtención de péptidos internos y separación de los mismos.....	38



6.7 Microsecuenciación del extremo amino terminal de proteínas y péptidos internos .....	37
6.8 Determinación cuantitativa de proteínas.....	39
7. Técnicas de Biología Molecular .....	38
7.1 Purificación de DNA.....	39
7.1.1 Extracción de DNA genómico de <i>S. acidocaldarius</i> y <i>S. solfataricus</i> . .....	39
7.1.2 Purificación de amplificadores de PCR y otros DNAs desde geles de agarosa.....	39
7.1.3 Extracción de plásmidos de cultivos de <i>E. coli</i> .....	40
7.1.3.1 A pequeña escala.....	40
7.1.3.2 A gran escala .....	40
7.1.4 Purificación de productos de digestión mediante fenol-cloroformo.....	40
7.2. Cuantificación de DNA .....	41
7.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	42
7.4 Partidores y determinaciones de PCR .....	42
7.4.1 DOP-PCR (“degenerate oligonucleotide primer polymerase chain reaction”).....	42
7.4.2 PCR inversa.....	43
7.4.3 Amplificación del gen <i>p60</i> de <i>S. acidocaldarius</i> .....	44
7.4.4 Amplificación del fragmento genómico que comprende los ORFs c50 004 y c50 003 de <i>S. solfataricus</i> .....	45
7.4.5 PCR en colonias .....	46
7.5 Digestiones de DNA con enzimas de restricción.....	46
7.5.1 Digestión de DNA total de <i>S. acidocaldarius</i> .....	46

7.5.2 Digestión de productos de PCR.....	46
7.5.3 Digestión de pET21-b(+) y de pGEM <sup>®</sup> -T <sub>ppxssSso</sub> .....	46
7.6 Ensayo de Southern blot.....	47
7.7 Ligaciones de DNA.....	47
7.7.1 Ligación de DNA genómico para PCR inversa.....	47
7.7.2 Ligaciones de vectores con fragmentos de PCR.....	48
7.7.2.1 Fragmento del gen <i>p60</i> obtenido por DOP-PCR.....	48
7.7.2.2 Gen <i>p60</i> .....	48
7.7.2.3 genes <i>ppxssSso</i> y <i>ppxSso</i> .....	47
7.8 Transformaciones.....	49
7.8.1 Con reacciones de ligación.....	49
7.8.2 Con vectores.....	50
7.9 Secuenciación de DNA.....	50
7.9.1 Templados utilizados.....	50
7.9.2 Métodos de secuenciación.....	50
8. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	51
8.1 P60 recombinante (P60r).....	51
8.2 PPX recombinante de <i>S. solfataricus</i> (PPXrSso).....	52
9. Métodos Bioinformáticos.....	53
10. Números de acceso a base de datos de las secuencias nucleotídicas.....	54
RESULTADOS.....	55
1. Polifosfatos en <i>S. acidocaldarius</i> y <i>S. solfataricus</i> .....	55
1.1 PoliP durante el crecimiento en medio rico.....	55
1.2 Niveles de PoliP durante carencias nutricionales en <i>S. solfataricus</i> .....	57

2. Caracterización de la proteína P60 en relación con su posible actividad PPK en <i>S. acidocaldarius</i> .....	61
2.1 Purificación de la P60 asociada al glicógeno y ensayos de actividad PPK y GT.....	61
2.2 Análisis de los productos de reacción del ensayo de actividad PPK..	65
2.3 Caracterización de los polipéptidos presentes en el complejo glicógeno-proteína correspondiente a la fracción F2 .....	69
2.4 Identificación y caracterización del gen <i>p60</i> .....	72
2.4.1 Obtención de un fragmento del gen <i>p60</i> por DOP-PCR.....	72
2.4.2 Obtención de los extremos 5' y 3' del gen <i>p60</i> por PCR inversa .....	77
2.4.3 Análisis de la secuencia aminoacídica deducida de la P60.....	79
2.5 Clonamiento y expresión del gen <i>p60</i> .....	80
2.6 Análisis funcional de la P60r .....	84
3. Actividad PPK en <i>S. acidocaldarius</i> .....	88
4. Búsqueda de genes involucrados en la síntesis de poliP en <i>Archaea</i> mediante métodos bioinformáticos.....	90
5. Identificación y caracterización del gen <i>ppx</i> en <i>S. solfataricus</i> ( <i>ppxSso</i> ) .....	90
5.1 Clonamiento y secuenciación del fragmento genómico que comprende los ORF c50 004-c50 003 .....	92
5.2 Clonamiento del gen <i>ppxSso</i> de <i>S. solfataricus</i> en el sistema de expresión pET.....	95
5.3 Análisis funcional del gen <i>ppxrSso</i> .....	96
5.3.1 Ensayo de actividad PPX en <i>S. solfataricus</i> .....	96
5.3.2 Expresión del gen <i>ppxrSso</i> en <i>E. coli</i> y ensayo de actividad PPX .....	97

5.3.3 Purificación de la PPXr de <i>S. solfataricus</i> .....	101
5.3.4 Caracterización bioquímica de la PPXr de <i>S. solfataricus</i> .....	103
6. Actividad PPX y niveles de poliP en <i>S. solfataricus</i> .....	106
 DISCUSIÓN.....	 108
1. Niveles de PoliP en <i>S. acidocaldarius</i> y en <i>S. solfataricus</i> .....	108
2. La supuesta PPK, asociada al glicógeno de <i>S. acidocaldarius</i> resultó ser una glicógeno sintasa .....	112
3. ¿Existe una gen responsable de la síntesis de poliP en <i>Sulfolobus</i> ? .....	114
4. El gen <i>ppx</i> de <i>S. solfataricus</i> .....	115
 CONCLUSIONES.....	 119
 BIBLIOGRAFÍA .....	 120
 ANEXO 1.....	 133
1.1 Contig b07c12-b04 del genoma de <i>S. solfataricus</i> .....	134
1.2 Análisis de la secuencia proteica de la P60 de <i>S. acidocaldarius</i> mediante el programa BLASTP.....	135
1.3 Análisis de la secuencia proteica de la P60 de <i>S. acidocaldarius</i> mediante el programa RPS-BLAST.....	136
1.4 Predicción de sitios de fosforilación de la P60 de <i>S. acidocaldarius</i> mediante el programa Phosphobase.....	137

1.5 Búsqueda de genes <i>ppk</i> y <i>PHM</i> en los genomas de <i>S. solfataricus</i> y <i>S. tokodaii</i> mediante el programa BLASTP.....	138
1.6 Contig sh03g1150 del genoma de <i>S. solfataricus</i> .....	139
1.7 Análisis del ORF c50 003 de <i>S. solfataricus</i> mediante el programa BLASTP.....	140
1.8 Análisis del ORF c50 004-c50 003 de <i>S. solfataricus</i> mediante el programa BLASTP.....	141
1.9 Búsqueda de genes <i>spoT</i> y <i>relA</i> en el genoma de <i>S. solfataricus</i> y en la base de datos COG (Cluster de genes ortólogos).....	142
ANEXO 2: Publicaciones generadas durante esta tesis.....	143



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arbol filogenético universal de los seres vivos.....	2
Figura 2. El árbol de la vida visto como una red.....	3
Figura 3. Fuente solfatárica del parque Yellowstone, EE. UU.....	7
Figura 4. Polifosfatos inorgánicos.....	10
Figura 5. Modelo de la acumulación de poli P inducida por estrés en <i>E.coli</i> .....	17
Figura 6. Niveles de PoliP durante el crecimiento en medio rico.....	56
Figura 7. PoliP durante carencias nutricionales en <i>S. solfataricus</i> .....	58
Figura 8. PoliP durante carencia de aminoácidos en <i>S. solfataricus</i> .....	60
Figura 9. Purificación de la P60 asociada al glicógeno .....	63
Figura 10. Análisis de los productos de reacción obtenidos durante el ensayo de actividad PPK.....	67
Figura 11. Análisis de la fracción F2 por NEPHGE.....	70
Figura 12. Fosforilación de la P60. ....	70
Figura 13. Amplificación por DOP-PCR de fragmentos del gen P60.....	74
Figura 14. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del fragmento de 800 pb amplificado por PCR.....	75
Figura 15. Secuencia completa del gen <i>p60</i> y secuencia aminoacídica deducida.....	80
Figura 16. Alineamiento múltiple de glicógeno sintasas bacterianas y de arqueas.....	82
Figura 17. Expresión del gen <i>p60r</i> en <i>E. coli</i> .....	87
Figura 18. Actividades PPK y GT medidas en la fracción de membranas .....	87
Figura 19. Actividad PPK asociada a membranas en <i>S. acidocaldarius</i> .....	89
Figura 20. Detalle del contig sh03g1150 de <i>S. solfataricus</i> .....	91
Figura 21. Esquema del alineamiento entre la PPK de <i>E coli</i> y los ORFs c50 004 y c50 003.....	92
Figura 22. Alineamiento múltiple de la PPX de <i>S. solfataricus</i> con PPXs bacterianas....	95

Figura 23. Actividad PPX en extractos crudos de <i>S. solfataricus</i> .....	97
Figura 24. Análisis funcional del gen <i>ppxrSso</i> de <i>S. solfataricus</i> .....	99
Figura 25. Análisis de la actividad PPX por TLC en las cepas SC3 y SC21.....	100
Figura 26. Purificación de la PPXr de <i>S. solfataricus</i> por cromatografía de afinidad a níquel.....	102
Figura 27. Efecto de la temperatura, pH y sales sobre la actividad de la PPXr de <i>S. solfataricus</i> .....	105
Figura 28. Actividad PPX y niveles de poliP durante el crecimiento de <i>S. solfataricus</i> .....	107

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de tres especies de <i>Sulfolobus</i> .....	7
Tabla 2. Actividades enzimáticas medidas durante la purificación de la P60. ....	63
Tabla 3. Secuencias proteicas similares al fragmento de la P60 amplificado por DOP-PCR.....	76

## 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 penta fosfato

**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. solfatarius* 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%).

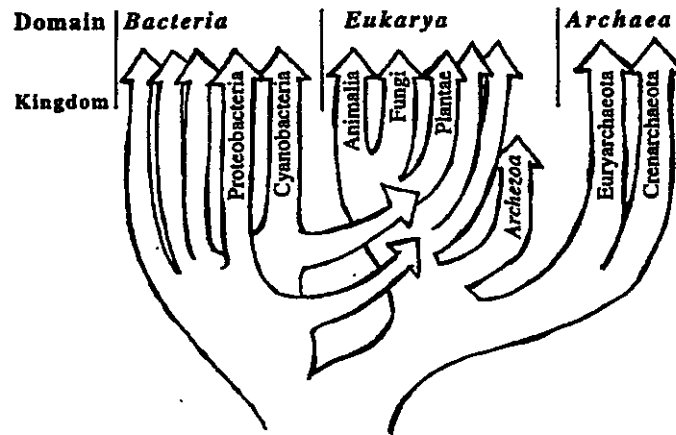


Figura 1. Árbol filogenético universal de los seres vivos (Doolittle, 1999).

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 construidos 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).

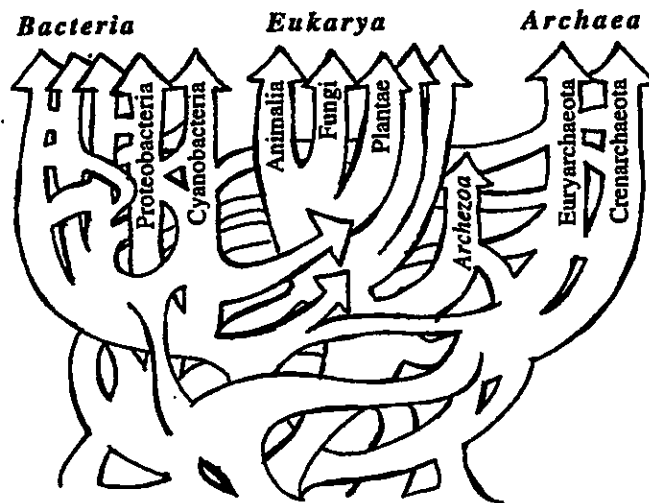


Figura 2. El árbol de la vida visto como una red (Doolittle, 1999).

---

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 halofílicas, 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*

Perteneciente al reino *Crenarcheota*, 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).

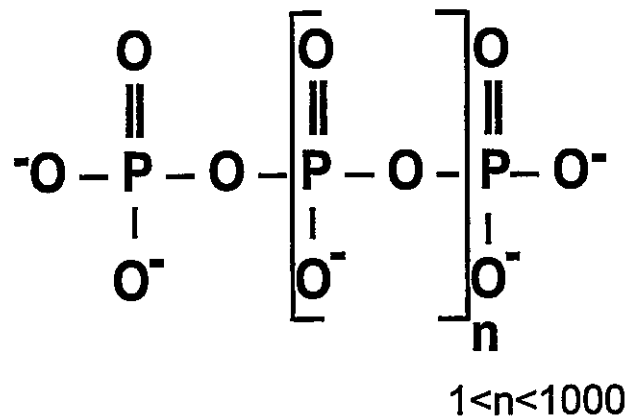


Figura 4. Polifosfatos inorgánicos. n representa el número de residuos de fosfato.

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**

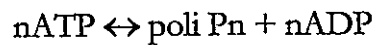
En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble (Rao y col., 1998). También existen pequeñas cantidades de poliP en las membranas plasmáticas, en complejo con poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y calcio (Reusch y Sadoff, 1988). En eucariontes, 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* (YFL004*w*), *PHM2* (YPL019*c*), *PHM3* (YJL012*c*) y *PHM4* (YER072*w*) que codifican para proteínas de la membrana vacuolar en *Saccharomyces cerevisisiae* 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).

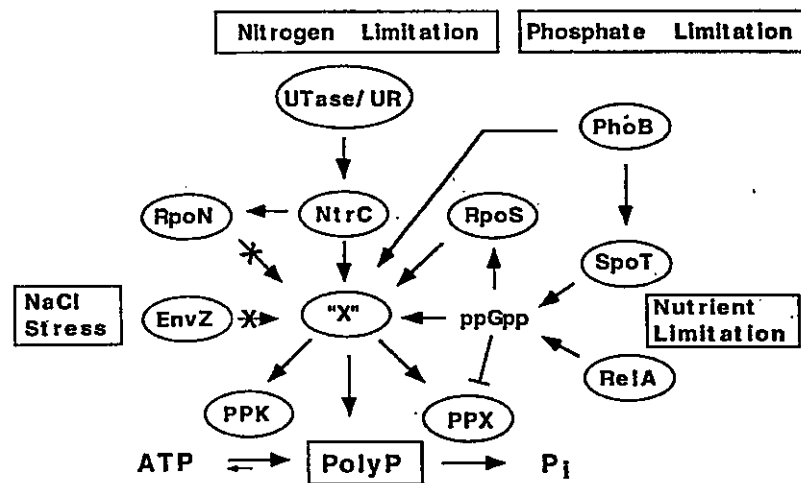


Figura 5. Modelo de la acumulación de poli P inducida por estrés en *Escherichia coli*. (Ault-Riché y col., 1998).

### 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* la 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* y plasmidios

#### 1.3.1 Cepas de Promega®

BL21(DE3). Genotipo  $F^+$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ) *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3),  $Cm^r$  *thi*, *supE*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*musS*::Tn10], [ $F'$ , *proAB*, *laqI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15].

JM109. Genotipo *endA1*, *recA1* *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [ $F'$ , *traD36*, *proAB*, *laqI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ 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-galactopiranosido (X-Gal), 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (Amp) o 34  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol (Cm).

#### 1.3.2 Plasmidios

pGEM®-T(Promega): pGEM®-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 T7 y 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<sub>ppxSso</sub>: plasmidio pGEM<sup>®</sup>-T que contiene como inserto el gen *ppx* de *S. solfataricus* 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 poliacilamida (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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNasa y RNasa. Ambas fracciones se utilizaron para determinar actividad PPK 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 µl 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 µl 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  $\mu$ l de una solución que contenía 50 mM Tris-acetato pH 7.0, 2 mM  $MnCl_2$ , 10 mM KCl, 1 mM  $[\gamma-^{32}P]ATP$  (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  $\mu$ l de  $HClO_4$  al 7% y 50  $\mu$ l de una solución de 20 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). El  $[^{32}P]$ 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  $\mu$ l de una solución conteniendo 50 mM Tris-acetato pH 7.0, 1 mM EDTA, 22 mM  $NH_4Cl$ , 5 mM UDP-[U- $^{14}C$ ]glucosa (0.8 mCi/mol). La reacción se detuvo con 117  $\mu$ 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 (PPK<sub>r</sub>) 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 µg/ml creatina fosfoquinasa (CPK), 1 mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (0.142 µCi/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 µl 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-ClH 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 µl. Para precipitar el poliP, se agregó a cada una de estas alícuotas 140 µl 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  $\mu$ l de etanol al 70%, se secaron durante la noche por vacío y se resuspendieron en 25  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. Para determinar la presencia y cantidad de [ $^{32}$ P]poliP se analizó la radiactividad de alícuotas de 1  $\mu$ 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 [ $^{32}$ P]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-ClH 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  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. La presencia y cantidad de [ $^{32}$ P]poliP se estimaron según se



indicó anteriormente. Típicamente se obtuvo una solución 8 mM de [ $^{32}\text{P}$ poliP] con una actividad específica de 13 cpm/pmol.

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

Se realizó según Wurst y col. (1995) en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  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 PPXSc (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  $\mu\text{l}$  de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30  $\mu\text{l}$  de 10% SDS y luego de incubación a 95°C durante 2 min, se agregó 300  $\mu\text{l}$  de 50% etanol y 5  $\mu\text{l}$  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 µl de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µg/ml DNasa y 5 µg/ml RNasa y se incubó a 37°C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 µl 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 µl 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 µl) 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 µl en tampón 50 mM Hepes-KOH pH 7.2, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 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  $\mu$ 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 $H_3^{32}PO_4$

Se realizó según Skórko (1984) con las siguientes modificaciones: 200 ml de un cultivo que había alcanzado una  $DO_{600}$  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  $H_3^{32}PO_4$  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 desnaturalante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

##### 6.2.1.1 Proteínas totales

Diez mg de células (peso húmedo) se resuspendieron en 100  $\mu$ l de agua destilada y se trataron con 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l correspondientes a las tres fracciones se trataron con 5  $\mu$ 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  $^{32}\text{P}$  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  $\mu\text{l}$  de 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  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  $\mu\text{l}$  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®-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-álcool 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  $\mu\text{l}$  de cloroformo-alcohol isoamílico en la relación 24:1. Para extraer la fase acuosa residual, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de agua siguiendo los mismos pasos de extracción. El DNA obtenido en las 2 fracciones (aproximadamente 200  $\mu\text{l}$ ) se precipitó con 1.5  $\mu\text{l}$  de una solución de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de glicógeno y 8  $\mu\text{l}$  de 5 M NaCl (agitando por vortex) y se agregaron 800  $\mu\text{l}$  de 90% de etanol. Se mezcló por inversión y se incubó 30 min en hielo (o toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Luego el DNA se centrifugó 30 min a 14500 g ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se recuperó como un sedimento blanquecino. El sedimento se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de 70% de etanol, agitando por inversión y centrifugando 10 min a 14500 g y se secó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 a 15 min. Finalmente, el DNA se resuspendió en 35  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 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'-YTNAARCA YGTNTGGATGAT-3'),

P6021DD (5'-ATHATHGAYWSNTGGAAYAT-3'),

P6021DR (5'-ATRTTCCANSWRWCWATWAT-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 *Xho*I 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 a 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 P60NNdeI y P60CAvaI2 correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen y que contenían los sitios de restricción para las enzimas *Nde*I y *Ava*I. Las secuencias de los partidores son:

P60NNdeI: 5'TTAACATATGAAGAGATATGAAAGCCT3'

P60CAvaI2: 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 partidor, 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 C5004NNdeI y C5003CXhoIH correspondientes a los extremos 5' del ORF c50 004 y 3' del ORF c50 003, sin su propio codón de término (*ppxssSo*) y C5004NNdeI y C5003CXhoI correspondientes a los extremos 5' del ORF c50 004 y 3' del ORF c50 003, con su propio codón de término (*ppxSo*). Los partidores contenían los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* según se indica por su denominación *NdeI* o *XhoI*, respectivamente. Las secuencias de los partidores son:

C5004NNdeI: 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>-T<sub>ppxssSso</sub>

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®) según el método de capilaridad. La prehibridación e hibridación se realizaron a 42°C con "DIG Easy buffer" (Boehringer Mannheim®). La sonda de 500 pb marcada con digoxigenina se obtuvo por PCR utilizando el PCR dig Probe System (Boehringer Mannheim®) 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'TATTTCAGCCCTATCCTCAGT3' 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 *ppx<sub>ss</sub>Sso* 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  $\mu$ l 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 *Xba*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/ $\mu$ g de DNA por lo que son adecuadas para transformar productos de ligación. Se utilizaron 25  $\mu$ l de células y 5  $\mu$ l 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  $\mu$ l de medio SOC (Promega), se incubó 45 min a 37°C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l de medio SOC (Promega), se incubó 45 min a 37°C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200  $\mu$ l 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/ $\mu$ l.

### 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  $\mu\text{m}$  para ser aplicado en una columna conteniendo 1.5 ml de resina His Bind Resin (Novagen) equilibrada con 50 mM  $\text{NiSO}_4$ . 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  $\text{DO}_{600}$  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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.0) y se agregó lisozima 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 (*glg-A*) 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.

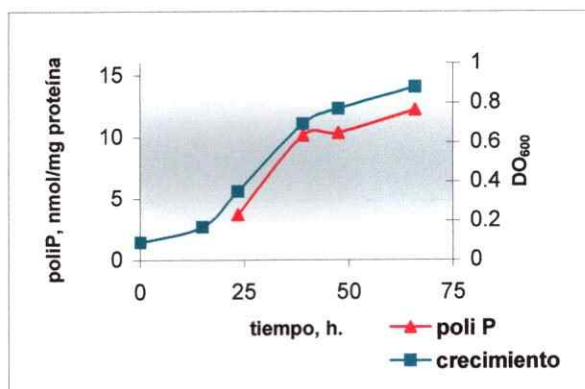
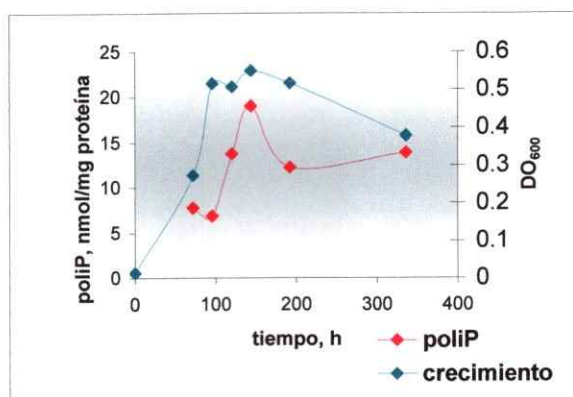
a) *S. acidocaldarius*b) *S. solfataricus*

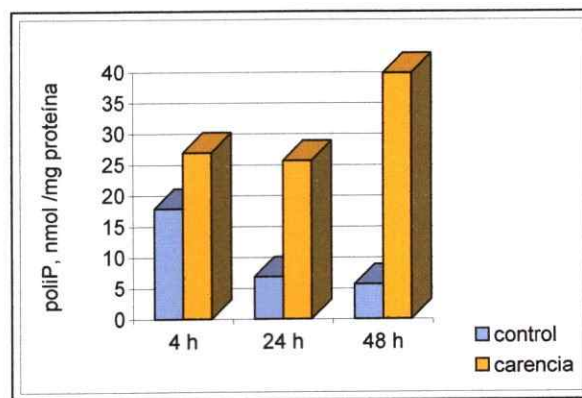
Figura 6. Niveles de PoliP durante el crecimiento. Los cultivos de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* se crecieron en medio 88 con extracto de levadura y medio 182 con extracto de levadura y casaminoácidos, respectivamente. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 1 ml para medir la densidad 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).

a)



b)

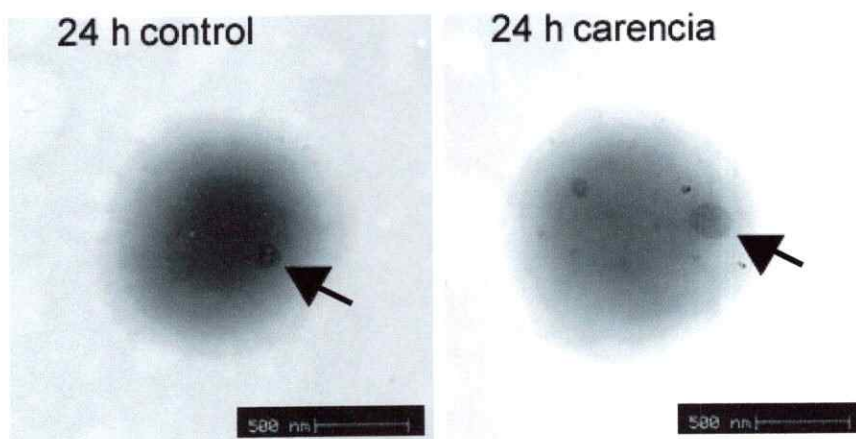
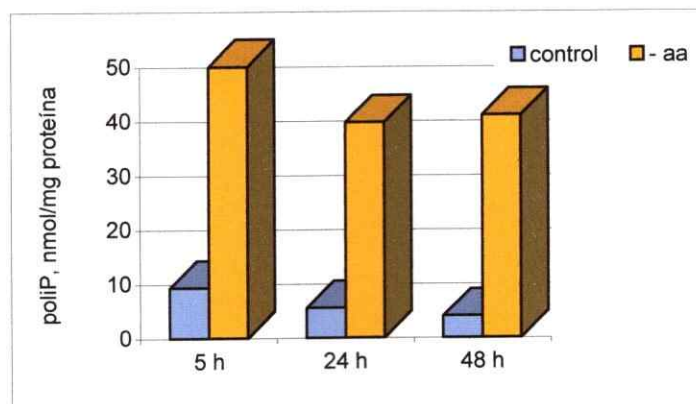


Figura 7. PoliP durante carencias nutricionales en *S. solfataricus*. Los microorganismos se crecieron en medio 182 suplementado con extracto de levadura (1 g/l) y casaminoácidos (1 g/l). Las células se colectaron al llegar a fase exponencial media ( $DO_{600}$  0.3) y se resuspendieron en igual volumen 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 acumulaci3n de los poliP, *S. solfataricus* se creci3 en el mismo medio 182 pero reemplazando el extracto de levadura por sacarosa y los casamino3cidos por una soluci3n de amino3cidos. Luego del crecimiento hasta la fase exponencial, las c3lulas se colectaron y se resuspendieron en el mismo medio omitiendo los amino3cidos (Fig. 8). Cuando las c3lulas se sometieron a la carencia de amino3cidos los niveles de poliP relativos a la cantidad de prote3nas aumentaron significativamente en todos los tiempos analizados (Fig. 8a) y adem3s las c3lulas mostraron gr3nulos electrodensos aumentados de tama1o que burbujeban bajo el haz de electrones, lo cual es caracter3stico de gr3nulos de poliP (Fig. 8b, -aa). En cambio en las c3lulas control, los gr3nulos eran casi imperceptibles (Fig. 8b, control).

Cuando las c3lulas 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)

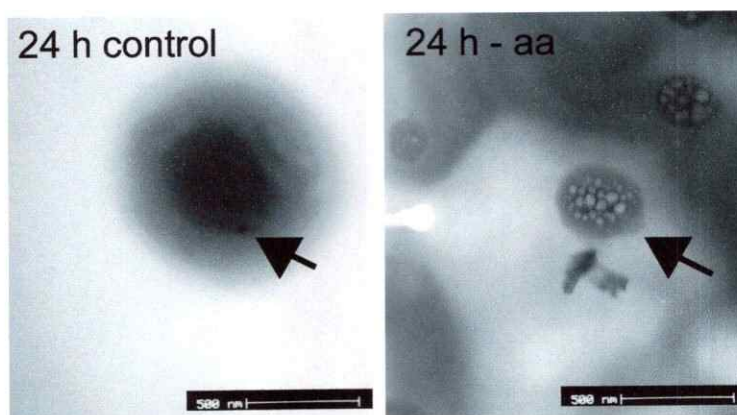


Figura 8. PoliP durante carencia de aminoácidos en *S. solfataricus*. Los microorganismos se crecieron en medio 182 suplementado con sacarosa (2 g/l), aminoácidos (0.05 g/l) y fosfato (3 g/l). Las células se colectaron al llegar a fase exponencial media ( $DO_{600}$  0.3) y se resuspendieron en el mismo 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.

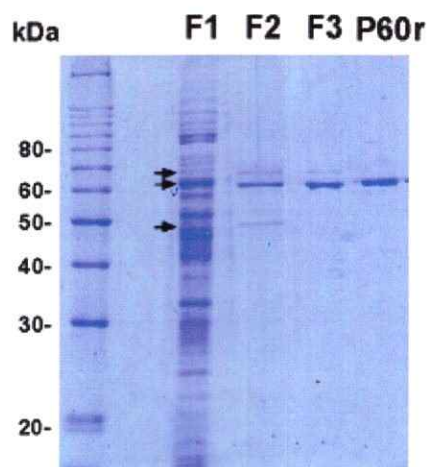


Figura 9. Purificación de la P60 asociada al glicógeno. Las fracciones obtenidas en la purificación se analizaron por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie. F1, extracto crudo (20 $\mu$ g); F2, primer gradiente de CsCl (1  $\mu$ g); F3, segundo gradiente de CsCl (1  $\mu$ g); P60r (0.5  $\mu$ g). 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 [ $\gamma$ - $^{32}$ 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 uso 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  $\mu\text{Ci/nmol}$ ) 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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  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 PPXSc. La hidrólisis del supuesto poliP a Pi se siguió por TLC (Fig. 10).

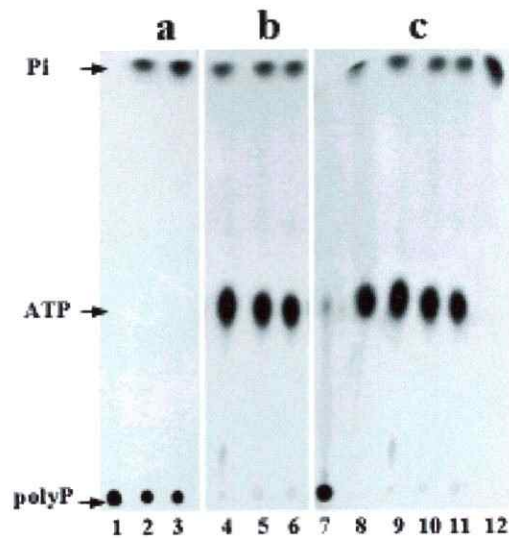


Figura 10. Análisis de los productos de reacción obtenidos durante el ensayo de actividad PPK.  $[^{32}\text{P}]\text{PoliP}_{700}$  (a, carriles 1, 2 y 3), el material marcado con  $^{32}\text{P}$  obtenido en el ensayo de actividad PPK usando la fracción F2 (b, carriles 4, 5 y 6 y c, carriles 9, 10 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:  $[^{32}\text{P}] \text{poliP}_{700}$  (carril 7),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (carril 8) y  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (carril 12).

---

Cuando se analizó el poliP que provenía del ensayo de PPK usando PPK<sub>r</sub>, (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 PPX<sub>Sce</sub> (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). Las 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 MKRYESLWFEDELKHWMI. 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).



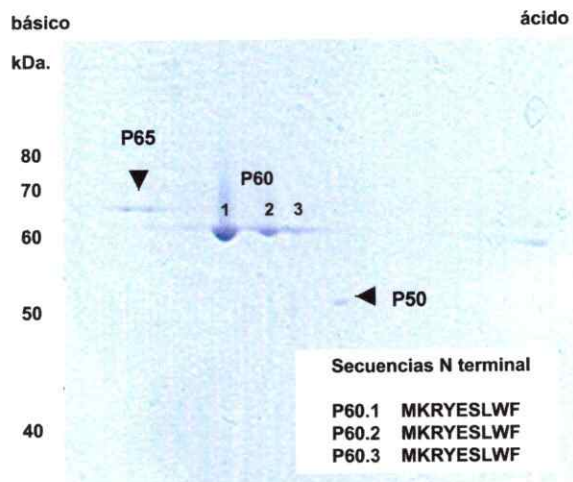


Figura 11. Análisis de la fracción F2 por NEPHGE. Una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  correspondiente a la fracción F2 se analizó por NEPHGE. Las manchas proteicas fueron visualizadas por tinción con Azul de Coomassie.



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 RNVILGFEVH. 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.

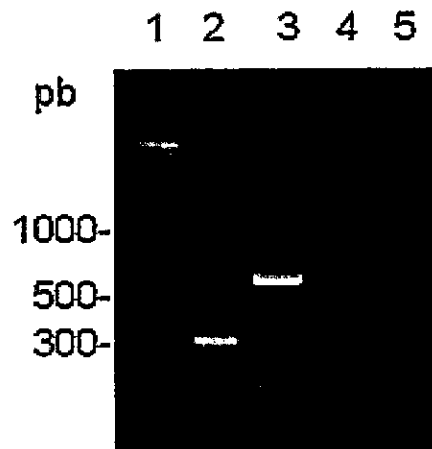


Figura 13. Amplificación por DOP-PCR de fragmentos del gen *p60*. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1, Standard de peso molecular; 2, partidores NH2DD/P21DR; 3, NH2DD/P27DR; 4, P21DD / P27DR; 5, P27DD /P21DR.

```

1   yTnAArCAcG TgTGGATGAT CAGTGCOGAG CTAGAGAAAAG TAGCTAGTCT
51  AGGGGGATTG GGACCAGTAG TATATAATCT TGGTAAAGAA TTAGTTAAGC
101 AGGGTATAAA AGTAACTGTA ATCATGCCAA GCCATGGTCG TCATCTTAAT
151 GACTATTATA GGTCACTCCT TAAATTGAAC GAAATATCTT TAGTCGCAGA
201 AGGAGATAGA ATAGGTATTG ATGGTAAATC TTATCACTAC AAGCTAGGGT
251 TTGAACATGG AAATTTGGAT GGAATGAACG TGGTTTTAAT TAAAGGACTG
301 GATTACAACA OGGGAAGGAT AATTGATTCA TGGAACATTT ACGATAACGC
351 CATGGAGAAA TCTTCACTTC TGGCTAGGGC TGTOGAGAAG TATGCAAAGT
401 TCTCAATACC TAATGACATA COGTCCATAA TACACGTACA TGATTGGCAC
451 TCTGTAATTG CAGGTGTGAC TGCTAAATTT ACATTTGAGG CTAGGAGAGT
501 AATAGTTCCT CTAGTATTTA CAGTTCACCT GTTAAACAAG GTCAGTGCAC
551 CTTGGCATTG OCGGTCAGAA GATTGGAGTG GACTGATGAA TTATCCACAT
601 TACATTTGGA GAATAATAAA ACATGACTTG TACACAATA GAGAAGTGTG
651 GGATTTCTTC TCTTCTGGTT CCATAGAAAA GTTTGGttCT TATGAGGCTG
701 ATCTAATAAC ATCAGTTAGT AAAAGCTACC TAACATATGA TATATTTAAC
751 TTCATAGGAA ACTGGATAGA GAACAAGAGT TGTATCCATT ATAACGGTAC
801 TGATTGGGAA GTAGAGGAGA CTA AAAAGTA CGCTTACAGC AAGTTTGGGA
851 CTGAGGATAG GGCTGAAATA AGAAAAAGGT TATTCGACGA GCTCGAATTC

1   XKHVWMISAE LEKVASLGGL GPVVYNLGKE LVKQGIKVTV IMPSHGRHLN
51  DYYRLLKLN EISLVAEGDR IGIDGKSYHY KLGFEHGNLD GMNVVLIKGL
101 DYNTGRIIDS WNIYDNAMEK SLLARAVEK YAKFSIPNDI PSIIHVHDwH
151 SVIAGVTAKF TFEARRVIVP LVFTVHLLNK VSAPWHYASE DWSGLMNYPH
201 YIWRIKHDL YTTREVWDFD SSGSIEKFGS YEADLITSVS KSYLTYDIFN
251 FIGNWIENKS CIHYNGTDWE VEETKKYAYS KFGTEDRAEI RKRLFDELEF

```

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 (bits)	Expect
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 *AvaI* y *XhoI* 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.









