



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**MECANISMO DE INHIBICIÓN POR CALCIO DE LA
ISOFORMA UNO DE PIROFOSFATASA DE
*ARABIDOPSIS THALIANA***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOEL ARTURO BASILIO VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres**

VOCAL: **Profesor: M. en C. Mireya Rodríguez Penagos**

SECRETARIO: **Profesor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra**

1° SUPLENTE: **Profesor: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño**

2° SUPLENTE: **Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Trabajo desarrollado en la Facultad de Química. UNAM, División de Estudios de Posgrado, Departamento de Bioquímica, Conjunto "E" , Edificio de Bioquímica y Farmacia. Laboratorio 115.

ASESOR DEL TEMA: _____

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

M. EN C. LILIAN VALENCIA TURCOTTE

SUSTENTANTE (S): _____

JOEL ARTURO BASILIO VELÁZQUEZ

Índice

1. ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 El pirofosfato y su producción en el metabolismo	5
3.2 Las pirofosfatasas y su importancia en el metabolismo	9
3.3 Aspectos evolutivos y clasificación de las pirofosfatasas.....	10
3.4 Las pirofosfatasas en el metabolismo vegetal.....	13
3.5 El calcio como señal ubicua en plantas	16
3.6 ¿Por qué el calcio es un buen segundo mensajero?.....	17
3.7 Calcio libre citosólico y almacenamiento de calcio.....	18
4. ANTECEDENTES	20
4.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de pirofosfatasas solubles.....	20
4.2 Mecanismo catalítico en pirofosfatasas solubles homólogas.....	20
4.3 Mecanismo de Inhibición por calcio de EsPPasa.....	23
4.4 Mecanismo catalítico de la enzima AtPPa1.....	25
5.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
5.2 HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares.....	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
7.1 MATERIALES	29
7.2 MÉTODOS	27
7.2.1 Extracción de RNA.....	30
7.2.2 Síntesis de cADN.....	31
7.2.3 Amplificación de inserto por PCR.....	32
7.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	33
7.2.5 Purificación de ADN en gel.....	33
7.2.6 Cuantificación de plásmido.....	34
7.2.7 Ligación de inserto en vector pGEM-T Easy.....	35
7.2.8 Transformación en células competentes	35

7.2.9 Purificación del plásmido	36
7.2.10 Digestión de plásmido pGEM-T Easy y PGEX-4t-2.....	37
7.2.11 Ligación del inserto al plásmido pGEX-4T-2.....	38
7.2.12 Cuantificación y secuenciación del plásmido.....	38
7.2.13 Inducción de la expresión de proteína.....	39
7.2.14 Extracción de proteína soluble.....	39
7.2.15 Cuantificación de proteína	40
7.2.16 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).....	40
7.2.17 Purificación en Glutathione Sepharose™ y Benzamidine Sepharosa™.....	41
7.2.18 Medición de actividad pirofosfatasa.....	43
7.2.19 Isotermas de inhibición por Ca ²⁺	43
7.2.20 Modelado y refinamiento de la estructura.....	45
8. RESULTADOS.....	47
8.1 Obtención del inserto de interés.....	47
8.2 Digestión del inserto de interés del vector pGEM T Easy.....	48
8.3 Digestión del vector pGEX-4t-2.....	49
8.4 Ligación del inserto de interés al vector pGEX-4t2.....	49
8.5 Inducción de la expresión de la proteína.....	52
8.6 Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.....	53
8.7 Isotermas de inhibición por Ca ²⁺	55
8.8 Modelado por homología.....	59
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
10. CONCLUSIONES.....	67
11. BIBIOGRAFÍA.....	68
12. ANEXO I Dedución de las ecuaciones de velocidad para diferentes modelos cinéticos de inhibición por calcio para la enzima AtPPa1	

1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADN	Adenosín difosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
cADN	ADN complementario
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
DO	Densidad Óptica
H ⁺ PPasas	Pirofosfatasa de membrana
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EsPPasa	Pirofosfatasa soluble de <i>E. coli</i>
Fru-6P	Fructosa 6-fosfato
GST	Gluthatione S-transferasa
NTP	Nucleosido trifosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFK	Fosfofructoquinasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
Pi	Fosfato inorgánico
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
SDS	dodecilsulfato sódico
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
YsPPasa	Pirofosfatasa soluble de Levadura
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

2. RESUMEN

Las pirofosfatasas inorgánicas son enzimas esenciales para la vida que catalizan la reacción de hidrólisis del pirofosfato. El pirofosfato se genera en las células vivas como producto de numerosas reacciones del metabolismo.

La relevancia de las pirofosfatasas en la regulación del crecimiento establece la necesidad de mecanismos de regulación de su actividad que permitan adecuar su actividad metabólica a las necesidades cambiantes de la planta. Una posibilidad es que la regulación a corto plazo se dé a través de cambios en la concentración de calcio. De hecho, el calcio es uno de los mensajeros secundarios más importantes en la transducción de señales en organismos vegetales.

Se ha propuesto que la relación calcio/magnesio puede ser un regulador de la actividad de la isoforma 1 de pirofosfatasa de *A. thaliana in vivo*. Esta posibilidad se exploró mediante la clonación del cDNA codificante de dichas pirofosfatasas, como proteína recombinante en *E. coli*. Se indujo la expresión de la proteína recombinante que se purificó usando técnicas de cromatografía de afinidad.

Se realizó una cinética de inhibición por calcio en la proteína recombinante la cual mostró una inhibición acompetitiva pura por calcio libre frente a magnesio-pirofosfato como sustrato. A partir de estos datos, se propone un modelo cinético que explica la inhibición observada.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El Pirofosfato y su producción en el metabolismo

El pirofosfato inorgánico (PPi) fue descubierto en el siglo XIX. Como su nombre lo indica, se forma al calentar sales de orthofosfato de sodio o de potasio (van Wazer 1958), sin embargo la formación de PPi en un sistema biológico fue reportada hasta el año de 1941 (Cori *et al.*, 1951) y la primera reacción biológica en la que se forma pirofosfato fue descrita por Kornberg en 1948.

El PPi se genera en las células vivas como producto de numerosas reacciones del metabolismo, una lista de las reacciones que producen PPi puede encontrarse en (Heinonem J.K., 2001), en total se muestran 190 reacciones en donde se involucra al PPi. Dichas reacciones participan en diversas rutas metabólicas, pero se observa un predominio en las reacciones de síntesis de macromoléculas. En la figura 1 se dan algunos ejemplos.

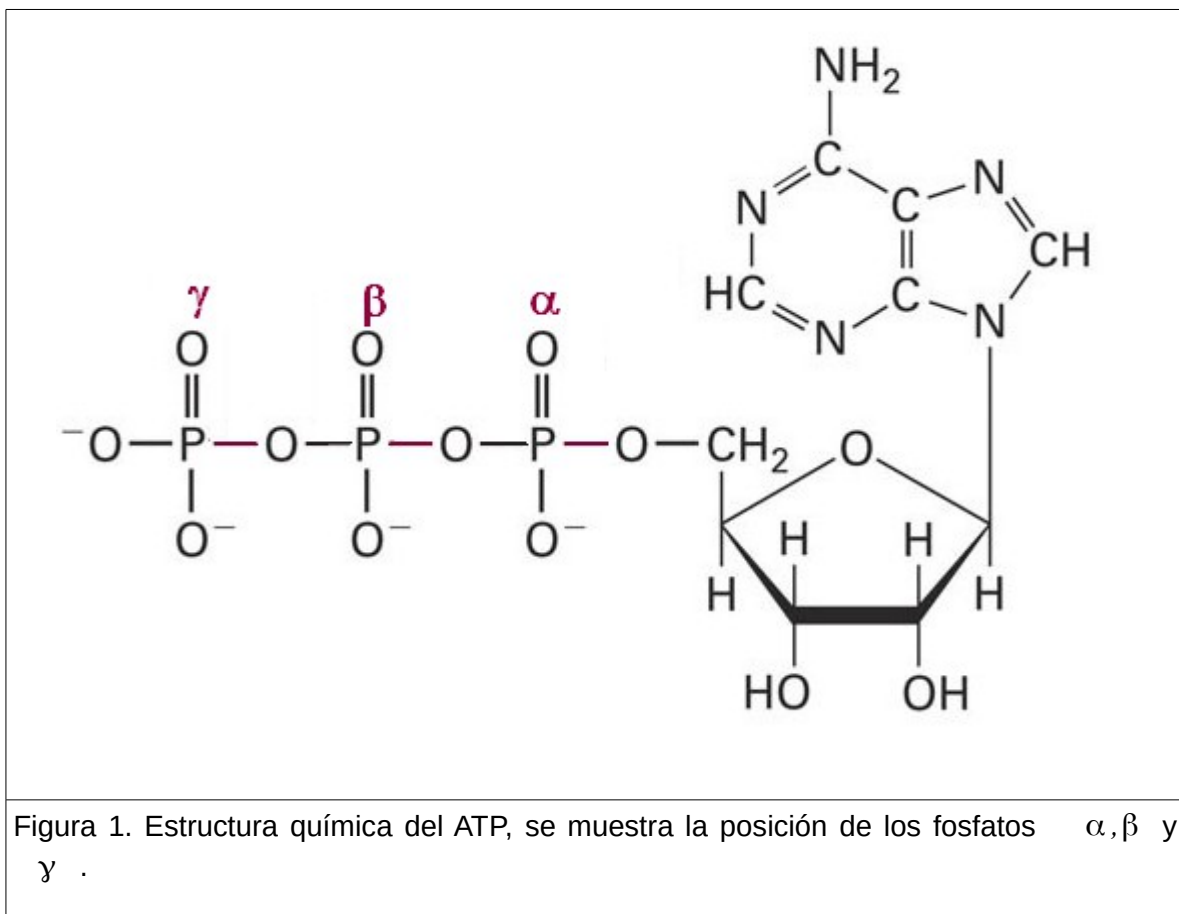
A En la activación de aminoácidos por la aminoacil RNAc-sintetasa
Aminoácido + ATP \rightleftharpoons 5' Aminoacil-adenilato + PPi
B En la activación de ácidos grasos por la acil-CoA sintetasa
Palmitato + ATP + CoA \rightleftharpoons AMP + Palmitoil-CoA + PPi
C En la síntesis de RNA por la RNA polimerasa
RNA + NTP \rightleftharpoons RNA (alargada en un nucleótido) + PPi
Figura 1. Ejemplos de reacciones que liberan pirofosfato catalizadas por distintas enzimas.

Para explicar porque se produce PPi durante la biosíntesis, es necesario entender la termodinámica detrás de los procesos biosintéticos. La constante de equilibrio K' de cualquier reacción química, depende del cambio de energía libre entre los productos y reactivos de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta G'^0 = -RT \ln K' \quad (\text{Eq. 1})$$

Aunado a la ley de Hess, la cual indica que a la suma de dos reacciones químicas le corresponde un $\Delta G'^0$ igual a la suma de las $\Delta G'^0$ de cada una de las reacciones, es posible entender por qué muchas reacciones biosintéticas que tienen un $\Delta G'^0$ desfavorable (positivo) al acoplarse a la hidrólisis de nucleótidos trifosfato NTP se hacen favorables ($\Delta G'^0$ negativo).

En la mayoría de los casos se hidroliza un NTP a NDP y Pi, pero en muchos casos la hidrólisis se lleva a cabo entre el fosfato α y β , (figura 1) liberando pirofosfatato, como se muestra en el esquema 1.





Esquema 1.

En ambos casos se hidroliza un enlace fosfoanhídrido, pero la reacción libera una mayor cantidad de energía, esto debido a que el Mg^{2+} se compleja de manera más fuerte al PPi que al Pi (Alberty, 1969). Se ha encontrado que la hidrólisis *in vivo* del enlace β del ATP tiene un $\Delta G'^0$ 20 kJ/mol inferior a la hidrólisis en el enlace γ (Guyn *et al.*, 1974). Por lo que una reacción acoplada a la hidrólisis del ATP en el enlace β tendrá una constante de equilibrio *in vivo* tres órdenes de magnitud mayor, que si la misma reacción estuviera acoplada a la hidrólisis del enlace γ del ATP.

Además, la hidrólisis del ATP en la posición β , al liberar pirofosfato, puede favorecerse más si el PPi es hidrolizado. La hidrólisis *in vivo* del PPi ha sido calculada en -17 kJ/mol para las condiciones en células animales (Floodgaard and Fleron, 1974) y en -23,7kJ/mol para células vegetales (Davies *et al.*, 1993).

De esta manera es posible desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas, que de otro modo resultarían desfavorables, desde el punto de vista termodinámico.

Por ejemplo, en la síntesis de ácidos grasos, el primer paso en la activación de un ácido graso, bien para su oxidación para producir energía, o para su uso en la síntesis de lípidos más complejos, es su unión al acarreador coenzima A. La condensación directa de un ácido graso con la coenzima A es endergónica, pero la formación del acil-graso-CoA se hace exergónica mediante la eliminación por pasos de los grupos fosforilo del ATP. La suma de estas dos reacciones es energéticamente equivalente a la suma de la hidrólisis exergónica del ATP a AMP y PPi ($\Delta G'^0 = -45.6 \text{ kJ/mol}$), más la formación endergónica del tioéster acil-graso-CoA ($\Delta G'^0 = 31.4 \text{ kJ/mol}$). Sin embargo, el $\Delta G'^0$ resultante(

-15.2 kJ/mol), no necesariamente implica un equilibrio completamente hacia la formación de productos. Al ser los ácidos grasos metabolitos tóxicos que desestabilizan las membranas, sus concentraciones libres en una célula son muy bajas, desplazando la reacción hacia la hidrólisis del tioéster. En otras palabras, es necesario proveer de un impulso termodinámico adicional, que asegure la formación de acil graso-CoA, aún a concentraciones muy bajas de ácidos grasos libres. Así, la formación del acil graso-CoA se hace energéticamente favorable, mediante la hidrólisis del PPI por la pirofosfatasa inorgánica soluble. Consecuentemente, en la activación de un ácido graso, se rompen dos enlaces fosfoanhídrido del ATP (David L y Michael M, 2005).

La activación de aminoácidos antes de su polimerización en proteínas se consigue mediante un conjunto de reacciones que representan un problema termodinámico análogo, en el que una molécula de RNA de transferencia hace las veces de coenzima A. El primer paso consiste en la activación de los aminoácidos, hasta aminoacil-tRNA, AMP y PPI, lo que debe acompañarse de la hidrólisis de PPI para desplazar el equilibrio hacia la formación de tRNA's cargados (David , Michael 2005).

Además, de que se libera PPI en la activación de los monómeros, también durante la síntesis de ciertas macromoléculas se libera PPI. Por ejemplo, durante la síntesis de ADN o ARN a partir de nucleósidos trifosfato, la polimerización va acompañada de la ruptura de la unión fosfoanhídrido entre los fosfatos α y β , del ATP con liberación de PPI. (Figura 1 C) (David L y Michael M, 2005).

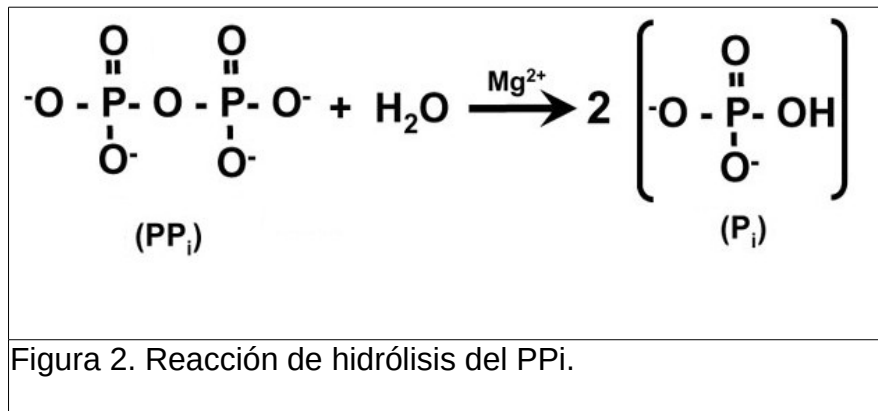
Debido a que la síntesis de ADN, proteínas, ácidos grasos, entre otras reacciones que liberan PPI, son reacciones que se están llevando a cabo en todo momento en la célula, no es de extrañarse que la velocidad en que se produce pirofosfato en células en crecimiento sea particularmente elevada (Klemme *et al.*, 1971).

Debido a la elevada tasa en que se produce pirofosfato en la célula, se requiere que ésta sea balanceada por un sistema catabólico eficiente, el cual permita la reutilización del fósforo. En todas las células estudiadas se encuentra al menos una actividad pirofosfatasa, la cual es capaz de convertir el PPI en Pi. (Cooperman *et al.*, 1982; Josse y Wong, 1971).

3.2 Las pirofosfatasas y su importancia en el metabolismo

Las pirofosfatasas inorgánicas (PPasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido en la molécula de pirofosfato (PPi) y, como se ha mencionado, el PPi es un compuesto producido en muchas reacciones reversibles dependientes de nucleótidos 5'-trifosfato.

Así pues, las pirofosfatasas juegan un importante papel en el anabolismo, dando un empuje termodinámico para reacciones como la síntesis de proteínas, ARN y ADN. (Kornberg, 1962).



La reacción de hidrólisis del pirofosfato inorgánico (Fig.2) tiene una energía libre *in vivo* de aproximadamente -23,7 kJ/mol (Floodgard and Fleron, 1974). Esta energía puede ser usada como un empuje termodinámico, con el cual es posible desplazar hacia la biosíntesis, aquellas reacciones que liberen pirofosfato como subproducto (Kornberg, 1962).

Se ha demostrado que la expresión basal de una cierta cantidad de pirofosfatasa soluble es necesaria para mantener el crecimiento de las células (Chen *et al.*, 1990), probablemente para la reutilización de fósforo. Sin embargo, los niveles de pirofosfato en la célula no parecen relacionarse directamente con la actividad de pirofosfatasa (Chen *et al.*, 1990).

3.3 Aspectos evolutivos y clasificación de las pirofosfatasas

Las pirofosfatasas se clasifican en dos grandes categorías, las pirofosfatasas solubles (sPPasas) y las pirofosfatasas de membrana transportadoras de protones. (H^+ -PPasas). Se cree que ambos tipos de enzimas participan de manera conjunta en la regulación de los niveles de pirofosfato intracelular, en aquellos organismos en los que se encuentran ambas actividades.

Las H^+ -PPasas son bombas que acoplan la hidrólisis del pirofosfato a la generación de un gradiente de protones, una forma muy versátil de energía en las células (Baltscheffsky *et al.*, 1999; Drozdowicks *et al.*, 2001).

A su vez y, de acuerdo a su estructura primaria, las pirofosfatasas inorgánicas solubles pueden subdividirse en dos familias, las cuales no tienen similitud significativa en sus secuencias de aminoácidos (Kuhn *et al.*, 1998).