*Sac* 1 MKRYEELWFEDELKHWMTSABTEKVASISGGLGPEVYVYVCKGIVKQCHRVVIVMPSHGRLNDYYSRLKDNHSTVAEG  
*Pab* 1 -----MKVLLIGREFTLEV-KVGGLABALTAISEAASISGHEVIVVTEPSHGRFQGEIIGKIRVVFGEVQVKVS  
*Mja* 1 -----MKIVTILAPTHLPIVSYGGLGDMVRDLPKPKKKGNEVVVLTIDNHNYRYFTLPIYEDIKKIKTVVYKGAKI  
*Tma* 1 -----MKVVFVSYEVSEFAKVGGLADVAGTPEKILKKEGVDVITVMPSEIRIVEKNAEKGFEYERKVAESLSV  
*Aae* 1 -----MRVLFCSSENYELAKTGGGLADFSFCILKYEKKYGVKVGVMYIYKTKAENLRKTKDKGVTIDNLKGD  
*Eco* 1 -----MVDLHVCSSEYFELLKTTGGGLADVIGAPPAQIADGVDARVLLPAFDIIRGVITDAQVVSRR-DTFAGH  
*Rtr* 1 -----MKVLSVSESEVPELIRKTTGGGLADVIGAPPLAKKPYGVEKTKLLEGGYPAVKAIRDPVVRLEPDLICEA

*Sac* 81 DRIGIDGKSYHRTGPEHGNDGMNVVHRKGLDYNTGRIDSNINIDNAMEKSSLIARAVEKYAKFSTENDIESIITHVHD  
*Pab* 67 YEE--RGNLRTYRIGG-----GLDSEDVYG--P-GWDELIRKAVTFCRASVLLNDHREERF--LDDVVHHD  
*Mja* 68 TEDVLRTRKHEFTGVDL-----IVFSNESVNN-----LNVWDFIKMEIEFDLVTIYDEVKD---IDVVSGHD  
*Tma* 68 SHVKTDQKFDIIEQSVLP-G-----SDVKTYFVANDYFSAEDVHAGPDIAGEQAEFFCAATLDLVKHLDLKEDIVHVNQ  
*Aae* 68 YTFEYVESEDCSEIRND-----EIFFGRDYITGP--P--GWGVEDNDHRECEGSEAVSELESTGQL--EADVVAHD  
*Eco* 67 ITLLFGHYNGVGLYLD-----APRLYDRPGSPYHDTNLFAYTDNVHREALLGWGAEMASGLDPFWRPDDVVAHD  
*Rtr* 68 ATILEVEHAGISSEVLD-----APAYYSRTGGPYVDATGKDYEDNWRRFPAABSLAGAEIAAGLLPGWPEDEVHHD

*Sac* 161 WHSVITAGVTRKFTBEAR--RVIVPLVETVHLNPKVSAPWHYASPDWSGLMN-----YBHYHNRMIKHDLYTTRF  
*Pab* 129 WHTVFAGALHKYK-----HPAVETIHRDNKSKLPAFVFEAG-----LSELAOPYDIDP--  
*Mja* 127 WMCGLALAKNDHLDL-----TTLTTHNFAKCEMIEYKCEVMIFLELGIKYADAVNTVSESHAEERKNYPIQKYL  
*Tma* 140 WQALHPVYKTVYRDPYFSRTAVLFEHNLGYQGVDFKYLSEFAG-----LEDVYVTDIGHEEYKQLN  
*Aae* 133 WQALHPVYKTVYRDPYFSRTAVLFEHNLGYQGVDFKYLSEFAG-----LEDVYVTDIGHEEYKQLN  
*Eco* 138 WBSGLAPAYLAARGPA--K---SVETVHNLAYQGMFYAHMNDIQ-----LWSEFENHGHGEEENQGIS  
*Rtr* 139 WQALHPVYKTVYRDPYFSRTAVLFEHNLGYQGVDFKYLSEFAG-----LEDVYVTDIGHEEYKQLN

*Sac* 228 VWDFSSGSIERKGSMEADHITSVSKSLTYDIFNEIGN-----WIENKSCIHNGADWEVEETK-----YAYSX  
*Pab* 180 EHTGGYIADIYTTVSRGLIDEWGFFRN-----FEGKTYVENGIDCSFVNES-----  
*Mja* 200 NN-----KPFCCILNGIDIDEYDPMKILERMCLNSNNKED-----PRNYATISPYSAEDSHNIRKIKYSWFYRGGV  
*Tma* 205 -----FKGGIVFSDVINTVSPYAREIQTEZYCEKLDG--VLRMRKDLVGLTNGIDYELYNPATDRYHYVNDV  
*Aae* 193 -----FMKGGIVFSDVINTVSPYAREIQTEZYCEKLDG--VLRMRKDLVGLTNGIDYELYNPATDRYHYVNDV  
*Eco* 197 -----FKAGLYYADHETAVSPYARELTPQFAYGMEGLLQQRHREGRLSGVNGYDERKTSSETDILLASRYAR  
*Rtr* 199 -----FKGGIQTAAHAIITTVSPYAREILTPFEGMLEGVTASKAYN--LYGIVNGIDADIWNPATDEMHAQYISA

*Sac* 294 FQNEDEAEIKRREDELEVLKRVTPEDYITGNILLWNRFNIGIKDDWTYSRELENGPLIFAGRMVY-OKGIDSILLIADSDV  
*Pab* 228 VLTGSRDERKKSLSKFG-----MDEGVTFEFGFRDRGOKGVQVLLKRAHELE  
*Mja* 267 VEYVDEWNKIDKCHSAIDVEVHGG-----VDGDIETPLTCEVGRATH-OKGENAVFPAIPEL  
*Tma* 274 NRLELKWENKVKIQEELGLEPVN-----REYAVAGLISRLVLP-OKGIDLIVDVMVDYL  
*Aae* 262 RNYSRKFNNKELSKELG-----TEAEKPLISEINFTYH-OKGVEILDNCABEM  
*Eco* 268 DYLEDEAENKROLQIANGIKVDDK-----VPLEFAVVSRITS-OKGIDLIVLEALPGL  
*Rtr* 268 ATLKERAINRHRVVEHEGDEEDD-----GPIFCVVSRLTW-OKGMDLLEAVASEV

*Sac* 373 FKIINNARLIIIGLPSDYGLONVVSNIISREGGNI--RUILGKMSKELYRLEFYASAVFVIPSRIEPEGLVAVESMAVC  
*Pab* 276 SSKKEFQEMFILLICRQDP-ELEGWARSHEERHGNV--KVTITMLSRFVRELYGSVDFVITIPSYEEPEGLVAEAMCIG  
*Mja* 323 FEKHD--HREVELTRGDR-DIEERLKNANEHDGR--HVALIGYSLPLSSLVFAGSDWITMPSYWEPCGLVOMEAMAVC  
*Tma* 324 TLFQD---LQIVVLGEGDE-QYENAFRKEQERYPK--VSANLKEVVEEAQKTYAGADIEFMPSRYEPCGLCOMFSMYG  
*Aae* 310 SKLN--ANFVSLGEGEY--ENAFILVSKIYKN--FKVFAEBNNEGFAKHYASSDEFLMPSYEEPCGLVOMEAMAVC  
*Eco* 318 FEQG---GQLAHLGAGDP-VLEGFLAAAEYPCQ--VGVQIGYHEAFSRRVCGADVILVPSREFPCGLVQLYGLKYG  
*Rtr* 317 VMHG---GKLABLCAEDA-ALEGALFAAAGHRGR--VGVVGRHNEPYSHLMQACDAILTPSRFEPCCGLVQLYGLKRS

*Sac* 451 TPFVAVSYGGLRESIVDI---R-VDQ--EQGCHVEPEPVVWELSKRALLSALSMSASE---TNGDFLKYT-EVKTND  
*Pab* 353 AEPFASAVGGLRDIIT-----NEPGLVKAQDPCELANAILKALEEERS  
*Mja* 397 TPFVATETGGLKDTIIEHPNYPYHPNEDKATGVLEKVEDKVGEMVCEHALNWTFYKLINEICMFMQYIRYKCPKHPYDE  
*Tma* 397 TPFVVRVYTGGLADTVKEDYD---PQS--MEGTGCFPKYDSABLDRVSKALHEFYR  
*Aae* 380 CVPIVRKTYGGLRDTVRDIS-----EGGVTIIEEPEKETFICSLIRALEEYEN  
*Eco* 391 TPFVVRVYTGGLADTVKEDYD---PQS--MEGTGCFPKYDSABLDRVSKALHEFYR  
*Rtr* 390 CIEFVARTGGLNDPTLIDANHAA-LQA--KVATGEOQSPVTEAGLLOAMRRAMBLEOD

```

Sac  520  VKLWDRIRONCVRRVNEFRWSASAKQLQECESKAQTMAYRALASF
Pab  397  --DLSKREKRCRRRAMS-FSWEKSAERYAKAETGSEDEAFDFIL---
Mja  477  NSPLSMMMKNCYHVFERNLSWONSPSIRRYKGLFGGAIYNEYLQF--
Tma  448  --EKDHWRRIMTNAAMTDLSWDRSAKCYVELYKKAIAKAVGR-----
Aae  428  ---AKREFRNSVETVMSLDFSCDRMTKCYHECYEEVQSEQ-----
Eco  445  ---PSLREFVCRQAMAMDFSWQVAKSYRELYYRLK-----
Rtr  444  ---RKVVTOMCKOGLKSDVSWGRSAERYAALVSSILVSRGA-----

```

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).

La búsqueda de dominios conservados en la P60 reveló la presencia del dominio de glicosil transferasas Grupo 1 de la base de datos de dominios proteicos Pfam (E:  $2 \times 10^{-23}$ ). (Fig. 16; anexo 1.3). Esta familia comprende glicosil transferasas de arqueas, bacterias, hongos y plantas. La glicógeno sintasa de *S. acidocaldarius* mostró 22% de identidad y 38% de similitud (E:  $9 \times 10^{-9}$ ) con la glicógeno sintasa codificada por el gen *glgA* de *E. coli*. Para esta enzima se han descrito dos sitios importantes para la actividad: Lys 15, el cual forma parte del motivo KXGG (donde X representa cualquier aminoácido) y está involucrado en la unión a ADP-glucosa (Furukawa y col., 1993) y Lys 277 que constituye parte del sitio activo (Furukawa y col., 1994). La Lys 277 está bien conservada en todas las secuencias analizadas (Fig. 16). Aunque la posición de la Lys 277 no es clara en la secuencia de la glicógeno sintasa de *M. jannaschii*, el alineamiento muestra dos Lys cerca de esta posición, lo que sugiere que este residuo está también conservado en esta proteína. Sin embargo este no es el caso de la Lys 15 la cual está ausente en las glicógeno sintasas de *S. acidocaldarius* y *M. jannaschii*.

A nuestro entender no está descrito que las glicógeno sintasas bacterianas ni de arqueas sean fosforilables. Sin embargo, anteriormente se mostró que la P60 se marcó *in vivo* con  $H_3^{32}PO_4$ , sugiriendo que es fosforilable. La marca fue estable a pH 2.5 (datos no mostrados), característica que no poseen fosfo-

histidinas como las fosfo-histidinas de la PPK de *E. coli* fosforilada *in vitro* (Kumble y col., 1996). Por otro lado, las glicógeno sintasas de mamíferos y de levadura están reguladas por fosforilación en Ser y Thr (Hardy y col., 1993; Skurat y col., 1994). En base a estos datos se buscó en la P60 sitios 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 (*p60<sub>r</sub>*). 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 *p60<sub>r</sub>* 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 desnaturalantes 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 partidador 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).

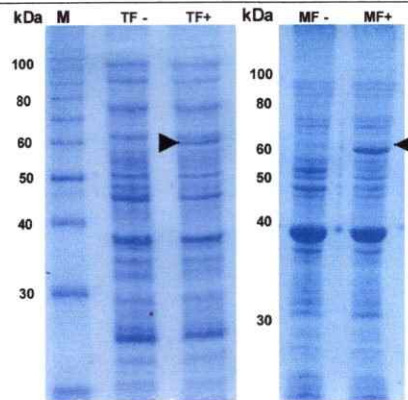


Figura 17. Expresión del gen *p60r* en *E. coli*. Las células de la cepa SC1 se crecieron durante 3 h en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG. Las proteínas totales (TF) y de membranas (MF) se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con Azul de Coomassie. Las flechas indican la posición de la banda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

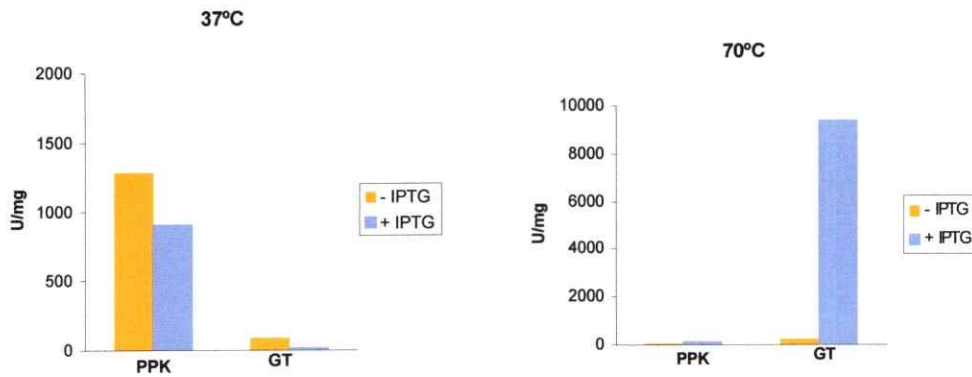


Figura 18. Actividades PPK y GT medidas en la fracción de membranas. Las actividades enzimáticas correspondientes se ensayaron a 37°C o a 70°C en la fracción membranas (FM) de células correspondientes a la cepa SC1 crecidas en ausencia (-IPTG) o en presencia de IPTG (+IPTG). Notar la diferencia de escala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

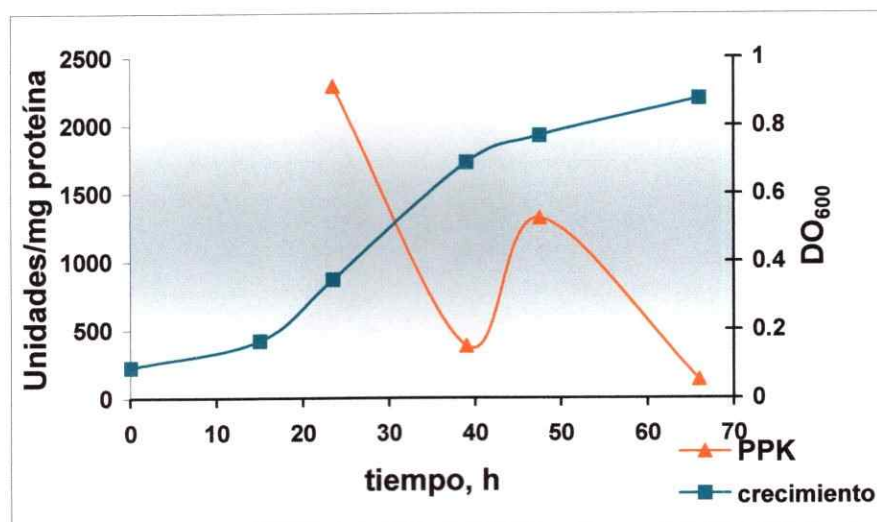


Figura 19. Actividad PPK asociada a membranas en *S. acidocaldarius*. Las células se cultivaron en medio 88 con sacarosa 0.2% y extracto de levadura 0.1%. A los tiempos indicados se colectaron alícuotas de 1 ml y se determinó la  $DO_{600}$ . La obtención de la fracción membranas y la determinación de 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.

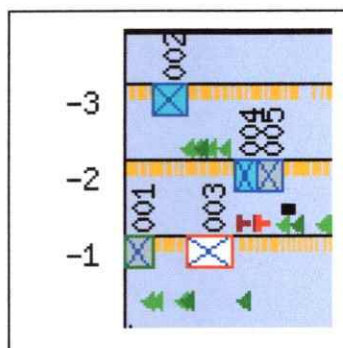


Figura 20. Detalle del contig sh03g1150 de *S. solfataricus*. Los recuadros numerados representan los siguientes ORFs: 001, timidilato quinasa; 002, timidilato quinasa; 003, proteína putativa; 004, fragmento de PPX; 005 fosfohistidina fosfatasa. Triángulos verdes: promotores putativos. Rectángulo negro: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

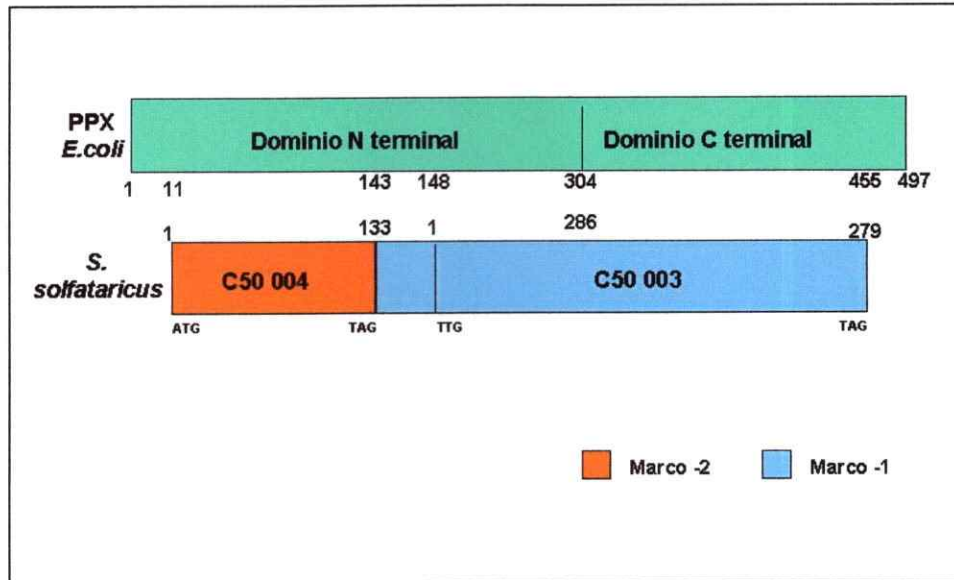


Figura 21. Esquema del alineamiento entre la PPK de *E. coli* y los ORFs c50 004 y c50 003. Los números indican las posiciones de aminoácidos equivalentes en el alineamiento. Se muestran los dominios N terminal y C terminal de la PPK según Bolesch y col. (2000).

### 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 plásmidos 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).





<i>Eco</i>	371	EVFLNHNHSGLEKRAITLQHSDFNQEQQMM-TLVHFA---IKLDDMPRFTLFKFKKQFLP	IQ	EGVLIANN
<i>Sty</i>	371	EVFLNHNHSGLEKRAITLQHSDFNQEQQMM-TLVHFA---IKLDDMPRFTLFKFKKQFLP	IQ	EGVLIANN
<i>Vch</i>	369	EVFLSNLQGEKRYITLRENNANSEQQVLVSNHFCQSS---LKLNLDDFSLFKKHHIG	IRV	EATVVNG
<i>Ssp</i>	393	NCITYVSHSAHFKSYHHRNEELVTEIIELELANNHRSKPKKRHDYVLESEPHRLAVRO	SS	ELAVALER
<i>Dra</i>	378	EAQIVSQSSHLKIGETLRHIGRAGPQDIEHNOTYHPSLSPKPSHPYVALAPADRALVAR	AGE	VADGLER
<i>Hpy</i>	361	SMKILSVYLAHKAALFELNLSYSSHQDRATCLLQESHK---IPKDNALAHMSAMMPSLLT	QW	SFILSLAN
<i>Cje</i>	361	HEVEYLNIFYANERHFVLCGLNYSHKSKAPSTIKLNGK---VNPYNLEPYKQLLPNHT	SW	NFILCLAKT
<i>Sso</i>	335	LEFKMVGYNFPRACYRFKESVPEATLDEVLIQLICEAASGK---VKKKHVKLLKDDITK	KEL	SFGNIVKNSIEK
<i>Cor</i>	363	DMVVRHPDHRADLVFEQVLEPLAQQGHAERCETLTAHARHATNEHPPPELTLERLLS	PAQLKRARALGATIR	ACEL
<i>Mlo</i>	367	DEWRAHPEYRGKLNHAEASFVVDHPGRAFLANARHDDGIFNESIAPETKALATPEY	LERARVLAAMRVVYLL	
<i>Eco</i>	448	QRQETTPPTFLTLITD-SHWTLRFPHDWFSQAAMLLDEKEQEQYEGVAGWRKIEEESTPEIAA-		
<i>Sty</i>	448	QRQETTPPTFLTLITD-SHWTLRFPHDWFSQAAMLLDEKEQEQYEGVAGWRKIEEESTPEIAA-		
<i>Vch</i>	446	QRNDDPLPPLPSAKD-EWRLECEQPDWLENKELHADLQTEQEQYQREVGWQLLF-----		
<i>Ssp</i>	473	QVGAIESFDCRYDQKRQLHLHITPKDPDDCAELWNEIDYKKVVEEENFKVATLAILLKS	RQG	
<i>Dra</i>	458	AHTGLARVDDLRRQGGQ-----WQLRVSGVTPDLAGVGEKGDVAREFGPLSVQNAEAKAT---		
<i>Hpy</i>	438	LCLTDSHHLKYTLEKTK-----LVIHSDTIYLAKEMLPKLVKPEPLTIEFA-----		
<i>Cje</i>	437	LSANEDKIDFAFANNTL-----Y--IYQEKILNLPKDELKKIAPATIALAINQKI-----		
<i>Sso</i>	411	YVVGVRV-----		

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 a ATP (Koonin, 1994) se indican con un recuadro en color rojo sobre la secuencia de *E. coli*.

## 5.2 Clonamiento del gen *ppxSso* de *S. solfataricus* en el sistema de expresión pET

Para caracterizar funcionalmente el gen *ppx* de *S. solfataricus* (*ppxSso*), el mismo se subclonó en el sistema pET. Para ello se purificó el vector pGEM<sup>®</sup>-T*ppxSso* desde la cepa SC16 y se digirió con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I. Los productos de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en geles de

agarosa y el inserto liberado se purificó. Este fragmento se ligó al vector pET-21b(+) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, en marco con la secuencia codificante de seis histidinas hacia el carboxilo terminal. Este gen recombinante se llamó *ppxrSso*. La reacción de ligación se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* JM109 y construir así la cepa SC19. Esta cepa se utilizó para obtener cantidades suficientes del vector pET-21b(+)ppxrSso. Con este vector se transformó la cepa BI21(DE3)pLysS y se obtuvo la cepa SC21.

### 5.3 Análisis funcional del gen *ppxrSso*

#### 5.3.1 Ensayo de actividad PPX en *S. solfataricus*

Para encontrar las condiciones óptimas para determinar la actividad PPX en la cepa SC21, primero se realizaron ensayos de actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus*. Para ello se sintetizó y se purificó [<sup>32</sup>P]poliP a gran escala para ser utilizado como sustrato de la reacción. El ensayo de actividad PPX se realizó según se indica en Materiales y Métodos midiendo la disminución de <sup>32</sup>P desde el [<sup>32</sup>P]poliP. Se utilizaron 50 µg de proteínas del extracto crudo de *S. solfataricus*. La actividad PPX se midió a 37°C, 56°C y 70°C y en presencia de 1 mM MgCl<sub>2</sub> o 1 mM MnCl<sub>2</sub>. La mayor actividad PPX se registró a 70°C y en presencia de MnCl<sub>2</sub> (Fig. 23), por lo que se eligieron estas condiciones para ensayar la actividad PPX en las células de la cepa SC21 inducidas con IPTG.

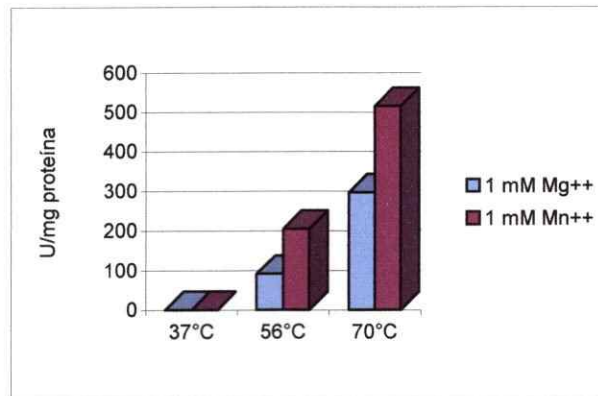


Figura 23. Actividad PPX en extractos crudos de *S. solfataricus*. Los extractos crudos se prepararon a partir de un cultivo de 5 días. La actividad PPX se determinó como se indica en Materiales y Métodos utilizando 50  $\mu\text{g}$  de proteínas totales.

### 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  $\mu\text{g}$  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.



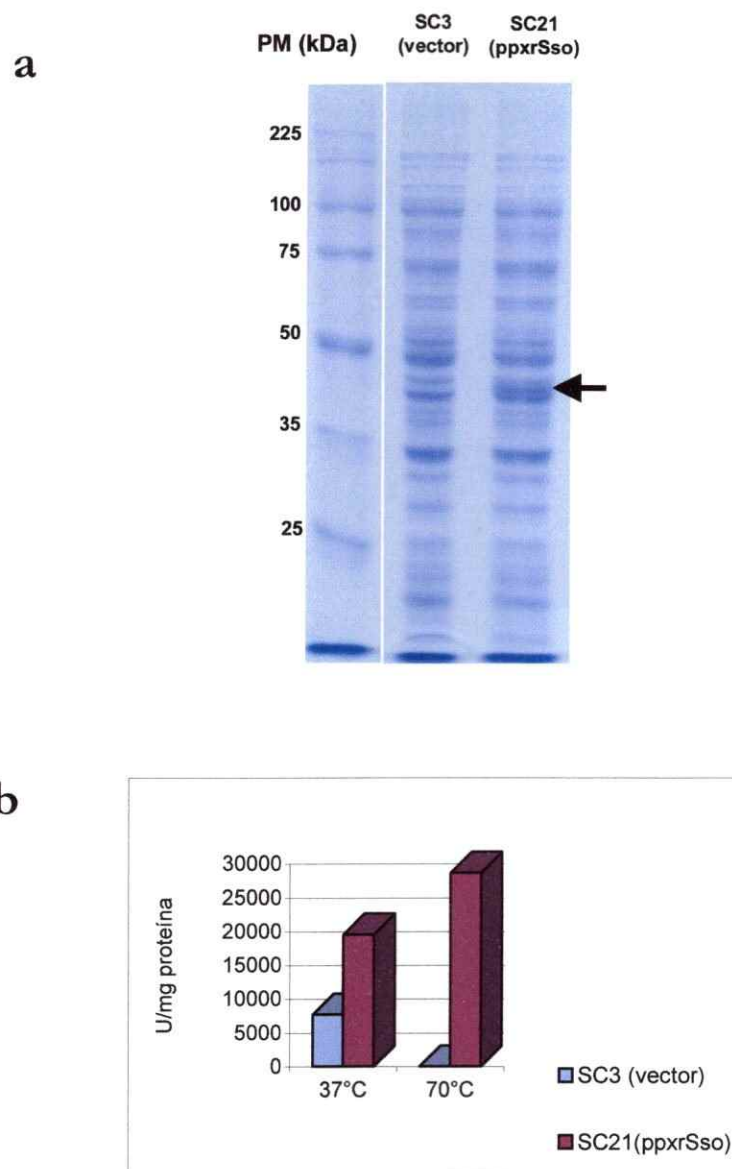


Figura 24. Análisis funcional del gen *ppxrSso* de *S. solfataricus*. Las células SC3 (vector) y SC21 (*ppxrSso*) se crecieron hasta fase exponencial y se indujeron 2 h con 1 mM IPTG. a, análisis de la expresión de proteínas por SDS-PAGE. La flecha indica la posición de la banda de 46 kDa. b, determinación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

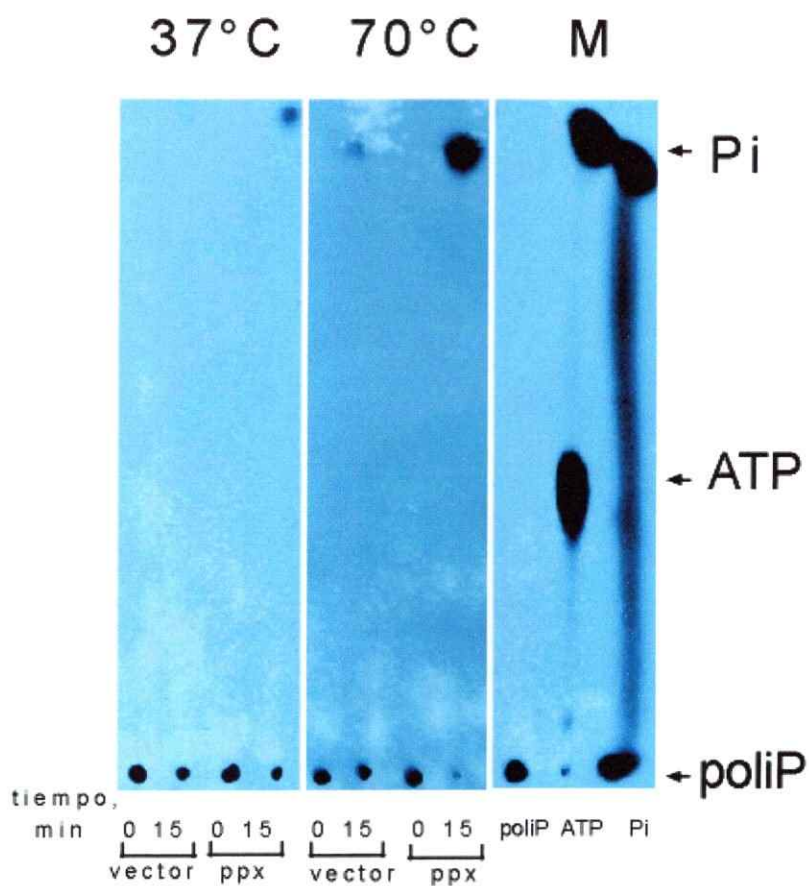


Figura 25. Análisis de la actividad PPX por TLC en las cepas SC3 y SC21. La actividad PPX se midió a 37°C y a 70°C en las cepas SC3 (vector) y SC21 (ppx). M, marcadores, poliP, ATP y Pi.

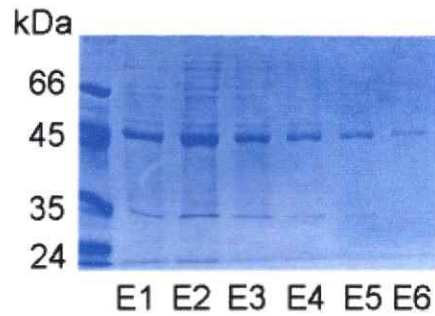
---

### 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

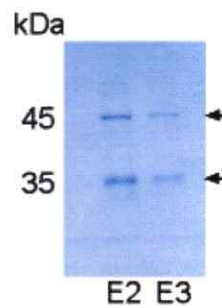


Figura 26. Purificación de la PPXr de *S. solfataricus* por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La PPXr se purificó a partir de la fracción membranas proveniente de 500 ml de cultivo de la cepa SC21 inducida con IPTG, en condiciones desnaturantes por afinidad en columnas de níquel. La elución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

mM de  $\text{MnCl}_2$ . Estos resultados también marcan una diferencia con la PPX de *E. coli* que prefiere  $\text{Mg}^{++}$  a  $\text{Mn}^{++}$  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).

#### 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

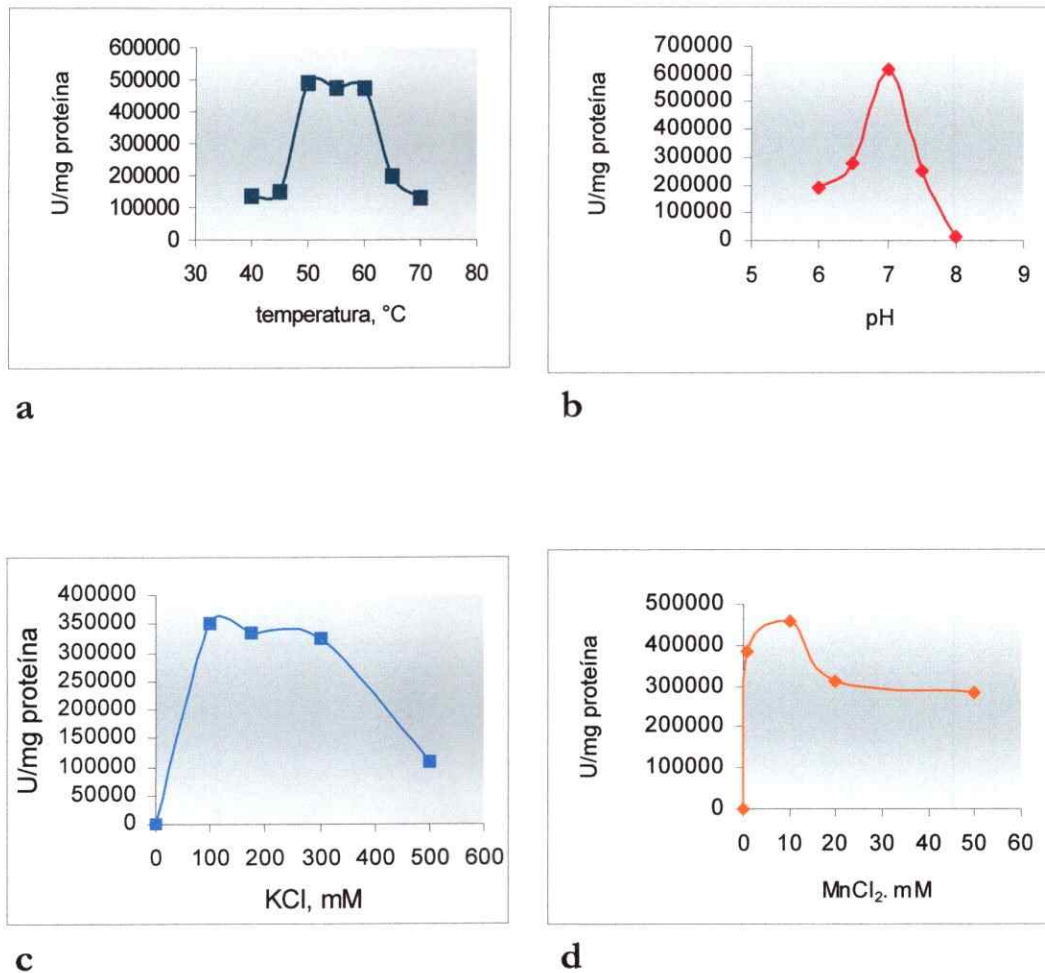


Figura 27. Efecto de la temperatura, pH y sales sobre la actividad de la PPXr de *S. solfataricus*. Se utilizaron 350 ng de PPXr en un volumen de 50  $\mu$ l, conteniendo 50 mM Tris-acetato y 250  $\mu$ M [ $^{32}$ P]poliP. Salvo en los casos indicados las concentraciones de MnCl<sub>2</sub> y KCl fueron 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).

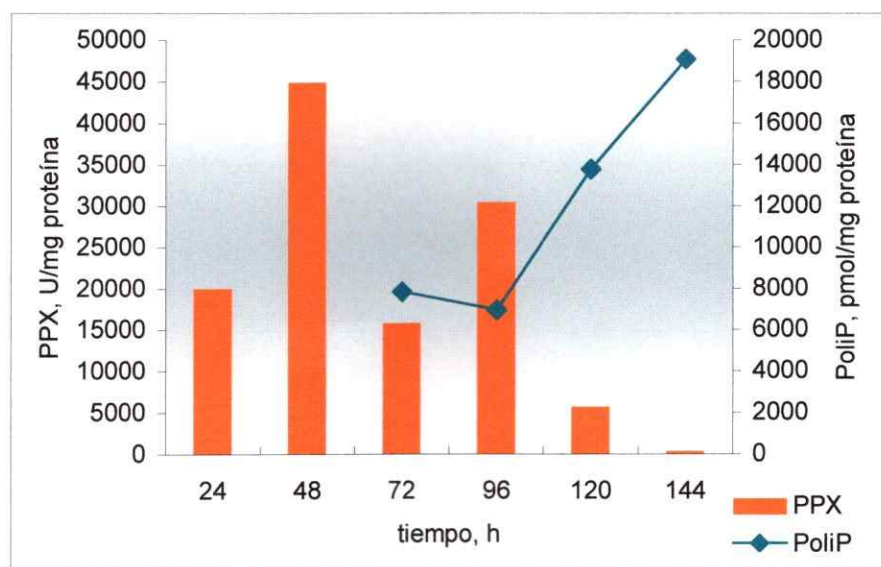


Figura 28. Actividad PPX y niveles de poliP durante el crecimiento de *S. solfataricus*. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos y se determinaron la actividad PPX y los niveles de poliP en los extractos crudos obtenidos.

## 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 (Scoarughi 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.
- Geißdörfer, 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 archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Eur. J. Biochem. 145:617-622.
- Skórko, R., Osipiuk, J. y Stetter, K.O. 1989. Glycogen-bound polyphosphate kinase from the archaeobacterium *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., Geißdörfer 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., Nimmegern, E., Wall, J.S., Hartl F.U. y Horwich, A.L. 1991. A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium 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*

# MAGPIE - PROJECT - sulfolobus

**GROUP: b07c12\_b04**


**STATE: finished**

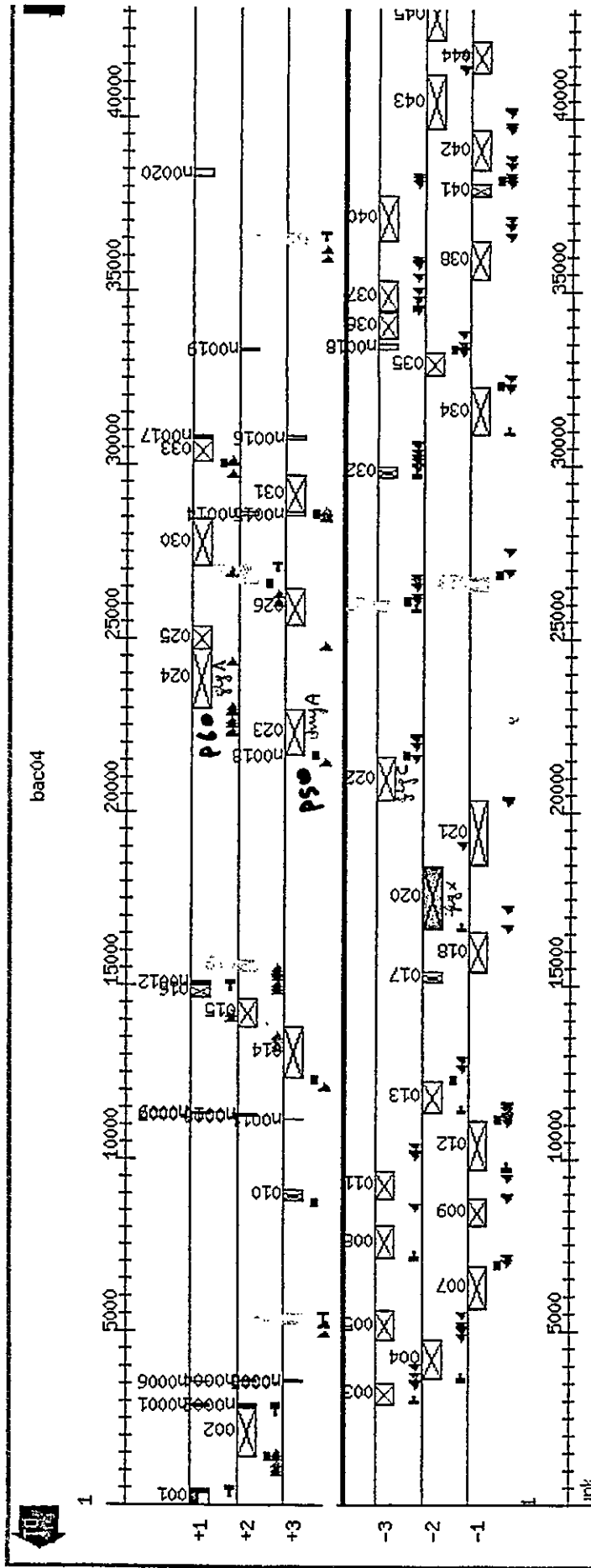
< b05zc01\_b09 -- b07za08\_b05 >  
Fri Jun 16 00:42:14 ADT 2000

sort by signature

## STATUS | CONFIG INFO | ANNOTATIONS | PRIMERS

The b07c12\_b04 group contains 42 ORFs.

 Pop up sequence



**MORE GRAPHICS (1)**

**42 LARGE ORFs (with 3 inside):**

ID	From ±	To	Fr.	Bases	N	AA	X	Traits	Evidence	Forms	EC	Description
bac04				43989 bp								
bac04_001	1	+ 486	+1	486 bp	161 aa			fac1	3p 1m	F M S		1.6.99.3 NADH DEHYDROGENASE
bac04_002	1448	+ 2854	+2	1407 bp	468 aa			f c1	3p 3d 1m	V F M S		> hypothetical transporter protein [C]

bac04_003	3559	-	2930	-3	630 bp	209 aa	fac1	3p	1m	V F M S	> hypothetical
bac04_004	4787	-	3657	-2	1131 bp	376 aa	fac1	2p	1m	V F M S	> hypothetical acetylornithine deacetylase
bac04_005	5683	-	4796	-3	888 bp	295 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical
bac04_007	6915	-	5680	-1	1236 bp	411 aa	fac1	2p	3d 1m	V F M S	> hypothetical
bac04_008	8083	-	7109	-3	975 bp	324 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical transmembrane multimeric protein
bac04_009	8883	-	8080	-1	804 bp	267 aa	f c1	2p	2d 1m	V F M S	> hypothetical transmembrane sugar phosphatase
bac04_010	8802	+	9137	+3	336 bp	111 aa	fa		2m	V F M S	> hypothetical
bac04_011	9712	-	8885	-3	828 bp	275 aa	f c1	1p	2d 1m	V F M S	> hypothetical transmembrane sugar phosphatase
bac04_012	11142	-	9709	-1	1434 bp	477 aa	fac1	3p	3d 2m	V F M S	> hypothetical sugar binding protein
bac04_013	12320	-	11385	-2	936 bp	311 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical quinolinate synthetase
bac04_014	12363	+	13826	+3	1464 bp	487 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical L-aspartate oxidase
bac04_015	13823	+	14650	+2	828 bp	275 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical nicotinate-nucleotidylic acid synthetase
bac04_016	14692	+	15063	+1	372 bp	123 aa	fac1	3p	1m	V F M S	> hypothetical
bac04_017	15431	-	15111	-2	321 bp	106 aa	fac1	3p	1m	V F M S	> hypothetical
bac04_018	16614	-	15424	-1	1191 bp	396 aa	f	2p	3d 1m	V F M S	> hypothetical fosmidomycin resistance protein
bac04_020	18497	-	16653	-2	1845 bp	614 aa	fac1	2p	3d 1m	V F M S	> hypothetical glycogen debranching enzyme
bac04_021	20373	-	18505	-1	1869 bp	622 aa	fac1	1p	1d 2m	V F M S	> hypothetical glucoamylase
bac04_022	21655	-	20387	-3	1269 bp	422 aa	fac1	1p	2d 1m	V F M S	> hypothetical mannose-1-phosphatase
bac04_023	21690	+	23033	+3	1344 bp	447 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical alpha-amylase
bac04_024	23020	+	24720	+1	1701 bp	566 aa	fac1	2p	2d 1m	V F M S	> hypothetical glycogen synthase
bac04_025	24730	+	25416	+1	687 bp	228 aa	fac1		1m	V F M S	> hypothetical
bac04_026	25413	+	26510	+3	1098 bp	365 aa	fac1	3p	3d 1m	V F M S	> hypothetical D-amino acid dehydrogenase
bac04_028	26859	-	26446	-1	414 bp	137 aa	f c1		1m	s F M S	
bac04_029	26630	+	27145	+2	516 bp	171 aa	fac1		1m	s F M S	
bac04_030	27145	+	28503	+1	1359 bp	452 aa	fac1	1p	1d 1m	V F M S	> hypothetical pyruvate kinase
bac04_031	28656	+	29720	+3	1065 bp	354 aa	fac2 T	1p	1d 2m	V F M S	> insertion element isc1217 DNA

bac04_032	29971	-	29669	-3	303 bp	100 aa	fac1	3p 3d 1m	V F M S	> hypothetical
bac04_033	30106	+	30789	+1	684 bp	227 aa	fac1	2p 1d 1m	V F M S	> hypothetical ribose 5-phosphate isor
bac04_034	32304	-	30919	-1	1386 bp	461 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical 2-isopropylmalate synt
bac04_035	33332	-	32649	-2	684 bp	227 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S	> hypothetical uridylylate kinase (UMP
bac04_036	34453	-	33656	-3	798 bp	265 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical dehydrogenase
bac04_037	35347	-	34478	-3	870 bp	289 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S	> hypothetical 3-hydroxyisobutyrate c
bac04_038	36483	-	35371	-1	1113 bp	370 aa	fac1	2p 1d 1m	V F M S	> hypothetical
bac04_039	36375	+	36701	+3	327 bp	108 aa	f	1d 1m	s F M S	
bac04_040	37795	-	36452	-3	1344 bp	447 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical signal recognition part
bac04_041	38193	-	37798	-1	396 bp	131 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical initiation factor 5A
bac04_042	39708	-	38539	-1	1170 bp	389 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical type II DNA topoisome
bac04_043	41297	-	39705	-2	1593 bp	530 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical TYPE II DNA topoisom
bac04_044	42264	-	41326	-1	939 bp	312 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical deoxyhypusine synthas
bac04_045	43709	-	42261	-2	1449 bp	482 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> conserved hypothetical protein [Unc

**3 ORFs INSIDE 42 LARGE ORFs:**

ID	From #	To	Fr.	Bases	N	AA	X	Traits	Evidence	Forms	EC	Description
bac04_006	5244	+ 5546	+3	303 bp		100 aa	f		3p 1m	F M S		207AA LONG HYPOTHETICAL PROTEIN
bac04_019	15443	+ 15778	+2	336 bp		111 aa	fa		1m	F M S		
bac04_027	26116	- 25811	-3	306 bp		101 aa	f		3d 2m	F M S		Z81565 Caenorhabditis elegans cosmid K06 (272

**21 features found between identified ORFs:**

ID	From	To	Fr.	Bases	N	AA	Forms	Description
bac04_n0001	2866 +	2925 +	+2	60 bp		20 aa	<u>confirm</u>	luxE protein - Xenorhabdus lumin (370 aa)
bac04_n0002	2876 +	2917 +	+3	42 bp		14 aa	<u>confirm</u>	(M90093) luxE [Xenorhabdus lu (370 aa)
bac04_n0003	3585 +	3626 +	+1	42 bp		14 aa	<u>confirm</u>	phosphofructokinase, live (700 aa)
bac04_n0004	3581 +	3640 +	+3	60 bp		20 aa	<u>confirm</u>	penicillin-binding protein 1A - (719 aa)
bac04_n0005	3564 +	3583 +	+1	20 bp		6 aa	<u>confirm</u>	Human DNA sequence from clone 459L4 on chromosome 6p22.3-24.
bac04_n0006	3574 +	3597 +	+2	24 bp		8 aa	<u>confirm</u>	Caenorhabditis elegans cosmid T07E3
bac04_n0007	11314 +	11336 +	+2	23 bp		7 aa	<u>confirm</u>	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, ESSA I FCA contig fra
bac04_n0008	11252 +	11276 +	+3	25 bp		8 aa	<u>confirm</u>	Plasmodium falciparum strain Dd2 heat shock protein 86 (HSP8
bac04_n0009	11362 +	11382 +	+2	21 bp		7 aa	<u>confirm</u>	Methanococcus jannaschii section 32 of 150 of the complete g
bac04_n0010	11315 +	11335 +	+3	21 bp		7 aa	<u>confirm</u>	Brassica campestris pseudogene for receptor-like 1
bac04_n0011	11178 +	11198 +	+1	21 bp		7 aa	<u>confirm</u>	Mycoplasma pneumoniae section 5 of 63 of the complete genome
bac04_n0012	15070 +	15105 +	+2	36 bp		12 aa	<u>confirm</u>	(L09121) cytochrome oxidase I (562 aa)
bac04_n0013	21669 +	21687 +	+1	19 bp		6 aa	<u>confirm</u>	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3, BAC clone T10K17
bac04_n0014	28580 +	28655 +	+3	76 bp		25 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
bac04_n0015	28581 +	28655 +	+1	75 bp		25 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
bac04_n0016	30798 +	30872 +	+1	75 bp		25 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
bac04_n0017	30841 +	30880 +	+2	40 bp		13 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
bac04_n0018	33526 -	33365 -	-1	162 bp		54 aa	<u>confirm</u>	probable ribonuclease p3 APES019 - Aeropyrum pernix (strain
bac04_n0019	33338 +	33360 +	+3	23 bp		7 aa	<u>confirm</u>	Caenorhabditis elegans cosmid Y46G5A, complete sequence
bac04_n0020	38344 +	38538 +	+2	195 bp		65 aa	<u>confirm</u>	S.shibatae top6B and top6A genes
bac04_n0021	43816 +	43887 +	+2	72 bp		24 aa	<u>confirm</u>	transcription repressor of sporul (172 aa)

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

NCBI BLAST Entrez ?

BLASTP 2.0.11 [Jan-20-2000]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= P60 Sulfolobus acidocaldarius (566 letters)

Database: nr 469,205 sequences; 144,685,294 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
dbj BA000127.11 (AP000001) 456aa long hypothetical protein ...	72.0	7e-35
afj CA046000.1 (AJ248283) GLYCOGEN SYNTHASE [Pyrococcus ab...	71.0	5e-31
gi 1270690.1 (AE000704) glycogen synthase [Aquifex aeolicus]	70.0	4e-18
gb F04800 LPS biosynthesis related rfbu-protein homolog -...	69.0	5e-18
sp P08389.1 COLETA ECOLI GLYCOGEN SYNTHASE (STARCH [BACTERIAL G...	68.0	6e-15
af AA173900 (AF173900) granule bound starch sy...	67.0	3e-14
sp Q49099.1 PEA GLYCOGEN [STARCH] SYNTHASE PRECURSOR (GB...	66.0	4e-14
sp Q49099.1 PEA UDPglucose--starch glucosyltransferase (EC 2.4....	65.0	4e-14
arj CAA46282.11 (X65183) glycogen (starch) synthase [Oryza ...	64.0	2e-13
sp Q49099.1 PEA GRANULE-BOUND GLYCOGEN [STARCH] SYNTHA...	63.0	2e-13
sp Q49099.1 PEA UDPglucose--starch glucosyltransferase (EC 2.4....	62.0	2e-13
af AA01754 (AF001754) glycogen synthase [The...	61.0	2e-13
sp P19355.1 ORYZA GRANULE-BOUND GLYCOGEN [STARCH] SYNTHA...	60.0	3e-13
af AF068834 (AF068834) starch synthase [Ipomoea batatas]	59.0	3e-13
sp CAA4547.11 (X64108) starch granule-bound starch syntha...	58.0	4e-13
sp P04711 GRANULE-BOUND GLYCOGEN [STARCH] SYNTHA...	57.0	6e-13
sp P03971 GLYCOGEN SYNTHASE (STARCH [BACTERIAL G...	56.0	3e-12
af AA19297 (AF019297) starch synthase isoform zSTSII-2 ...	55.0	5e-12
sp Q49099.1 PEA PROBABLE GLYCOGEN SYNTHASE (STARCH [BA...	54.0	9e-12
sp Q49099.1 PEA GRANULE-BOUND GLYCOGEN [STARCH] SYNTHA...	53.0	1e-11
af AA19296 (AF019296) starch synthase isoform zSTSII-1 ...	52.0	1e-11
af AA019745 (AF019745) WaaD [Escherichia coli]	51.0	1e-10
dbj BA000063 (AP000063) 392aa long hypothetical N-acetyl...	50.0	3e-10
sp D38221 SSS1 [Oryza sativa] >gi 5734103 gb...	49.0	3e-10
dbj BA000905 (D90905) hypothetical protein [Synechocysti...	48.0	3e-10
sp AB026295 ESTs AU075322(C11109),D22430(C11...	47.0	3e-10
sp AC007296 (AC007296) Strong similarity to g...	46.0	3e-10
sp Q49099.1 PEA SOLUBLE GLYCOGEN [STARCH] SYNTHASE PRE...	45.0	9e-10
af AA026421 (AF026421) starch synthase [Chlamydomonas re...	44.0	9e-10
sp AP000061 (AP000061) 363aa long hypothetical capM pro...	43.0	1e-09
af AA079260 (AF079260) granule-bound starch synthase [Ze...	42.0	1e-09
sp Q49099.1 PEA SOLUBLE GLYCOGEN [STARCH] SYNTHASE PRE...	41.0	1e-09
af AA079272 (AF079272) granule-bound starch synthase [Au...	40.0	1e-09
af AA079259 (AF079259) granule-bound starch synthase [Ze...	39.0	1e-09
af AA109395 (AF109395) granule-bound starch sy...	38.0	1e-09
af AA079261 (AF079261) granule-bound starch synthase [Ze...	37.0	1e-09
sp P03971 LIPOPOLYSACCHARIDE 1,2-N-ACETYLGLUCOSA...	36.0	3e-09
af AA079274 (AF079274) granule-bound starch synthase [Ha...	35.0	3e-09
arj CAA4547.11 (AL021287) hypothetical protein Rv3032 [Myc...	34.0	3e-09



AF079291	(AJ243803) putative glycosyl transferase [S...	74	3e-09
AF079291	hypothetical protein homolog MJ1178 - Methanoco...	74	3e-09
AF079291	(AF079291) granule-bound starch synthase [Gl...	74	4e-09
AF079295	(AF079295) granule-bound starch synthase [Er...	74	4e-09
AF079297	(AF079297) granule-bound starch synthase [Pa...	74	6e-09
AF079278	(AF079278) granule-bound starch synthase [Pe...	74	6e-09
AF079296	(AF079296) granule-bound starch synthase [Me...	74	7e-09
AF079281	(AF079281) granule-bound starch synthase [Ps...	74	7e-09
AF079268	(AF079268) granule-bound starch synthase [Ae...	74	7e-09
AF079275	(AF079275) granule-bound starch synthase [Er...	74	1e-08
AF019375	GlcNAc transferase [Escherichia c...	74	1e-08
AF079262	(AF079262) granule-bound starch synthase [Ae...	74	1e-08
AB029064	(AB029064) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	1e-08
AB029062	(AB029062) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	1e-08
AF079298	(AF079298) granule-bound starch synthase [Ph...	74	2e-08
AF113844	(AF113844) granule-bound starch synthase [Ae...	74	2e-08
AF079270	(AF079270) granule-bound starch synthase [Ae...	74	2e-08
AB019624	(AB019624) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	2e-08
AF079280	(AF079280) granule-bound starch synthase [Ps...	74	2e-08
AF079267	(AF079267) granule-bound starch synthase [Ae...	74	2e-08
AF079265	(AF079265) granule-bound starch synthase [Ae...	74	2e-08
AP000007	381aa long hypothetical protein ...	74	2e-08
AF079287	(AF079287) granule-bound starch synthase [Tr...	74	2e-08
AF079271	(AF079271) granule-bound starch synthase [Ag...	74	2e-08
AF079293	(AF079293) granule-bound starch synthase [Ch...	74	2e-08
AF110374	(AF110374) granule-bound starch sy...	74	3e-08
AF079285	(AF079285) granule-bound starch synthase [Tr...	74	3e-08
AF110373	(AF110373) granule-bound starch sy...	74	3e-08
AF079294	(AF079294) granule-bound starch synthase [Ch...	74	3e-08
AF079286	(AF079286) granule-bound starch synthase [Tr...	74	3e-08
AB019623	(AB019623) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	3e-08
AB012957	(AB012957) probable glucosyl transferase [V...	74	3e-08
AF079273	(AF079273) granule-bound starch synthase [Cr...	74	3e-08
AF079284	(AF079284) granule-bound starch synthase [Th...	74	4e-08
AF079279	(AF079279) granule-bound starch synthase [Ps...	74	4e-08
AE000829	LPS biosynthesis RfbU related pro...	74	4e-08
AF079276	(AF079276) granule-bound starch synthase [He...	74	4e-08
AF079282	(AF079282) granule-bound starch synthase [Se...	74	4e-08
AF113843	(AF113843) granule-bound starch sy...	74	5e-08
AB029061	(AB029061) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	5e-08
AF079266	(AF079266) granule-bound starch synthase [Ae...	74	5e-08
AF079263	(AF079263) granule-bound starch synthase [Ae...	74	5e-08
AE000822	LPS biosynthesis RfbU related pro...	74	5e-08
GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE [STARCH] SYNTHASE	GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE [STARCH] SYNTHASE...	74	5e-08
AF079277	(AF079277) granule-bound starch synthase [He...	74	5e-08
SUCROSE SYNTHASE (EC 2.4.1.13) - barley (fragme...	SUCROSE SYNTHASE (EC 2.4.1.13) - barley (fragme...	74	5e-08
AB029063	(AB029063) starch synthase (GBSSI) [Triticu...	74	5e-08
SUCROSE SYNTHASE 1 (SUCROSE-UDP GLUCOS...	SUCROSE SYNTHASE 1 (SUCROSE-UDP GLUCOS...	74	6e-08
(D63999) hypothetical protein [Synechocysti...	(D63999) hypothetical protein [Synechocysti...	74	6e-08
AF079283	(AF079283) granule-bound starch synthase [Th...	74	8e-08
AF079254	(AF079254) granule-bound starch synthase [Hy...	74	8e-08
AF079289	(AF079289) granule-bound starch synthase [Ly...	74	8e-08
AF079288	(AF079288) granule-bound starch synthase [Pe...	74	8e-08
AF079269	(AF079269) granule-bound starch synthase [Ae...	74	1e-07
AF079245	(AF079245) granule-bound starch synthase [Cy...	74	1e-07
AF079251	(AF079251) granule-bound starch synthase [Da...	74	2e-07
(Z93777) hypothetical protein Rv1212c [Myc...	(Z93777) hypothetical protein Rv1212c [Myc...	74	2e-07
AF079241	(AF079241) granule-bound starch synthase [Ch...	74	2e-07
AF079243	(AF079243) granule-bound starch synthase [Cy...	74	2e-07
AF079249	(AF079249) granule-bound starch synthase [Cy...	74	3e-07
AF079240	(AF079240) granule-bound starch synthase [Ch...	74	3e-07

AF079240 (AF079240) granule-bound starch synthase [Ch... 3e-07

AF000001 (AP000001) 456aa long hypothetical protein [Pyrococcus horikoshii]  
Length = 456

Score = 149 bits (372), Expect = 7e-35

Identities = 147/535 (27%), Positives = 223/535 (41%), Gaps = 137/535 (25%)

Query: 29 LGGLGPVVYVNLGKELVKQGIKVTVIMPSHGRHLNDYYRSLLLKLNELSLV-AEGDRIGIDG 87  
 +GGL - + + - L G +V V PSHGR +EI + + A G + - I

Sbjct: 25 VGGLAEALTSIAEALASLGHEVLVFTTPSHGRFQGE-----SEIGIIKAFGGKVAI-- 73

Query: 88 KSYHYKLGFEHGNLDGMNVVLIKGLDYNTGRIIDSWNIYDNAMEKSSLLARAVEKYAKFS 147  
 H + E+GNL + G ++D ++Y E L R + K S

Sbjct: 74 -KVHLE---ENGNLRIYRI-----GGGLLDHQDVYGPWEG---LIRKTVIFGKAS 117

Query: 148 I-----PNDIPSIIHVDWHSVIAGVTAKFTFEARRVIVPLVFTVHLLNKVSAPWHY 199  
 + D+P ++H HDWH+V AG K F +P VFT+H LNK P Y

Sbjct: 118 VLLLNELLKSEDLDPDVLHFHDWHTVFAGALIKKYFR-----IPAVFTIHLNKSIPAFY 172

Query: 200 ASEDWSGLMNYPHYIWRIIKHDLYTTREVVDFSSSGSIEKFGSYEADLITSVSKSYLTYD 259  
 E +GL Y DL E G Y AD++T+VS+ YL D

Sbjct: 173 FHE--AGLPELAPY-----PDL-----DPEHTGGYIADIVTTVSRGYLL-D 210

Query: 260 IFNFIGNWIENKSCIHNGTDWEVEETKXYAYSKFGTEDRAEIRKRLFDELEVLVTPED 319  
 ++F N+ K +NG D

Sbjct: 211 EWDFFRNF-NGKVTVYVFNIGIDCS----- 232

Query: 320 YTTGNILWNNRNFNIGIKDDWTYSRL-----ENGLPLIFAGRMVY-QKGIDSLLIADFDEVL 373  
 WN + G + + S L +G +F GR QKG+D+LL A + +

Sbjct: 233 -----FWNENYLKGRKERRSSILAKFGMSDGITFMFIGRFDRRQKGVDTLLRAIELLS 286

Query: 374 KT--INNARLIILGLPSSDYGLLQNVVSNISRHGGNIRIILGKMSKELYRLFYYSASV 431  
 + R II+G+ + L+N + + N+R++ +S+E R Y S +

Sbjct: 287 ERPEFKEMRFIIIGMGDPE---LENWARELEKRYDNVRVLTTEMLSRFVRELYGSDVDFVI 343

Query: 432 IPSRWEPFGLVAVESMAVGTTPVVAYSVGGGLRESIVDIRVDQEQGTGLLVEPENWVEXXX 491  
 IPS +EPFGLV++E+M +G +A SVGGLR+ IV I D GTGLLV+P + W+

Sbjct: 344 IPSYFEPFGLVSLAMCLGAIPIASSVGGGLRDVIVSIDEDHVDGTGLLVKPGDPWDLANA 403

Query: 492 XXXXXXXXXXXXETNNGDFLKYTEVKTNDVKLWDKIRQNCVRRVNNENFRWSASAKQ 546  
 L+ + D + +K+R NC +R ++F W SAK+

Sbjct: 404 -----ILRMHSI-AMDNEFVEKLRDNCKKRA-KSFSWENSARK 439

ref: JAB49 (AJ248283) GLYCOGEN SYNTHASE [Pyrococcus abyssi]  
 Length = 437

Score = 136 bits (339), Expect = 5e-31  
 Identities = 143/540 (26%), Positives = 217/540 (39%), Gaps = 144/540 (26%)

Query: 29 LGGLGPVVYVNLGKELVKQGIKVTVIMPSHGRHLNDYYRSLLLKLNELSLVAEGDRIGIDGK 88  
 +GGL + + + L G +V V PSHGR + E +I + G+

Sbjct: 15 VGGLAEALTAISEALASLGHEVLVFTTPSHGRFQGE-----EIGKIRVTFGE 59

Query: 89 SYHYKLGFEH-GNLDGMNVVLIKGLDYNTGRIIDSWNIY----DNAMEKSSLLARAVEKY 143  
 K+ +E GNL + G ++DS ++Y D + K+ RA

Sbjct: 60 EVQVKVSYEERGNLRIYRI-----GGGLLDSEDVYGPWGDGLIRKAVTFGRASVLL 110

Query: 144 AKFSIPND-IPSIHVDWHSVIAGVTAKFTFEARRVIVPLVFTVHLLNKVSAPWHYASE 202  
 + + +P ++H HDWH+V AG K F+ +P VFT+H LNK P Y E

Sbjct: 111 LNDLLREEPLDPVVFHFHDWHTVFAGALIKKYFK-----IPAVFTIHLNKSIPAFYFHE 165

Query: 203 -DWSGLMNYPHYIWRIIKHDLYTTREVVDFSSSGSIEKFGSYEADLITSVSKSYLTYDIF 261  
 S L YP E G Y AD++T+VS+ YL D +

Sbjct: 166 AGLSELAPYPDI-----DPEHTGGYIADIVTTVSRGYLI-DEW 202

Query: 260 NFIGNWIENKSCIHNGTDWEVEETKXYAYSKFGTEDRAEIRKRLFDELEVLVTPEDYT 321  
 F N+ E K +NG D

Sbjct: 203 GFFRNF-EGKITVYVFNIGIDCS----- 222

Query: 320 TGNILWNNRNFNIGIKDDWTYSRL-----ENGLPLIFAGRMVY-QKGIDSLLIADFDEVL-- 373  
 WN + G +D+ S L + G +F GR QKG+D LL A E+L

Sbjct: 223 ----FWNESYLTGSRDERKKSLLSKFGMDEGVTFMFIGRFD RGQKGV DVLLKAI-EILSS 277

Query: 374 -KTINNARLIILGLPSSDYGLLQNVVSNISRHGGNIRIILGKMSKELYRLFYYSASV FVI 432  
 K R II+G + L+ ++ GN+++I +S+E R Y S +I

Sbjct: 278 KKEFQEMRFIIIGKGDPE---LEGWARSLEEKHGNVKVITEMLSREFVRELYGSDVFVII 334

Query: 433 PSRWEFPLVAVESMAVGTPVVAYSVGGLESIVDIRVDQEQGTGLLVEPENVWEXXXXX 492  
 PS +EPFGLVA+E+M +G +A +VGGLR+ I + TG+LV+ + E

Sbjct: 335 PSYFEPFGLVALEAMCLGAIPIASAVGGLRDIITN-----ETGILVKAGDPGELANA- 386

Query: 493 XXXXXXXXXXXXETNNGDFLKYTEVKTNDVKLWDKIRQNCVRRV NENFRWSASAKQLQECFS 552  
 LK E+ +D+ K R+NC +R +F W SA++ + ++

Sbjct: 387 -----ILKALELSRSDL---SKFRENCKKRA-MSFSWEKSAERYVKAYT 426

gi|262624.1| (AE000704) glycogen synthase [Aquifex aeolicus]  
 Length = 463

Score = 93.6 bits (229), Expect = 4e-18  
 Identities = 116/475 (24%), Positives = 193/475 (40%), Gaps = 79/475 (16%)

Query: 16 VWMISAELEKVASLGGGLP VVYNLGKELVKQGIKVTVIMPSHGRHLNDYYRSL LKLNEIS 75  
 V S+E+ A GGL + L K L K G+KV +MP YY++L K +

Sbjct: 3 VLFCSS E IYPYAKTGGLADFSCLIKYLK KYGVKVKGVMP-----YYKTL-KAENLR 53

Query: 76 LVAEGDRIGIDGKSYHYKLGFEHGNLDGMNVVLIKGLDYNTGRIIDSWNIYDNAMEKSSL 135  
 +G + ++GK Y +++ +E + + + G DY G W DN +

Sbjct: 54 KTDKGVTLNLNGKDYTFEV-YES EDCYFLRNDELFGRDYIYGP--PGWGYEDNDIRFGGF 110

Query: 136 LARAVEKYAKFSIPNDIPSI IHVHDWHSVIAGVTAKFTFEARRVIVPLVFTVHLLNKVSA 195  
 E + + D+ +H +DW + + + K F+ V VFT+H L A

Sbjct: 111 SRAVSELISTGQLEADV---VHANDWQTALIP LFLKEVFKTP---VKT VFTIHNL-----A 160

Query: 196 PWHYASEDWSGLMNYPHYIWR I IKHDLYTTREVDWDFSSGSIEKFGSYEADLITSVSKSY 255  
 ++ + P Y++ + E +F+ + K G +DLIT+VS +Y

Sbjct: 161 YQGLFPKETVERVGI PPYLEFH-----EAVEFWGLVNFMKGGIVFSDLITTVSPTY 211

Query: 256 LTYDIFNFIGNWIEN-----KSCIH YNGTDWEV--EETK KYAYS KFGTEDRAEIRKRL 306  
 G +E K NG D+EV E KY Y + + + +

Sbjct: 212 AKEIQTOEYGYGLEGLV LK KY SYKLRGILNGIDYEVWNPEKDKYIYQNYSLRNYS----KK 267

Query: 307 FDELEVL RVTPEDYTTGNILWNNRFENIGIKDDW TYSRLENGPLILFAGRMVYQKGIDSL 366  
 F E L +GI+ + PLI F R +QKG++ +L

Sbjct: 268 FKNKEFLSK-----ELGIEAE-----KPLISFINRFTHQKGV ELIL 303

Query: 367 IAFDEVLKTINNARLIILGLPSSDYGLLQNVVSNISRHGGNIRIILGKMSKELYRLFYYS 426  
 +E+ K NA + LG G +N ++S+ N ++ + ++ R Y S

Sbjct: 304 NCAEFMSKL--NANFVFLGT-----GEYENAFLDVSKIYKNFKVF-AEFNEGFARKLYAS 355

Query: 427 ASV FVPSRWEFPLVAVESMAVGTPVVAYSVGGLESIVDIRVDQEQGTGLLVE 481  
 + ++PS +P GL + M G + GGLR+++ DI E G G+ E

Sbjct: 356 SLFILMPSYFPCGLTQMIGMRYGCVPIVRKTGGLRDTVKDI---SEG GYGITFE 407

gi|262624.1| LPS biosynthesis related rfbu-protein homolog - Methanococcus  
 jannaschii >gi|1500505|gb|AAB99629.1| (U67601) LPS  
 biosynthesis protein, putative [Methanococcus  
 jannaschii]  
 Length = 390