La familia uno comprende a la mayoría de las pirofosfatasas estudiadas y está presente en diversos grupos de procariontes, plantas, animales y hongos. Las mejor estudiadas a la fecha son la de *Escherichia coli* (*EsPPasa*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*YsPPAsa*) las cuales son los prototipos procarionte y eucariote para las sPPasas de la familia uno, respectivamente. (Lahti *et al.*, 1988; Kolakowski *et al.*, 1988; Cooperman *et al.*, 1992; Baykov *et al.*, 1999). Solamente 17 residuos están conservados en todas las pirofosfatasas de la familia 1, de los cuales 15 se encuentran en el sitio activo (Gómez-García *et al.*, 2006).

La familia II comprende a pirofosfatasas inorgánicas solubles que emplean manganeso o cobalto como activador esencial y se encuentran presentes en algunos grupos de procariontes (Sivula *et al.*, 1999). Estas proteínas no presentan homología de secuencia con las proteínas de la familia I, pero sí poseen semejanza estructural al nivel del sitio activo (Fabrichiniy *et al.*, 2007).

Recientemente, se reportó la existencia de un tercer grupo de pirofosfatasas inorgánicas solubles presentes en procariontes (Lee *et al.*, 2009) y plantas (May *et al.*, 2011). Estas proteínas son activadas por magnesio, aunque en el caso de la proteína de plantas dicha activación no es esencial (May *et al.*, 2011). Sin embargo, estas proteínas, a nivel de secuencia, se agrupan con una superfamilia

de proteínas cuyo prototipo presenta actividad de dehalogenasa de haloácidos (Huang *et al.*, 2011), además de que las pirofosfatasas de dicha familia presentes en procariontes y plantas poseen muy baja semejanza de secuencia entre ellas. Por otro lado, tampoco presentan homología con las pirofosfatasas inorgánicas solubles de las familias I, II o las que bombean protones.

Finalmente, las pirofosfatasas de membrana (H^+ -PPasa) no muestran similitud en secuencia con ninguna de las dos familias de pirofosfatasas inorgánicas solubles (Sivula *et al.*, 1999), con las pirofosfatasas de la familia II (Fabrichiniy *et al.*, 2007), ni con las de la familia de la dehalogenasas de haloácido.

Los alineamientos de secuencias entre la EsPPasa y la YsPPasa han mostrado que los residuos del sitio activo están muy conservados, aun cuando la similitud entre sus secuencias es relativamente pobre. La estructura entre estas dos proteínas también tiene un importante grado de semejanza, lo que podría indicar que ambas enzimas comparten un mecanismo químico de hidrólisis (Cooperman *et al.*, 1992).

y un tanto sorprendente, si consideramos el origen procarioto del cloroplasto propuesto por Lynn Margulis (Margulis L 1981)

3.4 El pirofosfato y las pirofosfatasas en el metabolismo vegetal

El PPi no es únicamente un subproducto de la activación y polimerización en distintas rutas biosintéticas, sino que puede servir como fuente de energía (Stitt, 1998). Se ha encontrado que en los plastidios de plantas superiores una elevada actividad pirofosfatasa mantiene una baja concentración de PPi en este organelo, con lo que se consigue impulsar a la biosíntesis de almidón dentro de los mismos, vía que sin este empuje termodinámico sería reversible (Gross y ap Rees, 1986; Weiner *et al.*, 1987; Farré *et al.*, 2001).

Sin embargo, en el citoplasma se encuentra una nula o muy pobre actividad pirofosfatasa, lo que trae como consecuencia, una acumulación de pirofosfato en dicho compartimento (Weiner *et al.*, 1987). Esta poza metabólica representa una cantidad considerable de energía, dado que, como ya se ha mencionado, la energía libre de hidrólisis del pirofosfato *in vivo* es aproximadamente la mitad de la energía libre de hidrólisis del ATP (Davies *et al.*, 1993). En consecuencia, se ha propuesto que el PPi en el citoplasma podría actuar como donador de energía para generar un gradiente electroquímico en la vacuola vía la H⁺-PPasa y para la fosforilación de la Fructosa-6-P vía la fosfofructotransferasa dependiente de PPi (Kruger, 1997; Mustrup *et al.*, 2005).

Además, en tejidos heterótrofos, puede almacenar algo de energía en la degradación de la sacarosa mediada por las enzimas; sacarosa sintasa, UDP Glucosa pirofosforilasa y fosfofructocinasa. (Kruger, 1997; Fernie *et al.*, 2002). En los tejidos que acumulan almidón, se ha encontrado que cuando la célula empieza a acumular este polisacárido, la forma de degradar la sacarosa cambia, de ser independiente de PPi, vía la invertasa, a ser dependiente de PPi vía la sacarosa sintasa (Ross *et al.*, 1994; Appeldorn *et al.*, 1997; Viola *et al.*, 2001; Fernie y Willmitzer, 2001). En estos tejidos, la principal fuente de PPi es la síntesis de almidón. En el tubérculo de patata se ha encontrado que un 75% de la sacarosa se metaboliza a almidón (ap Rees and Morrell, 1990) por lo que el PPi producido en la síntesis de almidón es, potencialmente, la mayor fuente del PPi empleado en

que el PPI generado durante la acumulación del almidón sería degradado y no llegaría al citoplasma.

Una propuesta relativamente reciente, señala que el pirofosfato podría convertirse en una fuente alternativa de energía bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Igamberdiev y Kleczkowski, 2011) u otras condiciones de limitación energética (ap Rees *et al.*, 1985; Dancer *et al.*, 1990; Plaxton, 1996; Huang *et al.*, 2008). Desafortunadamente, cada grupo propone mecanismos diferentes para la generación de pirofosfato bajo estas condiciones, además de que su sustento experimental es controversial (Hajirezaei *et al.*, 1993; Mustroph *et al.*, 2005).

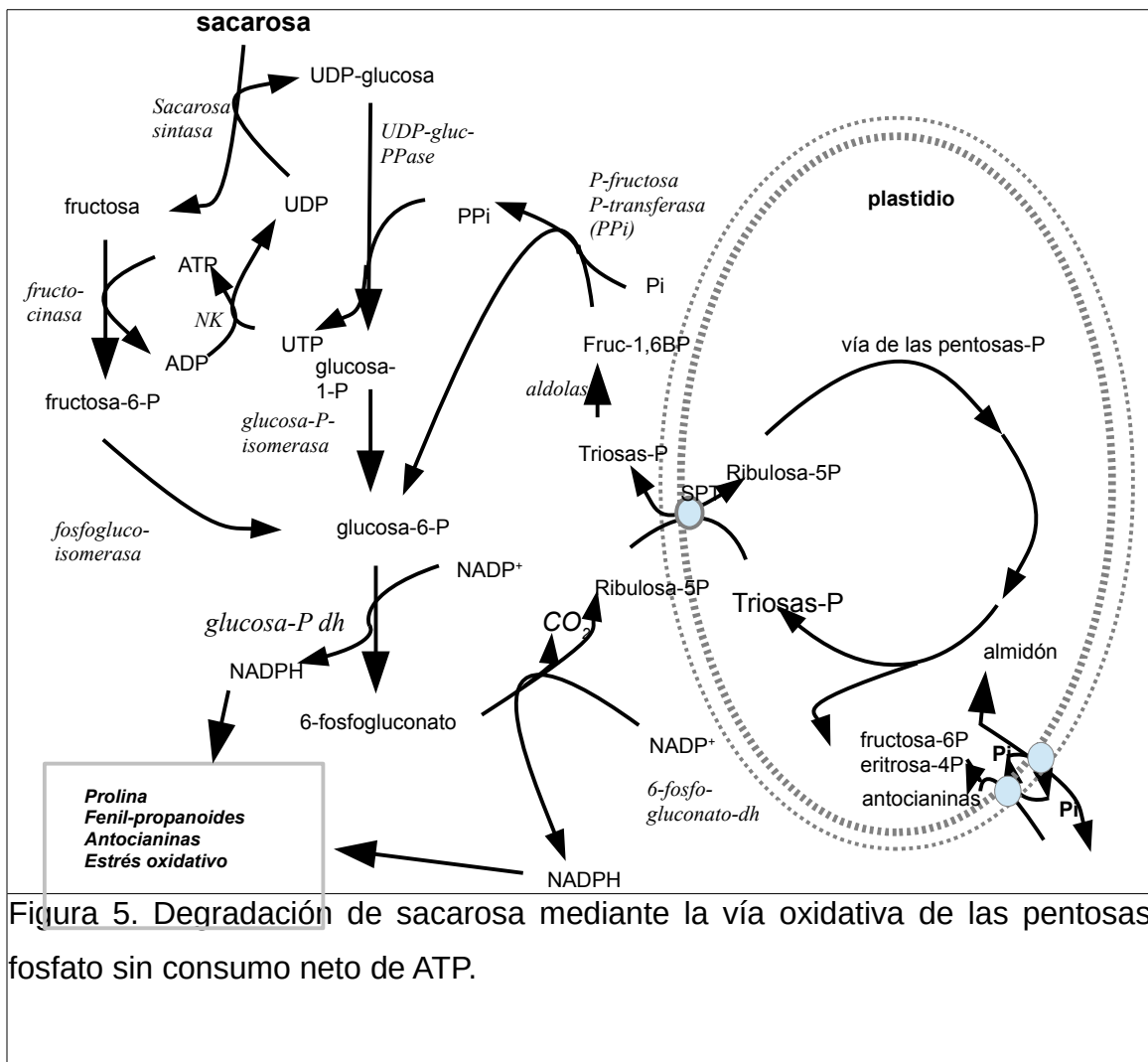


Figura 5. Degradación de sacarosa mediante la vía oxidativa de las pentosas fosfato sin consumo neto de ATP.

De acuerdo a esto ultimo, una propuesta novedosa para la producción de pirofosfato bajo condiciones de baja disponibilidad de energía en las células

vegetales, sería la esquematizada en la figura 5. Bajo condiciones de limitación de energía, esta última propuesta plantea que la sacarosa sería degradada sin consumo neto de ATP o pirofosfato a través de la vía de las pentosas fosfato oxidativa. La regeneración de hexosas fosfato en el citoplasma a través de la fructosa fosfato fosfotransferasa dependiente de pirofosfato, proporcionaría el pirofosfato necesario para la hidrólisis de sacarosa por la sacarosa sintasa, mientras que el UTP recuperado, que puede usarse para producir ATP, serviría para la fosforilación de la fructosa restante. El poder reductor acumulado se emplearía en las vías biosintéticas que operan bajo condiciones de estrés, tales como la síntesis de prolina, fenil-propanoides y antocianinas; además de servir para contender con el estrés oxidativo, que se sabe ocurre bajo condiciones de anoxia y/o limitación de ATP. Las actividades que operarían en dicho metabolismo alternativo han sido descritas en plantas, si bien, el conjunto de los flujos metabólicos propuestos no están demostrados en ningún modelo vegetal.

3.5 El calcio como una señal ubicua en plantas

Todas las células cuentan con una red de transducción de señales la cual les permite desarrollarse, obtener nutrientes, controlar su metabolismo y hacer frente al ambiente.

En células de plantas, se han identificado un gran número de segundos mensajeros tales como el Ca^{2+} , lípidos, pH, cGMP. Entre todos ellos, no se ha encontrado un segundo mensajero que responda a un mayor número de estímulos que el Ca^{2+} . Algunos de los estímulos que causan un cambio en la concentración de Ca^{2+} se listan en la tabla 1.

Tabla 1 Algunos estímulos fisiológicos que elevan $[Ca^{2+}]$ en las células de plantas.

Estímulo	Ejemplo de respuesta	Referencia
Luz roja	fotomorfogénesis	Shacklock et al. (1992)
Ácido abscísico	Cierre estomático	McAinsh et al. (1990)
Gibberellina	Secreción de Amilasa	Bush and Jones (1988)
Salinidad/Sequía	Síntesis de prolina	Knight et al. (1997)
Estrés hipoosmótico	Adaptación osmótica	Taylor et al. (1996)
Tacto	Retraso en el crecimiento	Knight et al. (1991)
Inductores fúngicos	Síntesis de Fitoalexina	Knight et al. (1991)
Frío	Expresión del gen KIN-1	Knight et al. (1996)
Choque térmico	Termo tolerancia	Gong et al. (1998)
Estrés oxidativo	Inducción de neutralizadores de radicales libres.	Price et al. (1994)

3.6 ¿Por qué el calcio es un buen segundo mensajero?

El metabolismo en todas las células requiere de ortofostato (Pi) y de compuestos orgánicos fosforilados, principalmente, en reacciones que se llevan a cabo en el citoplasma, asociadas a la transducción de energía. El bajo producto de solubilidad del complejo CaPi, habría obligado a la temprana evolución de mecanismos que mantuvieran la concentración de Ca^{2+} por debajo de los niveles milimolares que prevalecen en el agua de mar. Por lo que, los sistemas de transporte que exportan Ca^{2+} del citosol están presentes en todas las células. En

consecuencia, el nivel de $[Ca^{2+}]_c$ se encuentra por debajo del rango micromolar. Este mecanismo homeostático habría sido ideal para la subsecuente evolución de vías de señalización basadas en la concentración de Ca^{2+} . Es decir, dado el diferencial de concentración entre el $[Ca^{2+}]_c$ y el $[Ca^{2+}]_{exterior}$, la elevación en los niveles de Ca^{2+} por un factor de 10 o 20 veces, se llevaría a cabo mucho más rápidamente que para iones o soluto en el rango milimolar, con la apertura de un simple canal (Sanders *et al.*, 1999).

Además, la química del calcio presenta muchos aspectos favorables para la transducción de señales, la habilidad del Ca^{2+} de coordinar un número considerable de átomos de oxígeno, no cargados (normalmente 6 o 8) permite que dominios separados de una proteínas participen en la unión a calcio (McPhalen *et al.*, 1991). De hecho, el cambio conformacional inducido por la unión de Ca^{2+} a las proteínas, es un mecanismo recurrente en la transducción de señales.

3.7 Calcio libre citosólico y almacenamiento de Ca^{2+}

La concentración de calcio libre en el citoplasma se mantiene aproximadamente en 200 nM (Bush, 1995). Sin embargo, el contenido de calcio en el citoplasma es considerablemente más elevado, debido a la gran afinidad del Ca^{2+} por diversas proteínas. Se estima que sólo del 1% al 0.1% de Ca^{2+} se encuentra en forma libre, mientras que el resto está secuestrado por otras moléculas (Brinley *et al.*, 1977; Gorman and Thomas, 1980).

La tendencia del Ca^{2+} a asociarse mayoritariamente con proteínas del citoplasma, tiene el efecto de reducir el coeficiente efectivo de difusión del Ca^{2+} (Thomas, 1982). La baja difusión del Ca^{2+} es la clave para generar patrones diferenciados espacialmente y temporalmente que pueden ser usados en la transducción de señales.

La presencia de organelos intracelulares con la capacidad de almacenar Ca^{2+} contribuye también al amortiguamiento de los niveles de Ca^{2+} , lo que ayuda a moderar las señales codificadas en los patrones de Ca^{2+} . Entre estos se sabe que el retículo endoplásmico, la mitocondria y los cloroplastos son capaces de

secuestrar Ca^{2+} (Bush, 1995). Por su tamaño y capacidad de acumulación, las vacuolas son probablemente el factor predominante para apagar una señal de Ca^{2+} , luego de que se ha producido una elevación de su concentración, en respuesta a algún estímulo (Miller *et al.*, 1990). Es un dato importante resaltar la enorme diferencia entre la concentración de calcio en el citoplasma y en los compartimientos como el cloroplasto o la mitocondria pues en estos organelos la concentración de calcio se encuentra entre 1 y 10 mM, mientras que en el citoplasma la concentración se encuentra aproximadamente $0.1 \mu\text{M}$.

4. ANTECEDENTES

4.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de pirofosfatasas solubles

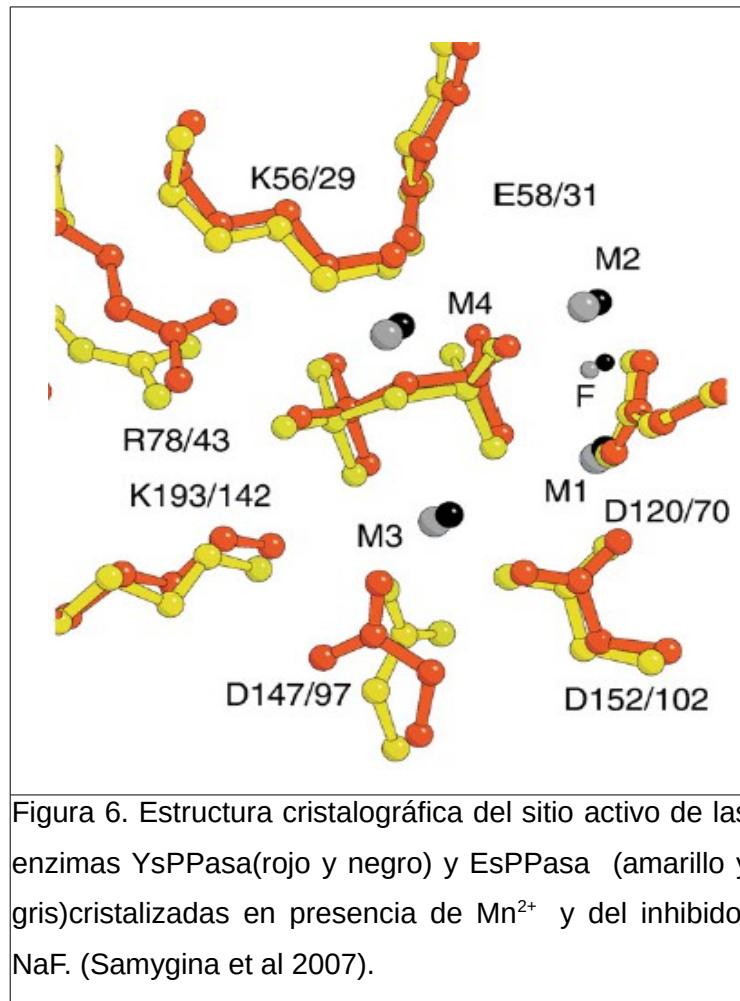
Los iones metálicos juegan un rol importante en la catálisis, las pirofosfatasas requieren cationes divalentes como activadores. Para las pirofosfatasas de la familia I el Mg^{2+} es el mejor activador, aunque, existen otros iones metálicos con los cuales es posible medir una ligera actividad. El Mg^{2+} es un activador esencial de estas enzimas, dado que en su ausencia, la actividad es indetectable. Para la YsPPasa la efectividad de los cationes divalentes como activadores se lista de la siguiente manera: $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ (Baykov *et al.*, 1999) , mientras que para las pirofosfatasas de la familia II el Mn^{2+} resulta ser el mejor activador (Kuhn *et al.*, 1998), el cual también es esencial. Como se mencionó antes, en las enzimas de la familia de las dehalogenasas de haloácido que presentan actividad de pirofosfatasa, la actividad aumenta en presencia de Mg^{2+} , pero en ausencia del catión presentan cierta actividad basal (May *et al.*, 2011).