Score = 93.2 bits (228), Expect = 5e-18  
 Identities = 104/395 (26%), Positives = 168/395 (42%), Gaps = 113/395 (28%)

Query: 97 EHG NLDGMNVVLIKGLDYNTGRIIDSWNIYDNAMEKSSLLARAVEKYAKFSIPNDIPSI 156  
 E+ N++G+NV ++ + + +W ++ + L V+KY +I

Sbjct: 47 EYENINGVNVRVVRPISHPH---FLTWAMFMAEEMEKKLGILGV D KY-----DVI 93

Query: 157 HVHDWHSVIAGVTAKFTFEARRVIVPLVFTVHLLNKV SAPWHYASEDWSGLMNYPHYIWR 216

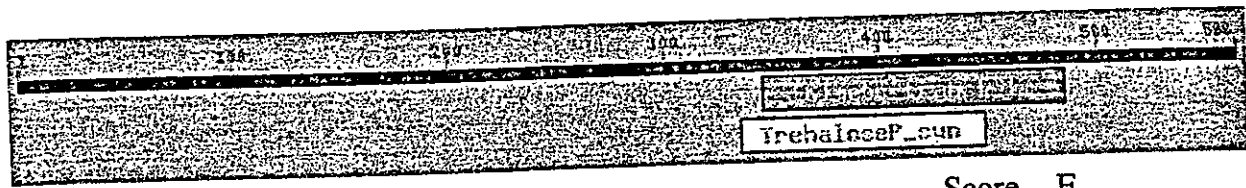
### 1.3 Análisis de la secuencia proteica de la P60 de *S. acidocaldarius* mediante el programa RPS-BLAST

S-BLAST 2.0.13 [May-26-2000]

Query= local sequence: P60 Sulfolobus acidocaldarius (566 letters)

Database: oasis\_sap.v1.00 2830 PSSMs; 604,881 total columns

Mouse-over boxes to display more information



- Sequences producing significant alignments:
- |  | Score | E (bits) value |
|--|-------|----------------|
| <a href="#">gnl Pfam pfam00534</a> Glycos_transf_1, Glycosyl transferases group 1        | 77.6  | 1e-15          |
| <a href="#">gnl Pfam pfam00982</a> TrehaloseP_syn, Trehalose-6-phosphate synthase domain | 35.6  | 0.007          |

[gnl|Pfam|pfam00534](#), Glycos\_transf\_1, Glycosyl transferases group 1

Add query to multiple alignment, display up to 10 sequences most similar to the query

Length = 210  
Score = 77.6 bits (188), Expect = 1e-15

Query:	345	ENGPLILFAGRMVYQKGIDSLLIAFDEVLKTIN-NARLIILG---LPSSDYGLLQNVVSN	400
Sbjct:	13	EGDRFYLSINRFEKKKNDVALAIKAFALSEDQINDNVKLVICGGYDERVAENVEYLKELQS	72
Query:	401	ISRH---GGNIRIILGKMS-KELYRLFYYSASVVFVPSRW-----	436
Sbjct:	73	LADEYELSHTTIYYQEIKRVSDLESFKTNNSKIIIFLTSISSSLKELLERTEMLLYTPAY	132
Query:	437	EPFGLVAVESMAVGTPVVAVYSVGGGLRESIVDIRVDQ--EQGTGLLVEPENV	485
Sbjct:	133	EHFGIVPLEAMKLGKPVLAVNNGGPLETIKSYVAGENESSATGWLKPAVPI	183

[gnl|Pfam|pfam00982](#), TrehaloseP\_syn, Trehalose-6-phosphate synthase domain

Add query to multiple alignment, display up to 10 sequences most similar to the query

Length = 559  
Score = 35.6 bits (80), Expect = 0.007

Query:	335	IKDDWTYSRLENGPLILFAGRMVYQKGIDSLLIAFDEVL---KTINNARLIILGLPSS-	389
Sbjct:	323	IKKQIMGRSADGGQLFFSVERFDYTKGISEKLRWQRYFEKYPDRIGKDVLFQVAVTNRR	382
Query:	390	---DYGLLQNVVSNI-----SRHGGNIRIILGKMSKELYRLFYYSASVVFVIPS	434
Sbjct:	383	SVDSYRQYQDDVLAVADLINQKFKSEDPYEWKPVIFETDGLPRTRLIAHYLAMDIGVVT	442
Query:	435	RWEPFGLVAVESMAV	449
Sbjct:	443	SKDGMNLVAKEMLVC	457

# CD: pfam00534

**Description:** Glycos\_transf\_1, Glycosyl transferases group 1

**CD status:** Full-length sequences, including 3D structure if known. Alignment from source, reindexed to representative

**Source:** Pfam

**Created:** 14-Jan-2001

**Taxonomy spanned:** cellular organisms -> [ 8 ] from Eukarvota  
 [ 11 ] from Archaea  
 [ 58 ] from Bacteria

**Aligned sequences:** 78

**Representative:** Consensus sequence:

**Aligned range:** 1-172

**Sequence:** DREEIRKKLGIKEEKKIILFVGRLLPEKGIIDLLLEAFKKLKKQLNPNLKLVIIVGDGEEK  
 ELKLLALKLGLLEDNVI FLGFVPDEDLPELYKSADVFLPSRYEGFGIVLLEAMACGLPVI  
 ATDVGGIPEIVKDGGETGLLVEPGDPEALAEATEKLLKDEELRKRLGENARKR

View Alignment showing up to 10  top listed sequences  Reset  
 • HTML Display FASTA with gaps Conservation color threshold: 2.0 bits   
 Text Display Phylip format Alignment width: 60

pick aligned sequences (will be added to selection above)

**PDB-Id/gi Definition**

- 1703249 GLYCOSYLTRANSFERASE ALG2 [CD]
- 7474472 capsular polysaccharide biosynthesis homolog yveN - Bacillus subtilis [CD]
- 1176936 SPORE COAT PROTEIN SA [CD]
- 7427928 probable hexosyltransferase (EC 2.4.1.-) ytcC - Bacillus subtilis [CD]
- 7433883 probable hexosyltransferase (EC 2.4.1.-) PH1844 - Pyrococcus horikoshii [CD]
- 7477104 hypothetical protein Rv2188c - Mycobacterium tuberculosis (strain H37RV) [CD]
- 7433885 probable hexosyltransferase (EC 2.4.1.-) slI1971 [similarity] - Synechocystis sp. (strain
- 2129096 probable hexosyltransferase (EC 2.4.1.-) MJ1607 - Methanococcus jannaschii [CD]
- 1731199 HYPOTHETICAL 43.5 KDA PROTEIN U2168F [CD]
- 7470345 hypothetical protein slr1076 - Synechocystis sp. (strain PCC 6803) [CD]
- 6015497 Anabaena sp. PCC 7120 hepD gene (essential for heterocyst differentiation), and transi
- 7474459 biosynthesis of teichuronic acid tuaC - Bacillus subtilis [CD]

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

# Phosphorylation site prediction for sequence >gi|10185177 Sac

Sequence identifier: >gi|10185177 Sac

Number of residues: 560

Full sequence:

MKRYESLWFEDELKHVMMISAELEKVASLGGLGPVVYNLGKELVKQGKIVTVIMPESHGRHLNDYYRSLKLNELSLVAEG  
 DRIGIDGKSYHYKLGFEHGNLDGMNVVLIKGLDYNTGRIIDSWNIYDNAMEKSSLLARAVEKYAKFSPNDIPSIHVHD  
 WHSVIAGVTAKFTFEARRVIVPLVFTVHLLNKVSAPWHYASEDWSGLMNYPHYIWRIKHDLYTTREVWDFSSGSIEKF  
 GSYEADLITSVSKSYLTIDIENFIGNWIENKSCIHYNGTDWEVEETKKYAYSKFGTEDRAEIRKRLFDELEVLRVTPEDY  
 TTGNILWNNRFNIGIKDDWTYSRLENGPLILFAGRMVYQKIDSLLIADFVLTININARLIILGLPSSDYGLLQNVVSN  
 ISRHGGNIRIILGKMSKELYRLFYYSASVFIIPSRWEPFGLVAVESMAVGTPEVAVSVVGLRESIVDIRVDQEQGTGLLV  
 EPENVWELSKALISALSLSMASETNNNGDFLKYTEVKTNDVVKLWDKIRQNCVRRVNNENFRWSASAKQLQECYSKAQTMAY

The prediction is based on the consensus sequence motifs. For the list of the used motifs see [here](#).

The consensus sequences for 10 different protein kinases are scanned for potential phosphorylation sites.

Potential phosphorylation sites for protein kinase CaMKII:

- S-6 RYESLWF

Potential phosphorylation sites for protein kinase CKI (N-terminal S/T must be prephosphorylated):

- T-173 TAKFTFEA
- S-205 SEDWSGLM
- S-236 SSGSIEK
- S-252 TSVSKSY
- T-257 SYLTYDI
- T-296 SKFGTEDR
- S-402 SNISRHG
- S-497 SALSLSM
- S-502 SMASETN
- T-517 TEVKTNDV
- T-556 SKAQTMAY

Potential phosphorylation sites for protein kinase CKII:

- T-224 DLYTTRE



- T-279 YNGTDWE
- T-316 LRVTPEd
- S-342 WTYSRLE
- S-434 VIPSRWE
- S-464 LRESIVD

Potential phosphorylation sites for protein kinase GSK3 (C-terminal +4 S must be prephosphorylated):

- S-201 HYASEDWS
- S-250 LITSEVSKS

No phosphorylation sites for protein kinase MLCK found.

No phosphorylation sites for protein kinase p34cdc2 found.

No phosphorylation sites for protein kinase p70s6k found.

Potential phosphorylation sites for protein kinase PKA:

- S-6 RYESLWF
- T-316 RVTPEd
- S-464 RESIVD
- S-541 RWSASA

Potential phosphorylation sites for protein kinase PKC:

- T-116 DYNTGRI
- T-169 AGVTAKF
- T-224 DLYTTRE
- T-286 VEETKKY
- S-543 WSASAKQ

No phosphorylation sites for protein kinase PKG found.

## Consensus sequences for protein kinases

<i>kinase</i>	consensus sequence	references
CaM II	R-X-X-S/T-X	3,4
CK I	Sp/Tp-X <sub>2-3</sub> -S/T-X	2
CK II	X-S/T-X-X-D/E	1
GSK3	X-S/T-X-X-X-Sp	3
MLCK	X-K-K-R-X-X-S-X	2,4
p34cdc2	X-S/T-P-X-R/K	3
p70s6k	K/R-X-R-X-X-S/T-X	2
PKA	R-X <sub>1-2</sub> -S/T-X	3
PKC	X-S/T-X-R/K	1
PKG	(R/K) <sub>2-3</sub> -X-S/T-X	3

### References:

1. PROSITE pattern.
2. Pinna, L.A. and Ruzzene M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1314**:191-225.
3. Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:15555-15558.
4. Kemp, B.E., and Pearson, R.B. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**:342-346.

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





# results of BLAST

## BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]

### Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1003364867-20826-13563

Query= gi|1788847|gb|AAC75554.1| polyphosphate kinase  
Escherichia coli  
(688 letters)

Database: Completed Aeropyrum pernix; Completed Sulfolobus solfataricus; Completed Sulfolobus tokodaii; Completed Archaeoglobus fulgidus; Completed Halobacterium sp. NRC-1; Completed Methanothermobacter thermautotrophicus; Completed Methanococcus jannaschii; Completed Pyrococcus abyssi; Completed Pyrococcus horikoshii; Completed Thermoplasma acidophilum; Completed Thermoplasma volcanium; Unfinished Ferroplasma acidarmanus  
24,453 sequences; 6,984,161 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

### Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
<a href="#">gnl DOE_97393 Contig135.revised.gene6.protein</a> Ferroplasma a...	40	0.002
<a href="#">ref NP_110905.1 </a> ABC-type nitrate transporter, ATPase compo...	31	1.1
<a href="#">emb CAC12522.1 </a> (AL445067) hypothetical protein [Thermopla...	31	1.1
<a href="#">ref NP_148625.1 </a> tryptophanyl-tRNA synthetase [Aeropyrum pe...	31	1.1
<a href="#">ref NP_070566.1 </a> hypothetical protein [Archaeoglobus fulgid...	30	1.8
<a href="#">ref NP_247878.1 </a> conserved hypothetical protein [Methanococ...	30	2.4
<a href="#">ref NP_070855.1 </a> hypothetical protein [Archaeoglobus fulgid...	30	3.1
<a href="#">dbj BAB67601.1 </a> (AP000990) 1288aa long hypothetical pseudo...	30	3.1
<a href="#">ref NP_147648.1 </a> hypothetical protein [Aeropyrum pernix]	30	3.1
<a href="#">gb AAK40909.1 </a> (AE006689) Histidinol dehydrogenase (HDH) (...	29	4.1
<a href="#">gnl DOE_97393 Contig120.revised.gene8.protein</a> Ferroplasma a...	29	5.3
<a href="#">ref NP_110572.1 </a> Vacuolar-type H <sup>+</sup> -ATPase, subunit B [Thermo...	29	5.3
<a href="#">ref NP_247199.1 </a> glycyl-tRNA synthetase (glyS) [Methanococc...	29	5.3
<a href="#">dbj BAB65188.1 </a> (AP000981) 154aa long conserved hypothetic...	29	5.3
<a href="#">ref NP_247353.1 </a> M. jannaschii predicted coding region MJ03...	28	7.0
<a href="#">ref NP_276985.1 </a> heterodisulfide reductase, subunit B [Meth...	28	7.0
<a href="#">gb AAK40540.1 </a> (AE006657) Conserved hypothetical protein [...	28	7.0
<a href="#">gb AAK41148.1 </a> (AE006707) Arginyl-tRNA synthetase (argS) [...	28	7.0
<a href="#">dbj BAB65849.1 </a> (AP000983) 123aa long conserved hypothetic...	28	9.1
<a href="#">dbj BAB66642.1 </a> (AP000986) 449aa long hypothetical tryptop...	28	9.1

## Alignments

>qnl|DOE\_97393|Contig135.revised.gene6.protein *Ferroplasma acidarmanus* unfinished pr  
Length = 318

Score = 40.0 bits (92), Expect = 0.002

Identities = 38/134 (28%), Positives = 61/134 (45%), Gaps = 18/134 (13%)

Query: 427 FSAPGLKIHAKLFLISRKENGEEVVRYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADARITNEVRR 486

F P + HAK +++S ++ A +GT NF E +Y +T+D +I ++

Sbjct: 91 FEKPNVFDHAK-YMVSERQ-----AEVGTPNFTEAAFSSNREYFTITSDKKIIKSLKT 142

Query: 487 VF--NFIENPYRPVTFDYLMVSPQNSRRLLYEMVDRE----IANAQQGLPSGITLKLNNL 540

+F +F + YL+VSP S + L + + RE I + G I L L

Sbjct: 143 IFLADFNKAAGEMPRKYLVSP-GSEKALGDFISRERKLLIETEEMGDDKEI---LKVL 198

Query: 541 VDKGLVDRLYAASS 554

+DKG +L SS

Sbjct: 199 MDKGRKVKLIVPSS 212

>ref|NP\_110905.1| ABC-type nitrate transporter, ATPase component [*Thermoplasma volcanium*]

Length = 270

Score = 31.2

bits (69), Expect = 1.1

Identities = 26/77 (33%), Positives = 39/77 (49%), Gaps = 4/77 (5%)

Query: 131 LRQHITPILINPDTDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTIRYALLEIPSDKVPRF-VNLP-PE 188

LRQ I IL +PDT L + ++ E+I + Y L +P+ V + V+LP P

Sbjct: 187 LRQDIYNILFSPDTPKGVVL--VSHNLTEVIELADVIVILNNVPATVVGKVQVDLPRPR 244

Query: 189 APRRRKPMILLDNILRY 205

+PR LLD++ Y

Sbjct: 245 SPRSEAFNRLLDLSLYNY 261

>emb|CAC12522.1| (AL445067) hypothetical protein [*Thermoplasma acidophilum*]

Length = 338

Score = 31.2

bits (69), Expect = 1.1

Identities = 17/59 (28%), Positives = 31/59 (51%)

Query: 604 KKVYLSSADWMTRNIDYRIEVATPLLDPRKQVRVLDIIDILFSDTVKARYIDKELSNRY 662

+++ + + D MT + IE+A PRL + +I++ LFS +KA + S +Y

Sbjct: 49 RQILVYTPDSMTDSYPLMIELAGTNWKPRHLHNKFANIVEKLFSSQGLKAVIANPNFSTKY 107

>ref|NP\_148625.1| tryptophanyl-tRNA synthetase [*Aeropyrum pernix*]

Length = 374

Score = 31.2

bits (69), Expect = 1.1

Identities = 34/124 (27%), Positives = 53/124 (42%), Gaps = 15/124 (12%)



# results of BLAST

## BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]

### Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1003419902-831-7210

Query= PHM1 YFLO04W  
(828 letters)

Database: Completed Aeropyrum pernix; Completed Sulfolobus solfataricus; Completed Sulfolobus tokodaii; Completed Archaeoglobus fulgidus; Completed Halobacterium sp. NRC-1; Completed Methanothermobacter thermautotrophicus; Completed Methanococcus jannaschii; Completed Pyrococcus abyssi; Completed Pyrococcus horikoshii; Completed Thermoplasma acidophilum; Completed Thermoplasma volcanium; Unfinished Ferroplasma acidarmanus  
24,453 sequences; 6,984,161 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

### Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
<a href="#">ref NP_248679.1 </a> conserved hypothetical protein [Methanococ...	32	1.0
<a href="#">ref NP_248047.1 </a> M. jannaschii predicted coding region MJ10...	31	1.7
<a href="#">ref NP_248424.1 </a> glucosamine--fructose-6-phosphate aminotra...	30	3.0
<a href="#">dbj BAB66289.1 </a> (AP000985) 259aa long hypothetical protein...	30	3.9
<a href="#">emb CAC11787.1 </a> (AL445065) argininosuccinate lyase related...	29	5.0
<a href="#">ref NP_142803.1 </a> hypothetical protein [Pyrococcus horikoshii]	29	5.0
<a href="#">emb CAC12287.1 </a> (AL445066) probable methionyl-tRNA synthet...	29	6.6
<a href="#">dbj BAB67169.1 </a> (AP000988) 172aa long hypothetical 30S rib...	29	6.6
<a href="#">ref NP_147942.1 </a> prefoldin subunit [Aeropyrum pernix]	28	8.6

### Alignments

>[ref|NP\\_248679.1|](#) conserved hypothetical protein [Methanococcus jannaschii]  
Length = 248

Score = 31.6  
bits (70), Expect = 1.0  
Identities = 20/67 (29%), Positives = 34/67 (49%), Gaps = 7/67 (10%)

Query: 4 GVKLANEVYPPWKGSY----INYEGLKKFLKEDSVKDGSDKKARWDDSDSKFVEELDK 59  
G+KL + Y GS I + +K K +G+ + K +SDE + + EL+  
Sbjct: 180 GMKLEDDYLGGSGSRGYGKIKFRDIKCLICKPKEYYEGNENSKK---ESDEVESLNELES 236

138C

1.6 Contig sh03g1150 del genoma de *S. solfataricus*





c50_001	526	-	1	-1	526 bp U	176 aa	1	fac1	3p 3d 1m	V F M S	> homology with thymidylate kinase
c50_002	1142	-	501	-3	642 bp U	213 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> THYMIDYLATE KINASE (TMK)
c50_003	1978	-	1139	-1	840 bp U	279 aa	fac1	fac1	3p 3d 1m	V F M S	> putative [Putative]
c50_004	2391	-	1990	-2	402 bp U	133 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> exopolyphosphatase (METAPHOSP
c50_005	2877	-	2392	-2	486 bp U	161 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> phosphohistidine phosphatase [Histi
c50_006	3455	+	4045	+2	591 bp U	196 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> hypothetical [CDS CATEGORY]
c50_007	4516	+	4992	+1	477 bp U	158 aa	fac2 T	fac2 T	1p 1d 1m	V F M S	> Insertion element ISC1217 (S. solfat
c50_008	5287	+	5919	+1	633 bp U	210 aa	fac2	fac2	1p 3d 1m	V F M S	> pilin gene inverting protein PivNG
c50_009	6882	-	5899	-2	984 bp U	327 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> putative transposase [CDS CATEG
c50_011	8414	-	7515	-3	900 bp U	299 aa	fac2	fac2	2p 3d 1m	V F M S	> Hypothetical Transposase [CDS CA
c50_013	8521	+	9042	+1	522 bp U	173 aa	fac2 T	fac2 T	1p 1d 1m	V F M S	> Insertion element isc1217 (from S. st
c50_014	9067	+	9411	+1	345 bp U	114 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> hypothetical
c50_015	9405	+	9770	+3	366 bp U	121 aa	f	f	3d 1m	s F M S	
c50_016	10330	-	9428	-1	903 bp U	300 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> Oxidoreductase [Electron transport
c50_017	11475	-	10318	-2	1158 bp U	385 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> closest to pyruvate oxidoreductase
c50_018	12310	-	11738	-1	573 bp U	190 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> oxidoreductases [Electron transport
c50_019	12464	+	14530	+2	2067 bp U	688 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> DEHYDROGENASE [CDS CATEG
c50_020	15630	-	15175	-2	456 bp U	151 aa	fac1	fac1	3p 3d 1m	V F M S	> putative [Putative]
c50_021	16574	-	15675	-3	900 bp U	299 aa	fac2	fac2	2p 3d 1m	V F M S	> hypothetical transposase [Replicatio
c50_023	17196	-	16708	-2	489 bp U	162 aa	fac1	fac1	3p 1m	V F M S	> putative [Putative]
c50_024	18192	+	18806	+3	615 bp U	204 aa	fac1	fac1	2p 3d 1m	V F M S	> hypothetical carbonic anhydrase [C
c50_025	19585	-	18824	-1	762 bp U	253 aa	fac1	fac1	3d 1m	V F M S	> putative [Putative]
c50_026	21169	-	19901	-1	1269 bp U	422 aa	fac2	fac2	1p 1d 1m	V F M S	> putative [Putative]
c50_027	21725	-	21138	-3	588 bp U	195 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> hypothetical [Hypothetical]
c50_028	22169	+	23647	+2	1479 bp U	492 aa	fac1	fac1	1p 1d 1m	V F M S	> dehydrogenase [Dehydrogenases]
c50_029	24367	-	23681	-1	687 bp U	228 aa	fac1	fac1	3p 3d 2m	V F M S	> putative [Putative]

c50_030	24601	+	25689	+1	1089 bp U	362 aa	fac1	1p 3d 1m	V F M S	1.1.1.1	> NAD(+)-dependent alcohol dehydrogenase [Hypothetical]
c50_031	25761	+	26567	+3	807 bp U	268 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S		> hypothetical [Hypothetical]
c50_032	26568	+	27461	+3	894 bp U	297 aa	fac1	1p 2d 2m	V F M S		> hypothetical [Hypothetical]
c50_033	28530	-	27523	-2	1008 bp U	335 aa	fac1	1p 2m	V F M S	1.13.1.1.2	> catechol 2,3-dioxygenase [CDS CAT]
c50_034	28634	+	29053	+2	420 bp U	139 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S		> hypothetical [Hypothetical]
c50_035	29219	+	29809	+2	591 bp U	196 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S	1.18.1.-	> NAD(+) REDUCTASE [CDS CATE]
c50_037	29799	+	30434	+3	636 bp U	211 aa	fac1	1p 2d 1m	V F M S	1.18.1.1	> hypothetical reductase or NADH oxidase [Hypothetical]
c50_038	30510	+	31316	+3	807 bp U	268 aa	fac1	1p 3d 1m	V F M S	1.14.13.7	> hypothetical monooxygenase subunit [Hypothetical]
c50_039	31449	+	32381	+3	933 bp U	310 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S		> TOLUENE-3-MONOOXYGENASE [Hypothetical]
c50_040	32387	+	32821	+2	435 bp U	144 aa	fac1	3d 1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_041	32826	+	33230	+3	405 bp U	134 aa	fac1	2p 3d 1m	V F M S		> FERREDOXIN [CDS CATEGORY]
c50_042	33277	-	32954	-1	324 bp U	107 aa	f	3d 2m	s F M S		
c50_043	33208	+	33555	+1	348 bp U	115 aa	fac1	2p 3d 1m	V F M S		> toluene-4-monooxygenase system protein [Hypothetical]
c50_044	33567	+	34697	+3	1131 bp U	376 aa	fac1	1p 1d 1m	V F M S	1.14.13.-	> TOLUENE-4-MONOOXYGENASE [Hypothetical]
c50_045	34694	+	35155	+2	462 bp U	153 aa	fac1	2p 3d 1m	V F M S		> HYPOTHETICAL 15.1 KD PROTEIN [Hypothetical]
c50_046	35597	-	35283	-3	315 bp U	104 aa	f c1	1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_047	36059	-	35601	-3	459 bp U	152 aa	fac2	3p 3d 1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_048	35656	+	36135	+1	480 bp U	159 aa		3d 1m	s F M S		
c50_049	36158	+	37141	+2	984 bp U	327 aa	fac1	2p 3d 1m	V F M S		> PUTATIVE TRANSPOSONASE (FRACTION) [Hypothetical]
c50_051	37131	+	37706	+3	576 bp U	191 aa	fac2	3p 1m	V F M S		> tranposase [Hypothetical]
c50_053	37710	+	38024	+3	315 bp U	104 aa	f c1	1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_054	38678	-	38373	-3	306 bp U	101 aa		3d 1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_055	38633	+	39025	+2	393 bp U	130 aa	fac1	1p 3d 1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_056	40264	-	39962	-1	303 bp U	100 aa	f c1	1p 3d 1m	V F M S		> putative [Putative]
c50_057	40064	+	41116	+2	1053 bp U	350 aa	fac2 T	1p 3d 2m	V F M S		> putative [Putative]
c50_060	41152	+	41475	+1	324 bp U	107 aa	f	2d 1m	s F M S		

ID	From	To	Fr.	Bases	N	AA	X	Traits	Evidence	Forms	EC	Description
c50_061	41891	-	41283	-3	609 bp U	202 aa		fac1	1p 1d 1m	V F M S		> IS ELEMENT ISC1217 [Uncategori
c50_062	42666	-	42325	-2	342 bp U	113 aa		fac1	3p 3d 1m	V F M S		> CONSERVED HYPOTHETICAL I
c50_063	43010	-	42657	-3	354 bp U	117 aa		fac1	2p 3d 1m	V F M S		> HYPOTHETICAL 13.4 KD PROTI
c50_064	43700	+	44152	+2	453 bp U	150 aa		fac1	1p 2d 1m	V F M S		> ORF C01016 [CDS CATEGORY]
c50_065	44933	-	44124	-3	810 bp U	269 aa		fac1	1p 1d 1m	V F M S	4.1.3.34	> CITRATE LYASE BETA CHAIN I
c50_066	45602	-	44964	-3	639 bp U	212 aa		fac1	2p 3d 1m	V F M S		> TRANSCRIPTIONAL REGULATC
c50_067	46428	+	47822	+3	1395 bp U	464 aa		fac1	1p 2d 1m	V F M S		> nonmuscle and muscle heavy chain i

### 9 ORFs INSIDE 59 LARGE ORFs:

ID	From	To	Fr.	Bases	N	AA	X	Traits	Evidence	Forms	EC	Description
c50_010	6320	+	6754	+2	435 bp U	144 aa		f	3d 1m	F M S		
c50_012	7560	+	8003	+3	444 bp U	147 aa		c1	1m	F M S		
c50_022	15720	+	16163	+3	444 bp U	147 aa		c1	1m	F M S		
c50_036	29787	-	29419	-2	369 bp U	122 aa		f	3d 1m	F M S		hypothetical protein rv2424c
c50_050	36720	-	36286	-2	435 bp U	144 aa		f	3d 1m	F M S		
c50_052	37651	-	37187	-1	465 bp U	154 aa			3d 1m	F M S		
c50_058	40834	-	40310	-1	525 bp U	174 aa		c1 T	1p 1m	F M S		
c50_059	40728	-	40429	-2	300 bp U	99 aa		T	3p 3d 1m	F M S		
c50_068	47303	-	46575	-3	729 bp U	242 aa		c2	3p 3d 1m	F M S		DYNEIN HEAVY CHAIN (DYHC) (FRAGME

### 53 features found between identified ORFs:

ID	From	To	Fr.	Bases	N	AA	Forms	Description
c50_n0001	4326	+	4436	+1	111 bp	37 aa	confirm	hypothetical protein PAB1954 - (354 aa)

c50_n0002	4046	+	4332	+3	287 bp	confirm	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0003	4440	+	4515	+1	76 bp	confirm	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0004	4438	+	4515	+2	78 bp	confirm	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0005	5005	+	5199	+2	195 bp	confirm	(Y08256) IS element ISC1217 [Sulfolobus solfataricus]
c50_n0006	6911	+	7279	+3	369 bp	confirm	(Y18930) hypothetical prote (137 aa)
c50_n0007	6904	+	7311	+2	408 bp	confirm	(Y18930) hypothetical prote (107 aa)
c50_n0008	7337	+	7416	+3	80 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0009	7233	+	7285	+1	53 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0010	6951	+	7031	+1	81 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0011	8440	+	8502	+2	63 bp	confirm	hypothetical protein F19I3.5 - (266 aa)
c50_n0012	8492	+	8512	+3	21 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0013	11736	-	11482	-2	255 bp	confirm	PYRUVATE SYNTHASE SUBUNIT PORD (PYRUVATE OXIDOREDI
c50_n0014	12371	+	12415	+3	45 bp	confirm	Human BAC clone RG308B22 from 7q22-q31, complete sequence [H
c50_n0015	15634	+	15653	+2	20 bp	confirm	Human DNA sequence from PAC 130N4, BRCA2 gene region chromos
c50_n0016	19732	+	19755	+2	24 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0017	19836	+	19863	+1	28 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0018	21726	+	21789	+1	64 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0019	21934	+	21985	+2	52 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0020	21791	+	21829	+3	39 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0021	21743	+	21791	+3	49 bp	confirm	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0022	22059	+	22081	+1	23 bp	confirm	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0023	25696	+	25715	+2	20 bp	confirm	Human Xp22 BAC CT-285I15 (from CalTech/Research Genetics),
c50_n0024	25695	+	25717	+1	23 bp	confirm	Human DNA sequence from clone 20N2 on chromosome 6q24. Conta
c50_n0025	27473	+	27511	+3	39 bp	confirm	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434G012 (from clone DKFZp434G0
c50_n0026	27492	+	27517	+1	26 bp	confirm	Helicobacter pylori 26695 section 117 of 134 of the complete
c50_n0027	27475	+	27498	+2	24 bp	confirm	Mus musculus PAI-2 gene, exons 4 to 8 (and joined CDS)
							Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F12K8 genomic sequence

c50_n0028	28551	+	28622	+1	72 bp	24 aa	<u>confirm</u>	(AL139075) 30S ribosomal pr (156 aa)
c50_n0029	28562	+	28598	+3	37 bp	12 aa	<u>confirm</u>	Arabidopsis thaliana chromosome III BAC T19F11 genomic seque
c50_n0030	28570	+	28590	+2	21 bp	7 aa	<u>confirm</u>	Caenorhabditis elegans cosmid F43H9.
c50_n0031	29072	+	29096	+3	25 bp	8 aa	<u>confirm</u>	Homo sapiens BAC clone RP11-206M19 from 2, complete sequence
c50_n0032	39756	+	39921	+1	166 bp	55 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0033	39108	+	39160	+1	53 bp	17 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0034	39112	+	39153	+2	42 bp	14 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0035	39432	+	39457	+1	26 bp	8 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0036	39031	+	39058	+2	28 bp	9 aa	<u>confirm</u>	Saccharomyces cerevisiae chromosome XIII, complete chromosom
c50_n0037	39175	+	39197	+2	23 bp	7 aa	<u>confirm</u>	Caenorhabditis elegans cosmid F15E6
c50_n0038	41117	+	41151	+3	35 bp	11 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0039	41893	+	41967	+2	75 bp	25 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0040	41909	+	41967	+3	59 bp	19 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0041	43357	+	43440	+2	84 bp	28 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0042	43442	+	43509	+3	68 bp	22 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0043	43437	+	43528	+1	92 bp	30 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0044	43177	+	43203	+2	27 bp	9 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0045	43214	+	43251	+3	38 bp	12 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0046	43224	+	43261	+1	38 bp	12 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0047	43274	+	43295	+3	22 bp	7 aa	<u>confirm</u>	S.solfataricus 100 kbp DNA fragment
c50_n0048	45787	+	45866	+2	80 bp	26 aa	<u>confirm</u>	Pyrococcus horikoshii OT3 genomic DNA, 777001-994000 nt. pos
c50_n0049	46359	+	46427	+1	69 bp	23 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus 281 kb genomic DNA fragment, strain
c50_n0050	46000	+	46023	+2	24 bp	8 aa	<u>confirm</u>	Sulfolobus solfataricus mRNA for coiled-coil protein
c50_n0051	46073	+	46094	+3	22 bp	7 aa	<u>confirm</u>	Thermotoga maritima section 3 of 136 of the complete genome
c50_n0052	45668	+	45693	+3	26 bp	7 aa	<u>confirm</u>	Caenorhabditis elegans cosmid Y64G10A, complete sequence
c50_n0053	47963	+	48055	+3	93 bp	31 aa	<u>confirm</u>	Chlamydia pneumoniae section 49 of 103 of the complete genom (AF017853) Gag [Human immuno (50 aa)]

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

BLASTP 2.0.14 [Jun-29-2000]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 966467082-29968-20011

Query=

(318 letters CSO 003

Database: nr

536,932 sequences; 168,632,586 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
pir  F71954 guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyroph...	79	5e-14
pir  F64554 guanosine pentaphosphate phosphohydrolase - Hel...	78	1e-13
pir  A71685 guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (gppA...	61	2e-08
pir  E70376 exopolyphosphatase - Aquifex aeolicus >gi 29834...	59	5e-08
pir  T31438 exopolyphosphatase homolog ppx - Heliobacillus ...	56	4e-07
emb CAB74190.1  (AL139075) phosphatase [Campylobacter jejuni]	53	4e-06
pir  S76869 hypothetical protein - Synechocystis sp. (strai...	49	7e-05
emb CAA18923.1  (AL023514) hypothetical protein MLCB4.02 [M...	48	2e-04
gb AAC24085.1  (AC003114) Similar to exopolyphosphatase gb ...	45	0.001
pir  T36297 probable DNA-binding protein - Streptomyces coe...	41	0.016
pir  C75615 exopolyphosphatase - Deinococcus radiodurans (s...	40	0.028
pir  C72407 hypothetical protein TM0195 - Thermotoga mariti...	39	0.062
sp P54882 Y496 MYCLE HYPOTHETICAL 43.4 KDA PROTEIN B2168 C2...	39	0.081
ref NP_010199.1  RNA helicase; Sub2p >gi 2500534 sp Q07478 ...	39	0.081
emb CAB61547.1  (AL133171) putative phosphatase [Streptomyc...	37	0.24
sp Q11161 Y496 MYCTU HYPOTHETICAL 34.9 KDA PROTEIN RV0496 >...	37	0.24
dbj BAA11746.1  (D83026) 6-phospho-beta-glucosidase [Bacill...	36	0.41
gb AAD56324.1 AC009326 11 (AC009326) hypothetical protein [...	36	0.41
sp P46320 CELF BACSU PROBABLE 6-PHOSPHO-BETA-GLUCOSIDASE >g...	36	0.41
gb AAF85387.1 AE004066 1 (AE004066) exopolyphosphatase [Xyl...	35	1.2
pir  H69332 conserved hypothetical protein AF0664 - Archaeo...	35	1.2
gb AAF93478.1  (AE004118) guanosine-5'-triphosphate,3'-diph...	34	1.6
ref NP_014977.1  vacuolar ATPase VI domain subunit E (27 kD...	34	1.6
gb AAA35209.1  (M60663) vacuolar membrane ATPase [Saccharom...	34	2.1
gb AAF30962.1 AE002153 10 (AE002153) unique hypothetical me...	34	2.7
pir  T05409 hypothetical protein F10M6.170 - Arabidopsis th...	34	2.7
pir  T37846 probable ATP-dependent RNA helicase - fission y...	33	3.6
dbj BAA13931.1  (D89270) similar to Saccharomyces cerevisia...	33	3.6
gb AAB59049.1  (M83316) pppGpp phosphohydrolase [Escherichi...	33	4.7
gb AAF33473.1  (AF233324) 80% identity with E. coli guansi...	33	4.7
dbj BAA16392.1  (D90880) exopolyphosphatase PPX [Escherichi...	33	4.7



sp P29014 PPX_ECOLI	EXOPOLYPHOSPHATASE (METAPHOSPHATASE) >g...	33	4.7
sp P25552 GPPA_ECOLI	GUANOSINE-5'-TRIPHOSPHATE, 3'-DIPHOSPHA...	33	4.7
pir  T19682	hypothetical protein C33D9.8 - Caenorhabditis e...	32	6.1
gb AAC34891.1	(AF085682) exopolyphosphatase [Salmonella ty...	32	8.0
pir  T14872	ABC exporter outer membrane component homolog -...	32	8.0
pir  E69851	conserved hypothetical protein yjka - Bacillus ...	32	8.0

### Alignments

>pir||F71954 guanosine-5'-triphosphate, 3'-diphosphate pyrophosphatase -  
 Helicobacter pylori (strain J99)  
 gb|AAD05842.1| (AE001463) GUANOSINE-5'-TRIPHOSPHATE, 3'-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASE  
 [Helicobacter pylori J99]  
 Length = 484

Score = 79.2 bits (192), Expect = 5e-14  
 Identities = 66/273 (24%), Positives = 131/273 (47%), Gaps = 27/273 (9%)

Query: 28 SDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSL-PEREIRKK-----VSDELST 81  
 + GI ++GGGS E A + G I + L +G +++ + ++++ K + E+S  
 Sbjct: 130 NSGITIDIGGGSTECALIEKGKIKDLISLDVGTIRIKEMFLDKDLLVLAFAFIQEVSK 189

Query: 82 INIKKANIMVGSGGNVRLAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLPSLDDESRL 141  
 + K N G GG +RAL+K+ +K +P S+HGY + + + + + L ++ +  
 Sbjct: 190 LPFKHKNAF-GVGGTIRALSKVLMKRFDYPIDSLHGYEIDAHKNLAFIEKIVMLKEDKLR 248

Query: 142 SLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGVLTEGKKLD----- 192  
 L G+++ER +I S ++I+ ++++L S MI S G+REGV  
 Sbjct: 249 LL-GVNEERLDSIRSGALILSVLEHLKTSIMITSGVGVREGVFLSDLLRHHYHKFPPNI 307

Query: 193 -----KMNWLEEISYSNAIDPPFGIFKEVMS---EVDSKYSFYVASSALLSLIFKMVG 242  
 K +L +S + EV+S ++D KY F++ + L+ + K++  
 Sbjct: 308 NPSLISLKDRLPHEKHSQVKKECVKLFVLSPLHKIDEKYLFLHFKIAGELASMGKILS 367

Query: 243 YFNPFRACYRFIKESVLPGFLLDEVLLIGLICE 275  
 + + FI ++ GF+ + +I L+ +  
 Sbjct: 368 VYLAHKHSAYFILNALSYGFSHQDRAIICLLAQ 400

>pir||F64554 guanosine pentaphosphate phosphohydrolase - Helicobacter pylori  
 (strain 26695)  
 gb|AAD07341.1| (AE000546) guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (gppA)  
 [Helicobacter pylori 26695]  
 Length = 484

Score = 78.0 bits (189), Expect = 1e-13  
 Identities = 65/273 (23%), Positives = 130/273 (46%), Gaps = 27/273 (9%)

Query: 28 SDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSL-PEREIRKK-----VSDELST 81  
 + GI ++GGGS E A + G I + L +G +++ + ++++ K + E+S  
 Sbjct: 130 NSGITIDIGGGSTECALIEKGKIKDLISLDVGTIRIKEMFLDKDLEVKLAKAFIQEVSK 189

Query: 82 INIKKANIMVGSGGNVRLAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLPSLDDESRL 141  
 + K N G GG +RAL+K+ +K +P S+HGY + + + + + L ++ +  
 Sbjct: 190 LPFKHKNAF-GVGGTIRALSKVLMKRFYCYPIDSLHGYEIDAHKNLAFIEKIVMLKEDQLR 248

Query: 142 SLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGVLTEGKKLD----- 192  
 L G+++ER +I S ++I+ ++++L S MI S G+REGV  
 Sbjct: 249 LL-GVNEERLDSIRSGALILSVLEHLKTSIMITSGVGVREGVFLSDLLRHHYHKFPPNI 307

Query: 193 -----KMNWLEEISYSNAIDPPFGIFKEVMS---EVDSKYSFYVASSALLSLIFKMVG 242  
 K +L +S + E +S ++D KY F++ + L+ + K++  
 Sbjct: 308 NPSLISLKDRLPHEKHSQVKKECVKLFVLSPLHKIDEKYLFLHFKIAGELASMGKILS 367



Query: 243 YFNPFRACYRFIKESVLPGFLLDEVLLIGLICE 275  
+ + FI ++ GF+ + +I L+ +  
Sbjct: 368 VYLAHKHSAYFILNALSYGFSHQDRAIICLLAQ 400

>pir||A71685 guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (gppA) RP294 - Rickettsia  
prowazekii  
emb|CAA14755.1| (AJ235271) GUANOSINE PENTAPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE (gppA)  
[Rickettsia prowazekii]  
Length = 470

Score = 60.9 bits (145), Expect = 2e-08  
Identities = 41/178 (23%), Positives = 92/178 (51%), Gaps = 13/178 (7%)

Query: 12 GRRE--LCRFGYVKHAPNSDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSLPER 69  
G RE L G + ++ GI +LGGGSLE+A + + + ++ LP+G + +  
Sbjct: 105 GEREAYLTAAGLISGISDAFGIVADLGGGSLELAHIYNKKVKGKLSLPLGTKIANSNFS 164

Query: 70 E---IRKKVDELSTINIKKANIMVGSGGNVRALAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQIS 126  
+ I K + +E + ++ GG +R +++++ ++ ++P K++H + ++ +  
Sbjct: 165 DVGLITKMLEEEFGVAHYPNLYLI---GGALRLMSRIYMESINYPLKNLHNFENRVEFE 221

Query: 127 KYASLLPSLDDESRSKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGV 184  
Y L +D K +++++A ++A +++ +IK + +I+S +G++EGV  
Sbjct: 222 LYLEKLSQID----KLKLSYYEQKAIN-YNAVLVIKAMIKVFSPEKIIISNYGLKEGV 274

>pir||E70376 exopolyphosphatase - Aquifex aeolicus  
gb|AAC06997.1| (AE000712) exopolyphosphatase [Aquifex aeolicus]  
Length = 312

Score = 59.3 bits (141), Expect = 5e-08  
Identities = 51/183 (27%), Positives = 81/183 (43%), Gaps = 16/183 (8%)

Query: 18 RFGYVKHA----PNSDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSL----- 66  
R+ Y+ A P + + GGS E + V LPIG + L  
Sbjct: 121 RYAYLAVAYSCLKPEGEVCVVDQGGGSTYVFGKGYKVREVISLPIGIVNLTETFFKQDPP 180

Query: 67 PEREIRKK---VSDELSTINIKKANIMVGSGGNVRALAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSK 123  
E E+++ + ELS + K + +VG GG + LA L+ + + + VHG +L+  
Sbjct: 181 TEEEVKRRFFEFLEKELSKVK-KPVDTIVLGGTITTLAALEYNVYPYDPQKVHGKVLTYG 239

Query: 124 QISKYASLLPSLDDESRSKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMRE 182  
QI K+ + E R K + RA I + I + ++ +IVS +G+RE  
Sbjct: 240 QIKKWFDTFKEIPSEERSKRFRQVEDRRRAKVLIGIGIFLKTLEIFEKDCILIVSDWGLRE 299

Query: 183 GVL 185  
GVL  
Sbjct: 300 GVL 302

>pir||T31438 exopolyphosphatase homolog ppx - Heliobacillus mobilis (fragment)  
gb|AAC84010.1| (AF080002) exopolyphosphatase Ppx [Heliobacillus mobilis]  
Length = 311

Score = 56.2 bits (133), Expect = 4e-07  
Identities = 36/151 (23%), Positives = 73/151 (47%), Gaps = 6/151 (3%)

Query: 31 IFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSLPEREIR-----KKVDELSTINIK 65  
+ ++GGS E+ R P+GA++L P + +++S++  
Sbjct: 140 VVVDIGGGSAAEVVFFHHKDRWWR-QSFPLGAVRLTESPLGRVDIASVWAPAVEKVVSSLQRM 198

Query: 86 KANIMVGSGGNVRALAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLPSLDDESRSKSLPG 145  
I++G GG + +A + L+L + VHG + + + A L ++D E RK + G  
Sbjct: 199 GRPILIGVGGTITTTVAAYALQLRDYAPDKVHGYEIPLEKVKSIARELRAMDLEERKQVAG 258

Query: 146 ISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVS 176  
+ ERA I + +++ ++ +++VS  
Sbjct: 259 LQPERADIIPAGLSVLEAFMEDGGFEEIVVS 289

>emb|CAB74190.1| (AL139075) phosphatase [Campylobacter jejuni]  
Length = 486

Score = 53.1 bits (125), Expect = 4e-06  
Identities = 48/177 (27%), Positives = 85/177 (47%), Gaps = 29/177 (16%)

Query: 25 APNSDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGAL-----KLVSLPE--REIR 72  
+P DG ++GGGS E+ + + II L IG + K+ SL E + I  
Sbjct: 128 SPFKDGTTLDIGGGSSSELCLIKNNRIISCISLDIGTVRLKELFYDTGKMSLEEFIKPIL 187

Query: 73 KKVDELSTINIKKANIMVSGGNVRLAKLDLKLSSFPKSVHG--YLLSSKQ---ISK 127  
+++ E N ++ GG++RA++ ++ +S+P K++H Y+L ++ +  
Sbjct: 188 EQIPKEFCNQ-----LIAIGGSLRAISNSIMQKNSYPLKNLHDFRYMLDEEKGHILKI 241

Query: 128 YASLLPSLDDESRRKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGV 184  
+ S L SL + GI K+R TI I ++ + + +I S G+REGV  
Sbjct: 242 FNSNLDLINF-----GIKKDRFDTIKEGIFIFLKIAEKIKAKQVITSGVGIREGV 292

>pir||S76869 hypothetical protein - Synechocystis sp. (strain PCC 6803)  
dbj|BAA18781.1| (D90917) exopolyphosphatase [Synechocystis sp.]  
Length = 540

Score = 48.8 bits (114), Expect = 7e-05  
Identities = 50/194 (25%), Positives = 84/194 (42%), Gaps = 24/194 (12%)

Query: 31 IFFELGGGSLEIA-----EVTSGNIIR-----VHQLPIGALKLVSLPE--REIRK 73  
+ ++GGGS E+ T +R VH PI A +L L R + +  
Sbjct: 144 VMIDIGGGSTELILADRRDVRFLSSTKVGAVRLTQDFVHSDPIDATELAVLRAVVRGMLE 203

Query: 74 KVSDELST-INIKKANIMVSGGNVRLAKLD-LKLSSFPKSVHGYLLSSKQISKYASL 131  
+ DE+ + + MVG+ G + LA + L+ + GY +S K + ++  
Sbjct: 204 RPVDEIKQRLKGGKEAQMVGTSGTIETLATMPALQKQKEVPNPIQGYSISQKDVVEEWVKK 263

Query: 132 LPSLDDESRRKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREG-----VLT 186  
L L+ + R + G+S RA I +VI+ E + L + + +REG +LT  
Sbjct: 264 LAGLNCQERFEVAGLSDRRAEIIIPGAVILLEAMTMELEDSITICERALREGMIVDWMILT 323

Query: 187 EGKLDKMNWLEEI 200  
G D+M + EI  
Sbjct: 324 HGLIQDRMRFQGEI 337

>emb|CAA18923.1| (AL023514) hypothetical protein MLCB4.02 [Mycobacterium leprae]  
Length = 317

Score = 47.6 bits (111), Expect = 2e-04  
Identities = 38/178 (21%), Positives = 79/178 (44%), Gaps = 25/178 (14%)

Query: 31 IFFELGGGSLEIAEVTSGN-----IIRVHQLPIGALKL-----VSLPEREI 71  
+ +LGGGS EI V G ++ + IG ++L V+ + +  
Sbjct: 137 VVIDLGGGSTEI--VLGGGSAECGVVASYSADIGCVRLTERCLHSDPPTPEEVAAARKVV 194

Query: 72 RKKVDELSTINIKKANIMVSGGNVRLAKLDLKLSSFPKSVHGYLLSSKQISKYASL 131  
R+++ L +++++A VG G + L+ L + ++ ++H + + +  
Sbjct: 195 RERLEVALQMVSVQARTWVGLAGTMTTSLAQAQNMITYDAAAIIHLSRVGSDLMEVCDR 254

Query: 132 LPSLDDESRRKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGVL 185  
L + R +LF + RA I +V+V EL++ L ++IVS + +G++  
Sbjct: 255 LIGMTRVQRVALPSMHRADVIGGAVLVQELVRELRTWAGIDELIVSERDILDGIV 312

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

BLASTP 2.1.1 [Aug-8-2000]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query=

(417 letters)

Database: nr

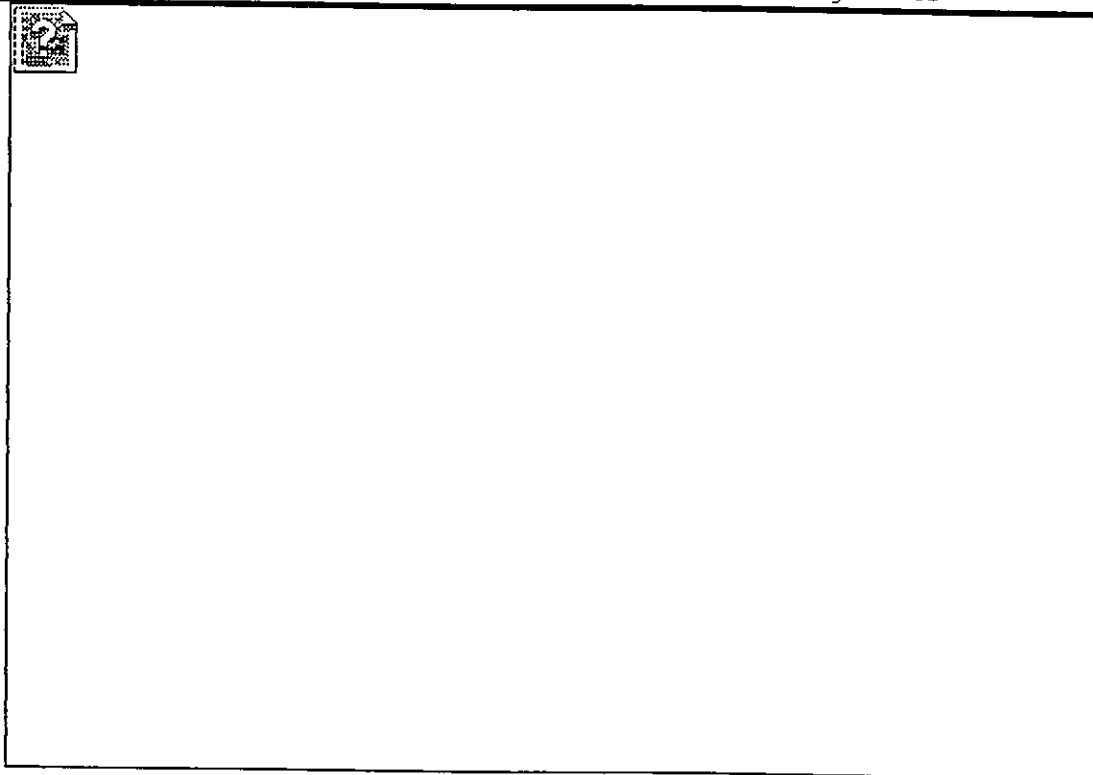
581,094 sequences; 183,006,481 total letters

E-value threshold for inclusion in PSI-Blast iteration 1: 0.002

E-value threshold for inclusion in PSI-Blast iteration 2: 0.002

**Distribution of 39 Blast Hits on the Query Sequence**

Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments



Run PSI-Blast iteration 1

Sequences with E-value BETTER than threshold

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  F71954</a> guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophos...	117	3e-25
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  F64554</a> guanosine pentaphosphate phosphohydrolase - Helic...	116	3e-25
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">dbj BAB05112.1 </a> (AP001511) exopolyphosphatase [Bacillus halod...	105	7e-22
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  E70376</a> exopolyphosphatase - Aquifex aeolicus >gi 2983414...	99	1e-19
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">emb CAB74190.1 </a> (AL139075) phosphatase [Campylobacter jejuni]	85	2e-15
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  C75615</a> exopolyphosphatase - Deinococcus radiodurans (str...	79	6e-14
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  S76869</a> hypothetical protein - Synechocystis sp. (strain ...	78	2e-13
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAC34891.1 </a> (AF085682) exopolyphosphatase [Salmonella typh...	78	2e-13
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  T31438</a> exopolyphosphatase homolog ppx - Heliobacillus mo...	78	2e-13
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  A71685</a> guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (gppA) ...	76	6e-13
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAC32884.1 </a> (AF083928) exopolyphosphatase [Vibrio cholerae]	75	1e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAF93887.1 </a> (AE004158) exopolyphosphatase [Vibrio cholerae]	75	1e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">sp P29014 PPX ECOLI</a> EXOPOLYPHOSPHATASE (METAPHOSPHATASE) >gi ...	75	2e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAB59049.1 </a> (M83316) pppGpp phosphohydrolase [Escherichia ...	73	4e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAF33473.1 </a> (AF233324) 80% identity with E. coli guanosine...	73	5e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">sp P25552 GPPA ECOLI</a> GUANOSINE-5'-TRIPHOSPHATE,3'-DIPHOSPHATE...	73	5e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">dbj BAA16392.1 </a> (D90880) exopolyphosphatase PPX [Escherichia ...	72	9e-12
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAC24085.1 </a> (AC003114) Similar to exopolyphosphatase gb 16...	72	2e-11
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAF93478.1 </a> (AE004118) guanosine-5'-triphosphate,3'-diphos...	71	3e-11
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  E70623</a> hypothetical protein Rv1026 - Mycobacterium tuber...	70	6e-11
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">dbj BAA74460.1 </a> (AB022715) exopolyphosphatase [Pseudomonas ae...	69	8e-11
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAD29107.1 AF053463_1</a> (AF053463) exopolyphosphatase; PPX [...	69	8e-11
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">emb CAA18923.1 </a> (AL023514) hypothetical protein MLCB4.02 [Myc...	69	1e-10
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">sp P54882 Y496 MYCLE</a> HYPOTHETICAL 43.4 KDA PROTEIN B2168_C2_2...	68	3e-10
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">sp P44828 PPX HAEIN</a> PUTATIVE EXOPOLYPHOSPHATASE (METAPHOSPHAT...	67	3e-10
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAF41824.1 </a> (AE002496) exopolyphosphatase [Neisseria menin...	65	2e-09
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">emb CAB84907.1 </a> (AL162756) exopolyphosphatase [Neisseria meni...	65	2e-09
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">dbj BAA94021.1 </a> (AB034704) exopolyphosphatase [Rubrivivax gel...	63	6e-09
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">emb CAC09534.1 </a> (AL442120) putative hydrolase [Streptomyces c...	58	2e-07
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">gb AAF85387.1 AE004066_1</a> (AE004066) exopolyphosphatase [Xylel...	58	3e-07
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">sp Q11161 Y496 MYCTU</a> HYPOTHETICAL 34.9 KDA PROTEIN RV0496 >gi...	57	5e-07
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">emb CAB61547.1 </a> (AL133171) putative phosphatase [Streptomyces...	56	7e-07
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">pir  T36297</a> probable DNA-binding protein - Streptomyces coeli...	55	2e-06

Run PSI-Blast iteration 1

Sequences with E-value WORSE than threshold

<input type="checkbox"/> <a href="#">emb CAB73491.1 </a> (AL139077) possible phosphatase [Campylobacte...	42	0.011
<input type="checkbox"/> <a href="#">ref NP_011262.1 </a> involved in interorganelle communication bet...	39	0.10
<input type="checkbox"/> <a href="#">pir  C72407</a> hypothetical protein TM0195 - Thermotoga maritima...	38	0.15

.144b

<input type="checkbox"/>	ref NP_010199.1	RNA helicase; Sub2p [Saccharomyces cerevisia...	36	0.91
<input type="checkbox"/>	sp P46320 CELF_BACSU	PROBABLE 6-PHOSPHO-BETA-GLUCOSIDASE >gi ...	33	6.9
<input type="checkbox"/>	dbj BAA11746.1	(D83026) 6-phospho-beta-glucosidase [Bacillus...	33	6.9

Run PSI-Blast iteration 1

Alignments

>pir||F71954 guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase -  
 Helicobacter pylori (strain J99)  
 gb|AAD05842.1| (AE001463) GUANOSINE-5'-TRIPHOSPHATE,3'-DIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASE  
 [Helicobacter pylori J99]  
 Length = 484

Score = 117 bits (290), Expect = 3e-25  
 Identities = 113/429 (26%), Positives = 200/429 (46%), Gaps = 32/429 (7%)

Query: 2 ISAVIDCGYNSFRMVVYQVFRNGTFRALGSSKSFVRIGEGDKGDTIPEE-KVEKAERTF 60  
 I+ VID G NS R+ V++ F L +KS VRI EG + +E +++A +  
 Sbjct: 4 ITTVIDIGSNSVRLAVFKKTSQFGFYLLFETKSKVRISEGCYAFKGVLOEIPMQRVAVKAL 63

Query: 61 TIEKRILNGINVDVVKIVATSAPRYASNGNEVRLRLSKIIENEVRVISGEEEGSYAALGM 120  
 + FK I ++ VATSA R A N E R+ K ++++I G++E Y +  
 Sbjct: 64 SEFKEIALKYKSKKILCVATSAPRDAPNRLEFVARVKKACGLQIKIIDGQKEALYGGIAC 123

Query: 121 LNTLPIPDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVS-----LPEREIRKKV 174  
 N L GI ++GGGS E A + G I + L +G +++ L + + +  
 Sbjct: 124 ANLLHKNSGITIDIGGGSTECALIEKGKIKDLISLDVGTIRIKEMFLDKDLVVKLAKAFI 183

Query: 175 SDELSTINIKKANIMVSGGNVRLAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLPSL 234  
 E+S + K N G GG +RAL+K+ +K +P S+HGY + + + + + L  
 Sbjct: 184 QKEVSKLPFKHKNAF-GVGGTIRALSKVLMKRFDYPIDSLHGYEIDAHKNLAFIEKIVML 242

Query: 235 DDESRSKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNDSMDIVSLFGMREGVLTEGKKLD--- 291  
 E + L G+++ER +I S ++I+ ++++L S MI S G+REGV  
 Sbjct: 243 -KEDKLRLLGVNEERLDSIRSGALILSVVLEHLKTSMLITSGVGVREGVFLSDLLRHHYH 301

Query: 292 -----KMNWLEEISYSNAIDPPFGIFKEVMS---EVDSKYSFYVASSALLSL 335  
 K +L +S + EV+S ++D KY F++ + L+  
 Sbjct: 302 KFPPNINPSLISLKDRLPHEKHSQKVKKECVKLFVLSPLHKIDEKYLPHLKIAGELAS 361

Query: 336 IFKMVGYFNPFACYRFIKESVLPGETLDEVLLIGLICEAASGKVKKK----HVKLLKDD 391  
 + K++ + + FI ++ GF+ + +I L+ + + K+ K H+ +  
 Sbjct: 362 MGKILSVYLAHKHSAYFILNALSYGFSHQDRAICLLAQFHKKIPKDNAIAHMSAMMPS 421

Query: 392 ITKKELLSF 400  
 + + LSF  
 Sbjct: 422 LLTLQWLSF 430

>pir||F64554 guanosine pentaphosphate phosphohydrolase - Helicobacter pylori  
 (strain 26695)  
 gb|AAD07341.1| (AE000546) guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (gppA)  
 [Helicobacter pylori 26695]  
 Length = 484

Score = 116 bits (289), Expect = 3e-25  
 Identities = 112/429 (26%), Positives = 204/429 (47%), Gaps = 32/429 (7%)

Query: 2 ISAVIDCGYNSFRMVVYQVFRNGTFRALGSSKSFVRIGEGDKGDTIPEE-KVEKAERTF 60  
 I+ VID G NS R+ V++ F L +KS VRI EG + I +E +++A +  
 Sbjct: 4 ITTVIDIGSNSVRLAVFKKTSQFGFYLLFETKSKVRISEGCYAFNGILQEIIPMQRVAVKAL 63

Ahc

Query: 61 TIFKRILNGINVDEVKIVATSAFRYASNGNEVRLRLSKIENEVRVISGEEEGSYAALGM 120  
 + FK I ++ VATSA R A N E R+ K ++++I G++E Y +  
 Sbjct: 64 SEFKEIALKYKSKKILCVATSAVRDAPNRLEFVARVKKACGLQIKIIDGQKEALYGGIAC 123

Query: 121 LNTLPIPDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSL-PEREIRKK-----V 174  
 N L GI ++GGGS E A + G I + L +G +++ + ++++ K +  
 Sbjct: 124 ANLLHKNSGITIDIGGGSTECALIEKGIKDLISLDVGTIRIKEMFLDKDLEVKLAKAFI 183

Query: 175 SDELSTINIKKANIMVSGGNVRALAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLPSL 234  
 E+S + K N G GG +RAL+K+ +K +P S+HGY + + + + + L  
 Sbjct: 184 QKEVSKLPFKHKNAF-GVGGTIRALSKVLMKRFCYPIDSLHGYEIDAHKNLAFIEKIVML 242

Query: 235 DDESRLSLPGISKERALTIIHSASVIVDELIKYLNDSMIVSLFGMREGVLTGKLD--- 291  
 ++ + L G+++ER +I S ++I+ ++++L S MI S G+REGV  
 Sbjct: 243 KEDQLRLL-GVNEERLDSIRSGALILSVVLEHLKTSIMITSGVGVREGVFLSDLLRHHYH 301

Query: 292 -----KMNWLEEISYSNAIDPPFGIFKEVMS---EVDSKYSFYVASSALLSL 335  
 K +L +S + E +S ++D KY F++ + L+  
 Sbjct: 302 KFPNINPSLISLKDRLFPEKHSQVKKECVLFEALSPLHKIDEKYLHFKIAGELAS 361

Query: 336 IFKMVGYNPFRACYRFIKESVLPGFLLDEVLLIGLICEAASGKVKKK---HVKLLKDD 391  
 + K++ + + FI ++ GF+ + +I L+ + + K+ K H+ +  
 Sbjct: 362 MGKILSVYLAHKHSAYFILNALSYGFSHQDRAIICLLAQFSHKKIPKDNAIAHMSAMMPS 421

Query: 392 ITKELLSF 400  
 + + LSF  
 Sbjct: 422 LLTLQWLSF 430

>dbj|BAB05112.1| (AP001511) exopolyphosphatase [Bacillus halodurans]  
 Length = 518

Score = 105 bits (261), Expect = 7e-22  
 Identities = 78/297 (26%), Positives = 140/297 (46%), Gaps = 21/297 (7%)

Query: 4 AVIDCGYNSFRMVVYQVFRNGTFRALGSSKSFVRIGEGLEKEDTIPEEKVEKAERTFTIF 63  
 A+ID G NS R+V+ + +G ++ L + K+ R+ L + +E T F  
 Sbjct: 7 AIIDIGSNSIRLVINTINEHGHYQELYNFKTVARLSNHLDAQNLTKEGTSILLTTLQKF 66

Query: 64 KRILNGINVDEVKIVATSAFRYASNGNEVRLRLSKIENE-----VRVISGEEEGSYAALG 119  
 + + + D +VAT+A R A+N R L K+ E E ++++S EE + L  
 Sbjct: 67 RTLTEDHHCRAIVVATAAMRKANN----RKELLKLAEQETGFSIKLLSEYEEAYFGYLA 122

Query: 120 MLNTLPIPDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLV-----SLPEREIRKK 173  
 ++N+ I DGI ++GGGS EI ++ ++ H P GA+ L + P E  
 Sbjct: 123 IVNSTSIQDGITIDIGGGSTEITRFSNRKLLHYHSFPFGAITLYRDFHSTDPSEELAS 182

Query: 174 VSDELST-----INIKKANIMVSGGNVRALAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISK 226  
 + L + + K ++G GG R L+ + + +P +H Y ++++  
 Sbjct: 183 LQTFLESAFATLPWLQDAKDLVIGIGGTARNLSLIHQRTDYPLAGLHQYSFPAEELHS 242

Query: 227 YASLLPSLDDESRLSLPGISKERALTIIHSASVIVDELIKYLNDSMIVSLFGMREGV 283  
 +L L R+ L G+SK+R I + + L+K + S I+S G+R+G+  
 Sbjct: 243 VTQMLQRLTSSERELDGLSKDRVDVIIPGTQAISSLVKTIGSSQFIMSRKGLRDGL 299

>pir||E70376 exopolyphosphatase - Aquifex aeolicus  
 gb|AAC06997.1| (AE000712) exopolyphosphatase [Aquifex aeolicus]  
 Length = 312

Score = 98.8 bits (243), Expect = 1e-19  
 Identities = 84/293 (28%), Positives = 139/293 (46%), Gaps = 14/293 (4%)

Query: 4 AVIDCGYNSFRMVVYQVFRNGTFRALGSSKSFVRIGEGLEKEDTIPEEKVEKAERTFTIF 63

Sbjct: 12 A ID G S R+ + Q+ ++G + +G +KE + E+++E+ + + ASIDIGSYSVRLTIAQI-KDGKLSIILERGRITSLGTKVKETGRLQEDRIEETIQVLKEY 70

Query: 64 KRILNGINVDEVKIVATSAFRYASNGNEVRLRLSKIENEVRVISGEEEGSYAALGMLNT 123  
K++++ V+ VK VAT A R A N E R+ + + V VI+ E+EG YA L + +

Sbjct: 71 KKLIDEFKVERVKAVATEAIRRAKNAEEFLERVKREVGLVVEVITPEQEGRYAYLAVAYS 130

Query: 124 L-PIPDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLVSL-----PEREIRK--- 172  
L P + + GGS E + V LPIG + L E E+++

Sbjct: 131 LKPEGEVVCVVDQGGGSTYEVFGKGYKRVREVISLPIGIVNLTETFFKQDPPTTEEEVKRFFE 190

Query: 173 KVSDELSTINIKKANIMVSGGNVRLAKLDLKLSSFPTKSVHGYLLSSKQISKYASLLP 232  
+ ELS + K + +VG GG + LA L+ + + + VHG +L+ QI K+

Sbjct: 191 FLEKELSKVK-KPVDITIVGLGGTITTLAALEYNVYPYDPQKVHGKVLTYGQIKKWEDTFK 249

Query: 233 SLDDSR-KSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREGVL 284  
+ E R K + RA I + I + ++ +IVS +G+REGVL

Sbjct: 250 EIPSEERSKRFRQVEDRRRAKVLILAGIFLKTLEIFEKDCILIVSDWGLREGVL 302

>emb|CAB74190.1| (AL139075) phosphatase [Campylobacter jejuni]  
Length = 486

Score = 84.8 bits (207), Expect = 2e-15  
Identities = 86/301 (28%), Positives = 139/301 (45%), Gaps = 33/301 (10%)

Query: 3 SAVIDCGYNSFRMVVYQVFRNGTFRALGSSKSFVRIGE-GLKEGDTIPEEKVEKAERTFT 61  
+AV+D G NS RMV+++ F K VR+GE G + EE +++AE

Sbjct: 5 TAVVDLGSNSIRMVIFEKTSRYGFYTTCEYKRKVRGENAYNNGKILQEEAMQRAEDALA 64

Query: 62 IFKRILNGINVDEVKIVATSAFRYASNGNEVRLRLSKIENEVRVISGEEEGSYAALGML 121  
FK+ ++ IV TSA R A N R+ + +R I G+ E SY

Sbjct: 65 FFKQCALXHKCKKIFIVGTSALRDAPNSKNFIKRIKDNLSLNIRCIDGKSE-SYLGLAA 123

Query: 122 NTL--PIPDGIFFELGGGSLEIAEVTSGNIIRVHQLPIGALKLV-----SLPE-- 167  
L P DG ++GGS E+ + + II L IG ++L SL E

Sbjct: 124 LNLSPFKDGTTLDIGGSSSELCLIKNNRIISCISLDIGTVRLKELFYDTGKMDSLEEFI 183

Query: 168 REIRKVSDELSTINIKKANIMVSGGNVRLAKLDLKLSSFPTKSVHG--YLLSSKQ-- 223  
+ I +++ E N ++ GG++RA++ ++ +S+P K++H Y+L ++

Sbjct: 184 KPILEQIPKEFCNQ-----LIAIGGSLRAISNSIMQKNSYPLKNLHDFRYMLDEEKGH 237

Query: 224 -ISKYASLLPSLDDSRKSLPGISKERALTIHSASVIVDELIKYLNQSDMIVSLFGMREG 282  
+ + S L SL + GI K+R TI I + + + + +I S G+REG

Sbjct: 238 ILKIFNSNLDLINF-----GIKKDRFDTIKEGIFLKAIEKIKAKQVITSGVGIREG 291

Query: 283 V 283  
V

Sbjct: 292 V 292

>pir||C75615 exopolyphosphatase - Deinococcus radiodurans (strain R1)  
gb|AAF12188.1|AE001862.14 (AE001862) exopolyphosphatase [Deinococcus radiodurans]  
Length = 515

Score = 79.3 bits (193), Expect = 6e-14  
Identities = 79/306 (25%), Positives = 131/306 (41%), Gaps = 24/306 (7%)

Query: 4 AVIDCGYNSFRMVVYQVFRN--GTFRALGSSKSFVRIGEGLKEGDTIPEEKVEKAERTFT 61  
AV D G NS +++ + G FR + + K R+GE L + E E+ T

Sbjct: 4 AVADVGTNSSHLLIAEALPGDAGGFRVIDTLKDRTRLGECLDTRGELTPEGEERLASALT 63

Query: 62 IFKRILNGINVDEVKIVATSAFRYASNGNEVRLRLSKIENEVRVISGEEEGSYAALGML 121  
F+ + +V++ ATSA R A NG EV R+ + VISG EG LG+

Sbjct: 64 RFRELAASAGADVVRVYATSALREAPNGAEVAERVRQRTGLYPAVISGVREGELTYLGVR 123



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)

Reference: Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-10.