Todas las pirofosfatasas solubles de la familia I estudiadas hasta la fecha, requieren de un catión divalente como cofactor. Siendo en la mayoría de los casos el Mg^{2+} el más eficiente. En contraste con esto, se ha reportado que el Ca^{2+} es un potente inhibidor en el caso de las sPPasas de bacterias (Kurilova *et al.*, 1984) (Yang *et al.* 1989), levaduras y animales (Felix *et al.*, 1975) (Mitchell *et al.*, 1997); Yang *et al.*, 1992). Se ha planteado que esta propiedad está relacionada con su regulación *in vivo*. Una excepción se observa en la pirofosfatasa de *Leishmania major* en donde el Ca^{2+} en lugar de ser un inhibidor, actúa como activador (Gómez García *et al.*, 2006).

4.2 Mecanismo catalítico en pirofosfatasas solubles homólogas

El mecanismo catalítico de las enzimas EsPPasa y YsPPasa ha sido ampliamente estudiado. Se ha encontrado que los sitios activos están muy conservados para ambas enzimas, como se puede apreciar en la figura 6. A pesar de que su semejanza a nivel de secuencia es baja, la semejanza estructural del sitio activo

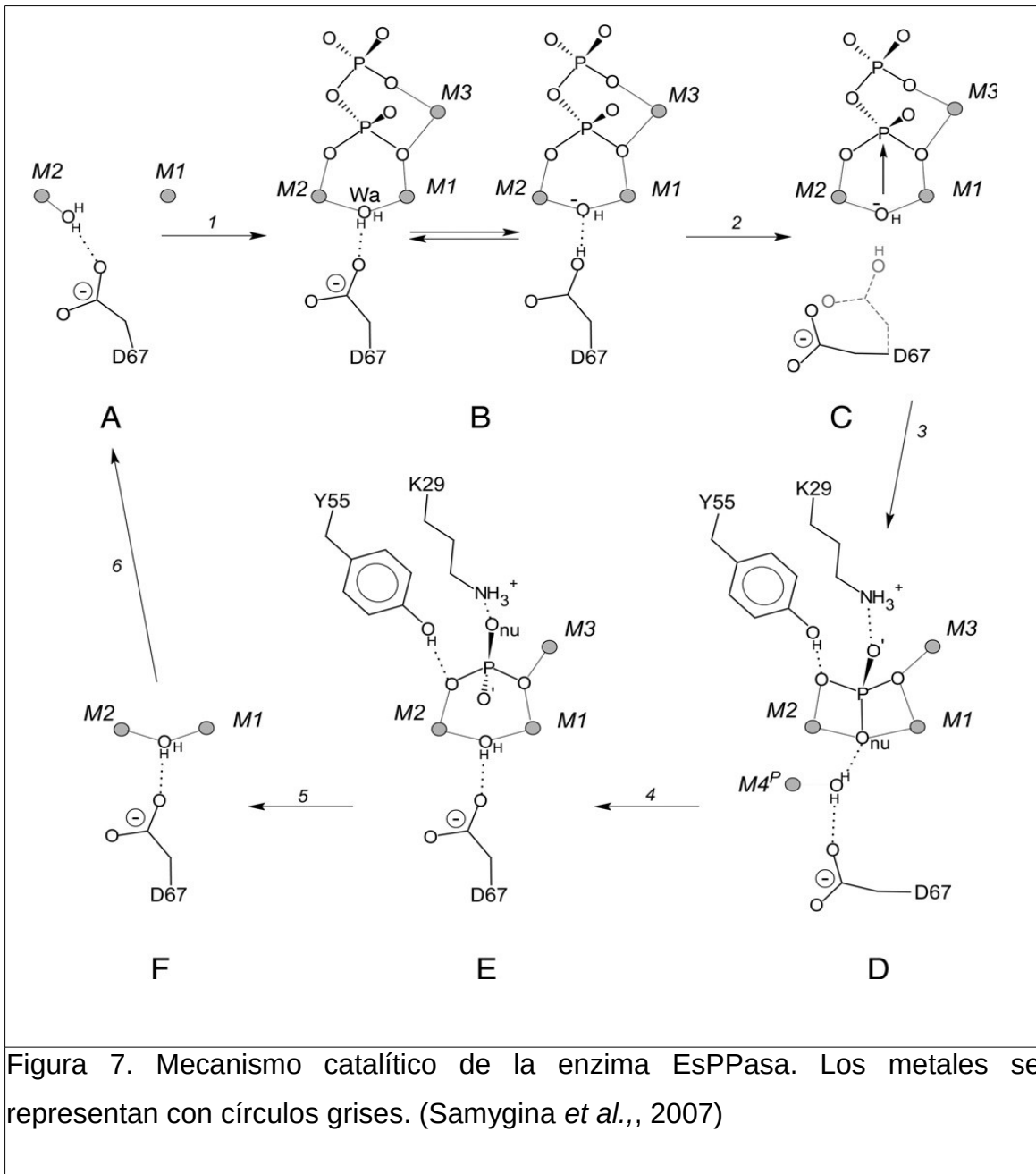
indica que comparten el mismo mecanismo catalítico, en el cual los iones metálicos juegan un papel fundamental al activar el agua nucleofílica, deslocalizar la carga negativa del sustrato y proporcionar un sitio de unión con alta especificidad para la forma inorgánica del pirofosfato (Baykov *et al.*, 1999).



En la figura 6 se puede observar que los sitios activos de las enzimas EsPPasa (residuos amarillos) y YsPPasa (residuos rojos) están muy conservados, los residuos del sitio activo están prácticamente en las mismas posiciones, al igual que el sustrato y los iones de Mn^{2+} . En esta estructura cristalográfica se aprecia que un ion fluoruro se une entre los dos metales M1 y M2, lugar en donde se ha planteado que se une también el agua que lleva a cabo el ataque nucleofílico al

sustrato, lo que explica porque el NaF es un potente inhibidor de ambas enzimas, ya que ocupa con facilidad el sitio para esta agua catalítica.

Para llevar a cabo la catálisis se necesita que la enzima esté unida a dos iones Mg^{2+} en su sitio activo en los sitios M1 y M2, los que posiblemente se ocupen en forma previa a la unión a su sustrato MgPPi. Una vez que se une el sustrato, el paso crucial en la catálisis es la activación de una molécula de agua (Wa), dicha molécula se localiza entre los dos iones metálicos en las posiciones M1 y M2. Se plantea que en los pasos iniciales este sitio está ocupado por dos moléculas de agua, cada una de las cuales está coordinada a uno de los dos átomos metálicos. La unión del sustrato induce un reacomodo del sitio que desplaza a una de las dos aguas y permite que la molécula restante quede coordinada al centro bimetálico, con la consecuente reducción en el pKa. El cambio en el pKa facilita que un ácido aspártico (D-67) del sitio activo acepte un protón del agua nucleofílica, generando así un hidroxilo nucleófilo, el cual ataca al fósforo del PPi que se encuentra en la posición más cercana. El fosfato que se genera en el sitio P1, abandona el sitio activo con relativa facilidad, mientras que el fosfato generado en el sitio P2, requiere que un agua sustituya al oxígeno del fosfato que interactúa con los metales M1 y M2 para facilitar su liberación. El mecanismo se ilustra en la figura 7. (Samygina *et al.*, 2007). Sin embargo, uno de los aspectos intrigantes del mecanismo, es la modulación del pKa del ácido aspártico que actúa como base, ya que el pKa de un carboxilato, usualmente es demasiado bajo como para aceptar un protón de una molécula de hidrato de Mg^{2+} , cuyo pKa es mayor que el de un carboxilato en dos o más unidades de pH. A pesar de los estudios teóricos realizados sobre el sitio activo de esta enzima (Yang *et al.*, 2009), aún no es claro, como es que se favorece dicha transferencia.



4.3 Mecanismo de inhibición por calcio de EsPPasa

Se ha estudiado con gran detalle la inhibición que se presenta por Ca^{2+} en la enzima PPasa de *Escherichia coli* (EPPa), en la que, en base a estudios cinéticos y cristalográficos, se ha encontrado que la inhibición se debe a dos efectos:

- i) El primero consiste en que el sustrato análogo CaPPi compite por el sitio de unión con el sustrato verdadero MgPPi . El complejo CaPPi no es

hidrolizable por la enzima EsPPasa debido a que el pirofosfato no se acomoda en el sitio de manera óptima. Lo que parece se debe a que la distancia entre el agua nucleofílica y el fósforo es demasiado grande para un ataque nucleofílico, además de que el ángulo no es el adecuado (Rodina *et al.*, 2001).

- II) El segundo se debe a que el Ca^{2+} sustituye al Mg^{2+} en el sitio M2. El metal que se encuentra en ese sitio es en gran parte el responsable de la activación del agua nucleofílica. Al ser el Ca^{2+} una pobre base de Lewis a diferencia del Mg^{2+} , el agua nucleofílica no resulta activada de manera efectiva, por lo que el aspártico 67 no es capaz de extraer el protón y no se lleva a cabo la catálisis, pues el agua, a diferencia del ion hidroxilo, no es un buen nucleófilo (Rodina *et al.*, 2001).

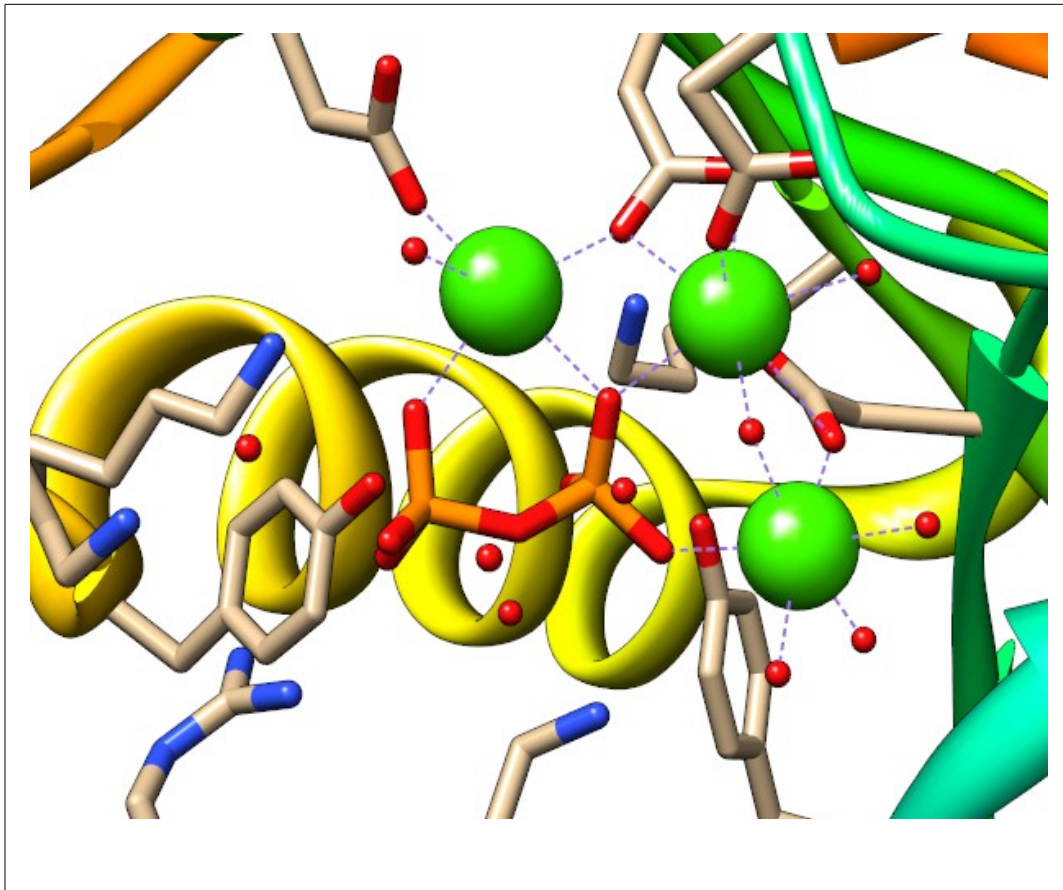


Figura 8. Estructura cristalográfica del sitio activo de la enzima EsPPasa con CaPPi y Ca^{2+} (PDB 1I6T). Los átomos de fósforo se muestran en color naranja. La figura fue generada mediante el programa Chimera (Goddard *et al.*, 2004).

En la figura 8, se indica el sitio activo de la enzima EsPPasa con el análogo del sustrato CaPPi y el metal Ca^{2+} , ocupando los dos sitios de unión para los iones Mg^{2+} , los cuales son los responsables de la activación del agua nucleofílica.

4.4 Mecanismo catalítico de la enzima AtPPa1

La enzima AtPPa1 ha sido clonada anteriormente y se ha caracterizado su mecanismo cinético (Navarro de la Sancha 2007 *et al.*, 2007). Al igual que las enzimas homólogas EsPPasa y YsPPasa (de *Saccharomyces cerevisiae*) se encontró que el Mg^{2+} es un activador esencial para la catálisis y se ha sugerido el mecanismo cinético ilustrado en la figura 9.

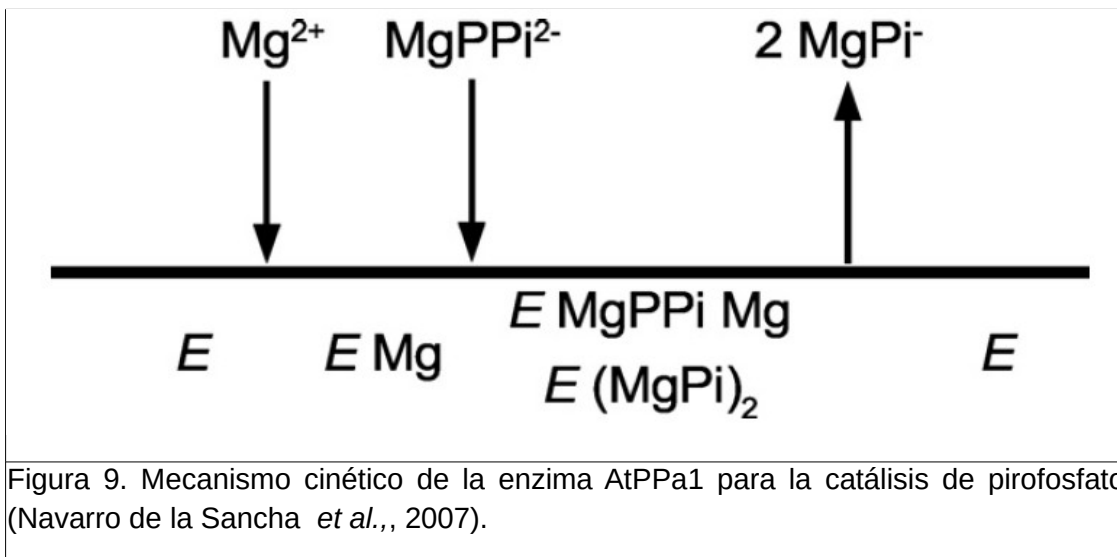


Figura 9. Mecanismo cinético de la enzima AtPPa1 para la catálisis de pirofosfato (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007).

En la figura 9, se ilustra el mecanismo cinético para la catálisis. En este mecanismo el Mg^{2+} es un cofactor esencial, se requiere la unión ordenada de un ion Mg^{2+} a la enzima, posteriormente, la unión del sustrato en forma de complejo con Mg^{2+} . En realidad, este trabajo provee evidencia de la existencia de un orden de adición de los ligandos Mg^{2+} y MgPPi a la enzima, pero la evidencia presentada no permite determinar el orden de adición, de manera que la unión de MgPPi podría preceder a la unión de Mg^{2+} , sin cambio en el patrón de velocidades iniciales reportado.

En este mismo trabajo se determinó que el Ca^{2+} inhibe la actividad pirofosfatasa, pero no se estudió el mecanismo por el cual este catión inhibe la actividad.

5.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La relevancia de las pirofosfatasas en la regulación del crecimiento, establece la necesidad de mecanismos de regulación de su actividad, para adecuar la actividad metabólica a las cambiantes condiciones ambientales.

Los cambios ambientales pueden ser graduales (como las estaciones), o repentinos, como los cambios del ciclo día-noche. Por lo tanto, es de esperarse que las enzimas del metabolismo puedan variar en su cantidad o en su estado de activación, en concierto con las variaciones de alguna señal metabólica. Dado que el pirofosfato es un subproducto de la biosíntesis de diversas macromoléculas y oligosacáridos, se esperaría que su concentración en la célula variará en función de la actividad de crecimiento y proliferación celular; sin embargo, se ha encontrado que la concentración del pirofosfato en el citoplasma de las plantas es notoriamente constante (Weiner *et al.*, 1987; Duff *et al.*, 1989; Farré *et al.*, 2001), lo que implica, que la concentración del sustrato no regula a estas enzimas. Una posibilidad es que la regulación a corto plazo se dé a través de cambios en la concentración de calcio. El calcio es, de hecho, uno de los mensajeros secundarios más importantes en la transducción de señales en organismos vegetales (Sanders *et al.*, 1999), en respuesta tanto a estímulos externos como a señales internas de la planta. Por otro lado, se ha determinado que la actividad de las pirofosfatasas inorgánicas solubles de plantas, utilizan exclusivamente magnesio como cofactor y la presencia de calcio resulta inhibitoria para su actividad (de Graff *et al.*, 2006; Navarro de la Sancha *et al.*, 2007).

A pesar de todo lo anterior, no se ha estudiado con detalle la cinética de inhibición por calcio de las pirofosfatasas inorgánicas solubles de organismos vegetales y no resulta claro si la sensibilidad de esta enzima al Ca^{2+} se presenta a niveles de concentración dentro del rango fisiológico. Entre otras cosas, las concentraciones intracelulares de calcio están estrictamente reguladas y se encuentran en el rango de 1 a 100 μM , en tanto que las concentraciones de Mg^{2+} suelen variar entre 500 y 1000 μM .

Así, en este trabajo se propone estudiar la cinética de inhibición por calcio de la isoforma 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtPPa1), siendo que, previamente, se ha

demostrado que el calcio inhibe a esta enzima (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007), pero sin reportarse el mecanismo cinético de dicha inhibición.

El mecanismo cinético de la inhibición es relevante ya que una inhibición competitiva se elimina cuando las concentraciones de sustrato se elevan, por el contrario, la inhibición acompetitiva se hace más efectiva a concentraciones elevadas de sustrato. En el presente caso, existen además dos ligandos para la proteína (MgPPi y Mg₂PPi), de manera que la inhibición por Ca²⁺ podría ser de diferente tipo frente a cada uno de estos ligandos. Adicionalmente, el uso de Ca²⁺ como inhibidor podría ayudar a definir mejor si la unión ordenada de Mg²⁺ y MgPPi se dan con Mg²⁺ como primero o como segundo ligando.

En el trabajo previo, la construcción empleada para obtener la proteína en forma recombinante, presentaba una extensión de 12 aminoácidos hacia el extremo amino terminal. Es posible que la presencia de ese extremo tuviera poca influencia en la cinética, pero eso debe demostrarse experimentalmente para tener certeza de ello.

El presente proyecto pretende extender dichos estudios y aportar nuevos elementos para entender cómo controla la planta la actividad de estas proteínas, en relación con sus necesidades de desarrollo y adaptación al ambiente.