Query= gi|13364000|dbj|BAB37948.1| (p)ppGpp synthetase II [Escherichia coli O157:H7]  
(702 letters)

Database: /niji01/sulfolobus/magpie/sulfolobus/html/super\_pub/orfAA.NR  
3247 sequences; 887,792 total letters.

Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100 done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum P(N)	Probability N
<u>c41 039</u> -- <u>sh20b0141 c41 c41 039</u> 35419 35754	61	0.70	1
<u>c46 049</u> -- <u>sh02a0946 c46 c46 049</u> 40900 41625	61	0.75	2
<u>bac27 077</u> -- <u>b01zcl1 b27 bac27 bac27 077</u> 64297 64803	64	0.80	1
<u>bac15 048</u> -- <u>b03zd11 b15 bac15 bac15 048</u> 37729 37427	57	0.92	1
<u>c21 037</u> -- <u>sh22g0921 c21 c21 037</u> 14750 15334	63	0.94	1
<u>c37 038</u> -- <u>sh03g0837 c37 c37 038</u> 7696 7259	58	0.997	1
<u>bac25 012</u> -- <u>b01ze09 b25 bac25 bac25 012</u> 62822 63121	54	0.998	1
<u>bac21 031</u> -- <u>b02za08 b21 bac21 bac21 031</u> 25288 25659	56	0.999	1
<u>bac13 052</u> -- <u>b02zell1 b13 bac13 bac13 052</u> 46184 45825	55	0.9997	1
<u>bac06 029</u> -- <u>b3zc08 b06 bac06 bac06 029</u> 43618 42251	63	0.99991	1
<u>bac20 051</u> -- <u>b07zh09 b20 bac20 bac20 051</u> 14263 14574	53	0.99992	1

>c41 039 -- sh20b0141 c41 c41 039 35419 35754 Length = 112

Score = 61 (21.5 bits), Expect = 1.2, P = 0.70  
Identities = 23/110 (20%), Positives = 52/110 (47%)

Query: 113 EAQAENFRKMIMAMVQDIRVILIKLADRTHNMRTLGSRLRPDKRRRIARETLEIYSPLAHR 172  
E + + K IM +I+ I ++AD + + TL + R A ++L L +  
Sbjct: 4 EVKFNAYSKAIMEFEDEIKRIKKEIADDSKRLITLSDSYLSELRATAEKSLGVDVQKLLN- 62

Query: 173 LGIHHIKTELEELGFEALYPNRYRVIKEVVKAARGNRKEMIQKILSEIEG 222  
K +L+E+ + + R + ++E+ K A N +++ +++ ++ G  
Sbjct: 63 ---DEKKRQLDEIRNKYI-SEREKQLEEIRKEAEKNIDKVVNEVIRQLLG 108

>c46 049 -- sh02a0946 c46 c46 049 40900 41625 Length = 242

Score = 61 (21.5 bits), Expect = 1.4, Sum P(2) = 0.75  
Identities = 17/72 (23%), Positives = 36/72 (50%)

Query: 126 MVQDIRVILIKLAD--RTHNMRTLGSRLP--DKRRRIARETLEIYSPLAHLGIIHHIKTE 181  
+V+D VIL+++ R ++ T+ + +K + I + + +P H IK  
Sbjct: 169 VVKDSSVILVEITSSIRGDLPTIKKKKEFYEKVKNIKVNLVYVITPFIHNDRYPERIKAM 228

Query: 182 LEELGFEALYPN 193  
+++G E +YP+  
Sbjct: 229 AKDMGIEIIYPS 240

Score = 46 (16.2 bits), Expect = 1.4, Sum P(2) = 0.75  
Identities = 15/48 (31%), Positives = 27/48 (56%)

Query: 60 KLDYETIMAALLHDVIEDTPATYQDMEQLFGKSVAEELVEGVSKLDKLG 107

>bac27 077 -- b01zcl1 b27 bac27 bac27 077 64297 64803 Length = 169

Score = 64 (22.5 bits), Expect = 1.6, P = 0.80  
Identities = 35/128 (27%), Positives = 61/128 (47%)

Query: 175 IHHIKTELEELGF-EALYPNR--YRVIKEVV-KAARGNRKEMIQKILSEIEGRLQEAGIP 230  
++++K E +E+ E LYP+R VI + V + N KE I++ +E AG P  
Sbjct: 21 LNNVKIEGKEIKINEKLYPDRAWVDVICDYVCSKVKDNTKEEIEEFGKILEKFSMNAG-P 79

Query: 231 CRVSGREKHLYSIYCKMVLKEORFHSIMDIYAFRVIVNDSBTCYRVLGQ--MHSLYKPRP 288  
+S +Y++ LKE +IY+ D + + L + + +  
Sbjct: 80 L-ISREINIIYNL--AKDLKEGERKQYSEIYS-----EDEEGRSKQLSEEELKRNFIAHA 131

Query: 289 GRVKDYIAIPKANG 302  
G +K+Y+ I K NG  
Sbjct: 132 GLLKEYVIIKNG 145

>bac15 048 -- b03zd11 b15 bac15 bac15 048 37729 37427 Length = 101

Score = 57 (20.1 bits), Expect = 2.5, P = 0.92  
Identities = 19/74 (25%), Positives = 37/74 (50%)

Query: 142 HNMRTLGLSLRPDKRRRIARETLEIYSPLAHLGIHHIKTELEELGFALYPNRYRVIKEV 201  
+NM+T+ SLR DK RE +E Y+ + I+ +EEL E + + I +  
Sbjct: 26 YNMKTVYSLRLDKE---LREEMEKYNVKNWNEEIESFIRKRIEELKKEIL-KKINEILQT 81

Query: 202 VKAARGNRKEMIQK 215  
+ + N +++++  
Sbjct: 82 MPETKSNSADLVRE 95

>c21 037 -- sh22g0921 c21 c21 037 14750 15334 Length = 195

Score = 63 (22.2 bits), Expect = 2.8, P = 0.94  
Identities = 30/137 (21%), Positives = 61/137 (44%)

Query: 84 DMEQLFGKSVAEELVEGVSKLDKLFKFRDKK-EAQAENFRKMIMAMVQDIRVILIKLADRTH 142  
D EQL KS+ ++ E + K + K D+ + E K++ Q I +++K +  
Sbjct: 2 DFEQLLDKSLNKVREEI-KTELSKSLDEAIKLLNEGHNKIVQEYSQRINELIVKTKEEIE 60

Query: 143 NMRTLGLSLRPDKRRRIARETL--EIYSPLAHLGIHHIKTELEELGFALYPNRYRVIKE 200  
+ + + + +E ++Y + ++G +KT+ + E + + I+E  
Sbjct: 61 GEKARLEVENKRTLLVEKEYWINKVYERVLGKIG-EVVKTKEYKDAIENIISKEIKEIRE 119

Query: 201 --VVKAARGNRKEMIQKIL 217  
V N K MI+KI+  
Sbjct: 120 EKVTIYCSPNDKLMIEKIV 138

>c37 038 -- sh03g0837 c37 c37 038 7696 7259 Length = 146

Score = 58 (20.4 bits), Expect = 5.8, P = 1.0  
Identities = 35/125 (28%), Positives = 58/125 (46%)

Query: 178 IKTELEELGF-EALYPNR--YRVIKEVV-KAARGNRKEMIQKILSEIEGRLQEAGIPCRV 233  
+K E +E+ E LYP+R VI + V + N KE I++ +E AG P +  
Sbjct: 1 MKIEGKEIKINEKLYPDRAWVDVICDYVCSKVKDNTKEEIEEFGKILEKFSMNAG-PL-I 58

Query: 234 SGREKHLYSIYCKMVLKEQRFHSIMDIYAFRVIVNDS DTCYRVLGQ--MHSLYKPRPGRV 291  
S +Y++ LKE +IY+ D + + L + + + G +  
Sbjct: 59 SREINIIYNL--AKDLKEGERKQYSEIYS-----EDEEGRSKQLSEEELKRNFI AHAGLL 111

Query: 292 KDYIAIPKANG 302  
K+Y+ I K NG  
Sbjct: 112 KEYVIIKNG 122

>bac25 012 -- b01ze09 b25 bac25 bac25 012 62822 63121 Length = 100  
Score = 54 (19.0 bits), Expect = 6.0, P = 1.0  
Identities = 14/28 (50%), Positives = 19/28 (67%)

Query: 177 HIKTELEELGF-EALYPNRYRVIKEVVKA 204  
HI +ELE LG E Y N + IK+++KA  
Sbjct: 54 HI-SELENLGLVEVEYQNGIKGIKIIKA 81

>bac21 031 -- b02za08 b21 bac21 bac21 031 25288 25659 Length = 124  
Score = 56 (19.7 bits), Expect = 6.8, P = 1.0  
Identities = 30/113 (26%), Positives = 51/113 (45%)

Query: 137 LADRTHNMRTLGLSRPDKRRRIARET-----LEIYSPLAHLRGLGHHIKTELEELGFEALY 191  
+A + + T+ S R D+ RRI E Y +L + + EL L  
Sbjct: 11 IASKILSPLTIDSKRLDEARRILGEAEVKYFNSSYGGNPKKLIDFLLSPDFTELSL-ILG 69

Query: 192 PNRVYRVIKEVVKAARGNR--KEMIQKILSEIEG---RLQEAGIPCRVSGREKHLYS 242  
P+ + + E +K + K+++ KIL EI G +E + +VS +K+L S  
Sbjct: 70 PDMTKKLLAIAIKDNYTDEDIKKVDKILEEINGYTENTEETNV--KVSVNKKYLV 123

>bac13 052 -- b02ze11 b13 bac13 bac13 052 46184 45825 Length = 120  
Score = 55 (19.4 bits), Expect = 8.2, P = 1.0  
Identities = 12/35 (34%), Positives = 20/35 (57%)

Query: 261 YAFRVIVNDS-DTCYRVLGQMHSLYKPRPGRVKDY 294  
Y F V++ D CY VLG ++L K + +++ Y  
Sbjct: 56 YIFNVVLRGKYDFCYHVLGLKYALEKDQITKIELY 90

>bac06 029 -- b3zc08 b06 bac06 bac06 029 43618 42251 Length = 456  
Score = 63 (22.2 bits), Expect = 9.4, P = 1.0  
Identities = 23/90 (25%), Positives = 40/90 (44%)

Query: 421 CVGARVDRQPYPLSQPLTSGQTVEIITAPGARPNAAWLNFVSSKARAKIRQLLKNLKR 480  
C+G + P S L G+T EI P P N A L V+ + + + L D  
Sbjct: 336 CIGCNICVNVCPESCKLEEKGTSEI---P---PNIASLTKVIKVEKSKSVNKEVRKLVGD 389

Query: 481 DSVSLGRRLLNHALGGSRKLINEIPQENIOR 510  
+ V R+ +G + LN + + I++  
Sbjct: 390 ELVRC--RVCGAPIGSRKSLNHVKKIMIEK 417

>bac20 051 -- b07zh09 b20 bac20 bac20 051 14263 14574 Length = 104  
Score = 53 (18.7 bits), Expect = 9.5, P = 1.0

Identities = 18/59 (30%), Positives = 29/59 (49%)

Query: 171 HRLGIHHIKTELEELGFEALYPNRYRVIKEVVKAAARGNRKEMIQILSEIEGRLOEAGI 229  
+R +H IKT+ F +Y N + IK+ + R KE I + I+ +L E G+  
Sbjct: 4 NRHSLHPIKTK----NFFLIY-NLVK-IKDAINRVRWKYKEKIDYVIVIKDKLTETGL 56

Parameters:

matrix=/gendata/programs/blastapp/matrix/BLOSUM62

V=500  
B=250  
ctxfactor=1.00  
E=10

Query	Frame	MatID	Matrix name	-----	As Used	-----	-----	Computed	-----
				Lambda	K	H	Lambda	K	H
+0	0		BLOSUM62	0.320	0.135	0.389	same	same	same
			q=9 r=2	0.244	0.0300	0.180			

Query	Frame	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+0	0		702	702	10.	52	3	11	22	0.19	34
									36	0.22	37

Statistics:

Query	Frame	MatID	Expected High Score	Observed High Score	HSPs Reportable	HSPs Reported
+0	0		56 (25.8 bits)	56 (25.8 bits)	12	12

Query	Frame	MatID	Neighborhd Words	Word Hits	Excluded Hits	Failed Extensions	Successful Extensions	Overlaps Excluded
+0	0		14548	1109651	205602	902251	1796	3

Database: /niji01/sulfolobus/magpie/sulfolobus/html/super\_pub/orfAA.NR  
Title: /niji01/sulfolobus/magpie/sulfolobus/html/super\_pub/orfAA.NR  
Release date: unknown  
Posted date: 11:13 AM AST Dec 1, 2000  
Format: BLAST

# of letters in database: 887,792  
# of sequences in database: 3247  
# of database sequences satisfying E: 11  
No. of states in DFA: 570 (56 KB)  
Total size of DFA: 201 KB (256 KB)  
Time to generate neighborhood: 0.02u 0.00s 0.02t Real: 00:00:00  
No. of processors used: 2  
Time to search database: 2.15u 0.02s 2.17t Real: 00:00:01  
Total cpu time: 2.18u 0.04s 2.22t Real: 00:00:01

142d

BLASTP 2.0alMP-WashU [8-May-1996] [Build 23:14:26 May 7 1996]

Reference: Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-10.

Query= gi|1789147|gb|AAC75826.1| (p)ppGpp synthetase I (GTP pyrophosphokinase); regulation of RNA synthesis; stringent factor [Escherichia coli K12]  
(744 letters)

Database: /niji01/sulfolobus/magpie/sulfolobus/html/super\_pub/orfAA.NR  
3247 sequences; 887,792 total letters.

Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100 done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
<u>bac17 036</u> -- <u>b08ze05 b17 bac17 bac17 036</u> 39229 38594	71	0.35	1
<u>lam38 006</u> -- <u>1240 138 lam38 lam38 006</u> 5047 4274	65	0.94	1
<u>bac19 002</u> -- <u>b03zd10 b19 bac19 bac19 002</u> 70538 71593	66	0.97	1
<u>c20 034</u> -- <u>sh02g0820 c20 c20 034</u> 22281 23507	65	0.995	1
<u>lam33 018</u> -- <u>11140 133 lam33 lam33 018</u> 16360 16049	55	0.996	1
<u>bac04 034</u> -- <u>b07c12 b04 bac04 bac04 034</u> 11686 13071	56	0.998	3
<u>c57 021</u> -- <u>sh19b1057 c57 c57 021</u> 13137 14195	63	0.9993	1
<u>c63 007</u> -- <u>sh17g1063 c63 c63 007</u> 34744 33431	64	0.9994	1
<u>bac13 070</u> -- <u>b02ze11 b13 bac13 bac13 070</u> 57751 56471	63	0.99990	1

>bac17 036 -- b08ze05 b17 bac17 bac17 036 39229 38594 Length = 212

Score = 71 (25.0 bits), Expect = 0.43, P = 0.35  
Identities = 26/116 (22%), Positives = 53/116 (45%)

Query: 629 RGISVHRADCEQLAELRSHAPERIVDAVWG--ESYSAGYSLVVRVVANDRSGLLRDITTI 686  
+ I ++ E++ ++R A + D ++ Y L + A R G +RD+  
Sbjct: 16 KAIQINGIGVEEIHDMRV-AVRKYFDVLYAIHPVYENVECLFLAKEAIKRLGKVRDMDIC 74

Query: 687 -LANEKVNVLVGVASRSDTKQ-QLATIDMTIEIYNLQVLGRVVGKLNQVPDVIDARRL 741  
+AN + L + + D ++ Q+ ++ I L + R+L L+Q+ D+ D L  
Sbjct: 75 EIANGERTKLAIKALDRELVCFVNDKIYGVRLTIYNRILSSLHQLQDITDFHEL 131

>lam38 006 -- 1240 138 lam38 lam38 006 5047 4274 Length = 258

Score = 65 (22.9 bits), Expect = 2.8, P = 0.94  
Identities = 25/70 (35%), Positives = 42/70 (60%)

Query: 674 NDRSGLLRDITTILANEKV-NVLGVASRSDTKQQLATIDMTIEIYN--LQVLGRVVL--GK 728  
ND++ +L+DIT + N + ++G S S L ++ IEIY+ ++V G+VL GK  
Sbjct: 21 NDKA-ILKDITIKIPNNSIFGIMG-PSGSGKSTLLKVLNRLIEIYDSKIKVDGKVLVYFGK 78

Query: 729 -LNQVPDVIDARR 740  
+ Q+ D I R+  
Sbjct: 79 DIFQI-DAIKLRK 90

>bac19 002 -- b03zd10 b19 bac19 bac19 002 70538 71593 Length = 352

Score = 66 (23.2 bits), Expect = 3.4, P = 0.97  
Identities = 21/71 (29%), Positives = 35/71 (49%)

Query: 392 EMLDEVRSQVFD--DRVYVFT-----PKGDVVDLPAGSTPLDFAYHIHSDVGHRCIGAK 443  
+ +D++ +FD + + V+T P D + L GST LD A +HS + A+  
Sbjct: 262 DQIDKLPKHLFDMLEVIRVYTKPEGEEPTKDPLILKKGSTVLDVARKLHSSLAENFRYAR 321

Query: 444 IGGRIVPFTYQ 454  
+ G+ V F Q  
Sbjct: 322 VWGKSVKFGQ 332

>c20 034 -- sh02g0820 c20 c20 034 22281 23507 Length = 409

Score = 65 (22.9 bits), Expect = 5.3, P = 0.99  
Identities = 19/54 (35%), Positives = 30/54 (55%)

Query: 414 DVVDLPAGSTPLDFAYHIHSDVGHRCIGA-KIGGRI-VPFTYQLQMGDQIEIIT 465  
D + L GSTP D A IH+++ + A + ++ V YQLQ D I+I++  
Sbjct: 349 DAILLKKGSTPKDLANAIHTELAKGFLYAIDVKKRMRVGENYQLQNNDEVKIVS 402

>lam33 018 -- l1140 133 lam33 lam33 018 16360 16049 Length = 104

Score = 55 (19.4 bits), Expect = 5.6, P = 1.0  
Identities = 21/56 (37%), Positives = 28/56 (50%)

Query: 502 DKNILAGRQILDDELEHLGISLKEAEKHL---LPRYN--FNDVDELLAAIGGGDIR 552  
D IL+ + L DELE L +E EK L +PR+ F V L+ GD+R  
Sbjct: 20 DNIILSEVKFLLDELERLEARKREVEKRLDVDVPRDSLIFRKVLGLIILARVGDVR 75

>bac04 034 -- b07c12 b04 bac04 bac04 034 11686 13071 Length = 462

Score = 56 (19.7 bits), Expect = 6.4, Sum P(3) = 1.0  
Identities = 27/110 (24%), Positives = 44/110 (40%)

Query: 497 RKQDRDKNILAGRQILDDELEHLGISLKEAEK-HLLPRYNFNDVDELLAAIGGGDIRLNQ 555  
R +D + G+ L D+ E LG+ + EAE +L + N D+ L +  
Sbjct: 313 RTRDYTIDKYTGKHALRDKYEKLGVKISEAEMDQILAKIKSNTTIRFYR-----DVDLLE 367

Query: 556 MVNFLOSQFNKPSAEQDAAALK-QLQOKSYTPQNRSKDNGRNVVVEGVGNLM 606  
+ + + KP EQ A + + YT S V+ GV +M  
Sbjct: 368 LAEVTGRVLKPRPEQIEALISVKCDSNVYTT---SVTRRLSVINGVKEVM 416

Score = 46 (16.2 bits), Expect = 6.4, Sum P(3) = 1.0  
Identities = 23/79 (29%), Positives = 40/79 (50%)

Query: 208 PTEYKRIAKLLHERRLDREHYI-EEFVGHLEAEMKAEGVKAEV-YGRPKHIYSIWR-KMQ 264  
P Y+ I +++ +L +E I E VGH RA + + AE+ R Y + ++  
Sbjct: 51 PDIYEGIKRIV---KLKKEGIITSEIVGHSRAVKRDIEIAAELEVDRIAIFYGVSDIHLK 107

Query: 265 KKNLAFDELFDVRAVRIVAERL 286  
K+ A E A+R++AE +  
Sbjct: 108 AKHKATRE----EALRVIAETI 125

Score = 44 (15.5 bits), Expect = 6.4, Sum P(3) = 1.0  
Identities = 11/47 (23%), Positives = 23/47 (48%)

Query: 425 LDFAYHIHSDVG---HRCIGAKIGGRIVPFTYQLQMGDQIEIITQKQ 468  
L++ H H+D+G + A GG + +G+++ I+ -Q  
Sbjct: 193 LEYDIHAHNDLGLAVANALAAVEGGATIVHATVNLGERVGVIVPLQQ 239

142 F

>c57 021 -- sh19b1057 c57 c57 021 13137 14195 Length = 353

Score = 63 (22.2 bits), Expect = 7.2, P = 1.0  
Identities = 18/45 (40%), Positives = 25/45 (55%)

Query: 150 VIKLAERIAHLREVKDAPEDERVLAAKECTNIYAPLANRLGIGQL 194  
VI + I LREVKD E ER+ A E T + A ++G+ +L  
Sbjct: 117 VIDFSNEIVRLREVKDNDEIERIRKAGEITAV----AMKIGMEKL 157

>c63 007 -- sh17g1063 c63 c63 007 34744 33431 Length = 438

Score = 64 (22.5 bits), Expect = 7.4, P = 1.0  
Identities = 15/63 (23%), Positives = 34/63 (53%)

Query: 506 LAGRQILDDELEHLGISLKEAEKHLPRYNFNDVDELLAAIGGGDIRLNQMVNFLQSQFN 565  
+ GR +++ + + L E E+ L+ +Y+ DV+EL A+G +++ N+ ++  
Sbjct: 221 MGGRVLIIEGFYDDVR-ELTEEERELIKKYDI-DVEELKKALGFKELKYNEKEKIAEALLT 278  
Query: 566 KPS 568  
P+  
Sbjct: 279 YPT 281

>bac13 070 -- b02zell b13 bac13 bac13 070 57751 56471 Length = 427

Score = 63 (22.2 bits), Expect = 9.2, P = 1.0  
Identities = 23/81 (28%), Positives = 43/81 (53%)

Query: 504 NILAGRQILDDELEHLGISLKEAEKHLPRYNFNDVDELLAAIGGGDIRLNQMVNFLQSQ 563  
NI R+I+D ++ +L+E HL+ + N VDE L + +I+ +++FL  
Sbjct: 163 NIGIFRKIMDKY--NIEDNLQEHVHLIDK---NKVDEALVILEK-NIKNKDIMDFLNMI 216  
Query: 564 FNKPSAEEQDAAALKQLQOKS 584  
K A+ +D +L +L++ S  
Sbjct: 217 LTKKEAKLEDIESLAELEEVs 237

Parameters:

matrix=/gendata/programs/blastapp/matrix/BLOSUM62

V=500  
B=250  
ctxfactor=1.00  
E=10

Query Frame	MatID	Matrix name	As Used			Computed		
			Lambda	K	H	Lambda	K	H
+0	0	BLOSUM62	0.320	0.137	0.404	same	same	same
		q=9 r=2	0.244	0.0300	0.180			

Query Frame	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+0	0	744	744	10.	53	3	11	22	0.19	34
								37	0.22	37

Statistics:

Query Frame	MatID	Expected High Score	Observed High Score	HSPs Reportable	HSPs Reported
+0	0	57 (26.3 bits)	62 (28.6 bits)	11	11

.1420



Anexo 2: Publicaciones generadas durante esta tesis

Process Metallurgy 11<sup>A</sup>

# BIOHYDROMETALLURGY

“Fundamentals, Technology and Sustainable Development”

Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium,  
IBS-2001, held in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil,  
September 16-19, 2001

*Part A*

**Bioleaching, Microbiology and Molecular Biology**

Edited by

**V.S.T. Ciminelli**

Universidade Federal de Minas Gerais

**O. Garcia Jr.**

Universidade Estadual de São Paulo

Associate Editors

M.C. Teixeira

R.P. de Carvalho

P.F. Pimentel

2001



**ELSEVIER**

Amsterdam • London • New York • Oxford • Paris • Shannon • Tokyo

## Polyphosphate metabolism in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*.

S. Cardona, F. Remonsellez, N. Guiliani and C. A. Jerez

Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Dpto. de Biología e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile  
scardona@ciencias.uchile.cl - cjerez@uchile.cl

In response to nutrient limitation and during stationary phase, bacteria dynamically accumulate reserve polymers as glycogen and polyphosphates (polyP). PolyP is synthesized by polyphosphate kinase (PPK), having a role in the survival during these stressful conditions. At present no quantitative study of polyP has been done nor its relationship with environmental changes has been established in the domain *Archaea*. Our purpose is to study, in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, the components of the polyP metabolism and their connection with survival under nutrient limitation.

PPK activity was assayed in membrane fractions of cells grown in normal and phosphate starved conditions. Taking advantage of the reported purification in *S. acidocaldarius* of a glycogen-bound protein of 60 kDa with PPK as well as glycosyl-transferase activities (R. Skórko, J. Osipiuk and K. Stetter. *J. Bacteriol.* 171:5162-5164, 1989), we purified the glycogen-protein complex, identified the 60 kDa protein (P60) and cloned its gene by using reverse genetics. Phosphorylation of P60 was studied *in vivo* in normal and phosphate-starved conditions. Recombinant P60 (rP60) was overexpressed in *E. coli* and after purification it was assayed for both PPK and glycosyl-transferase activities.

Although PPK activity was higher during the exponential phase of growth of *S. acidocaldarius*, PolyP accumulated mainly during the stationary phase. PPK activity was higher in cultures starved for phosphate. Under these conditions P60 was phosphorylated *in vivo*. Unexpectedly, the deduced amino acid sequence of the *p60* gene showed a high percentage of identity with bacterial and archaeal glycogen synthases and no similarity with the 18 PPK bacterial sequences reported so far. In agreement with these results, the recombinant protein did not show any PPK activity but only a glycosyl-transferase activity, according to with its homology to glycogen synthases. Our results strongly suggest that P60 is a glycogen synthase which is not responsible for the PPK activity present in crude extracts of *S. acidocaldarius*. Further research will be required to elucidate the metabolic pathway of synthesis of polyP in *Archaea* specially in view of the absence of a PPK gene in the finished sequences of Archaeal genomes.

## 1. INTRODUCTION

The thermoacidophilic archaea *S. acidocaldarius* and *S. metallicus* are considered good candidates for accomplishing metal recovery from mineral resources because they offer the advantage of increased rates of leaching at higher temperatures (1, 2). During this process the cells are normally exposed to several stressing conditions such as lack of nutrients, which may affect the efficiency of the operation.

In response to nutrient limitation and during stationary phase, bacteria dynamically accumulate reserve polymers such as glycogen and polyphosphates (polyP). Likely prevalent in prebiotic evolution, polyP is found in every living organism. This ubiquity claims for a variety of physiological functions, among them: reservoir of Pi, substitution for ATP in kinase reactions and chelator of metals. Also it has recently been established that polyP has a role in adjustments to growth in response to nutrient limitation and during stationary phase (3).

The main enzyme involved in biosynthesis of polyP is the polyphosphate kinase (PPK) that catalyzes the reversible conversion of the terminal phosphate of ATP into polyP. This enzyme has been purified from *E. coli* and its gene has been identified in several bacteria. An equivalent *ppk* gene has not been described so far in the finished genomes from *Archaea* and *Eukarya* neither a quantitative study of polyP has been done nor its relationship with stressing environmental changes has been established in a microorganism of the domain *Archaea*. The only report of a PPK activity in *Archaea* is the purification of a glycogen-bound protein of 60 kDa from *S. acidocaldarius*, with PPK as well as glycosyl-transferase activities (4). We have previously studied the adaptive responses of this thermoacidophilic archaeon to phosphate starvation (5). In this paper, we initiated studies of polyP metabolism and aimed to establish the genetic bases of its synthesis in *S. acidocaldarius*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*S. acidocaldarius* DSMZ 639 was heterotrophically grown at 70°C, according to Skórko *et al.* (4). Growth on high and low phosphate (0.2 mM and 0.002 mM respectively) was done in the same medium but the yeast extract was replaced by 2% amino acids. *Escherichia coli* JM109 and BL21(DE3)pLysS strains were cultivated in Luria-Bertani medium at 37°C.

### 2.2. Electron Microscopy

The thin sections of fixed and embedded samples of *S. acidocaldarius* were stained by standard procedures with uranyl acetate followed by lead citrate. Analysis was done with a Siemens Elmiskop IA transmission electron microscope.

### 2.3. Subcellular fractioning of *S. acidocaldarius*

Cell suspensions of *S. acidocaldarius* (1ml) were harvested by centrifugation (15,000g for 5 min at 4°C). The cell pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl

pH 7.5, 10% sucrose and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The cell suspensions were sonicated (8 times during 30 s on ice), centrifuged at 2,200g for 5 min and the supernatants centrifuged (100,000g for 2 h) to obtain the pellets of the membrane fraction and the supernatant soluble fractions. Membrane fractions were resuspended in 100 ml of 50 mM Tris-acetate pH 7, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10 mg/ml each DNase and RNase. Both fractions were assayed for PPK activity and total proteins.

#### 2.4. Extraction and enzymatic assay of polyP

PolyP was extracted as described by Ault-Riché *et al.* (6). Briefly, 1ml aliquots of *S. acidocaldarius* cultures (optical density at 600nm [ $\text{OD}_{600}$ ] between 0.3 – 1) were pelleted, lysed with 4M guanidine isothiocyanate (GITC) lysis buffer and the polyP bound to powdered glass (Glassmilk Bio101). After treating with 5 mg/ml of DNase and RNase the pellet was washed and polyP was eluted from the pellet by vortexing the glassmilk with 100 ml of water at  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min. PolyP was assayed according to Ault-Riché *et al.* (6) by conversion to ATP using *E. coli* recombinant PPK (7) in the presence of excess ADP. Aliquots of these reactions were added to equal volumes of luciferase reaction mixture (Roche). Luminiscense was measured using a luminometer (Monolight 2010 [Analytical Luminiscense Laboratory]).

#### 2.5. Assay for PPK activity

PPK activity in *S. acidocaldarius* fractions was determined in the conditions described by Skórko *et al.* (4) but following the method described by Ahn and Kornberg (8). A 250 ml reaction mixture containing 50 mM Tris-acetate pH 7, 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM KCl and 1mM [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]ATP (2000 cpm/nmol), was incubated for 1 h at  $70^{\circ}\text{C}$ . The reaction was stopped with 250 ml of 7%  $\text{HClO}_4$  and 50 ml of 2 mg/ml bovine seroalbumin. PolyP[ $^{33}\text{P}$ ] was collected by filtration on Whatman GF/C glass fiber filters, washed with 0.1 M pyrophosphate, 1 M HCl followed by ethanol and quantified by liquid scintillation counting. One unit of enzyme was defined as the amount incorporating 1 pmol of phosphate into polyP per min at  $70^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.6. Assay for glycogen synthase (GS) activity

GS activity was assayed according to König *et al.* (9). A 50 ml reaction mixture containing 50 mM Tris-acetate pH 7, 1 mM EDTA, 22 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2% glycogen and 5 mM UDP-[ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] glucose (4 mCi/mol) was incubated 30 min at  $70^{\circ}\text{C}$ . The reaction was stopped with 117 ml of ethanol. [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glycogen was collected by filtration on Whatman GF/C glass fiber filters, washed with 70% ethanol and quantified by liquid scintillation counting. One unit of enzyme was defined as the amount incorporating 1 pmol of glucose into glycogen per min at  $70^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.7. Purification of glycogen-protein complex from *S. acidocaldarius*

The glycogen-protein complex containing P60, was extracted by a isopycnic  $\text{CsCl}$  gradient, as described by Skórko *et al.* (4). A 48 h culture ( $\text{OD}_{600}$  : 1.3), was harvested by centrifugation (7000g for 30 min). The pellet was washed, resuspended in one volume of buffer D: 50 mM Tris-acetate pH 7, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and sonicated. The lysate was centrifuged (10,700g for 10 min) and the supernatant was

loaded into a step gradient of CsCl (step gradients: 1.79, 1.52, 1.30 and 1.11). After 2 h of centrifugation (100,000g) the glycogen, located as a sharp turbid band near the bottom of the tube was collected, dialyzed against buffer D, diluted and centrifuged (100,000g for 2 h). The pellet, composed of the glycogen-protein complex was resuspended in 50 mM Tris-acetate pH 7 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.8. *In vivo* labeling of *S. acidocaldarius* with $\text{H}_3^{32}\text{P}_4$

Cells from an 800 ml culture was grown for 4 days. At the 3<sup>rd</sup> day one aliquot of 100 ml was removed and 15 mCi of  $\text{H}_3^{32}\text{P}_4$  were added. The cells were further incubated for 24 h, collected and the radioactive glycogen-protein complex was isolated as described before.

### 2.9. Protein analysis

Protein concentration was determined by the method of Biuret (BCA Protein Assay Kit, Pierce). The proteins of the glycogen-protein complex were separated by 2-D non-equilibrium pH polyacrylamide gel electrophoresis (2-D NEPHGE) (pH 3 to 10 in the first dimension) as described by O'Farrell *et al.* (10). The second dimension consisted of an 11.5% SDS-PAGE, followed by staining with Coomassie Blue. The protein spots corresponding to P60 were cut out from the dried Coomassie Blue stained gels and concentrated by SDS-PAGE. The protein was electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PDVF) Immobilon P (Millipore) membrane as described by Towbin *et al.* (11) and subjected to N-terminal end sequencing in the Laboratoire de Microséquencage des Protéines of the Institut Pasteur in Paris.

### 2.10. DNA methods

Restriction enzyme digestions and  $\text{T}_4$  DNA ligase reactions were performed according to the manufacturer's recommendations. Recombinant DNA techniques were carried out according to standard laboratory procedures (12). The dideoxy chain termination method was employed to sequence DNA using  $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$  and the dsDNA Cycle Sequencing System from GIBCO BRL®. The DNA sequences were compiled and analysed with the UWGCG package (13). *Taq* polymerase and *Elongase* were from Promega® and GIBCO BRL® respectively. DOP-PCR was performed with degenerate oligonucleotides, designed on the basis of amino-terminal-end sequence determinations. The fragments were recovered from 1 % agarose gels, purified with Wizard PCR Prep (Promega®) and cloned in the pGEM-T vector (Promega®). Amplification of flanking sequences was done by inverse PCR as was described before by Ochman *et al.* (14).

### 2.11. Cloning and expression of *P60* gene and purification of the recombinant P60 (rP60)

We used the pET System from Novagen. The *p60* gene was obtained by PCR using P60NNdeI and P60CAvaII primers. We used elongase (GIBCO BRL®) and a low number of amplification cycles to decrease the sequence error. After purification of the amplified DNA fragment and digestion by the corresponding restriction enzymes, the DNA fragment was ligated to the pET21b vector previously digested with *NdeI* and *AvaII*. The ligation product (pET21bP60 vector) was used to transform

the *E. coli* strain BL21(DE3)pLys. The recombinant clones were selected on LB solid medium supplemented with ampicillin (50mg/ml) and chloramfenicol (34 mg/ml). The induction/expression analysis was done in the presence or absence of 2 mM IPTG added when the cultures reached an OD<sub>600</sub> of 0.6.

rP60 was purified by metal-chelate affinity chromatography according to the manufacturer's recommendations.

### 2.12. Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence of the *p60* gene is available in the EMBL database under accession no. AJ294724.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. PolyP levels and PPK activity in *S. acidocaldarius*

As a preliminary observation, we detected the presence of electron-dense granules in *S. acidocaldarius* by using electron microscopy (Fig. 1). These granules have been classically described as polyP accumulations (15). However, they are not a conclusive proof of the presence of polyP given that electron-dense bodies may be composed by other phosphocompounds like glucose pentakis (diphosphate) (16). To confirm the presence of polyP in *S. acidocaldarius*, we used the quantitative non-radioactive method developed by Kornberg (6). We could observe that cells growing in rich medium accumulated polyP to a maximum of 12 nmol/mg protein (Fig. 2). PPK activity was mainly associated to membrane fractions. However, the highest observed PPK specific activity did not correlate with the highest levels of polyP suggesting that the accumulation of polyP is regulated not only by its synthesis but also by its utilization.



Figure 1. Transmission electron microscopy of thin sections from *S. acidocaldarius* cells. The arrows indicate electron-dense bodies.

PPK activity was also assayed in membrane fractions of phosphate-starved cells (Fig. 3). During the exponential phase of growth, the specific activity of PPK reached the highest values (Fig. 2 and 3). Also, the specific activity of PPK was twice higher in cells starved for phosphate compared with cells grown in normal conditions.

However, this difference was not observed during the stationary phase of growth (Fig. 3).

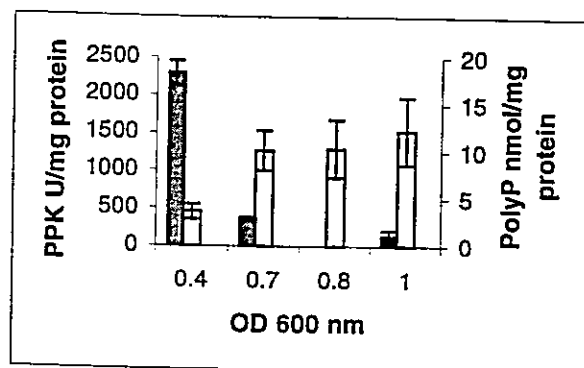


Figure 2. PolyP levels and PPK activity in *S. acidocaldarius*. Cells were grown in rich medium. Cultures (1ml) were sampled for measurement of growth, polyP content and membrane bound PPK activity. Empty bars, polyP levels. Filled bars, PPK activity. Error bars, standard deviation; n=3.

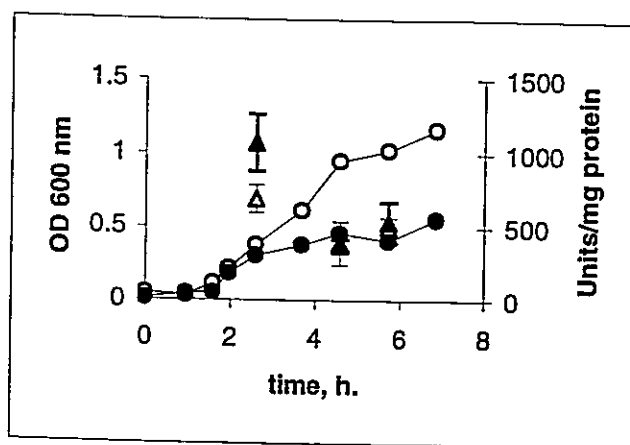


Figure 3. PPK activity in membrane fractions of cells starved for phosphate. Cultures were grown in 2 mM (empty symbols) and 0.002 mM (filled symbols) phosphate medium. At the indicated times aliquots were taken for measurement of growth and PPK activity. Circles, growth. Triangles, PPK activity. Error bars, standard deviation; n=3.

Although in *E. coli*, the enzyme PPK does not seem to be regulated only by phosphate starvation, through the *phoR-phoB* two component system (17), in *Acinetobacter* sp., a polyP accumulating bacteria, the transcription of the *ppk* gene is induced by phosphate starvation (18). PolyP levels in *S. acidocaldarius* were measured in cells grown in rich medium. Under these conditions polyP levels are comparable to those of *E. coli*, a non polyP accumulating bacteria. At present, we do



not know if under different conditions of growth, such as a defined minimal medium, *S. acidocaldarius* could reach polyP levels comparable to *Acinetobacter* sp. but at least, the PPK activity may be similarly regulated.

### 3.2. *In vivo* Phosphorylation of P60 in phosphate-starvation conditions

Taking advantage of the reported purification of a glycogen-bound protein with PPK and glycosyl-transferase activities (4), we purified the glycogen-protein complex, and isolated this protein of approximately 60 kDa (P60) by 2D PAGE (Fig. 4A, upper panel). P60 showed to be composed of three spots of the same molecular weight, suggesting a possible post-translational modification. This observation and the report of the phosphorylation of *E. coli* PPK (8) led us to carry out *in vivo* phosphorylation experiments. P60 was highly phosphorylated in cells grown in phosphate starvation conditions (Fig. 4B). This observation could be affected by an effect of concentration on the specific activity of  $^{32}\text{P}$  in the low phosphate medium. However, not all the phosphorylated proteins increased their phosphorylation levels after similar labeling conditions in experiments previously performed in our laboratory (19). Therefore, we took this result as a suggestion of a possible regulation of P60 by phosphorylation.

### 3.3. Isolation of the p60 gene

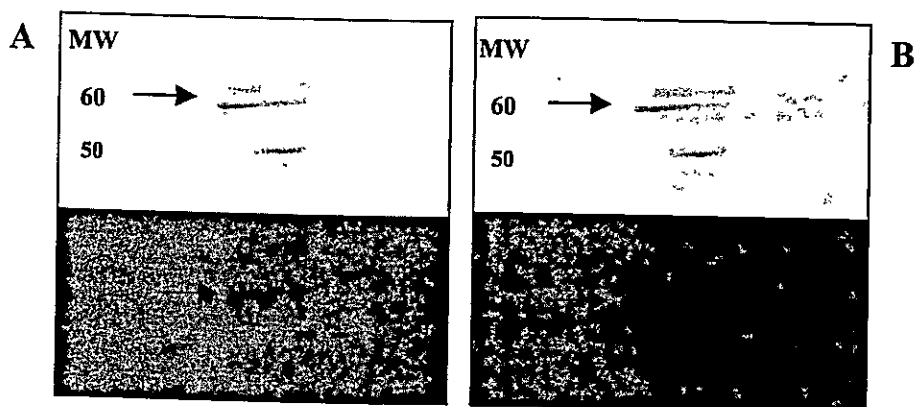


Figure 4. 2D PAGE of *in vivo* glycogen-bound phosphorylated proteins from *S. acidocaldarius* grown in normal (A) or in low-phosphate (B) conditions. The glycogen-bound proteins were separated by 2D PAGE and stained with Coomassie Blue (upper panels) or subjected to autoradiography (lower panels). Arrows indicate the position of P60.

We determined the  $\text{NH}_2$ -terminal end sequence of P60 and the  $\text{NH}_2$ -terminal end sequences of two internal peptides. We used these data to obtain degenerate oligonucleotide primers which were then employed in DOP-PCR experiments using purified genomic DNA from *S. acidocaldarius* as template. An 800 bp DNA fragment was amplified, cloned in the pGEM-T vector and sequenced. Then, a probe was synthesized using primers designed from the 800 pb DNA fragment which was used in Southern experiments. Only one DNA fragment hybridized with the probe, indicating the presence of a single copy of the *p60* gene (data not shown). Two other

primers were defined and employed in reverse PCR experiments which allowed us to obtain the 5' and 3' ends of the gene. The analysis of the nucleotide sequence revealed that only one open reading frame contained the correct sequences upstream and downstream of the initial peptide sequence (Fig. 5). The search in data banks gave a positive similarity to glycogen synthases of *Archaea* and *Bacteria*. (Table 1). This is in agreement with the reported glycosyl-transferase activity. However, P60 did not show any similarity with sequences of known PPKs.

#### 3.4. Cloning, expression and functional analysis of p60 gene

As no function of any glycogen synthase gene of the domain *Archaea* has been experimentally confirmed and in view of the reported PPK activity of P60, we decided to elucidate the functional properties of this protein. We cloned the *p60* gene, overexpressed the recombinant protein (rP60) in *E. coli* host cells, and purified it. The identity of *p60* gene was confirmed by sequencing both strands of the cloned insert in pET21b+ (Data not shown).

We measured the proposed activities of PPK and GS of rP60 at 37°C and at 70°C. rP60 did not show any PPK activity neither at 37°C nor at 70°C even in the presence of glycogen. However, rP60 did show GS activity at 70°C in agreement with the similarity of P60 with glycogen synthases. This activity reached a value of 750,000 U/mg protein in the presence of glycogen. We concluded that P60 is a phosphorylatable thermostable glycogen synthase not being responsible for the PPK activity present in crude extracts from *S. acidocaldarius*

#### 4. CONCLUSIONS

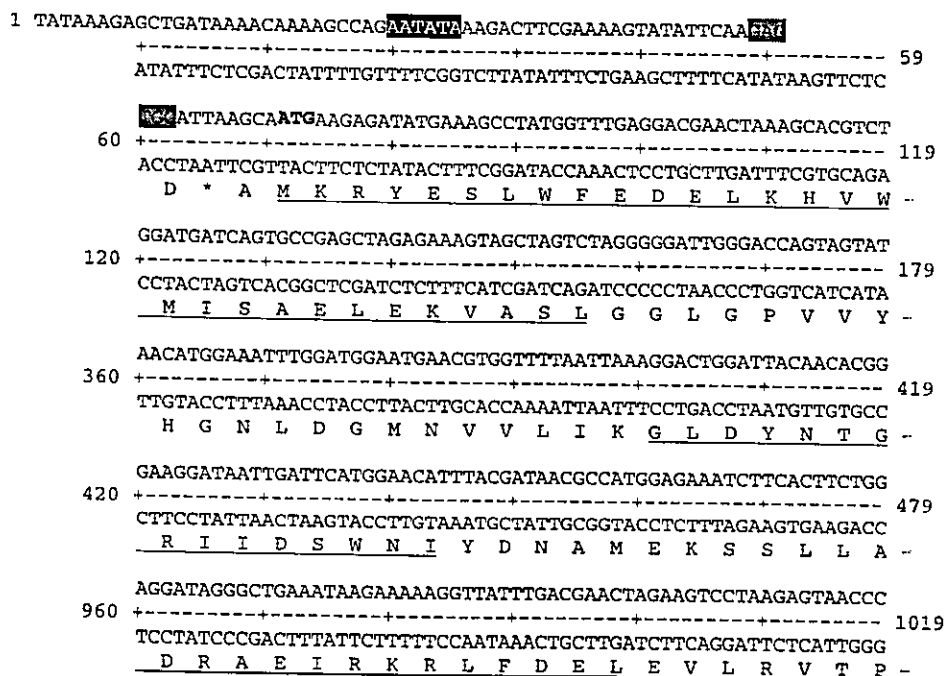


Figure 5. Partial sequence of the *p60* gene and deduced amino acid sequence. The amino acid residues obtained from peptide sequencing are underlined. Black box, putative promoter. Grey box, putative Shine Dalgarno sequence. Bold, start codon.

Table 1.

Similarity of P60 primary amino acid sequence with other database proteins.

Accession number	Description	Score (bits)	Expect
emblCAB49000.1(AJ248283)	<i>Pyrococcus abyssi</i> Glycogen synthase	81	1e-14
gil2983303 (AE000704)	<i>Aquifex aeolicus</i> Glycogen synthase	56	4e-07
emblCAA167961 (AL021713)	<i>Arabidopsis thaliana</i> Starch synthase-like protein	50	2e-05
emblCAB40375.11 (AJ006752)	<i>Vigna unguiculata</i> Starch synthase, isoform V	49	6e-05

The search was performed with the blastP program of NCBI.

Although polyP is considered an ubiquitous reserve polymer, only in a few microorganisms it has been studied by specific quantitative methods. We demonstrated that the archaeon *S. acidocaldarius* does contain comparable levels of polyP to those of *E. coli*. It has been suggested that poly P accumulation in *E. coli*, during nutritional limitation, is due to an inhibition of the enzyme responsible of the hydrolysis of polyP to phosphate, the exopolyphosphatase (PPX) (17). Given that PPK activity was higher in *S. acidocaldarius*, during exponential phase of growth, the accumulation of polyP observed in the stationary phase may be caused by a lack of hydrolysis by a PPX. However, although a fragment of the *ppx* gene has been described in *S. solfataricus* genome (<http://niji.imb.nrc.ca/sulfolobus/>) at present its function has not been experimentally confirmed.

Our effort to identify a PPK gene in *S. acidocaldarius* was based on P60 being apparently responsible for PPK activity (4). However, our results demonstrate that P60 is a glycogen synthase. Given the presence of polyP and PPK activities in crude extracts from *S. acidocaldarius* and the absence of a PPK gene in the *S. solfataricus* genome and other archaeal genomes, the existence of polyphosphate kinase in this microorganism and others of the domain *Archaea* is still controversial. The identification of functional domains in the known PPKs from different organisms will be of great help in future exhaustive databank searching in the *Sulfolobus* and other archaeal genomes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants FONDECYT 2990035 and 1000/679, ICGB (Project CRP/CHI00-04, contract 01/001) and ICM P99-031-F.

#### REFERENCES

1. J.A. Brierley and C.L. Brierley. (1986). In: T.D. Brock, (ed.), *Thermophiles: general, molecular and applied microbiology*. p. 280. John Wiley & sons, Inc.
2. E.B. Lindström, E. Gunneriusson and O.H. Tuovinen. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12

- (1992) 133.
3. A. Kornberg, N.N. Rao and D. Ault Riché. *Annu. Rev. Biochem.*, 68 (1999) 89.
  4. R. Skórko, J. Osipiuk and K.O. Stetter. *J. Bacteriol.*, 171 (1989) 5162.
  5. G. Osorio and C.A. Jerez. *Microbiol.*, 142 (1996) 1531.
  6. D. Ault-Riché, C.D. Fraley, C.M. Tzeng and A. Kornberg. *J. Bacteriol.*, 180 (1998) 1841.
  7. K.D. Kumble, K. Ahn and A. Kornberg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 14391.
  8. K. Ahn and A. Kornberg. *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 11734.
  9. H. König, R. Skórko, W. Zillig and W-D Reiter. *Arch. Microbiol.*, 132 (1982) 297.
  10. P. Z. O' Farrell, H. M. Goodman and P. H. O' Farrell, *Cell*, 12 (1977) 1133.
  11. H.T. Towbin, T. Staehelin and J.Gordon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 4350.
  12. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
  13. Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
  14. H. Ochman, M.M. Medhora, D. Garza and D.L. Hartl (1990). *In PCR protocols, a guide to methods and applications*, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (Eds) Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. p. 219.
  15. J-M. Wiame *Federation Proc.*, 6 (1947) 302.
  16. C.M. Hensgens, H. Santos, C. Zhang and T.A. Hansen. *Eur. J. Biochem.*, 242 (1996) 327.
  17. N.N. Rao, S. Liu, and A. Kornberg. *J. Bacteriol.*, 180 (1998) 2186.
  18. W. Geibdörfer, A. Ratajczak and W. Hillen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1998) 896.
  19. M. Seeger, G. Osorio and C.A. Jerez. *FEMS Microbiol Lett.*, 138 (1996) 129.

## The Glycogen-Bound Polyphosphate Kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* Is Actually a Glycogen Synthase

SILVIA CARDONA, FRANCISCO REMONSELLEZ, NICOLAS GUILIANI, AND CARLOS A. JEREZ\*

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology and Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology (CBB), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Received 21 May 2001/Accepted 1 August 2001

Inorganic polyphosphate (polyP) is obtained by the polymerization of the terminal phosphate of ATP through the action of the enzyme polyphosphate kinase (PPK). Despite the presence of polyP in every living cell, a gene homologous to that of known PPKs is missing from the currently sequenced genomes of *Eukarya*, *Archaea*, and several bacteria. To further study the metabolism of polyP in *Archaea*, we followed the previously published purification procedure for a glycogen-bound protein of 57 kDa with PPK as well as glycosyl transferase (GT) activities from *Sulfolobus acidocaldarius* (R. Skórko, J. Osipiuk, and K. O. Stetter, J. Bacteriol. 171:5162–5164, 1989). In spite of using recently developed specific enzymatic methods to analyze polyP, we could not reproduce the reported PPK activity for the 57-kDa protein and the polyP presumed to be the product of the reaction most likely corresponded to glycogen-bound ATP under our experimental conditions. Furthermore, no PPK activity was found associated to any of the proteins bound to the glycogen-protein complex. We cloned the gene corresponding to the 57-kDa protein by using reverse genetics and functionally characterized it. The predicted product of the gene did not show similarity to any described PPK but to archaeal and bacterial glycogen synthases instead. In agreement with these results, the recombinant protein showed only GT activity. Interestingly, the GT from *S. acidocaldarius* was phosphorylated *in vivo*. In conclusion, our results convincingly demonstrate that the glycogen-protein complex of *S. acidocaldarius* does not contain a PPK activity and that what was previously reported as being glycogen-bound PPK is a bacterial enzyme-like thermostable glycogen synthase.

Polyphosphate (polyP) is a linear polymer of hundreds of orthophosphate residues, linked by high-energy phosphoanhydride bonds. Likely prevalent in prebiotic evolution, polyP is found in every living organism, including the domain *Archaea* (14). This ubiquity is explained by the variety of physiological functions it performs, among them providing a reservoir of phosphate ( $P_i$ ), substituting for ATP in kinase reactions, and chelating metals. Also it has recently been established that polyP has a role in adjustments to growth in response to nutrient limitation and during stationary phase (6). The main enzymes involved in the metabolism of polyP in bacteria are the polyphosphate kinase (PPK) that catalyzes the reversible conversion of the terminal phosphate of ATP into polyP and the exopolyphosphatase (PPX) that processively hydrolyzes the terminal residues of polyP to liberate  $P_i$ . These enzymes from *Escherichia coli* have been purified, and their genes have been cloned (2, 3). Manipulation of the genes responsible for polyP metabolism has been proposed as a possible way to remove heavy metals or phosphate from contaminated environments (12).

At present almost nothing is known about the metabolism of polyP in the domain *Archaea*. A gene homologous to *ppk* has not been described so far in the finished or unfinished archaeal genomes. The reported purification of an enzyme identified as a glycogen-bound PPK from *Sulfolobus acidocaldarius* (28) is,

to our knowledge, the only described PPK activity in *Archaea* (25, 27). This putative PPK of 57 kDa was shown to be active only in the presence of glycogen, a striking feature considering known PPKs. Also, the 57-kDa protein was described as a glycosyl transferase (GT) by the same laboratory (13). The possibility of finding a novel archaeal *ppk* gene prompted us to repurify this protein and characterize it. By using definitive accurate and specific enzymatic assays to analyze polyP (5), we found that the glycogen-protein complex from *S. acidocaldarius* does not contain a PPK activity. Instead, the protein previously thought to be a PPK is a glycogen synthase.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** *S. acidocaldarius* DSM 639 was heterotrophically grown in medium 88 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) with 0.1% yeast extract and 0.2% sucrose, according to the method of Skórko et al. (28). For  $^{32}P$ -labeling purposes, growth was done in the same medium but the yeast extract was replaced by 2% amino acids and the concentration of  $P_i$  was diluted 1:100. *E. coli* strains JM109 and BL21(DE3)pLysS were cultivated in Luria-Bertani medium at 37°C.

**Purification of the previously described glycogen-bound PPK activity from *S. acidocaldarius*.** The glycogen-protein complex containing the 57-kDa protein was extracted by two-step isopycnic CsCl gradient centrifugation, as described by Skórko et al. (28). A culture was grown to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.8 and was harvested by centrifugation ( $7,000 \times g$  for 30 min). The pellet was washed, resuspended in 1 volume of buffer D (50 mM Tris-acetate [pH 7], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM EDTA), and sonicated five times for 30 s. The lysate was centrifuged ( $10,700 \times g$  for 10 min) to eliminate cellular debris, and the supernatant (F1) was loaded into a step density gradient of CsCl (step densities were 1.79, 1.52, 1.30, and 1.11). After 2 h of centrifugation ( $100,000 \times g$ ) the glycogen was located as a sharp turbid band near the bottom of the tube. The glycogen contained in this band was dialyzed against buffer D, diluted, and sedimented by centrifugation ( $100,000 \times g$  for 2 h at 4°C). The final pellet, composed of the glycogen-protein complex, was resuspended in 1 volume of 50 mM Tris-acetate (pH 7.0) and stored at  $-20^\circ C$  as fraction F2.

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago 1, Casilla 653, Santiago, Chile. Phone and fax: (56-2) 678 7376. E-mail: cjerez@uchile.cl.

For the next purification step, the glycogen band obtained after 2 h of centrifugation ( $100,000 \times g$ ) was collected and reloaded into an identical gradient of CsCl and centrifuged at  $100,000 \times g$  for 48 h at 4°C. The glycogen contained in the band resulting after this centrifugation was dialyzed against buffer D, diluted, and sedimented by centrifugation ( $100,000 \times g$  for 2 h). The final pellet was resuspended in 1 volume of 50 mM Tris-acetate (pH 7.0) and stored at -20°C as fraction F3.

**In vivo labeling of *S. acidocaldarius* with  $H_3^{32}PO_4$ .** A 200-ml culture of *S. acidocaldarius* was grown to an  $OD_{600}$  of 0.8, harvested by centrifugation, and resuspended in 40 ml of medium 88 with 0.02 mM  $H_3^{32}PO_4$  (6.25  $\mu Ci/nmol$ ). The cells were further incubated for 24 h and harvested. The radioactively labeled glycogen-protein complex was isolated by centrifugation for 2 h in CsCl as described above.

**Assay for PPK activity.** PPK activity was determined by using the buffer, salts, and temperature conditions reported by Skórko et al. (28), except that the method described by Ahn and Kornberg was followed (1). A 250- $\mu l$  reaction mixture containing 50 mM Tris-acetate (pH 7), 2 mM  $MnCl_2$ , 10 mM KCl, and 1 mM [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP (1.08 mCi/nmol; NEN) was incubated for 1 h at 70°C. After the mixture was cooled on ice for 5 min, the reaction was stopped with 250  $\mu l$  of 7%  $HClO_4$  and 50  $\mu l$  of 2-mg/ml bovine serum albumin. The acid-precipitated  $^{32}P$ -labeled material was collected on Whatman GF/C glass fiber filters and washed with 0.1 M pyrophosphate and 1 M HCl, followed by ethanol. Quantitation was done by liquid scintillation counting. One unit of enzyme was defined as the amount incorporating 1 pmol of phosphate from ATP into polyP per min at 70°C.

**Assay for GT activity.** GT activity was assayed according to the method of König et al. (13). A 50- $\mu l$  reaction mixture containing 50 mM Tris-acetate (pH 7), 1 mM EDTA, 22 mM  $NH_4Cl$ , and 5 mM UDP-[U- $^{14}C$ ]glucose (4 mCi/mol; Amersham) was incubated for 30 min at 70°C. The reaction was stopped with 117  $\mu l$  of ethanol. Incorporation of [U- $^{14}C$ ]glucose into the precipitated  $^{14}C$  material was quantified by liquid scintillation counting after collection on Whatman GF/C glass fiber filters and washing with 70% ethanol. One unit of enzyme was defined as the amount incorporating 1 pmol of glucose into glycogen per min at 70°C.

**In vitro preparation of [ $^{32}P$ ]polyP<sub>750</sub>.** Radioactively labeled polyP was prepared as described by Ault-Riché et al. (6). According to the properties of *E. coli* PPK, the synthesized polyP has a uniform length of around 750 residues (16). A 0.35-ml reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 40 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 4 mM  $MgCl_2$ , 40 mM creatine phosphate, 20  $\mu g$  of creatine kinase per ml, 1 mM [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP (14  $\mu Ci/nmol$ ), and 35,000 U of purified recombinant PPK from *E. coli* (PPK<sub>EC</sub>) (16). After 30 min of incubation at 37°C the mixture was cooled on ice for 5 min, and the reaction was stopped by the addition of 35  $\mu l$  of 0.5 M EDTA.

The polyP reaction mixture was loaded over a cushion of 1.9 ml of 2.5 M CsCl-50 mM Tris-HCl (pH 7.4)-10 mM EDTA. After centrifugation at 45,000 rpm for 4 h at 4°C in an AH-650 rotor (Sorvall), aliquots of 200  $\mu l$  were taken and to each one was added 140  $\mu l$  of isopropanol. After incubation at room temperature for 30 min and centrifugation at 13,000 rpm for 30 min in an Eppendorf centrifuge, the supernatants were removed and the pellets were washed twice with 600  $\mu l$  of 70% ethanol, dried overnight in a vacuum-desiccator, and resuspended in 25  $\mu l$  of distilled water.

**Assay of polyP.** PolyP was assayed according to the method of Wurst et al. (32) in a 20- $\mu l$  reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM  $Mg(CH_3COO)_2$ , 50 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 200  $\mu M$  [ $^{32}P$ ]polyP<sub>750</sub>, and 6,000 U of PPK<sub>EC</sub> (32). Conversion of polyP to P<sub>1</sub> was analyzed by ascending thin layer chromatography (TLC) in polyethyleneimine-cellulose (Merck) using 0.75 M  $KH_2PO_4$  (pH 3.5) as the solvent. The products obtained were quantified after autoradiography.

**Protein analysis.** Protein concentration was determined by the method of Bradford (Coomassie Plus Protein Assay Reagent; Pierce). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and staining with Coomassie blue were performed as described before (17). Two-dimensional nonequilibrium pH polyacrylamide gel electrophoresis (2-D NEPHGE) (pH 3 to 10 in the first dimension) was performed as described by O'Farrell et al. (20) and as used for *S. acidocaldarius* in our laboratory (21). The second dimension consisted of an SDS-11.5% PAGE, followed by staining with Coomassie blue and drying. When  $^{32}P$ -labeled proteins were analyzed, they were detected by autoradiography after 7 days of exposure.

**Isolation of P60 from 2-D gels and amino-terminal amino acid sequencing.** The 57-kDa protein discussed in the work of Skórko et al. (28) migrated with a molecular mass of 60 kDa under our conditions and will be referred to as P60. The glycogen-protein complex was separated by 2-D PAGE, and the protein spots were cut out from the dried Coomassie blue-stained gels. After rehydration in 500  $\mu l$  of 50 mM  $H_3BO_3$ -0.1% SDS for 2 h at room temperature, the spots were concentrated by SDS-PAGE. The proteins were electroblotted onto a

polyvinylidene difluoride Immobilon P (Millipore) membrane as described by Towbin et al. (30) by employing the Trans-Blot Cell system (Bio-Rad) in transfer buffer and application of a 0.8-A constant current for 48 min. For the generation of internal peptides from P60, the protein was subjected to partial proteolysis with endolysine C. The peptides were separated by high-pressure liquid chromatography. Amino-terminal end sequencing was performed in the Laboratoire de Microséquence des Protéines of the Institut Pasteur.

**DNA manipulations.** Restriction enzyme digestions and T<sub>4</sub> DNA ligase reactions were performed according to the manufacturer's recommendations. Recombinant DNA techniques and Southern blotting were carried out according to standard laboratory procedures (23). Prehybridization and hybridization reactions were performed at 42°C with the DIG Easy Buffer (Roche). Digoxigenin-labeled probes were obtained by PCR as described by Roche with the nondegenerated primers P60ND1D (5'-GCTAGAGAAAGTAGCTAGTC-3') and P60ND2R (5'-TATTTTCAGCCCTATCCTCAGT-3') deduced from the sequence of the *S. acidocaldarius* DNA fragment obtained by degenerate oligonucleotide primer (DOP)-PCR. Detection of digoxigenin-labeled DNA fragments was accomplished by using the DIG Luminescent Detection Kit as described by Roche.

The dideoxy chain termination method was employed to sequence DNA using [ $\gamma$ - $^{33}P$ ]ATP and the dsDNA Cycle Sequencing System from GIBCO-BRL. The DNA sequences were compiled and analyzed with the University of Wisconsin GCG Package (version 9.1; Genetics Computer Group, Madison).

**Primers and PCR conditions.** The oligonucleotide primers were purchased from Genset Corporation. *Taq* polymerase and *Elongase* were from Promega and GIBCO-BRL, respectively, and were used according to the manufacturer's recommendations. The DNA fragments were recovered from 1% agarose gels, purified with Wizard PCR Prep (Promega), and cloned into the pGEM-T vector (Promega). Twenty-mer DOPs were designed on the basis of P60 amino-terminal sequence determinations. Sixty picomoles of each nucleotide and 25 ng of *S. acidocaldarius* total DNA were used in 50- $\mu l$  reaction mixtures.

The DOPs for DOP-PCR were P60NH2DD (5'-YTNAARCAAYGTNTGGA TGAT-3'), P6021DD (5'-ATHATHGAYWSNTGGAAYAT-3'), P6021DR (5'-ATRTTCCANSWRWCWATWAT-3'), P6027DD (5'-ACNGARGAYMGNGC NGARAT-3'), and P6027DR (5'-ARNACYTCNARYTCRTCAA-3'). DOP-PCR amplification conditions were 3 min at 95°C followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, 40°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and then 3 min at 72°C.

Amplification of flanking sequences was done by inverse PCR as was described before by Ochman et al. (19). Inverse PCRs with nondegenerate primers P60ND3R (5'-AGACTAGCTACTTCTCTAC-3') and P60ND5D (5'-CTTCTCTTCTGGTCCATAG-3') were performed on total *S. acidocaldarius* DNA digested by *Xho*I and religated as follows: 3 min at 95°C followed by 30 cycles at 95°C for 25 s, 67°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and then 3 min at 72°C.

**p60 gene cloning and expression.** We used the pET system from Novagen. The p60 gene was obtained by PCR using P60NdeI (5'-TTAACATATGAAGAG ATATGAAAGCCT-3') and P60AvaI (5'-AATACTCGAGAAATGATGCT AACAGTCTAT-3') primers corresponding to the N-terminal and C-terminal end sequences of P60 and containing *Nde*I and *Ava*I restriction sites, respectively. We used *Elongase* (GIBCO-BRL) and a low number of amplification cycles to decrease sequence errors. After purification of the amplified DNA fragment and digestion by the corresponding restriction enzymes, the DNA fragment was ligated to the pET21b(+) vector previously digested with *Nde*I and *Ava*I. The ligation product [pET21b(+)+P60 vector] was used to transform *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS. The recombinant clones were selected on Luria-Bertani solid medium supplemented with ampicillin (50  $\mu g/ml$ ) and chloramphenicol (34  $\mu g/ml$ ). The induction and expression analysis was done in the presence or absence of 2 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) added when the cultures reached an  $OD_{600}$  of 0.6. Expression of the recombinant P60 (rP60) was determined in total cell fractions and membrane fractions.

**Purification of rP60.** rP60 was purified under denaturing conditions as follows. A 400-ml culture of BL21(DE3)pLysS transformed with pET21b(+)+P60 vector was grown to an  $OD_{600}$  of 0.5 and induced with 2 mM IPTG. Cells were harvested by centrifugation, and the pellet was resuspended in 40 ml of 1 $\times$  binding buffer containing 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 20 mM Tris HCl (pH 7.9). Cell disruption was performed by sonication (three times for 30 s each). After centrifugation ( $20,000 \times g$  for 15 min) the pellet (membrane fractions) was resuspended in 10 ml of 1 $\times$  binding buffer containing 6 M urea and incubated for 1 h on an ice bath. The sample was centrifuged ( $40,000 \times g$  for 20 min), and the supernatant, previously filtered through a 0.45- $\mu m$ -pore-size Millipore filter, was applied onto a column containing 1.5 ml of His-Bind resin (Novagen). rP60 was eluted with 9 ml of elute buffer containing 300 mM imidazole, 0.25 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), and 6 M urea. The collected fractions (0.5 ml) were analyzed by SDS-PAGE. Finally, rP60-containing fractions, which were essentially free from other proteins, were pooled and renatured by dialyzing the

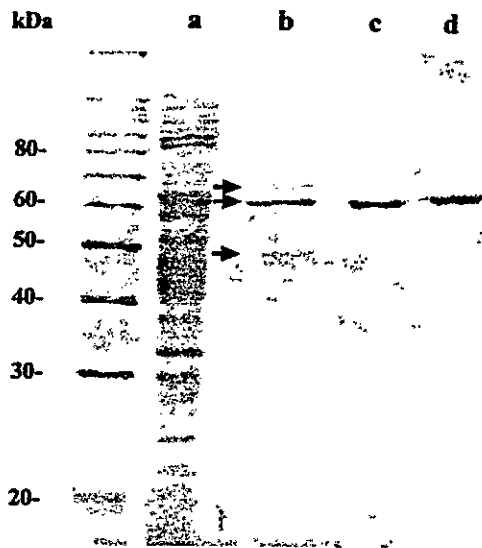


FIG. 1. Purification of the glycogen-bound P60. The different protein fractions obtained by the two-step isopycnic CsCl gradient centrifugation were analyzed by SDS-PAGE. Protein bands were visualized by staining with Coomassie blue. Lanes: a, total cell extract fraction (F1); b, 2-h CsCl centrifugation fraction (F2); c, 48-h CsCl centrifugation fraction (F3); d, purified recombinant P60 (rP60). Arrows, protein bands of 65, 60, and 50 kDa.

urea away in three sequential steps with 50 mM Tris-acetate (pH 7) buffer containing 4 M, 2 M, and no urea.