5.2 HIPÓTESIS

Previamente se ha demostrado que el Ca²⁺ inhibe la actividad de la isoforma 1 de pirofosfatasa de *Arabidopsis thaliana* a concentraciones muy superiores a las encontradas in vivo, hace falta un estudio mas detallado de esta inhibición.

Se propone que el Ca²⁺ actuará como inhibidor de la isoforma 1 de *Arabidopsis thaliana in vitro*, a concentraciones que estén dentro de los rangos fisiológicos para este catión.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Estudiar la cinética de inhibición por calcio de la isoforma 1 de Pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana*, expresada como proteína recombinante en *E. coli* y determinar el mecanismo cinético de su inhibición por este catión divalente.

6.2 Objetivos Particulares

- 1) Clonar el cDNA de la isoforma 1 de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana*, como proteína recombinante, en una construcción que presente cambios mínimos respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa. Se buscará añadir a la Glutación-S-transferasa como tallo de purificación, ya que esta estrategia resultó efectiva en el trabajo previo (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007).
- 2) Producir las proteínas con actividad de Pirofosfatasa Inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana* en cultivos de *E. coli*.
- 3) Purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad y eliminar la etiqueta de purificación mediante digestión con Trombina.
- 4) Purificar la proteína digerida para eliminar la etiqueta y la proteasa.
- 5) Analizar la literatura para generar una buena base de datos de las constantes de estabilidad de los complejos magnesio-pirofosfato y calcio-pirofosfato, que con confiabilidad suficiente, permitan calcular las concentraciones de las formas libres y complejos de pirofosfato, calcio y magnesio en mezclas al pH en que se realizaron los estudios previos, el cual es ligeramente superior al fisiológico (7.5), pero en el que la enzima tiene buena actividad *in vitro*.
- 6) Determinar la actividad de la proteína a concentraciones variables de magnesio, pirofosfato y calcio.

7) Proponer modelos cinéticos que expliquen la inhibición por calcio observada en términos de la unión de calcio libre y/o complejos de calcio-pirofosfato a la proteína durante la catálisis.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1 Sustancias

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos por cualquiera de estos proveedores Sigma (St. Louis, MO. USA), Roche (Hvi dovre, Denmark) o Merck (Damstadt, Germany). Las resinas de afinidad Gutatione Sepharose™ y Benzamidine Sepharosa™ para la purificación de las proteínas recombinantes se obtuvieron de Amersham Biosciences. Las enzimas de restricción BamHI, EcoRI, la Ligasa T4, así como todas las enzimas y reactivos usados para amplificación por PCR o en la síntesis de cADN fueron obtenidos de Invitrogen™.

7.1.2 Material biológico y microbiológico

Para los procesos de clonación y expresión heteróloga se usaron los recursos biológicos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Recursos biológicos empleados para la clonación.	
Bacteria/Plasmido	Propiedades/Fenotipo
E. coli BL21 (DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)
E. coli JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, laqI</i> ^q ZΔM15].
pGEMT- Easy	Amp ^r , ori, Lac Z
pGEX-4T-2	Amp ^r , ori, Lac Iq, GST, Ptac, thrombin cleavage site.

7.2.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, todo el material empleado se esterilizó en autoclave, en presencia de H₂O con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1 % v/v. El protocolo detallado se describe a continuación:

- Macerar 100 mg de tejido foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) agregando lentamente N₂ (líquido); cuando las muestras se encuentren completamente congeladas adicionar 1 mL del reactivo TRI® RNA Isolation Reagent.
- Los homogenados se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, para favorecer la disociación de complejos de nucleoproteínas.
- En seguida se procedió a centrifugar las muestras a 12 000 g durante 10 min a 4° C; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril.
- A continuación se adicionaron 100 mL de Br,Cl- propano por cada 1 mL del reactivo TRI®, la mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. El Br,Cl-propano puede sustituirse con CHCl₃ (libre de alcohol isoamílico).
En este caso se recomienda adicionar 280 µL de CHCl₃.

- Después de agitar la mezcla en vórtex e incubar durante 12 min, las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 10 min a 4° C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 500 µL de isopropanol por cada 1 mL del reactivo TRI®.
- Las muestras se agitaron en vórtex durante 10 seg y se incubaron por un lapso de 5 -10 min, transcurridos los cuales, se centrifugaron a 12 000 g por 8 min (t = 4-25 °C), eliminándose el sobrenadante y procurando mantener la integridad de la pastilla de RNA.
- En seguida se adicionó 1 mL de EtOH al 75% por cada mL de TRI® empleado para homogeneizar la muestra. Las muestras se centrifugaron a

7500 g por 5 min, el EtOH se eliminó lentamente, al incubar el tubo abierto a temperatura ambiente; alternativamente puede emplearse $N_2(g)$.

- El RNA se disolvió en 100 μL de H_2O libre de RNAsas. La muestra se almacenó a -70°C .

7.2.2 Síntesis de cADN

Para la síntesis de cADN, se preparó una mezcla de reacción en un tubo para PCR con los reactivos y cantidades descritos en la tabla 3, se mezcló y centrifugó cada uno de los componentes antes de su uso.

Tabla 3. Reactivos para síntesis de cADN (A)

Componente	Cantidad
RNA	2 μL
Oligo(dT) ₂₀ (50 μM)	1 μL
dNTP Mix (10mM)	1 μL
H ₂ O estéril	9 μL

Posteriormente, se calentó la mezcla a 65°C por 5 minutos, transcurrido este tiempo, se colocó en hielo por un minuto más. En seguida, en el mismo tubo se agregaron los componentes listados en la tabla 4.

Tabla 4.Reactivos usados para síntesis de cADN (B)

Componente	Cantidad
5X "First-Strand Buffer"	4 µL
DTT 0.1M	1 µL
RNaseOUT™	1 µL
SuperScript™ III RT	9µL

- La mezcla de reacción anterior se incubó a 50 °C por 60 minutos y transcurrido este tiempo se detuvo la reacción, calentando a 70 °C por 15 minutos.

7.2.3 Amplificación del inserto por PCR

La amplificación del inserto se realizó utilizando los cebadores diseñados con el programa Biology Workbench (San Diego Supercomputer Center) y presentados en la tabla 5. Se construyeron con un sitio de corte para la enzima EcoRI y para la enzima BamHI. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la amplificación del gen sq-241114

Oligonucleótido	Secuencia
241114 F:	5'CCGGATCCATGAGTGAAGAACTAAAGATAACCAGAG3'
241114 R:	5'CCGAATTCTCAACGCCTCAGGGTGTG 3'

La amplificación de los insertos se llevó a cabo en un tubo para PCR de polipropileno de 0.5 mL, la preparación de la reacción y las condiciones para la amplificación se listan en la tabla 6.

Tabla 6. Preparación y condiciones para PCR.

Reactivo	Cantidad	Condiciones de reacción
Buffer para PCR 10X	5µL	<ul style="list-style-type: none"> •Un ciclo 95.0°C/3 min. •25 Ciclos 95°C/1 min. 55 °C/1 min. 72°C/ 1 min.
50 mM MgCl ₂	1.5µL	
Mezcla de dNTP (10mM)	1µL	
Oligonucleotido sentido (10µM)	1µL	
Oligonucleotido antisentido (10µM)	1µL	
cADN	2µL	
Taq DNA polimerasa (5U/ 1µL)	0.4 µL	
H ₂ O Estéril	38 µL	

7.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para visualizar los productos de PCR y productos de digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). El gel se corrió a un voltaje de 10 V/cm por 45 minutos. Posteriormente, el gel se tiñe con solución de bromuro de etidio y se visualiza el ADN por fluorescencia en una lámpara de UV.

7.2.5 Purificación de ADN en gel

Después de haber amplificado el inserto de interés, así como después de la digestión y haber observado que la amplificación o la digestión fue exitosa con una electroforesis de ácidos nucleicos (Sección 7.2.4), se realizó la purificación de la

banda de interés a partir del gel usando el kit de purificación QIAquick de QIAGEN. A continuación se describe el protocolo:

- Se cortó la sección del gel que contenía el inserto.
- Se pesó el trozo de gel y se agregó 1 mL de amortiguador de solubilización por cada gramo de gel.
- Se incubó a 50 °C por 10 minutos.
- Se agregó un volumen de isopropanol.
- Se colocó la mezcla en una columna del Kit QIAquick y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm.
- Se descartó el filtrado y se colocó la columna en el mismo tubo colector.
- Para lavar se agregó 0.75 mL de Amortiguador PE a la columna y se centrifugó a 13000 rpm., por 1 minuto.
- Se descartó el filtrado y se centrifugó la columna una vez más por 1 minuto a 10 000 x g.
- Se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se agregaron 50 µL de agua estéril en el centro de la membrana de la columna, se dejó reposar por 1 minuto y, posteriormente, se centrifugó nuevamente a 10 000 x g por 1 minuto.
- Se colectó el filtrado y se almacenó a -20°C.

7.2.6 Cuantificación de plásmido

Para cuantificar el plásmido y los vectores se midió su absorbancia a 260 nm en un Espectrofotómetro OPTIZEN UV/Vis POP, usando una celda de cuarzo y una dilución 1/30 (v/v)

7.2.7 Ligación del inserto al plásmido pGEMT-Easy

La ligación se realizó usando el sistema pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Madison WI, USA) en un tubo Eppendorf de polipropileno de 0.5 mL, usando el medio de reacción y condiciones de ligación se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Composición y condiciones de la ligación en vector pGEM-T Easy.

Reactivos	Cantidad	Condiciones de ligación
Amortiguador de ligación 2X	5.0 μ L	4 °C durante 12 horas
pGEM-T Easy	1.0 μ L	
Producto de PCR	2.0 μ L	
DNA ligasa T4	1.0 μ L	
H2O destilada	1.0 μ L	

7.2.8 Transformación en células competentes E. coli JM109 o E. coli BL21 DE3

La transformación se llevó a cabo en células JM109 con el producto de ligación en el sistema pGEM-T Easy, en células JM109 una vez que se hizo la ligación del vector pGEX-4T-2, y en células BL21 DE3 con la construcción final para su expresión heteróloga. El protocolo detallado se describe a continuación:

- Se mezcló el producto de la reacción de ligación con 100 μ L de células competentes E. coli JM109 o E. coli BL21 DE3 en un tubo estéril Eppendorf de 1.5 mL.
- Se aplicó choque térmico a 42 C°, por 45 segundos y, posteriormente, se dejaron en hielo por 5 minutos.

- Se adicionaron 900 μ L de medio SOC (0.5% Extracto de levadura, 2% Triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ 20 mM Glucosa) y se incubaron a 37°C por una hora.
- Se inocularon por extensión 4 cajas Petri (Medio LB, ampicilina [0.1mg/mL] final, IPTG [0.5mM] final y X gal [80 μ g/ml]) con las bacterias transformantes .
- Se incubaron las cajas Petri a 37°C por 12 horas.
- Finalmente, se seleccionaron colonias que presentaran el fenotipo deseado.

7.2.9 Purificación del plásmido

Para la purificación del plásmido pGEMT-Easy, así como del plásmido pGEX-4T-2 se usó el quit comercial para purificación de plásmido de GE Healthcare illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit, el protocolo usado se describe a continuación:

- Se incubó un inóculo de bacterias transformantes en 10 mL de medio LB (Triptona 0.5% Extracto de Levadura 1.0% NaCl 0.5%) hasta una densidad óptica de 0.8.
- Se tomó 1.5 mL de cultivo bacteriano, previamente incubado.
- Se centrifugaron por 1 minuto a 13 000 rpm.
- Se procedió a decantar y descartar el sobrenadante.
- Se agregaron 175 μ L de amortiguador de lisis tipo 7 y se resuspendió la pastilla.
- Se agregaron 175 μ L de amortiguador de lisis tipo 8 y se mezcló por inversión.
- Se agregaron 350 μ L de amortiguador de lisis tipo 9 y se mezcló por inversión.

- Se centrifugó por 5 minutos a 13 000 x g y se transfirió el sobrenadante a una columna del quit.
- Se centrifugó por un minuto a 13000 x g y se descartó el filtrado.
- Se agregaron 400 µL de buffer de lavado tipo 1 y se centrifugó por un minuto a 13 000 x g y posteriormente se descartó el filtrado.
- Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL libre de nucleasas.
- Se agregaron 50 µL de H₂O estéril al filtro de la columna y se dejó reposar por 2 minutos.
- Se centrifugó 1 minuto a 13 000 x g, se retiró la columna y se guardó el filtrado a -20°C.

7.2.10 Digestión de plásmido pGEM-T Easy y PGEX-4t-2

La reacción de digestión se llevó a cabo en las condiciones descritas en la tabla 8. Con esta reacción se consigue liberar el inserto de interés del vector pGEMT-Easy y generar los sitios adecuados para la ligación en el vector pGEX-4t-2. Posteriormente, estos fragmentos se purifican con la técnica descrita en la sección (7.2.5).

Tabla 8. Composición y condiciones para reacción de digestión con EcoRI y BamHI.		
Reactivos	Cantidad	Condiciones
Plásmido	8.8 µL	37 °C por 2 horas
Amortiguador Tango 10X	4 µL	
Enzima Eco RI	1.5 µL	
Enzima Bam HI	2 µL	
H ₂ O	9.9 µL	

7.2.11 Ligación del inserto al plásmido pGEX-4T-2

Con esta ligación se incorpora la secuencia del gen de interés al vector pGEX-4t-2. Las condiciones y la mezcla de reacción utilizada para la ligación se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Composición y condiciones de reacción para ligación del inserto al vector pGEX-4T-2.		
Reactivo	Cantidad	Condiciones
Amortiguador de ligación 5X	10 μ L	16°C por 4 horas
Vector pGEX-4t-2	0.8 μ L	
Inserto	2.6 μ L	
Ligasa T4	1 μ L	
H ₂ O	5.6 μ L	

Con 2 μ L de la reacción de ligación se transformaron células competentes *E. coli* JM109 de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.8.

7.2.12 Cuantificación y secuenciación del plásmido

Se seleccionaron dos colonias transformantes, con el fin de comprobar la integridad del gen de interés se tomó un inóculo de dichas colonias, se cultivaron en 10 mL de medio LB con ampicilina y se les extrajo plásmido de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.9.

Se cuantificó el plásmido de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.6. Y se secuenció el contenido de los plásmidos usando los vectores mostrados en la

tabla 10. La secuenciación se realizó en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para la secuenciación de la construcción.	
Oligonucleótido usado	Secuencia
pGEXfw	GGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEXrv	GAGCTGCATGTGTCAGAGG

7.2.13 Inducción de la expresión de la proteína

Con el fin de obtener suficiente proteína, se cultivó un inóculo de células *E. coli*-BL21 (DE3) transformadas con el plásmido portador de la secuencia de la proteína de fusión AtPPa1-GST en 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración final [100 µg/mL] a 37 °C, con agitación constante durante toda la noche.

De este inóculo se tomó 1mL y se inoculó un matraz Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de medio LB estéril adicionado con ampicilina [100 µg/mL] final, se incubó a 37°C, con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, momento en el cual se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se incubó a 25°C en agitación constante por 12 horas. Con los extractos crudos se hizo una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE para comprobar la inducción de la proteína.

7.2.14 Extracción de proteína soluble

Una vez terminada la inducción de la proteína recombinante se procedió a extraer la proteína soluble, el protocolo se describe a continuación:

- Se centrifugó el medio a 5000 rpm por 10 minutos para formar una pastilla con las células.

- Se decantó el medio LB y se lavó la pastilla celular con 1mL de amortiguador de lisis celular (Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, MgCl₂ 3 mM Y EDTA 1 mM), se resuspendió la pastilla en 20 mL de amortiguador de lisis celular.
- Se sonicaron las células (10 repeticiones de 30 segundos) en 15 mL de amortiguador de lisis celular adicionado con inhibidor de proteasas completetm.
- Se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos y se colectó el sobrenadante.
- El sobrenadante anterior se filtró por una membrana de 65 µm de la marca millipore.

7.2.15 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante dos métodos: la técnica de Bradford y por absorción a 280 nm.

Para la técnica de Bradford se empleó el reactivo de la marca comercial Bio-Rad Quick StartTM Bradford Protein Assay. Se realizó el ensayo en una placa de Elisa, usando una curva patrón de BSA en un rango de 0 a 64.8 µg de proteína en un equipo de Elisa “ Bio-Rad Benchmark”. La determinación proteica se efectuó usando la A₅₉₅ de la muestra (50µL) diluida en el reactivo Bio-Rad Quick StartTM Bradford Protein Assay (200 µL).

Para la técnica de Absorción a 280nm se midió la A₂₈₀ de la muestra (Proteína purificada) y usando el coeficiente de absorción molar se calculó la cantidad de proteína pura.

7.2.16 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Para realizar la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se prepararon geles de poliacrilamida, cuya composición se describe en la tabla 11.

Tabla 11. Composición de gel de poliacrilamida.		
Disolución	Gel apilador (mL)	Gel separador(mL)
30% Acrilamida, Bis-Acrilamida 0.8%	0,67	4
Amortiguador para gel apilador ¹	1.25	0
Amortiguador para gel separador ²	0	2.5
Agua	3.05	3.44
Desgasificar la disolución con vacío por 10 minutos		
TEMED	0.01	0.01
Persulfato de amonio 10%	0.1	0.2
Volumen final	5	10

¹ 0.25M Tris HCL pH: 6.8, 0.2% SDS, Urea 6M

² 0.75M Tris HCL pH: 8.8, 0.2% SDS, Urea 6M

El gel se prepara entre dos placas de vidrio y se corre a 70 mV (Aproximadamente a 100mA) por un período de dos a tres horas. Posteriormente, se retira el gel de entre los vidrios, se lava con agua destilada y se revela por inmersión en solución de azul de Coomasie (Coomasie R250 0.05% en metanol:acético:agua, 5:1:5). Se destiñe en una disolución de ácido acético al 7% (v/v). Una vez desteñidos los geles pueden conservarse en una disolución de ácido acético al 5 % (v/v).

7.2.17 Purificación en Glutathione Sepharose™ y Benzamidine Sepharosa™

- Se equilibró una columna de Glutathione Sepharosa™ con amortiguador de lisis (Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, MgCl₂ 3 mM Y EDTA 1 mM).
- Se hizo pasar por la columna el extracto proteico obtenido en la sección 7.2.14 a un flujo de 1 mL por minuto, con lo cual la proteína de fusión AtPPa1-GST quedó en la fase estacionaria.