**Sequence analysis.** Identity and similarity searching in databases was done using the BlastP program (4) from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and from the *Sulfolobus solfataricus* genome site (<http://niji.imb.nrc.ca/sulfolobus/>). Multiple alignments were performed with ClustalW 1.8 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) and edited using BOXSHADE 3.21 ([http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX_form.html)). Searching of conserved domains was done with RPS-BLAST 2.1.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>). Identification of potential phosphorylation sites of P60 was done with Phosphobase (15) (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/index.html>).

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the *p60* gene (*glgA*) from *S. acidocaldarius* is available in the EMBL database under accession no. AJ294724.

## RESULTS

**Purification of glycogen-bound P60 and assays of PPK and GT activities.** The two-step purification of the protein described as glycogen-bound PPK in *S. acidocaldarius*, was repeated essentially as described by Skórko et al. (28). After 2 h of CsCl centrifugation we obtained the previously reported sharp turbid band produced by the glycogen-protein complex. The presence of glycogen in this band was confirmed by acid hydrolysis during 2 h in 1 N HCl and enzymatic hydrolysis with amyloglucosidase (Sigma) rendering

glucose as the product of the reaction (data not shown). After dialysis and sedimentation, the glycogen-protein fractions were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1). F2 was composed of three protein bands of 65, 60, and 50 kDa (Fig. 1), similar in molecular mass to those previously reported (61, 57, and 46.5 kDa, respectively) by Skórko et al. (28). As described before for the band of 57 kDa, reported to be the glycogen-bound PPK (28), after 48 h of CsCl centrifugation the resulting fraction (F3) was largely enriched in the band of 60 kDa (Fig. 1, lane c). Only a barely detectable band corresponding to the protein of 65 kDa was noticed. Thus, we assumed that this enriched protein of 60 kDa (P60) corresponded to the 57-kDa glycogen-bound protein described Skórko et al. (28).

As the 57-kDa band was described to be composed by several polypeptides of different isoelectric points (28) and in view of the reported PPK (28) and GT activities (13) for the same protein, we assayed these fractions simultaneously for both activities (Table 1). Crude extracts from *S. acidocaldarius* showed GT activity and PPK activity (as determined by measuring the  $^{32}\text{P}$ -labeled acid-precipitable material). However, although these activities seemed to be present in the glycogen-bound complex (F2), the yields of the supposed PPK and GT activities were quite poor (0.2% for PPK and 5% for GT) indicating that only a minor fraction of these activities was bound to glycogen, specially in the case of PPK. The specific activity of PPK was 11 times higher in F2 and 5 times higher in F3 than in crude extracts. This indicates that during the centrifugation for 48 h in CsCl, a 50% loss of activity was observed for F3. In contrast, the GT activity was purified 644-fold. When the GT/PPK ratio was calculated it did not remain constant, clearly showing that the GT activity was being purified while PPK activity was not. This could be due to some kind of inactivation of the PPK activity or to the loss of the enzyme from the F3 fraction. In addition, our results cannot discard the possibility that P65, still present in very low amounts in F3 (Fig. 1), could be responsible for the PPK activity. Skórko et al. (28) attributed the PPK and GT activities to the band of 57 kDa. Their PPK activity was reported as 2.34 nmol of phosphate incorporated into polyP per h. However, the specific activity for this enzyme was not reported. We estimated this value, based on their assay conditions, to be 19,500 U/mg of protein, much higher than the value observed in our assays. This lack of congruence of our data with their previously reported results led us to investigate in more detail the method used by Skórko et al. (28) in measuring PPK activity and to compare it with the one we used. Briefly, to measure the synthesized polyP, they boiled in Laemmli's sample buffer a 21- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing the glycogen-protein complex and [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (0.9  $\mu\text{Ci}$ ) for 3 min at 100°C and loaded it on a standard SDS-10% PAGE. The supposed polyP was detected as the radioactivity

TABLE 1. Enzymatic activities reported to be associated to the glycogen-protein complex from *S. acidocaldarius*

Fraction	Total protein (mg)	PPK <sup>a</sup> activity		GT activity		GT/PPK activity ratio
		Total units	U/mg of protein	Total units	U/mg of protein	
F1	116	44,660	385	208,916	1,801	4.7
F2	0.02	84.46	4,223	10,054	502,700	119
F3	0.01	18.43	1,843	11,600	$1.16 \times 10^6$	629

<sup>a</sup> The putative PPK activity was measured as the acid-precipitable  $^{32}\text{P}$ -labeled material, collected on Whatman GF/C glass fiber filters.

remaining at the origin of the running gel by autoradiography since, as they claimed, polyP failed to enter the SDS-polyacrylamide gel. Instead, to measure the supposed PPK activity, we used the same buffer and conditions as those described by Skórko et al. (28) except that a lower radioactivity (0.27  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP) was used, the acid-precipitated  $^{32}$ P-labeled compound present in the reaction mixture was filtered through glass fiber filters and washed, and the retained radioactivity was measured by liquid scintillation counting (see Materials and Methods). When we repeated the PPK assay exactly according to Skórko et al. (28), we noticed that no radioactivity was obtained in the stacking-running interface of the SDS-polyacrylamide gel, as they described for the polyP location, while the glycogen from *S. acidocaldarius* and a control glycogen from oyster (Sigma) were found at this position in the gel, as revealed by silver staining (data not shown). In addition, when 2 nmol of purified [ $^{32}$ P]polyP<sub>750</sub> (0.007  $\mu$ Ci/nmol) was loaded in the gel as a control, this compound did not remain in the stacking gel but ran out of the gel.

**Analysis of the reaction products of the PPK assay.** Although the method for polyP synthesis measurement that we used has been tried with success in many previous works (2, 5, 16), it is still necessary to demonstrate that the acid-precipitated  $^{32}$ P corresponds to polyP. The purified overexpressed PPK (16) and PPX from *E. coli* (3) and the PPX from *Saccharomyces cerevisiae* (PPX<sub>Scv</sub>) (32) have been successfully used as specific reagents in polyP analysis (5). Pure PPK allows the in vitro synthesis of [ $^{32}$ P]polyP<sub>750</sub> for use as a marker, while the nature of the putative synthesized polyP can be confirmed by treatment with PPX and analysis of the reaction product by TLC (5). Typically, the nature of polyP was previously analyzed by acid hydrolysis of the compound. However, the use of PPX as an enzymatic reagent to hydrolyze the polyP is much more specific.

To accumulate the radioactively labeled material synthesized we performed the PPK assay with fraction F2, which had been shown to have the highest specific activity (Table 1), in the same conditions as described above but in a preparative manner as for the in vitro preparation of [ $^{32}$ P]polyP<sub>750</sub> (see Materials and Methods). We used 9  $\mu$ g of the glycogen-bound proteins (F2) in a reaction mixture of 0.35 ml incubated for 30 min at 70°C. As a control, we ran in parallel the same reaction at 37°C using 35,000 U of purified PPK<sub>Ec</sub> (16). To extract the polyP formed in each case, we loaded the reaction mixtures over a cushion of CsCl. After centrifugation, the gradient was divided in aliquots of 200  $\mu$ l, precipitated with isopropanol, and washed. The pellets were resuspended in 20  $\mu$ l of distilled water and quantified by liquid scintillation. The  $^{32}$ P-labeled compound was found to be present in the 200- $\mu$ l fractions corresponding to the bottom of the CsCl gradients, as expected for polyP (6). These fractions were used as a substrate for the assay of polyP with PPX<sub>Scv</sub>. Conversion of the putative polyP to P<sub>i</sub> was followed by TLC (Fig. 2). When the polyP substrate obtained from the PPK assay using PPK<sub>Ec</sub> was analyzed (Fig. 2a), the polyP spot, located at the origin of the TLC, clearly diminished with time by the action of PPX while P<sub>i</sub> appeared concomitantly, confirming the identity of polyP (Fig. 2a, lanes 1, 2, and 3). However, no spot was observed in the location of polyP when the putative polyP substrate came from the reaction with fraction F2 (Fig. 2b). Instead, radioactive spots mi-

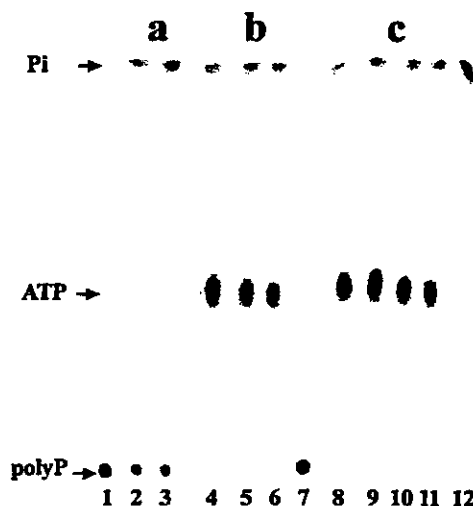


FIG. 2. TLC analysis of the reaction products obtained during PPK assay. [ $^{32}$ P]polyP<sub>750</sub> (panel a, lanes 1, 2, and 3), the  $^{32}$ P-labeled material obtained in the PPK assay using fraction F2 (panel b, lanes 4, 5, and 6 and panel c, lanes 9, 10, and 11) were incubated in the presence (a and b) or in the absence (c) of PPX<sub>Scv</sub> at time zero (lanes 1, 4, and 9), at 5 min (lanes 2, 5, and 10), or at 15 min (lanes 3, 6, and 11). Standards used were [ $^{32}$ P]polyP<sub>750</sub> (lane 7), [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (lane 8), and H<sub>3</sub> $^{32}$ PO<sub>4</sub> (lane 12).

grating with ATP and P<sub>i</sub> were observed at all the times analyzed (Fig. 2b, lanes 4, 5, and 6). The observed P<sub>i</sub> corresponded to partial hydrolysis of ATP as shown by a control tube without PPX<sub>Scv</sub> (Fig. 2c, lanes 9, 10, and 11) and ATP run as a standard (Fig. 2c, lane 8). The putative polyP synthesized using fraction F2 therefore may correspond to the nonspecific binding of ATP to some isopropanol-precipitable compound, present at the bottom of the CsCl gradient, possibly the glycogen-protein complex.

The evidence just presented strongly suggests that the glycogen-protein complex from *S. acidocaldarius* does not have any PPK activity. Therefore, our measurements of PPK activity present in fractions F2 and F3 (Table 1) may correspond to this nonspecific binding of ATP to the acid-precipitable glycogen-protein complex and not to a real PPK activity. Since it is also possible that some kind of enzymatic inhibition was present in our preparations of F2 and F3, we further investigated the identity of the proteins present in the glycogen-protein complex and genetically characterized P60.

**Characterization of the polypeptides present in the glycogen-protein complex corresponding to fraction F2.** The glycogen-protein complex (F2) was analyzed by 2-D PAGE (Fig. 3). Three protein spots were resolved, P65, P60, and P50 (Fig. 3a), which migrated according to their previously observed molecular masses (Fig. 1). P60 was composed of at least three spots with the same molecular mass, P60.1, P60.2, and P60.3 (Fig. 3a and b, upper panel). This was in agreement with Skórko et al. (28), who reported that their 57-kDa protein (our P60) showed several bands by one-dimensional isoelectric focusing. The observed spots (P65, P60.1, P60.2, and P60.3) and P50 were excised from the gel and subjected to amino-terminal sequencing. The amino-terminal sequence of P60.1 was MKRYESLWFEDELKHWMI. The amino-terminal sequences of P60.2



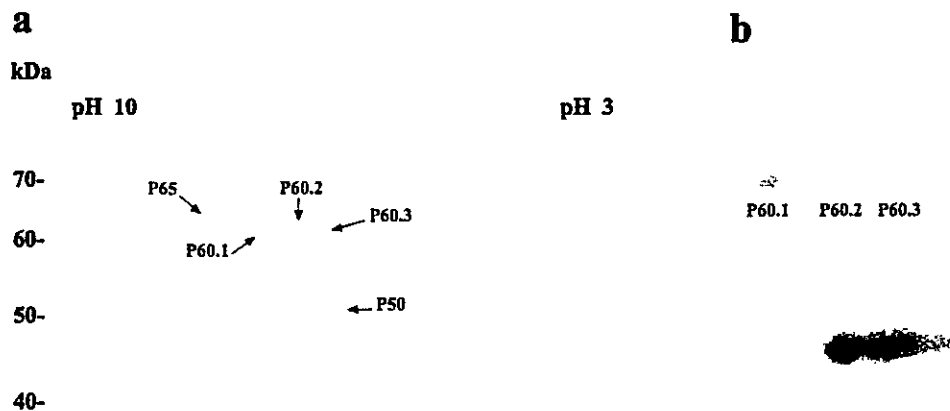


FIG. 3. Characterization of the polypeptides present in the glycogen-protein complex fraction F2. (a) Fraction F2 was analyzed by 2-D NEPHGE. Protein spots were visualized by staining with Coomassie blue. (b) Cells of *S. acidocaldarius* were labeled in vivo with  $H_3^{32}PO_4$ . Fraction F2 was obtained and analyzed by 2-D NEPHGE. Upper panel, portion of the 2-D gel containing P60.1, P60.2, and P60.3 stained with Coomassie blue; lower panel, autoradiography of the same gel showing  $^{32}P$ -labeled P60.2 and P60.3.

and P60.3 were both MKRYESLWF. These results indicate that P60 had different forms. These forms appeared to be more acidic, which is typical of phosphorylated proteins. To test this idea, we obtained the F2 fraction from an in vivo  $^{32}P$ -labeled culture and analyzed these proteins by 2-D NEPHGE (Fig 3b). Autoradiographic analysis (Fig. 3b, lower panel) clearly showed that the two more acidic spots (P60.2 and P60.3) were  $^{32}P$  labeled most likely due to phosphorylation. Taken together, these observations demonstrate that P60, the 57-kDa protein described by Skórko et al. (28) as a PPK and by König et al. (13) as a GT is composed of a single polypeptide chain that is probably phosphorylated.

While no sequence was obtained for P65 due to insufficient material or to a blocked amino terminus, the amino-terminal sequence of P50 was RNVILGFEVH. With the sequences obtained for P60 and P50, no match was found against the available databases. A further search in the recently completed genome sequence of *S. solfataricus* genome database revealed that P50 and P60 match with the open reading frames (ORFs) bac04\_023 and bac04\_024, the former coding for a hypothetical alpha-amylase (*amyA*) of 447 amino acids (53.6 kDa; pI, 4.47) and the latter coding for a glycogen synthase (*glgA*) of 566 amino acids (65.6 kDa; pI, 6.73). These values are similar to the molecular masses and approximate pIs of the glycogen-bound proteins from *S. acidocaldarius*. These putative ORFs are consecutive in the genome and are probably clustered in the same operon. Other genes involved in the metabolism of glycogen, *glgX* (encoding for a glycogen-debranching enzyme) and *glgC* (ADP-glucose pyrophosphorylase), are adjacent to *amyA* but oriented in the opposite direction.

**Isolation of the *p60* gene and analysis of the deduced amino acid sequence of P60.** To clone the *p60* gene we used the amino-terminal amino acid sequence of P60 and the amino-terminal sequences of two internal peptides to obtain degenerate oligonucleotide primers, which were then employed in DOP-PCR experiments using purified genomic DNA from *S. acidocaldarius* as a template. A 300-bp DNA fragment and an 800-bp DNA fragment were amplified with P60NH2DD and P60P21DR (for the former) and P60NH2DD and P60P27DR (for the latter). These two DNA

fragments were cloned into the pGEM-T vector and sequenced. New primers were defined from the nucleotide sequence and employed to produce a digoxigenin probe, which was used in Southern blotting experiments against total DNA from *S. acidocaldarius*. After digestion with different restriction enzymes, only one DNA fragment hybridized with the probe, indicating that *S. acidocaldarius* strain 639 DSM carried a single copy of the *p60* gene (data not shown). Two other primers, P60ND3R and P60ND5D, were defined and employed in reverse PCR experiments which allowed us to obtain the entire sequence of the *p60* gene.

The 2,000-nucleotide sequence revealed the presence of one ORF of 1,698 bp that contained exactly the sequences of the initial peptides used to define the degenerate oligonucleotide primers (Fig. 4). This observation confirms that we isolated the gene coding for P60 protein. Searching in data banks with the BLASTP program indicated that P60 had a positive similarity to glycogen synthases from *Archaea* and *Bacteria* (Fig. 4) and a carboxyl-terminal portion of plant starch synthases. This was in agreement with the reported GT activity of the 57-kDa protein (13) and with our purification of GT activity (Table 1). Searching for conserved domains in P60 revealed the presence of the GT group 1 domain (expect value  $[E] = 2 \times 10^{-23}$ ) from the Pfam database of protein domains (Fig. 4). This family comprises GTs from archaea, bacteria, fungi, and plants. The glycogen synthase from *S. acidocaldarius* showed 22% identity and 38% similarity ( $E = 9 \times 10^{-9}$ ) to the glycogen synthase encoded by the *glgA* gene of *E. coli*. Two important sites have been described for *E. coli* GT: Lys 15, which forms part of the motif KXGG (where X represents any amino acid) and is involved in ADP-glucose binding (9), and Lys 277, which constitutes part of the proposed active site (10). Lys 277 is well conserved in all the analyzed bacterial and archaeal glycogen synthases (Fig. 4). Although the position of the equivalent Lys 277 is not clear in the sequence of the glycogen synthase of *Methanococcus jannaschii*, the alignment shows two Lys residues near this position, suggesting that this residue is also conserved in this protein. However, this is not the case for Lys 15, which appears to be lacking from the glycogen synthases of *S. acidocaldarius* and *M. jannaschii*.

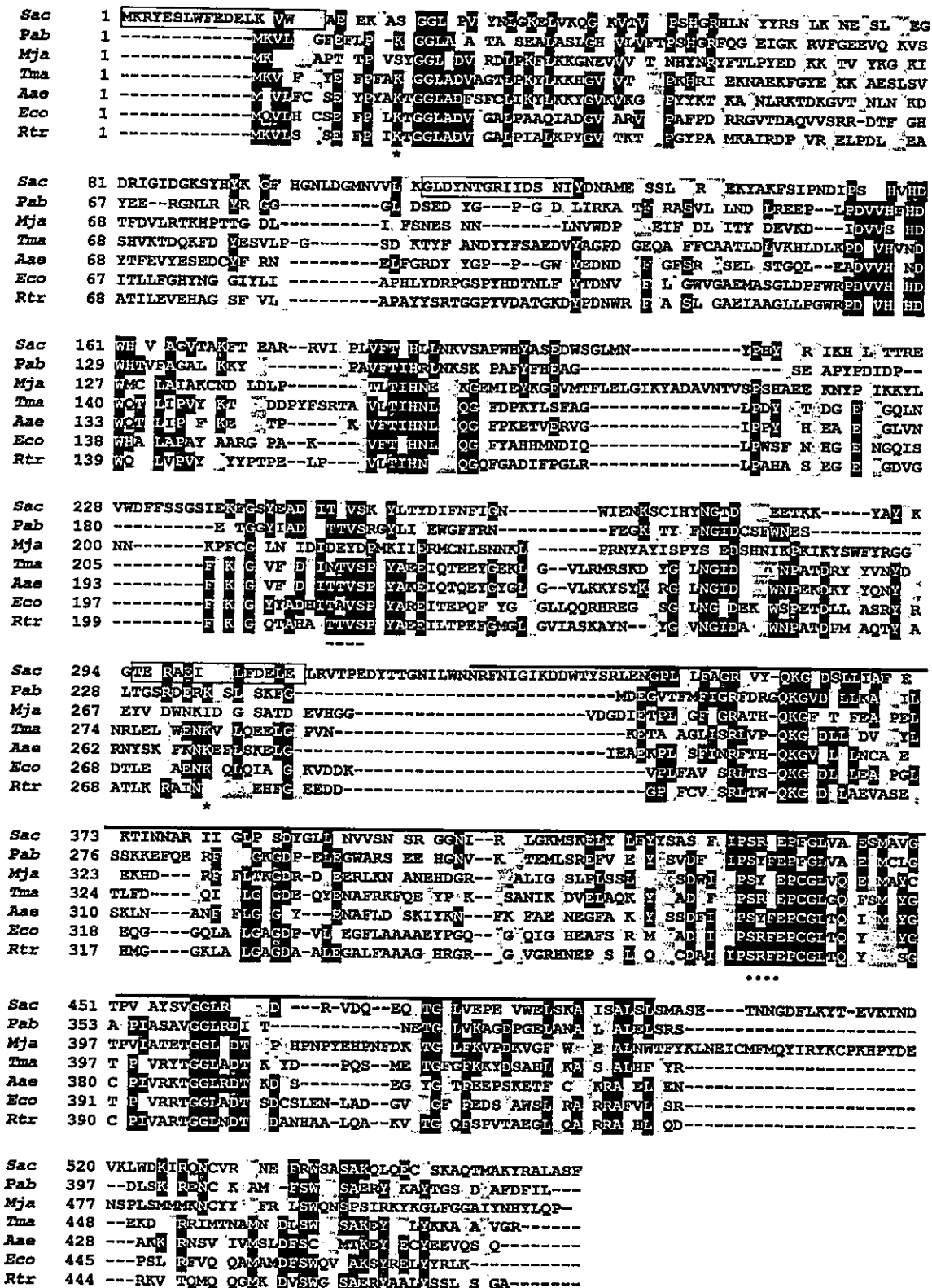


FIG. 4. Multiple alignment of bacterial and archaeal glycogen synthases. The P60 deduced amino acid sequence from *S. acidocaldarius* (*Sac*) was aligned (accession numbers in brackets) with other archaeal (*Pab*, *Pyrococcus abyssi* [CAB49000]; *Mja*, *Methanococcus jannaschii* [E64500]) and bacterial (*Tma*, *Thermotoga maritima* [AAD35976]; *Aae*, *Aquifex aeolicus* [AAC06894]; *Eco*, *Escherichia coli* [AAC76454]; *Rtr*, *Rhizobium tropici* [CAC17472]) glycogen synthases. Identical (shaded in black) and similar (shaded in grey) residues are indicated. The peptides which allowed us to isolate the *p60* gene by reverse genetics are boxed. Conserved Lys 15 and 277 are indicated by an asterisk. The black bar over the P60 sequence represents the glycosyl transferase 1 domain. Putative phosphorylation sites for CKI (dashed lines) and CK2 (circles) are shown.

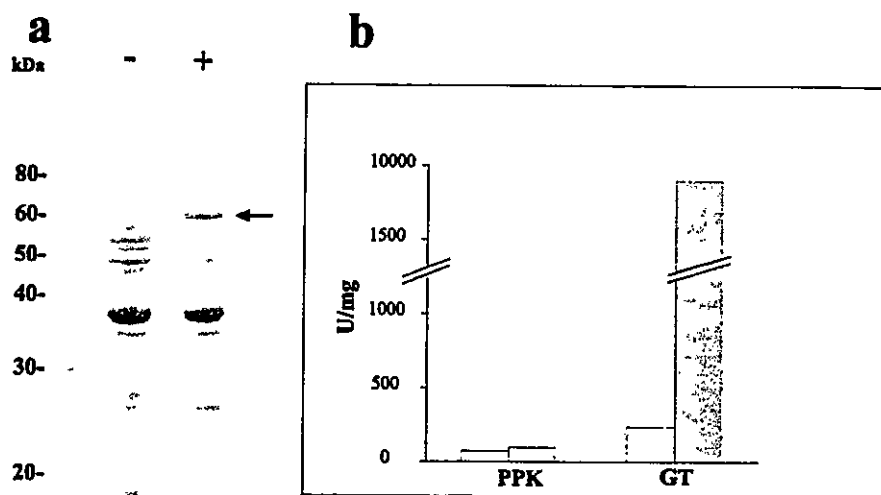


FIG. 5. Overexpression and functional analysis of rP60 in *E. coli*. (a) *E. coli* strain BL21(DE3)/pLysS transformed with pET21b(+) carrying a *p60* insert was grown for 2 h in the presence (+) or in the absence (-) of 2 mM IPTG. Membrane fractions were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The arrow indicates the overexpressed rP60 protein. (b) PPK and GT activities, present in the membrane fractions of *E. coli* strain BL21(DE3)/pLysS transformed with pET21b(+) carrying a *p60* insert in the presence (shaded bars) or in the absence (empty bars) of 2 mM IPTG, were measured at 70°C.

P60 was found to be labeled *in vivo* with  $H_3^{32}PO_4$ , suggesting a probable phosphorylation of the protein. This labeling was stable at pH 2.5 (data not shown), a characteristic not present in phospho-histidine proteins such as the PPK from *E. coli* phosphorylated *in vitro* (16). On the other side, mammalian and yeast glycogen synthases, which may be distant relatives of bacterial glycogen synthases, are regulated by phosphorylation in Ser and Thr residues (11, 29). Therefore, we searched for potential Ser/Thr phosphorylation sites of P60 in the PhosphoBase database (15). We found a potential casein kinase II (CKII) phosphorylation site that was remarkably conserved in all the glycogen synthases analyzed and a potential casein kinase I (CKI) phosphorylation site that was conserved in all sequences analyzed with the exception of the glycogen synthases of *M. jannaschii* and *Thermotoga maritima* (Fig. 4).

**Cloning, expression, and functional analysis of the *p60* gene.** At present, no function for any glycogen synthase gene of the domain *Archaea* has been experimentally confirmed. Since gene disruption systems for *S. acidocaldarius* are not currently available, we decided to elucidate the functional properties of the product of the *p60* gene by cloning and expressing it in a heterologous host. Therefore, we cloned the *p60* gene in the expression vector pET21b(+) and expressed the recombinant protein (rP60) in *E. coli* host cells. The rP60, which was associated to the membrane fraction (Fig. 5a), was purified under denaturing conditions by nickel affinity chromatography (Fig. 1, lane d). The identity of the *p60* gene was confirmed by sequencing both strands of the cloned insert in pET21b(+), obtaining 100% identity with the previous 2,000-nucleotide sequence (data not shown).

We measured PPK and GT activities of rP60 in membrane fractions of noninduced and induced cells. When the proposed activities were measured at 37°C neither PPK nor GT activity increased in the induced cells (not shown). Therefore, we assayed these enzymatic activities at 70°C. Under these condi-

tions (Fig. 5b), there was a large increase in GT activity in the membrane fractions of induced cells. This was expected due to the similarity of P60 with glycogen synthases. However, the PPK activity was barely detectable, while the slight increase observed in induced cells was not significant. As Skórko et al. (28) reported that the enzyme was active only in the presence or glycogen, we also assayed these activities with the purified rP60 in the presence of 2% glycogen and/or 20  $\mu$ M primer polyP<sub>750</sub>. However, the result obtained confirmed the absence of PPK activity. The GT specific activity of the purified rP60 was 750,000 U/mg of protein in the presence of 2% glycogen, a value in agreement with the native purified enzyme (fraction F3). Other reported specific activities of glycogen synthases range from  $10^6$  to  $2 \times 10^8$  U/mg of protein depending on the sources and the experimental conditions used (8, 22).

## DISCUSSION

Skórko et al. (28) reported that their glycogen-bound 57-kDa band was composed of several polypeptides possessing different isoelectric points. This observation allowed them to speculate on the possible existence of two different proteins with two different enzymatic activities (PPK and GT) or one protein with the ability to perform both reactions. In this paper, we demonstrate that the 57-kDa band contains  $^{32}P$ -labeled forms of a single polypeptide (P60). The gene coding for P60 turned out to be homologous to bacterial glycogen synthases and did not show similarity to any of the amino acid sequences of more than 15 known PPKs. Moreover, the native and the overexpressed P60 showed only GT activity. Taken together, these results demonstrate that the proposed glycogen-bound PPK from *S. acidocaldarius* is actually a bacterial-type glycogen synthase. The properties of the functional glycogen-bound glycogen synthase, which we describe for *S. acidocaldarius*, may lead to a revision of the current view of the prokaryotic glycogen synthases for two reasons. First, the conserved Lys 15 at

the ADP-glucose binding site (9) is lacking in the glycogen synthase from *S. acidocaldarius* (P60) and from *M. jannaschii*. Second, P60 was labeled with  $H_2^{32}PO_4$  in vivo, suggesting it to be phosphorylatable. The analysis of the bacterial-archaeal glycogen synthase sequences revealed the presence of highly conserved potential phosphorylation sites for CKI and CKII. Although experimental evidence is required in order to confirm this prediction, this observation could support a regulation of the bacterial-archaeal glycogen synthases by phosphorylation by a yet unidentified eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase, a very probable phenomenon given the presence of several types of Ser/Thr protein kinases in bacterial and archaeal genomes (18, 26). In addition, the finding of a glycogen-bound alpha-amylase encoded by a gene clustered in the same operon suggests that this enzyme may fulfill the catabolic function of the glycogen phosphorylase (*glgP*) (24).

A possible explanation for a glycogen-bound PPK may reside in the nucleoside-diphosphate kinase activity of the PPK of *E. coli* (31). PPK, acting as a nucleoside-diphosphate kinase, might take part in glycogen metabolism, regenerating the ATP consumed in the synthesis of the ADP glucose, the precursor of glycogen synthesis. An ATP-regenerating role for PPK has been described for endogenous PPK from the *E. coli* RNA degradosome (7). Therefore, it seems reasonable that PPK might form part of other macromolecular complexes, such as those formed with glycogen. Although this speculative model of a glycogen-bound system for regenerating ATP seems possible, in this paper we demonstrate the absence of a glycogen-bound PPK activity in *S. acidocaldarius*.

Given the presence of polyP in *S. acidocaldarius* (14), the small amount of PPK-like activity detected in the crude extracts (this paper), and the absence of *ppk* genes in the *S. solfataricus* genome and other archaeal genomes, the existence of polyphosphate kinase in this microorganism and others of the domain *Archaea* remains controversial. The most reasonable route to achieve the identification of an enzyme involved in polyP synthesis in *Archaea* seems to be an alternative exhaustive purification. Also, the characterization of functional domains in the known PPKs from different organisms will be of great help in identifying a PPK-like gene(s) on the largely divergent genomic sequences of the domain *Archaea*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by FONDECYT projects no. 2990035 and no. 1000679, project ICM P-99-031-F, and ICGEB (project CRP/CHI00-04, contract 01/001). S.C. was the recipient of a DAAD Ph.D. scholarship.

We are very grateful to Arthur Kornberg for spurring our involvement in polyP research and for kindly providing us with PPK<sub>Sec</sub> and *E. coli* strain NR 100 in order to obtain [ $^{32}P$ ]polyP<sub>750</sub>.

#### REFERENCES

- Ahn, K., and A. Kornberg. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 265:11734-11739.
- Akiyama, M., E. Crooke, and A. Kornberg. 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., E. Crooke, and A. Kornberg. 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., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. L. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Ault-Riché, D., and A. Kornberg. 1999. Definitive enzymatic assays in polyphosphate analysis, p. 241-251. In H. C. Schröder and W. E. G. Müller (ed.), *Inorganic polyphosphates. Biochemistry, biology, biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Ault-Riché, D., C. D. Fraley, C.-M. Tzeng, and A. Kornberg. 1998. A novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:1841-1847.
- Blum, E., B. Py, A. J. Carpousis, and C. F. Higgins. 1997. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* 26:387-398.
- Fox, J., K. Kawaguchi, E. Greenberg, and J. Preiss. 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., M. Tagaya, K. Tanizawa, and T. Fukui. 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., M. Tagaya, K. Tanizawa, and T. Fukui. 1994. Identification of Lys277 at the active site of *Escherichia coli* glycogen synthase. Application of affinity labeling combined with site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269:868-871.
- Hardy, T. A., and P. J. Roach. 1993. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268:23799-23805.
- Keastling, J. D., S. J. Van Dien, P. Trelstad, N. Renninger, and K. McMahon. 2000. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)* 65:324-331.
- König, H., R. Skórko, W. Zillig, and W. Reiter. 1982. Glycogen in thermoacidophilic archaeobacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Arch. Microbiol.* 132:297-303.
- Kornberg, A., N. N. Rao, and D. Ault-Riché. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
- Kreepipuu, A., N. Blom, and S. Brunak. 1999. PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res.* 27:237-239.
- Kumble, K. D., K. Ahn, and A. Kornberg. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14391-14395.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Leonard, C. J., L. Aravind, and E. V. Koonin. 1998. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res.* 8:1038-1047.
- Ochman, H., M. M. Medhora, D. Garza, and D. L. Hartl. 1990. Amplification of flanking sequences by inverse PCR, p. 219-227. In M. A. Innis, D. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. White (ed.), *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman, and F. H. O'Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1142.
- Osorio, G., and C. A. Jerez. 1996. Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology* 142: 1531-1536.
- Pollock, C., and J. Preiss. 1980. The citrate-stimulated starch synthase of starchy maize kernels: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 204:578-588.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schinzl, R., and B. Nidetzky. 1999. Bacterial alpha-glucan phosphorylases. *FEMS Microbiol. Lett.* 171:73-79.
- Schröder, H. C., B. Lorenz, L. Kurz, and W. E. G. Müller. 1999. Inorganic polyphosphate in eukaryotes: enzymes, metabolism and function, p. 45-74. In H. C. Schröder and W. E. G. Müller (ed.), *Inorganic polyphosphates. Biochemistry, biology, biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Shi, L., M. Potts, and P. J. Kennelly. 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.
- Skórko, R. 1989. Polyphosphate as a source of phosphoryl group in protein modification in archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochimie* 71:9-10.
- Skórko, R., J. Osipiuk, and K. O. Stetter. 1989. Glycogen-bound polyphosphate kinase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 171:5162-5164.
- Skurat, A. V., Y. Wang, and P. J. Roach. 1994. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 269:2534-2542.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tzeng, C.-M., and A. Kornberg. 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.
- Wurst, H., T. Shiba, and A. Kornberg. 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177:898-906.