- Se lavó la columna con 100 mL de amortiguador de lisis y, posteriormente, se eluyó con amortiguador de lisis adicionado con 15 mM de glutatión reducido. Se monitoreó con UV cada eluato y se dejó de recolectar cuando no se observó medición a 280 nm. Se midió actividad y se comprobó la pureza de la proteína con un gel de electroforesis SDS-PAGE.
- Se midió la cantidad de proteína con el método de Bradford (sección 7.2.14) y se adicionó trombina a la proteína de fusión (AtPPa1-GST), 10 U de trombina por cada miligramo de proteína de fusión (AtPPa1-GST) y se incubó la reacción por 12 horas, a 25 °C.
- Se adicionó el extracto proteico con NaCl 0.5 M y, posteriormente, se agregaron 40 µL de benzamidine sepharosa. Se incubó por una hora con agitación constante, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se volvió a agregar benzamidine sepharosa (20 µL) y se incubó por 30 minutos a 25 °C, se centrifugó y retiró el sobrenadante una vez más, para asegurarse de que toda la trombina había sido retirada. Finalmente, se adicionó benzamidina 1 mM para prevenir cualquier actividad de proteasa.
- Se desaló la proteína usando ultrafiltración, centrifugando la disolución en un centricon con un tamaño de malla de 10 kD, a 3 500 rpm un total de seis veces, cinco minutos cada una, con lo que se retiró el glutatión, el NaCl y se concentró la muestra a un volumen aproximado de 1 mililitro.
- Posteriormente, se retiró la disolución de proteína del centricon y se colocó en un tubo Eppendorff de 1.5 mL, ahí se agregó Glutathione Sepharose™ (60µL) y se incubó a 25°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó brevemente y se retiró el sobrenadante colocándolo en otro tubo Eppendorf. Con este paso de purificación se consigue quitar la GST y conservar únicamente la proteína de interés.
- Finalmente, se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE para comprobar la integridad y pureza de la proteína.

7.2.18 Medición de actividad pirofosfatasa

La medición de actividad se llevó a cabo determinando la cantidad de Pi liberado a partir del PPI por minuto, el ensayo se realizó en placas multipozo de 12 x 8 pozos, tipo ELISA. La muestra a la que se le medirá actividad se diluye en un volumen de amortiguador de ensayo, Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, con concentraciones variables de sustrato MgPPI. La mezcla se incuba por un periodo de 5 a 30 minutos (según el nivel de actividad esperada) y se detiene la reacción con 0.2 mL de reactivo de verde de Malaquita (RVM). Todo el material empleado debe ser de plástico nuevo, o bien haberse lavado con ácido nítrico (libre de fosfatos) al 10%, enjuagando luego con abundante agua desionizada.

Para la preparación del (RVM), se requieren las siguientes disoluciones: RVM-A: 0.45% de verde de Malaquita en HCl 2M, dejar reposar por 24 horas; RVM-B: 12.4% de Molibdato de Amonio en HCL 6M y RVM-C: 4M NaCl con 3% de Brij 35. Antes de realizar el ensayo se mezclan 2 mL de RVM-A, 1mL de RVM-B, 9 mL de H₂O y al final 1 mL de RVM-C.

Después de la adición del reactivo de verde de Malaquita, la placa multipozo es incubada de 5 a 10 minutos y se lee la absorbancia con un filtro de 595 nm en un lector de placas de Elisa "Bio-Rad Benchmark".

Para determinar la cantidad de fosfato producida se prepara una curva patrón, utilizando una disolución 0.1mM de Fosfato de Sodio monoácido Na₂HPO₄. Dicha disolución se diluye para obtener cantidades variables de Pi, desde 0.2 nmoles hasta 20 nmoles en 25 µL, esta disolución se mezcla con 25 µL de amortiguador de ensayo y 200 µL de RVM.

7.2.19 Isotermas de inhibición por Ca²⁺

Cada determinación cinética se realizó a una temperatura constante de 25°C en un volumen total de 100 µL, en un medio de reacción constituido por Tris 0.1M pH 7.5 EDTA 0.1mM y concentraciones variables de Mg²⁺ Ca²⁺ y PPI. Los tiempos para cada determinación variaron desde 5 minutos hasta 180 minutos, según se requiriese para generar la respuesta adecuada. El Mg²⁺ total varió desde 350µM hasta 2.5mM, el PPI total varió de 1600µM a 8 µM y el Ca²⁺ total varió de 0 a 200

μM , en total se realizaron 32 mediciones cinéticas, cada una a diferentes tiempos de reacción y con sus triplicados. Los experimentos presentados se repitieron dos veces en forma independiente.

Para cada determinación cinética se realizó un ensayo de punto final, se inicia la reacción al agregar la enzima a un medio con una cantidad calculada para que la reacción transcurra en alguna de las condiciones descritas en la tabla 12. Se deja transcurrir la reacción por un tiempo determinado y se detiene al agregar reactivo de verde de Malaquita en H_2SO_4 6M esto se hace por triplicado para cada condición y tiempo de reacción. Posteriormente, se calcula la cantidad de Pi producida según lo descrito en la sección 7.2.17. cada medida se realiza a 3 tiempos, más un blanco, el cual se hace deteniendo la reacción antes de agregar la enzima ($t=0$). Para el cálculo de la velocidad de reacción, se usa la pendiente de la gráfica $[\text{PPi}]$ hidrolizado vs. tiempo de reacción.

Las concentraciones de las especies libres y complejos en equilibrio químico múltiple en disolución, se calcularon usando el programa Metal Complex (Rodríguez-Sotres 1990). Para este cálculo se consideraron las constantes de estabilidad global reportadas en la tabla 12.

Tabla 12 . Constantes de estabilidad global usadas para el cálculo de las concentraciones analíticas.

Complejo	Constante	Unidades	Referencia
PPiMg ²⁻	7.76x10 ²	mM ⁻¹	(Volk S E et al. 1982)
PPiHMg ⁻	5.12x10 ⁶	mM ⁻¹	(Volk S E et al. 1982)
PPiMg ₂ ⁰	3.89x10 ²	mM ⁻¹	(Volk S E et al. 1982)
PPiH ₂ Mg ⁰	3.89x10 ⁸	mM ⁻¹	(Volk S E et al. 1982)
PPiCa ²⁻	2.4547x10 ²	mM ⁻¹	Volk S E et al. 1982)
PPiHCa ⁻	2.6915x10 ⁶	mM ⁻¹	Volk S E et al. 1982)
PPiNa ³⁻	1x10 ⁻²	mM ⁻¹	(Lambert S M, Watters J I 1957)
PPiHNa ²⁻	4.1687x10 ³	mM ⁻¹	(Lambert S M, Watters J I 1957)
PPiNa ₂ ²⁻	4.68x10 ⁻⁴	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
PPiH ³⁻	1.2882x10 ⁶	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
PPiH ₂ ²⁻	3.0903x10 ⁹	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTAH ³⁻	2.19x10 ⁷	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTAH ₂ ²⁻	3.162x10 ¹⁰	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTANa ³⁻	5.01x10 ⁻²	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTAMg ²⁻	3.98x10 ⁵	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTAHMg ⁻	3.98x10 ⁹	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTACa ²⁻	5.42x10 ⁷	mM ⁻¹	(Rodriguez-Sotres, R.,Munoz-Clares, R.A. 1990)
EDTAHCa ⁻	8.2035x10 ⁷	mM ⁻¹	Maxchelator

7.2.20 Modelado y refinamiento de la estructura

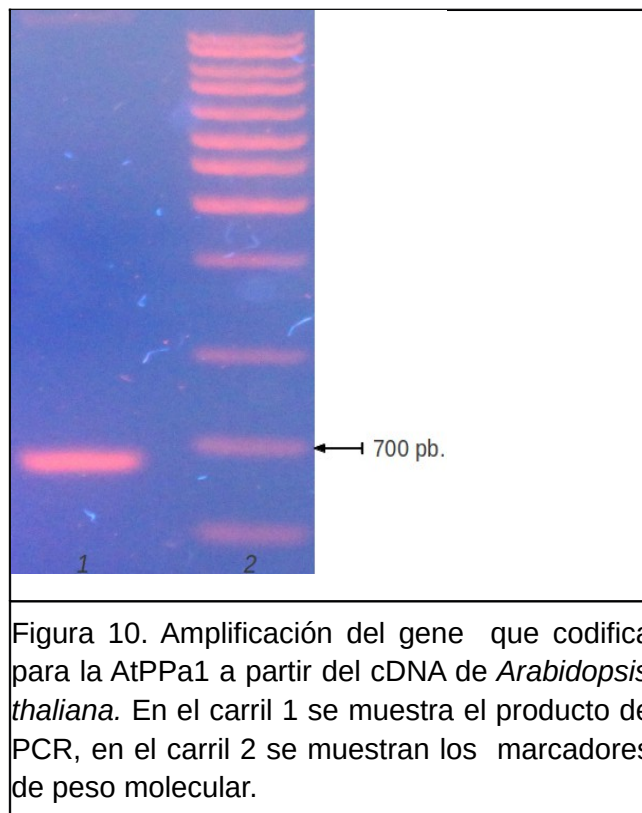
Los archivos de PDB 1UDE y 1E9G presentaron mayor semejanza de secuencia con las siPPiasas de *Arabidopsis thaliana* (AtPPa1 a la 6). Dichos archivos se sometieron al protocolo Rd.HMM (Martínez-Castilla y Rodríguez-Sotres, 2011), buscando en la RefSeq (NCBI). El Rd.HMM derivado de 1UDE recuperó las

secuencias de AtPPa1 a la 5 y el Rd.HMM de 1E6G recuperó a la AtPPa6 (la calificación fue baja pero significativa, E-value < 0.01; tabla 1). El alineamiento de Rd.HMM se alimentó a MODELLER 9v4 y se generaron 50 modelos. Los 50 modelos fueron calificados con Rd.HMM y se escogió el modelo con calificación más alta, menor valor-E y mejor alineamiento para su propia secuencia. Las calificaciones fueron pobres, por defectos en el alineamiento entre la secuencia y el plegamiento. El nuevo alineamiento Rd.HMM se empleó para una segunda ronda en MODELLER 9v4 y se calificaron como antes. El mejor modelo resultó con calificaciones más altas y su alineamiento sin huecos o corrimientos del marco de lectura. Estos modelos fueron relajados mediante simulaciones de Dinámica Molecular, (MD) a 313 K, por espacio de 5 a 10 ns, con solvente explícito y 0.15 M NaCl (GROMACS/ff:GROMOS53a6). Los confórmeros del último ns de MD se agruparon (algoritmo Jarvis-Patrick). El confórmero representativo del grupo más poblado se minimizó y se calificó de nuevo con Rd.HMM. La MD y la calificación se repitió hasta que la calificación ya no mejoró.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención del inserto de interés

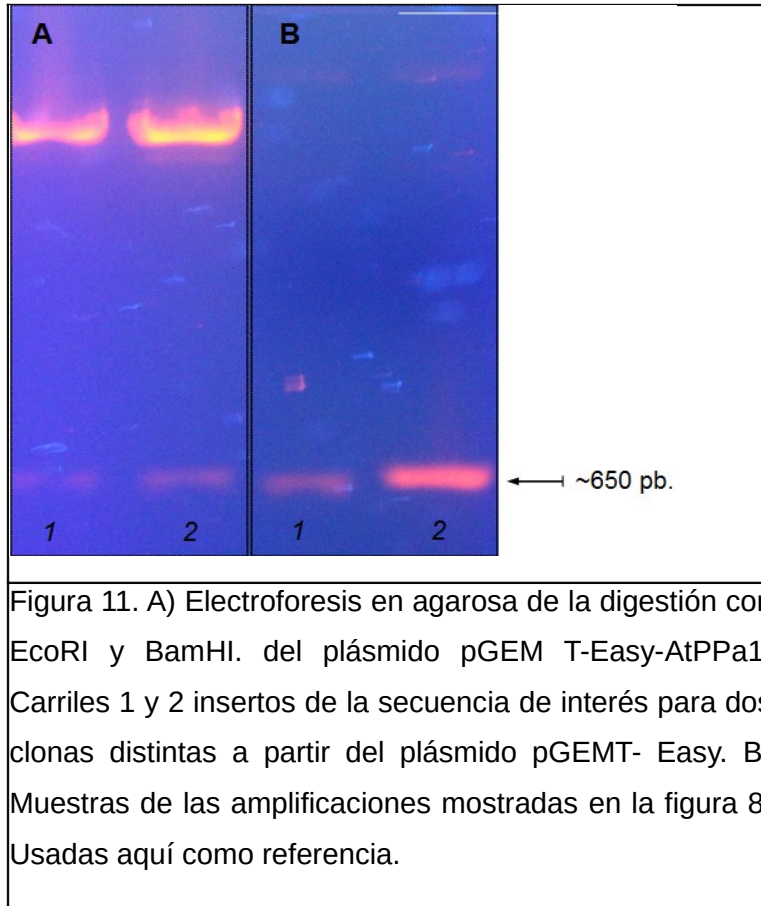
A partir del cDNA sintetizado, se obtuvo el inserto de interés por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos específicos para el gene a clonar. La técnica usada y los oligonucleótidos empleados se describen en la sección 7.2.3. Posteriormente, para visualizar los productos se realizó una electroforesis en agarosa al 1% y se reveló con una disolución de bromuro de etidio, según lo descrito en la sección 7.2.4.



Se observa la banda del gen amplificado en el peso molecular esperado (~650 pb). Se cortó la banda correspondiente al inserto de interés de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.5., se purificó el ADN de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.9. y se llevó a cabo una ligación en el vector pGEM T-Easy de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.7.

8.2 Digestión del inserto de interés del vector pGEMT- Easy

Una vez que el inserto se encontró clonado en el vector pGEM T-Easy, se cultivó un inóculo de una colonia transformante. Posteriormente, se le extrajo plásmido de acuerdo a lo descrito en 7.2.9 y se sometió a una digestión de con las enzimas EcoRI y BamHI, con lo cual se generan los sitios para la ligación en el vector pGEX-4t-2, de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.10. Se realizó una electroforesis de agarosa con el fin de observar los fragmentos liberados.



Se recortaron las bandas del inserto liberado y se purificaron de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.5. Se liofilizó el producto obtenido y se re suspendió en 10 μ L de agua, posteriormente se determinó su concentración de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.6. La absorbancia obtenida y su correspondiente concentración se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones del inserto y digerido con BamHI y EcoRI			
Muestra	A ₂₆₀	Concentración	Volumen necesario para 50 ng.
Inserto AtPPa1	0.013	19.5 ng/μL	2.6 μL

8.3 Digestión del vector pGEX-4t-2

Se digirió el vector pGEX-4t-2 de acuerdo a lo descrito en 7.2.10. Se realizó una electroforesis de agarosa al 1% y se purificó la banda correspondiente al vector; al cual, se le determinó su concentración, se liofilizó y, posteriormente, se resuspendió en 10 μL de agua desionizada y estéril., Posteriormente, se determinó su concentración de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.6. La absorbancia obtenida y su correspondiente concentración se encuentran en la tabla 14.

Tabla 14. Concentración del vector pGEX-4T-2 digerido con las enzimas BamHI y EcoRI.			
Muestra	A ₂₆₀	Concentración	Volumen para ligación.
Vector pGEX-4T-2	0.038	57 ng/μL	0.8 μL

8.4 Ligación del inserto en el vector pGEX-4t-2

Para la construcción del DNA codificante para la proteína de fusión, se llevó a cabo una ligación entre el vector pGEX-4t-2 y el inserto de acuerdo a lo descrito en 7.2.11. Una vez realizada la ligación se transformaron bacterias JM109 de acuerdo a la sección 7.2.8. Se cultivó un inóculo de una colonia hasta una DO de 1 en medio LB líquido adicionado con ampicilina y se purificó plásmido conforme se indica en la sección 7.2.6; con este plásmido se realizó un PCR (sección 7.2.3) y, posteriormente, se realizó una electroforesis en agarosa al 1% para comprobar la integridad del inserto (Figura 12).

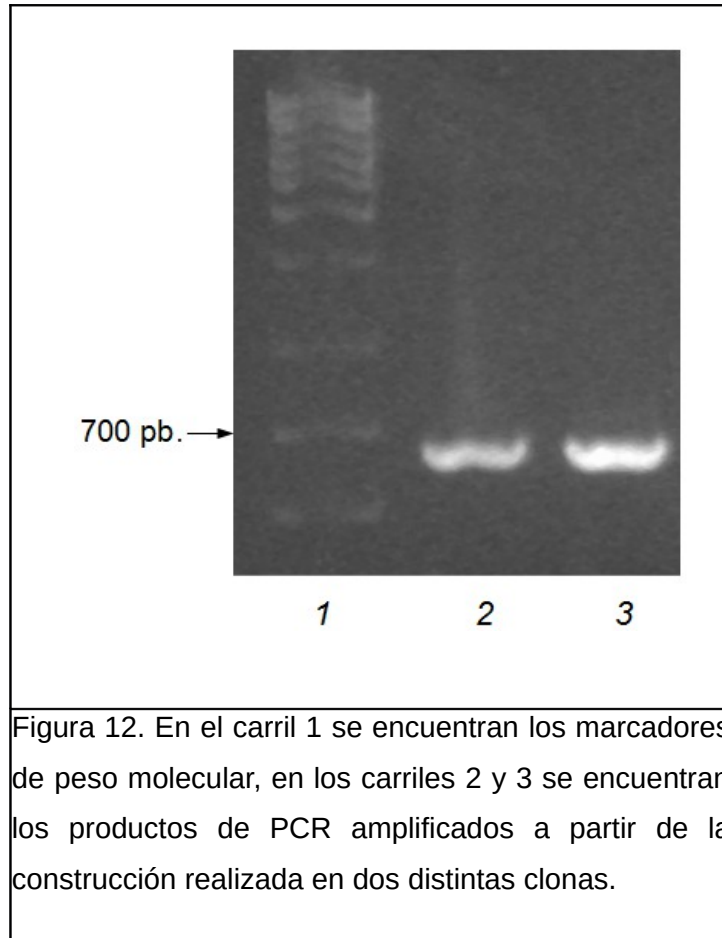


Figura 12. En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se encuentran los productos de PCR amplificados a partir de la construcción realizada en dos distintas clonas.

Como se puede ver en la figura 12, los iniciadores específicos para el gen de interés amplificaron un producto del tamaño esperado ≈ 650 pb, con lo que se comprueba que el inserto de interés se encuentra en el vector. Posteriormente, se secuenció la construcción de acuerdo a lo descrito en 7.2.12. En la figura 11 se muestra el resultado de la secuenciación.

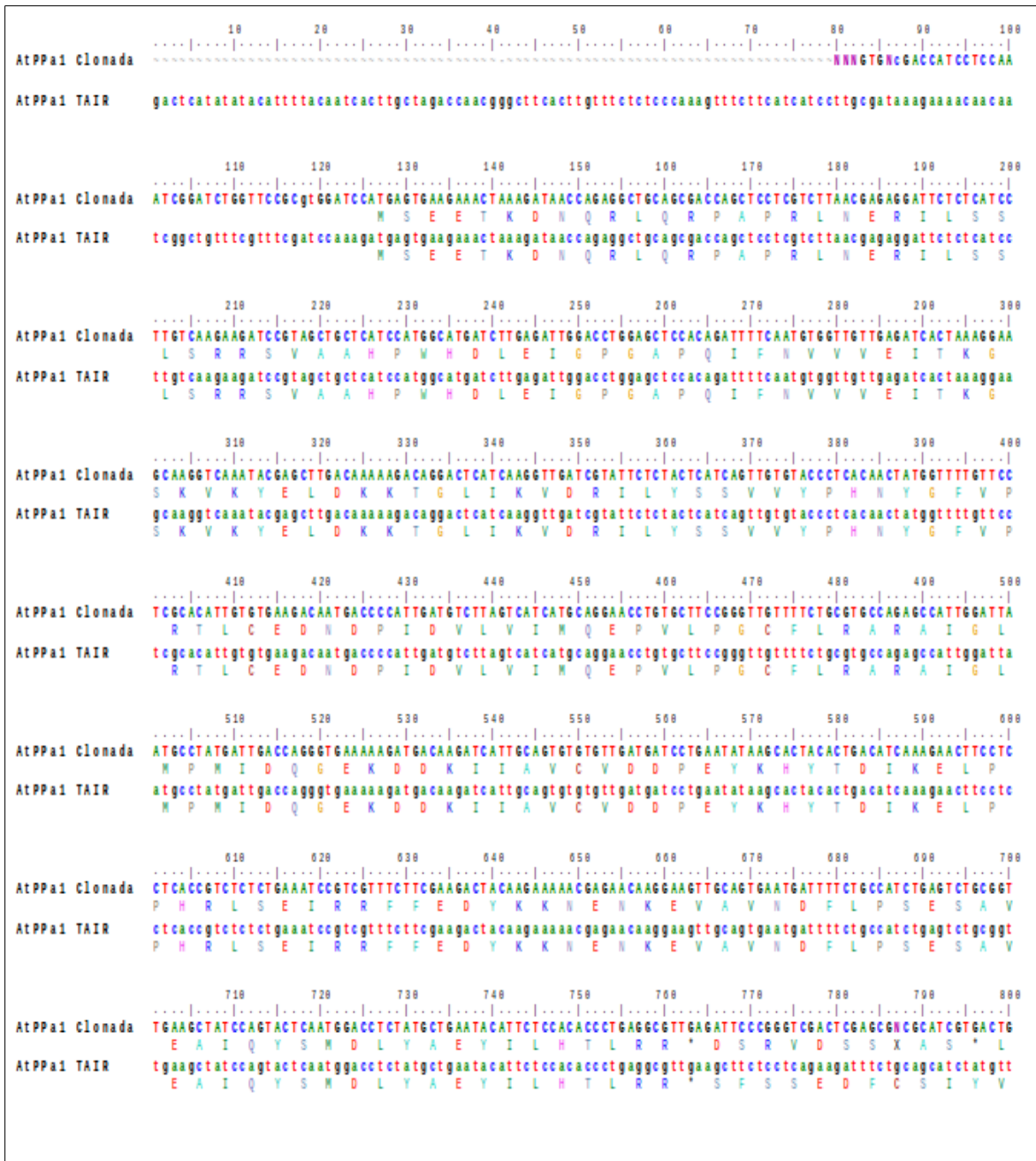


Figura 13. Alineamiento que muestra el resultado de la secuenciación (AtPPa1 Clonada) comparando con la secuencia teórica (AtPPa1 TAIR), debajo de cada secuencia se encuentra la traducción correspondiente.

Como se observa en la figura 13, el gen clonado tiene una identidad del 100% al gen reportado en TAIR, además de que los codones antecedentes (correspondientes al dominio carboxilo terminal de la GST), vienen en fase con los codones de la proteínas AtPPa.

8.5 Inducción de la expresión de la proteína

Se indujo la expresión de la proteína recombinante en células *E. coli* BL21 DE3, de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.12. Se extrajo la proteína soluble de dichas células, de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.13 y se realizó una electroforesis SDS PAGE, para comprobar la producción de proteína recombinante (Figura 14).

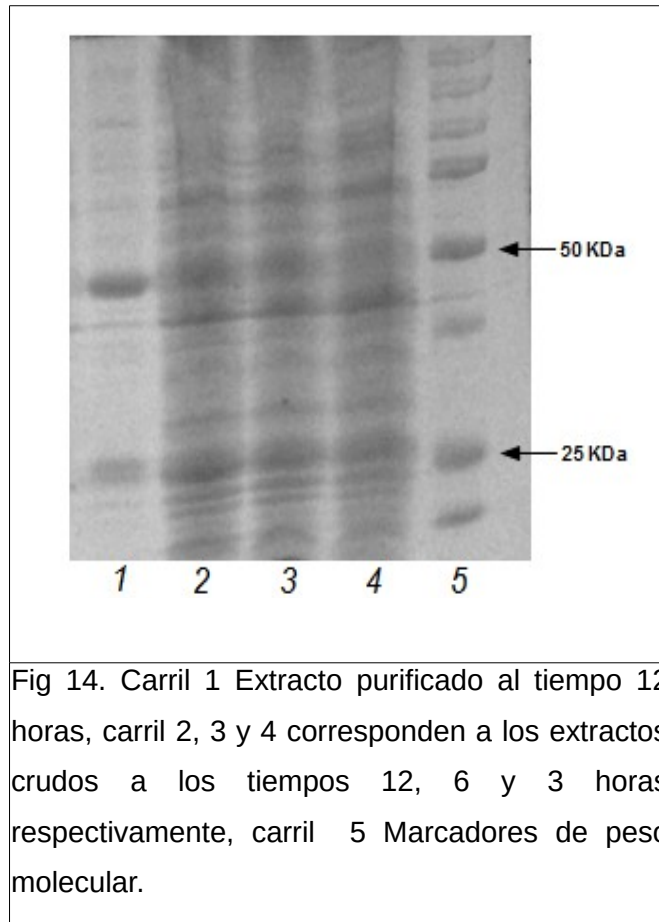


Fig 14. Carril 1 Extracto purificado al tiempo 12 horas, carril 2, 3 y 4 corresponden a los extractos crudos a los tiempos 12, 6 y 3 horas respectivamente, carril 5 Marcadores de peso molecular.

Como se observa en la figura, a medida que transcurre el tiempo existe un aumento en la banda señalada en un peso aproximado de 50kDa. En el carril uno se contempla el mismo extracto después de un proceso de purificación con resina de afinidad (sección 7.2.16), el cual necesitó optimizarse pues se obtuvieron muchas bandas contaminantes, pero el hecho de encontrar la banda esperada en un peso molecular de 50 kDa, indica la presencia de la proteína de fusión.

8.6 Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad

Con el fin de purificar la proteína recombinante, se llevó a cabo una purificación en columna, usando la resina de afinidad Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.16. Se realizó una electroforesis SDS PAGE para verificar la integridad de la proteína de fusión y una isoterma de saturación para medir su actividad.(figuras 15 y 16 respectivamente).

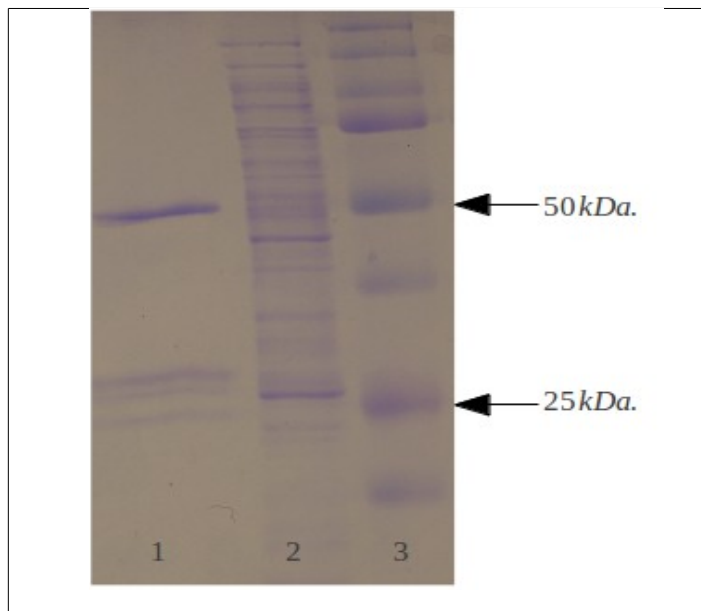
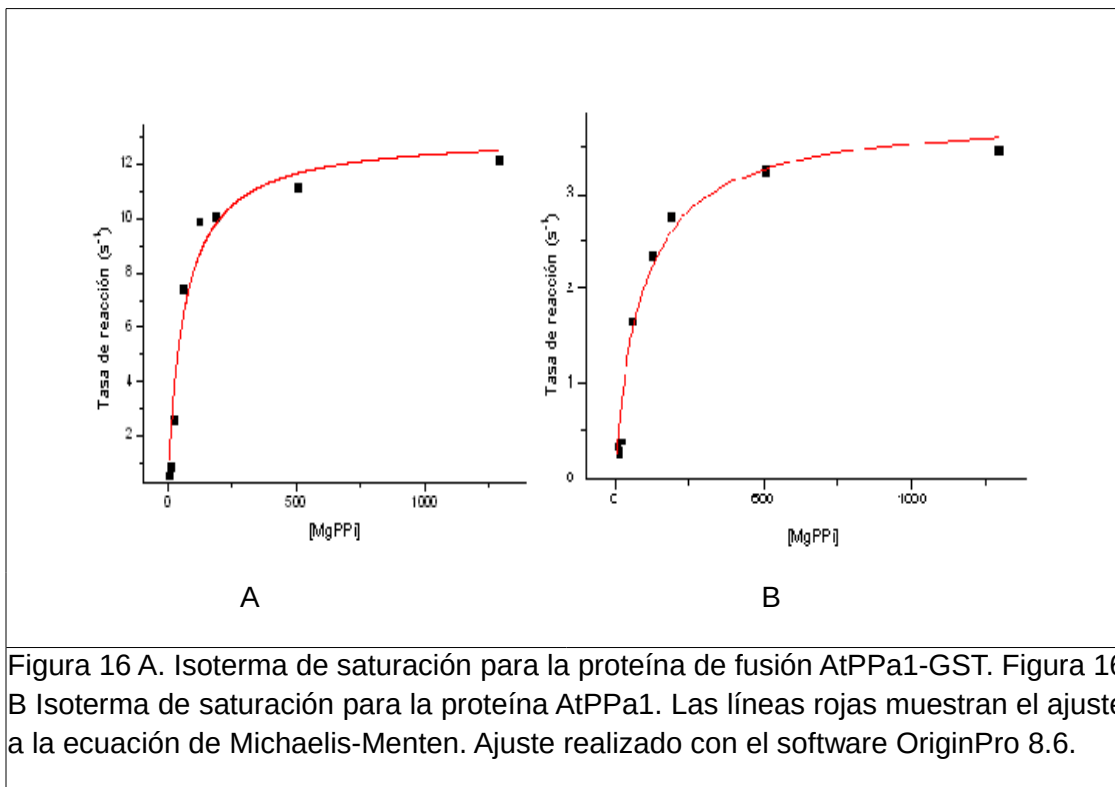


Figura 15. Electroforesis SDS PAGE. En el carril 1 proteína eluida de la columna con amortiguador de elución, en el carril 2 el extracto crudo antes de la purificación, en el carril 3 los marcadores de peso molecular.

En la figura 15 se observa que la proteína de fusión con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa eluye de la columna de afinidad, al hacer pasar por ésta, amortiguador adicionado con glutatión. Además, se observan otras bandas contaminantes menos intensas, la más importante con una masa moleculares alrededor de 25 kDa.



En la Figura 16 se muestra una cinética de saturación para la proteína de fusión, los resultados del ajuste se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Parámetros del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten para la proteína de fusión AtPPa1-GST y AtPPa1		
Parámetro	AtPPa1-GST	AtPPa1
K_m	63,17 μM +/- 15,24 μM	91,10 μM +/- 17,94 μM
V_{max}	13,14 s^{-1} +/- 0,86 s^{-1}	3,85 s^{-1} +/- 0,22
R^2	0,96	0,97

Posteriormente, se digirió la proteína de fusión con trombina, con lo cual la proteína recombinante quedó libre de su etiqueta y usando las resinas Benzamidine Sepharosa y Glutathione Sepharose 4 Fast Flow se purificó la

proteína de interés, retirando así la trombina y la GST, el protocolo detallado se encuentra en la sección 7.2.16.

Una vez terminada la purificación, se realizó una electroforesis SDS PAGE para verificar la integridad y pureza de la proteína (Figura 17).

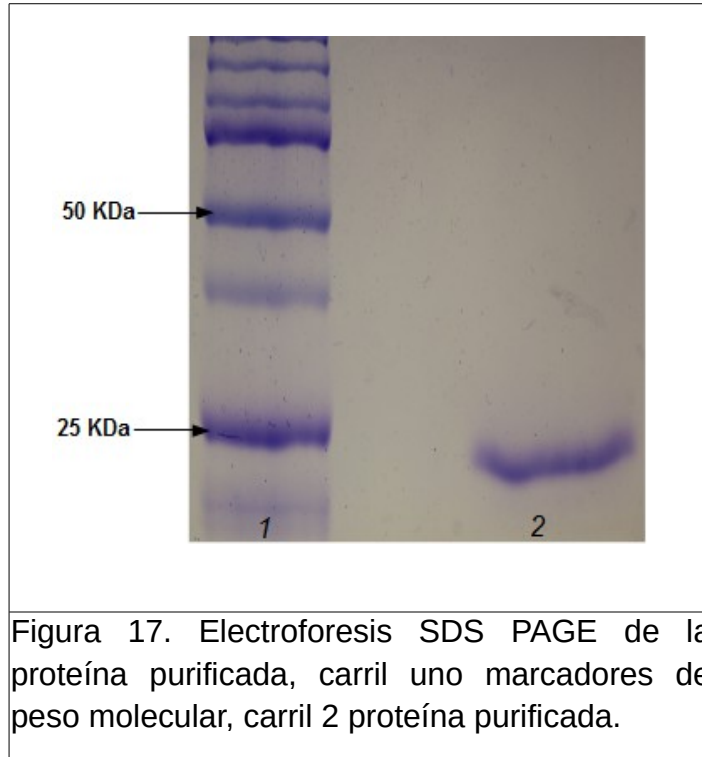


Figura 17. Electroforesis SDS PAGE de la proteína purificada, carril uno marcadores de peso molecular, carril 2 proteína purificada.

En la figura 17, en el carril 2 se observa una sola banda de un peso aproximado de ≈ 24 kDa. No se observa rastro de las contaminaciones anteriores ni de la proteína de fusión.

8.7 Isoformas de inhibición por calcio

Se realizaron las cinéticas de inhibición según lo descrito en la sección 7.2.17. Los resultados se resumen en la figura 18, en donde se grafica la velocidad de reacción en nmol de PPI/min contra la concentración analítica del complejo PPI Mg^{2+} para 4 concentraciones diferentes de Ca^{2+} total; 0 50 μM , 100 μM y 200 μM .

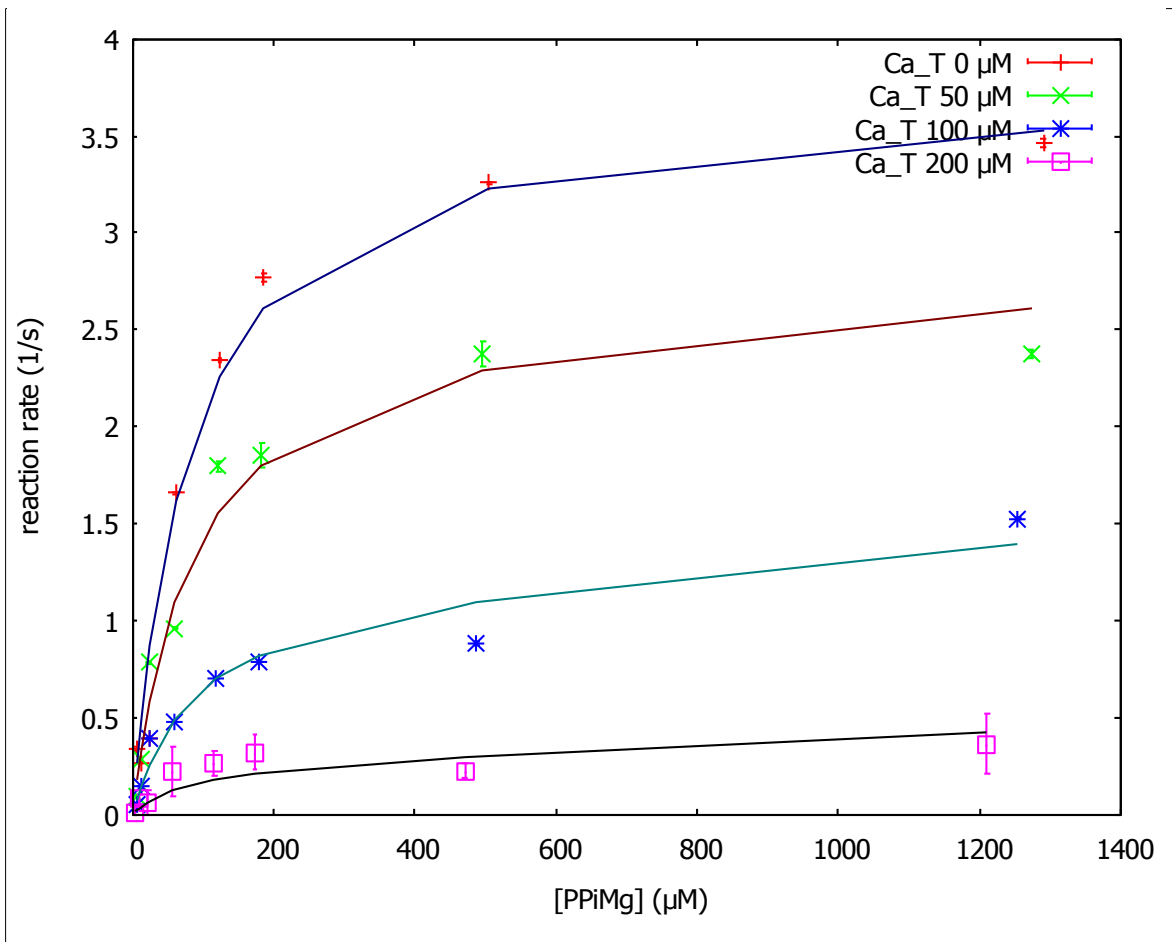


Figura 18. Cinéticas de inhibición. Se gráfica la velocidad de hidrólisis (s^{-1}) contra la concentración analítica del complejo $PPiMg^{2-}$, a cuatro concentraciones distintas de Ca^{2+} total 0 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M.

Las líneas continuas unen los resultados teóricos obtenidos mediante un ajuste no lineal basado en un modelo de inhibición general (Eq. 2), tomando como sustrato la concentración analítica del complejo $PPiMg^{2-}$ y como inhibidor la concentración analítica del Ca^{2+} .

Abreviaturas

V_{max} = Velocidad máxima

K_{iu} = Constante de inhibición acompetitiva

K_{ic} = Constante de inhibición competitiva

[I] = Concentración de inhibidor

[S] = Concentración de sustrato.

Ecuación de velocidad.

$$V_o = \frac{V_{max}[S] \left(\frac{K_{iu}}{K_{iu} + [I]} \right)}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + [S]}$$

(Eq 2. Modelo de inhibición general reversible simple)

El modelo de inhibición general reversible simple se puede ajustar tanto a una inhibición competitiva o acompetitiva y dependiendo de los resultados obtenidos es posible evaluar cuando una inhibición es mayoritariamente competitiva o mayoritariamente acompetitiva.

La ecuación 2 es una función de dos variables $V_o = f([MgPPi], [Ca^{2+}])$ es decir que dada una concentración de sustrato $[MgPPi]$ y otra de inhibidor $[Ca^{2+}]$ se calcula la velocidad inicial, pero es necesario conocer los valores K_{iu} , K_{ic} , V_{max} , y K_m . los cuales determinan que tipo de inhibición se observa.

Mediante el experimento de la sección 8.7 obtuvimos una colección de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de $[MgPPi]$ y $[Ca^{2+}]$, de manera que es posible calcular con una regresión no lineal de dos variables, los parámetros K_m , V_{max} , K_{iu} , y K_c . Esto se hace de manera totalmente análoga a una regresión lineal de una variable, por un proceso iterativo se calculan las constantes K_m , V_{max} , K_{iu} , y K_c , de manera que la función determinada por estas constantes y la ecuación 2 es la que mejor explica el conjunto de valores experimentales obtenidos, el software usado para dicha regresión fue el programa Gnuplot.

En la tabla 16 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos.

Tabla 16. Parámetros cinéticos obtenidos para la inhibición de la AtPPa1		
Parámetro	Medición	Error
$V_{max} (s^{-1})$	3,75	+/- 0.1277
$K_{iu} (\mu M)$	8,72	+/- 0,9939
$K_m (\mu M)$	81,6	+/- 8.917
$K_{ic} (\mu M)$	2,93E+007	+/- 8,983 E12

Estos parámetros son característicos de una inhibición acompetitiva porque al obtener un valor tan elevado de K_{ic} . ($2,93E+07 \mu M$) comparado con la K_{iu} ($8,72 \mu M$) el modelo de inhibición general simple (Ecuación 2) se reduce a un modelo mas sencillo, un modelo de inhibición acompetitivo. Lo anterior se ilustra matemáticamente, cuando en la ecuación 2 evaluamos el límite cuando la constante de inhibición competitiva tiende a infinito.

$$\lim_{K_{ic} \rightarrow \infty} V_o = \frac{V_{max}[S] \left(\frac{K_{iu}}{K_{iu} + [I]} \right)}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + [S]} = V_o = \frac{V_{max}[S] \left(\frac{K_{iu}}{K_{iu} + [I]} \right)}{K_m + [S]}$$

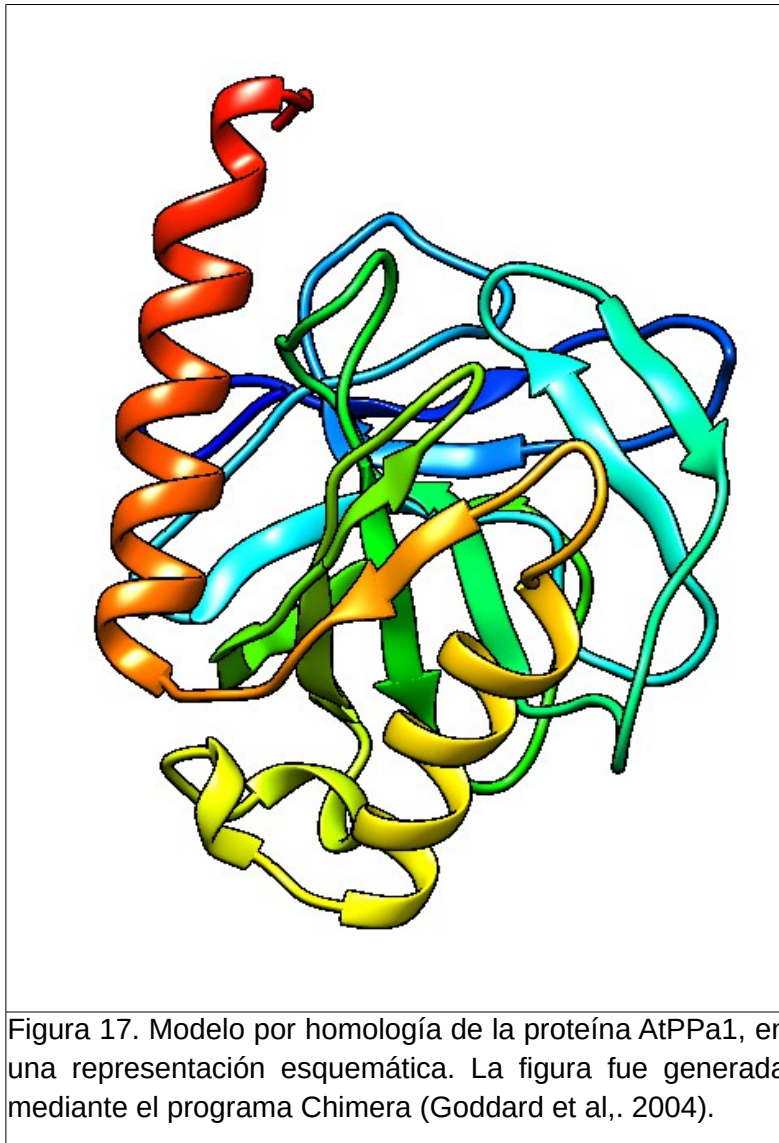
Eq. 3 Modelo de inhibición acompetitivo.

La parte izquierda de la igualdad es la velocidad inicial según el modelo de inhibición general simple, al evaluar en esta ecuación el límite cuando la constante de inhibición competitiva tiende a infinito, obtenemos el modelo de inhibición acompetitivo el cual se encuentra en la parte derecha de la igualdad.

Al repetir el ajuste con la Eq. 3, se obtienen esencialmente los mismos estimados de V_{max} , K_m y K_{iu} mostrados en la tabla 16. Cabe aclarar que los valores de V_{max} y K_m son valores aparentes, ya que la concentración de Mg^{2+} libre no se varió. Para hacer estos valores totalmente comparables con los presentados por Navarro de la Sancha y colaboradores (2007), se requeriría hacer un patrón de inhibición completo a distintas concentraciones de Mg^{2+} libre y realizar un análisis del mecanismo cinético, en forma integral. Sin embargo, este estudio se consideró, fuera del alcance de este trabajo y se deja para algún trabajo subsecuente a esta tesis.

8.8 Modelado por homología

En la figura 17 se muestra el resultado de la modelación por homología.



El modelo obtenido presentó una calificación Rd.HMM alta, equivalente al 75% de la longitud de secuencia, lo que se considera muy aceptable (Martínez-Castila y Rodríguez-Sotres, 2010), además de que el valor de Expectancia (E-val) fue altamente significativo (*i.e.* muy cercano a cero) y que la secuencia que se deseaba modelar se encuentra en la tercera posición de la lista (sp|P21216), con un score muy cercano al de la primera (sp|O48556), que corresponde a la proteína ortóloga en maíz. Además, la secuencia de la proteína empleada como molde

(1UDE, de *Pyrococcus furiosus*) aparece en la posición 15 de la lista (sp|Q8U438), con un score muy bajo (11%) y significancia estadística marginal (Eval=0.0074)

El alineamiento mostrado en la parte inferior indica la buena concordancia entre el modelo estructural de la figura 17 y la secuencia de aminoácidos de la proteína de *A. thaliana* (indicado por signos de + o letras en la línea intermedia del alineamiento), lo que cubre casi la totalidad de la secuencia, sin alteraciones del marco de lectura (huecos, que aparecerían aquí como puntos en la línea superior del alineamiento, o guiones en la línea inferior).

Todas estas son indicaciones de la buena calidad del modelo generado (Chavelas-Adame et al., 2011). Una consecuencia del modelado usando este protocolo, es que no se fuerza al alineamiento a observar concordancia estructural para los residuos del sitio activo, por lo que cabe destacar que la estructura generada presentó un alto grado de conservación estructural en el sitio activo de la proteína modelada.

El modelo también cubre la región amino-terminal, que tiene una secuencia divergente, respecto de las proteínas usadas como molde para el modelado (de *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus acidularius*), la cual descansa sobre la región que se consideraría interfacial en las proteínas bacterianas. Este dato, explica el que estas proteínas no formen oligómeros activos (Navarro de la Sancha, 2007), en contra de lo propuesto por Sivula y colaboradores (1999), con base en un modelado parcial de la AtPPa6, realizado por estos autores.

Tabla 17. Resultados de la búsqueda con el modelo de Markov oculto obtenido a partir del modelo mostrado en la Figura 17, según el protocolo Rd.HMM ((Martínez-Castila y Rodríguez-Sotres, 2011),).

```

hmmsearch - search a sequence database with a profile HMM
HMMER 2.3.2 (Oct 2003), Copyright (C) 1992-2003 HHMI/Washington University School
of Medicine, Freely distributed under the GNU General Public License (GPL)
-----
HMM file:                atppal_rlxM_a-0.hmm [atppal_rlxM_a-0]
Sequence database:       uniprot_sprot.fasta
score cutoffs: per-sequence: [none], per-domain: [none], per-sequence Eval: <=
10, per-domain Eval: [none]
-----
Query HMM:  atppal_rlxM_a-0
[HMM has been calibrated; E-values are empirical estimates]
Scores for complete sequences (score includes all domains):
Sequence           Description                               Score      E-value     N
-----
sp|O48556|IPYR_MAIZE Soluble inorganic pyrophosphata  170.5      1.9e-46     1
sp|Q43187|IPYR_SOLTU Soluble inorganic pyrophosphata  167.9      1.1e-45     1
sp|P21216|IPYR2_ARATH Soluble inorganic pyrophosphata  165.0      8.8e-45     1
sp|Q0DYB1|IPYR_ORYSJ Soluble inorganic pyrophosphata  152.1      6.7e-41     1
sp|A2X8Q3|IPYR_ORYSI Soluble inorganic pyrophosphata  152.1      6.7e-41     1
sp|O23979|IPYR_HORVD Soluble inorganic pyrophosphata  150.9      1.5e-40     1
sp|Q949J1|IPYR2_CHLRE Soluble inorganic pyrophosphata   68.9      7.6e-16     1
sp|P37981|IPYR_THEAC Inorganic pyrophosphatase OS=Th   29.2      0.00066    1
sp|O59570|IPYR_PYRHO Inorganic pyrophosphatase OS=Py   27.7      0.0018     1
sp|Q6KZB3|IPYR_PICTO Inorganic pyrophosphatase OS=Pi   27.5      0.0021     1
sp|Q5JIY3|IPYR_PYRKO Inorganic pyrophosphatase OS=Py   27.2      0.0027     1
sp|P77992|IPYR_THELI Inorganic pyrophosphatase OS=Th   25.8      0.0059     1
sp|Q9UY24|IPYR_PYRAB Inorganic pyrophosphatase OS=Py   24.7      0.0072     1
sp|Q9HSF3|IPYR_HALSA Inorganic pyrophosphatase OS=Ha   24.7      0.0072     1
sp|Q8U438|IPYR_PYRFU Inorganic pyrophosphatase OS=Py   24.6      0.0074     1
Alignments of top-scoring domains:
...
sp|P21216|IPYR2_ARATH: domain 1 of 1, from 7 to 218: score 165.0, E = 8.8e-45
      *->iaaqtntssRkdqnPYPYynPddlPalaplkksnDllaersinpGlpG
      + + +          nP  +n +++ a + + + +  +++++i p p
sp|P21216|      7  EGSAKGYAFPLRNPVTLNERNFAAFTHRSAAAHPWHDLEIGPEAPT 53

      iflvvvettkGdnydykiieeqGfiillkirylnvvnPhdFGfvPRTlag
      +f vve +kG +++y++++ G+i + ++ y  +v Ph++Gf+PRT+
sp|P21216|      54 VFNCVVEISKGGKVKYELDKNSGLIKVDRVLYSSIVYPHNYGFIPRTICE 103

      yyePvkvdvisdvstlpGasvlaravGampaDdqGiKkwiiavrvqddr
      ++P++v v+ ++++l G ++ ara+G mp+ dqG K  i+av ++d +
sp|P21216|     104 DSDPMDVVLVMQEPVLTGSFLRARAIGLMPMIDQGEKDDKIIAVCADDP 153

      frwveqvlrlpPeelnkiekffrdyfyGnGnFpvdiesflPknaAikqile
      fr+  + +lpP++l +i+ff+dy n n +vd+e+flP +aAi +i++
sp|P21216|     154 FRHYRDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKKVDVEAFLEPAQAIDAIDK 203

      alqrflyilntLDk<-*
      ++ + yi+ L +
sp|P21216|     204 SMDLYAAYIKAGLQR      218

```


9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Primeramente, la clonación del gene de la isoforma 1 de pirofosfatasa de *Arabidopsis thaliana* fue un éxito como lo muestra la figura 12. En donde se observa una identidad del 100% entre el gene reportado en TAIR y el resultado de la secuenciación. Además, los residuos adicionales resultantes de la clonación son únicamente dos, por lo que esta construcción ofrece una ventaja respecto a la antes reportada (Navarro de la Sancha 2007).

En la purificación de la proteína de fusión (figura 14), se pueden observar bandas de proteína contaminante con pesos moleculares alrededor de 25kDa. Estas contaminaciones las podemos explicar con base en que la proteína de fusión puede sufrir degradación en el sitio de corte para trombina, durante la inducción o el proceso de purificación, dicha degradación puede generar un segmento de GST el cual se purifica junto con el resto de la proteína de fusión.

La hipótesis de que estas bandas contaminantes se purifican con la proteína de fusión debido a su afinidad por el glutatión, se comprueba al hacer el siguiente paso de purificación, donde la proteína de interés previamente digerida se separa de la GST, pues en este paso, se logra obtener la proteína de interés, ya pura, como se observa en la figura 17, al separarse de las demás proteínas que tenían afinidad por el glutatión.

Las cinéticas realizadas a la proteína de fusión indican que ésta se ajusta a un modelo de Michaelis-Menten, a un valor fijo de Mg^{2+} de 1.1 mM usando como sustrato el complejo MgPPi en un rango de 5 a 1500 μ M. El valor de la V_{max} , así como el de la K_m , son muy similares a los reportados anteriormente (Navarro de La Sancha 2007.) Para realizar estos ensayos fue necesario hacer el cálculo de las especies libres de disolución, tanto como de el Mg^{2+} , y del complejo MgPPi, pues esta proteína usa como activador esencial el Mg^{2+} (Navarro de la Sancha, 2007).

Una vez terminado el proceso de purificación, se observa la presencia de una sola banda de proteína en el gel de SDS, con un peso molecular que coincide con el peso teórico de 24 kDa. Ésto nos asegura que la proteína tiene un grado de pureza suficiente para un estudio cinético más detallado.

Los resultados cinéticos obtenidos con la proteína purificada indican varias cosas; en primera, nos muestran claramente el rango de inhibición en el cual esta proteína se ve inhibida por Ca^{2+} . A un valor de $100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} total, se observa una disminución de más del 50% respecto a la actividad en ausencia de inhibidor. Este dato indica que el Ca^{2+} si puede funcionar como regulador de la actividad *in vivo*, dado que la concentración citosólica total de este catión se encuentran entre 1 y $100 \mu\text{M}$ total. La inhibición *in vivo* podría ser aún más importante que la observada *in vitro*, ya que la concentración citosólica de Mg^{2+} en la célula vegetal podría estar por debajo de la que se empleó en estos experimentos.

La inhibición antes descrita, junto con el importante papel que desempeñan las pirofosfatasas en el anabolismo y la versatilidad de las células vegetales para generar patrones espacial y temporalmente distintos en los niveles de Ca^{2+} , permite plantear la hipótesis de que la inhibición por Ca^{2+} de la isoforma 1 de pirofosfatasa de *A. thaliana* regula su actividad *in vivo*.

Otro dato que salta a la vista es una disminución de la velocidad máxima cuando se quita la etiqueta en comparación a cuando la tiene de 13 s^{-1} a 3.5 s^{-1} . Esta reducción en la actividad se puede deber a que una porción de la proteína ha perdido su actividad durante el proceso de purificación, posiblemente durante la digestión con trombina, aunque también puede obedecer a que la concentración de Mg^{2+} empleada fue inferior a la concentración más alta empleada en el estudio anterior (5.1 mM ; Navarro de la Sancha et al., 2007).

Adicionalmente se observó que una vez que se retiraba la etiqueta, la proteína resultante tenía una vida de anaquel muy corta, esto puede deberse a que la proteína sin etiqueta sea menos estable y tienda a formar aglomerados, cosa que podría prevenirse por la presencia de la GST, cuando se encuentra como proteína de fusión.

Para el análisis cinético de los datos obtenidos en la sección 8.7 se manejaron como variables independientes las concentraciones analíticas de Ca^{2+} , Mg^{2+} y el complejo MgPPi^{2-} , claramente estas variables no son independientes, lo cual dificulta el estudio de su intervención en el mecanismo de reacción, pues no nos es posible preparar una disolución con cantidades arbitrarias de las especies

libres, para analizar por separado el efecto de cada especie sobre la actividad de la enzima. Por ello, el enfoque utilizado, fue preparar disoluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y pirofosfato total, y posteriormente calcular las concentraciones analíticas, por lo que los resultados obtenidos no son lineales.

Aún así, es posible evaluar las cinéticas usando una herramienta computacional de regresión no lineal y evaluar la proximidad de todos los datos obtenidos a la predicción de un modelo general de inhibición, usando como sustrato e inhibidor diferentes concentraciones de las especies libres.

Como lo indican los resultados obtenidos en la sección 8.7, el modelo de inhibición que mejor se ajusta a los datos experimentales, es un modelo de inhibición acompetitivo, al tomar como sustrato el complejo MgPPi y como inhibidor el ion Ca^{2+} . Con el fin de explicar este resultado se plantean varios modelos de inhibición que se desarrollan en detalle las ecuaciones de velocidad para cada modelo bajo la suposición del estado estacionario. Dicho estudio fue realizado por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y se encuentra como Anexo I.

Los modelos tratados muestran que los resultados obtenidos pueden explicarse en base a un modelo en donde la unión ordenada de MgPPi y Mg^{2+} promueve la catálisis, y el Ca^{2+} , forma un complejo no catalítico al unirse a la forma de la Enzima unida al sustrato (MgPPi) con la forma libre de la enzima (Sección 5, Anexo 1), modelo esquematizado en la figura 18.

La respuesta predicha de la actividad de esta enzima, bajo el modelo cinético de la figura 18, se muestran en las figuras 7 y 8 del anexo I.

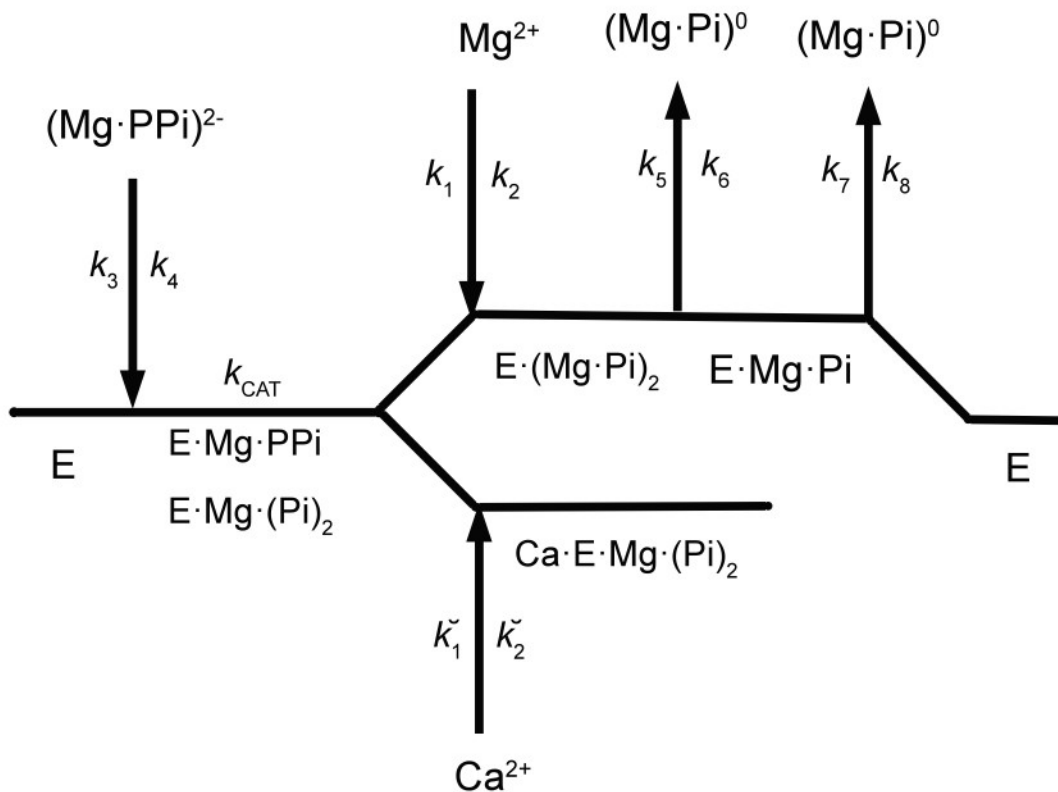


Figura 18. Esquema cinético propuesto para la hidrólisis del pirofosfato por la pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} en plantas. En este esquema la unión de complejo $MgPPI$ precede a la adición de Mg^{2+} previo a la catálisis. La unión de Ca^{2+} al complejo $EMgPPI$ formaría un complejo sin salida no productivo.

Dicho modelo supone que para que la catálisis se lleve a cabo se requiere la unión ordenada sustrato $MgPPI$, seguida de un ion Mg^{2+} previa hidrólisis del sustrato, lo cual concuerda con estudios previos (Navarro de la Sancha 2007), excepto por el orden de adición de las especies. Como se mencionó, el trabajo previo no aporta datos suficientes para determinar el orden de adición, por lo que el esquema presentado por estos autores no se contrapone al mostrado en la figura 18. En el modelo propuesto, la inhibición se provoca cuando un ion de Ca^{2+} se une a la enzima, formado un complejo $EMgPPICa^{2+}$ que no sería capaz de completar la reacción.

En el anexo I se presenta una revisión de mas modelos propuestos, primeramente se consideró un modelo en donde el Ca^{2+} competía con un Mg^{2+} previa unión del sustrato $MgPPI$. Figura 19 (ver sección 2, anexo 1). Este otro modelo cinético no

es consistente con la inhibición acompetitiva observada, ya que la ecuación correspondiente indica que el Ca^{2+} sería uninhibidor no competitivo contra MgPPi .

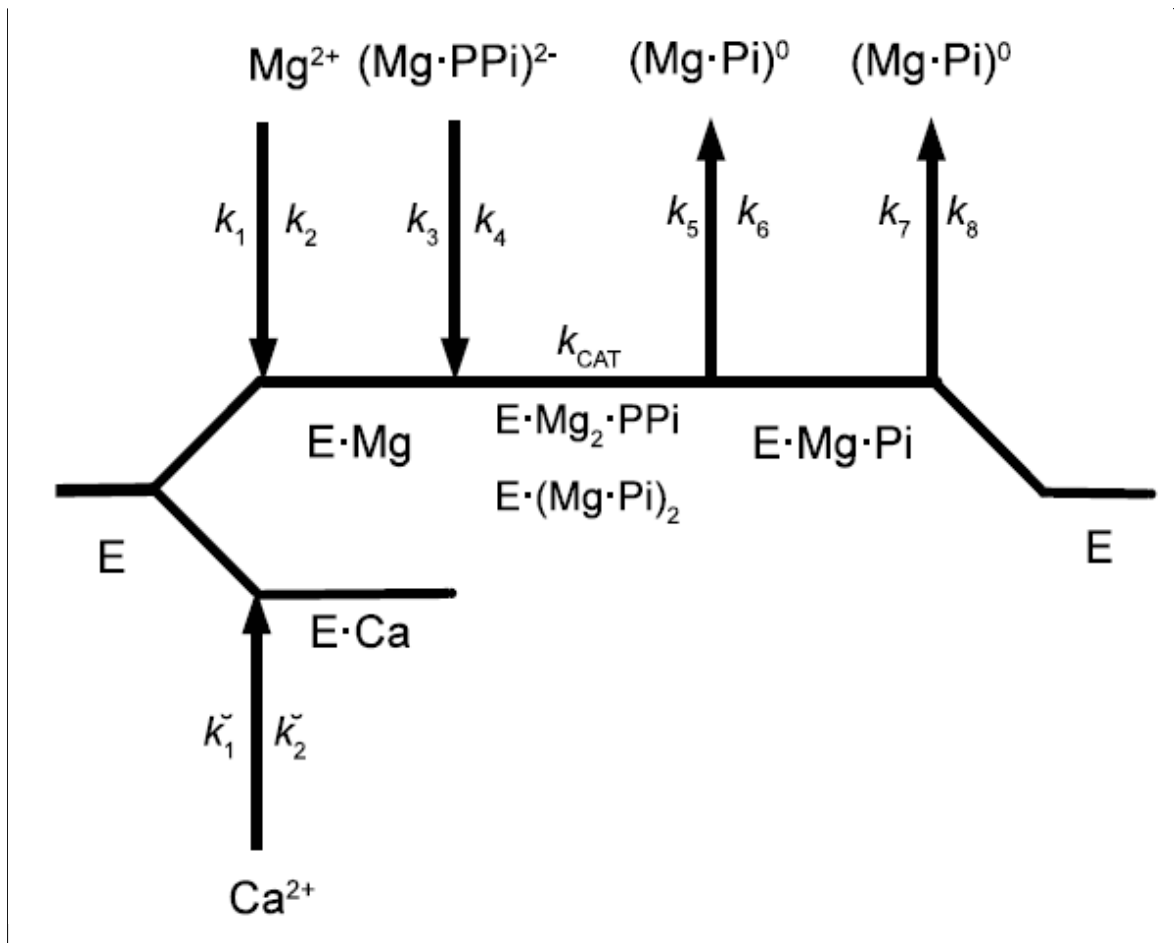


Figura 19. Esquema cinético para la hidrólisis del pirofosfato por la pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} en plantas.

En este modelo el Ca^{2+} compite por un sitio de unión con el Mg^{2+} y está de acuerdo a lo reportado previamente para las enzimas YsPPasa y EsPPasa, sin embargo no explica la inhibición acompetitiva del Ca^{2+} contra el sustrato MgPPi encontrada en este trabajo.

Además, el resultado obtenido por el ajuste, indica claramente que el componente competitivo es despreciable, por lo que que el complejo CaPPi no compite por el sitio activo con el sustrato MgPPi . Lo anteriormente descrito muestra diferencias en el mecanismo de inhibición por Ca^{2+} respecto a las enzimas EsPPasa y YsPPasa.

Un factor adicional que soporta la validez del modelo anterior es la inhibición competitiva entre el Ca^{2+} y el Mg^{2+} encontrada por Chavelas-Adame en un estudio previo (datos no publicados).

El hecho de que la enzima AtPPasa 1 tenga un mecanismo de inhibición distinto a los previamente reportados para otras enzimas homólogas es un argumento a favor para la hipótesis de que el Ca^{2+} es un regulador de estas enzimas *in vivo*, pues la inhibición por este catión, podría no ser únicamente una característica accidental *in vitro*, sino el resultado de una presión de selección debida a su función en el metabolismo, durante la evolución de estas enzimas.

10 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se consiguió la clonación de la proteína AtPPa 1 como proteína recombinante y su expresión heteróloga en células de *E. coli* y posterior purificación con resinas de afinidad.

Un análisis de su inhibición por Ca^{2+} prueba claramente que la enzima es muy sensible a este catión y que la inhibición se observa en rangos cercanos a los fisiológicos, por lo que la inhibición por Ca^{2+} podría regular la actividad de estas enzimas *in vivo*.

Se encuentra que la inhibición por Ca^{2+} en la isoforma 1 de pirofosfatasa de *A. thaliana* es incompetitiva frente al sustrato verdadero, MgPPi , por lo que un incremento en la cantidad de este sustrato no tendería a aliviar a la enzima de la inhibición, sino que la reforzaría. Por otro lado, la inhibición competitiva con Mg^{2+} , sugiere que la relación $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{Ca}^{2+}]$ puede ser el factor que determine el nivel de actividad de esta enzima *in vivo*.

El modelo cinético que explica el patrón de inhibición es diferente a los previamente reportados para las enzimas homólogas YsPPasa y EsPPasa, se propone un modelo cinético en donde la catálisis ocurre cuando se unen de manera ordenada un ion Mg^{2+} seguido por el sustrato MgPPi , y el Ca^{2+} inhibe la actividad al formar un complejo estable E-MgPi-Ca e impedir la liberación de los productos. Las diferencias en el mecanismo catalítico sugieren la existencia de

presiones evolutivas distintas para estas enzimas, entre organismos vegetales y levaduras o bacterias.

11. REFERENCIAS

ap Rees T , Green JH , & Wilson PM (1985) Pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase and glycolysis in non-photosynthetic tissues of higher plants. *Biochem J* 227(1):299-304.

ap Rees T, Morrell S (1990). Carbohydrate metabolism in developing potatoes. *Am Pot J* 6:835–847.

Alberty RA (1969). Standard Gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates. *J Biol Chem* 244:3290-302.

Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas LHW (1997) Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta* 202:220–226.

Baltscheffsky M, Schultz A, Baltscheffsky H. (1999) H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett.* 457(3):527-33.

Baykov AA, Cooperman BS, Goldman A, Lahti R. (1999) Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog Mol Subcell Biol.* 1999;23:127-50.

Bush, D.S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 95–122.

Bush, D.S., and Jones, R.L. (1988). Cytoplasmic calcium and α -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.* 46, 466–469.

Brinley, F.J., Tiffert, T., and Scarpa, A. (1977). Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ. *J. Gen. Physiol.* 70, 355.

Chavelas Adame EA , Hernández-Domínguez EE , Gaytán-Mondragón S , Rosales León L , Valencia-Turcotte L , & Rodríguez-Sotres R (2011). A Hitchhiker's Guide to the modeling of the three-Dimensional structure of proteins. *International Color Biotechnology Journal* 1(1):26-35.

Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmitter J, Blanquet S & Plateau P (1990) Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 5686–5689.

Cooperman, B.S. (1982). The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods Enzymol.* **87**, 526–548.

Cooperman BS, Baykov AA Lathi R (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* Jul; **17**: 266.

Cori GT, Ochoa S, Slein MW Cori C.F. (1951) The metabolism of fructose in liver. Isolation of Fructose-1-phosphate and Inorganic Pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* **7**: 304-17.

Dancer J , Veith R , Feil R , Komor E , & Stitt M (1990) Independent changes of inorganic pyrophosphate and the AT/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Science* **66** :59 - 63.

Davies JM, Poole RJ, Sanders D. (1993) The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for inorganic pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1993**; **1141**:29-36

David L, Michael M (2005), Principles of Bioenergetics in Lenhinger Principles of Biochemistry pp. 502-506 cap 14. W.H Freeman and Company, Inc USA.

de Graaf BH, Rudd JJ, Wheeler MJ, Perry RM, Bell EM, Osman K, Franklin FC, Franklin-Tong VE. (2006). Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature* **444**, 490–493

Drozdowicz Y.M. , Rea P.A. (2001) Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream *Trends Plant Sci.*, **6** , pp. 206–211.

Duff SMG, Moorhead GBG, Lefebvre DD, Plaxton WC (1989) Phosphate starvation inducible “bypasses” of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* **90** 1275-1278

Fabrichniy IP , Lehtiö L , Tammenkoski M , Zyryanov AB , Oksanen E , Baykov AA , Lahti R , & Goldman A (2007) A trimetal site and substrate distortion in a family II inorganic pyrophosphatase. *J Biol Chem* **282**:1422-31.

Farré E M, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethwey R N, Willmitzer L (2001) Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars,

organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol* 127:685-700

Felix R and Fleisch H (1975) Properties of inorganic pyrophosphatase of pig scapula cartilage. *Biochem* 147(1): 111–118.

Fernie AR, Willmitzer L. (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol* 127:1459–1465

Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci* 7:35–42

Flodgaard H, Fleron P (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate at pH 7.4 as a function on [Mg²⁺], [K⁺], and ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J Biol Chem* 1974; 249:3465-74.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605-16012.

Gong, M., Van de Luit, A.H., Knight, M.R., and Trewavas, A.J. (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular Ca²⁺ level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol.* 116, 429–437.

Gómez García M R., Losada M, Serrano A (2006) A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *Biochem J* 395: 211-221.

Gorman A. L. F. and Thomas M. V. (1980) Potassium conductance and internal calcium accumulation in a molluscan neurone *Physiol J.* 308, 287-313.

Gross P. and ap Rees T. (1986), Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* 167:140-145

Guynn RW, Velos D, Lawson JW Veech RL (1974) The concentration and control of cytoplasmic free inorganic pyrophosphate in rat liver *in vivo*. *Biochem J* 140:369-75.

Hajirezaei M , Sonnewald U , Viola R , Carlisle S , Dennis D , & Stitt M (1993) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* 192:16-30.

- Heinonem J K (2001)** Biological role of inorganic pyrophosphate Kluwer Academic Publishers. Pp 2-10.
- Huang S , Colmer TD , & Millar AH (2008)** Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPI? Trends Plant Sci 13 :221-7.
- Huang H , Patskovsky Y , Toro R , Farelli JD , Pandya C , Almo SC , Allen KN , & Dunaway-Mariano D (2011)** Divergence of structure and function in the haloacid dehalogenase enzyme superfamily: *Bacteroides thetaiotaomicron* BT2127 is an inorganic pyrophosphatase. Biochemistry 50 :8937-49.
- Igamberdiev AU & Kleczkowski LA (2011)** Magnesium and cell energetics in plants under anoxia. Biochem J 437:373-9.
- Josse J Wong SCK (1971)** Inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. In: Boyer PD (ed) The enzymes, 3rd edn, vol. 4. Academic Press, New York, pp 499–527.
- Klemme JH, Klemme B, Gest H (1971)** Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatase from photosynthetic bacteria. J Bacteriol 108: 1122–1128
- Knight H. Knight M.R. (1996)** Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis* Exp Botany J. 51, 1679- 1686.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997).** Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. Plant J. 12, 1067–1078.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1991).** Transgenic plant aequorin reports the effects of cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature 352, 524–526.
- Kolakowski LF, Jr, Schloesser M, Cooperman BS. (1988).** Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 16(22):10441–10452.
- Kornberg, A. (1962).** In Horizons in Biochemistry, Ed. by Kasha, M. & Pullman, B. New York: Academic Press Inc. pp 251.
- Kruger NJ (1997)** Carbohydrate synthesis and degradation. In: Dennis D, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (eds) Plant metabolism. Addison Wesley Longman, Harlow, pp 83–104.

Kuhn Nicholas J., Ward Simon. (1998), Purification, properties and multiple forms of a Manganese activated Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. Biophys; 354:1; 47-56.

Kurilova SA, Bogdanova AV, Nazarova TI, Avaeva SM (1984) Changes in *E. coli* inorganic pyrophosphatase activity on its interaction with magnesium, zinc, calcium and fluoride ions. Bioorg Khim 10. 1153–1160 .

Lambert S M, Watters J I (1957). The Complexes of Pyrophosphate Ion with Alkali Metal Ions Journal of the American Chemical Society 79:4262-4265.

Lara-Núñez A & Rodríguez-Sotres R (2004) Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for -malate in non-photosynthetic plastids from developing maize embryos. Plant Science 166:1335 - 1343.

Lathi, R., Pitkaranta, T., Valve, E., Iita, I., Kukko-Kalske, E. and Heinonen, J. (1988) Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 170, 5901-5907.

Lahti R, Kolakowski LF, Jr, Heinonen J, Vihinen M, Pohjanoksa K, Cooperman BS. (1990). Conservation of functional residues between yeast and *E. coli* inorganic pyrophosphatases. Biochim Biophys Acta. 1038(3):338–345.

Lee HS , Cho Y , Kim Y , Lho T , Cha S , Lee J , & Kang SG (2009) A novel inorganic pyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1. FEMS Microbiol Lett 300: 68-74.

Mitchell S. J., Michael F. M. (1997) Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from *Bartonella bacilliformis* *Canadian Journal of Microbiology*, 43(8): 734-743.

Margulis L (1981) Symbiosis in cell evolution. WH Freeman, San Francisco.

Martínez-Castilla LP & Rodríguez-Sotres R (2010) A score of the ability of a three-dimensional protein model to retrieve its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness. PLoS One 5:e12483.

May A , Berger S , Hertel T , & Köck M (2011). The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPsPase1* encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. Biochimica et Biophysica Acta 1810:178 - 185.

Maxchelator <http://maxchelator.stanford.edu/xlsconstants.htm> 04/03/13

McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M. (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signaling systems. Trends Plant Sci. 3, 32–36.

- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C., and James, M.N.G. (1991).** Calcium-binding sites in proteins: A structural perspective. *Adv. Prot. Chem.* 42, 77–144.
- Miller, A.J., Vogg, G., and Sanders, D. (1990).** Cytosolic calcium homeostasis in fungi: Roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9348–9352.
- Mustroph A, Albrecht G, Hajirezaei M, Grimm B, Biemelt S. (2005)** Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing E.coli pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Ann Bot* 96:717–726.
- Navarro de la Sancha E., Coello-Coutiño M. P., Valencia-Turcotte L. G., Hernández-Domínguez E. E., Trejo-Yepes G, Rodríguez-Sotres R. (2007)** Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 172(4) 796–807.
- Owen A., Moe and Larry G. Butler (1972)** Kinetics of Ca^{2+} inhibition. *Biochem. J* Vol. 247: 7315-7319.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1994).** Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301–1310.
- Plaxton WC (1996)** The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185-214.
- Rex M. C. Dawson, Daphne C. Elliott, William H. Elliott (1989).** Data for Biochemical Research Clarendon Press.
- Rodina E.V., Samygina V.R., Popov A.N, Vorobyeva N.N., Lamzin V.S., Polyakov K.M., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Avaeva S.M. (2001).** The structures of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with Ca^{2+} or CaPP_i at atomic resolution and their mechanistic implications. *Mol. Bio J* 314(3) 633-645.
- Rodriguez-Sotres, R., Munoz-Clares, R.A. (1990).** Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 276:180-190.
- Ross H, Davies HV, Burch LR, Viola R, McRae D. (1994).** Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plantarum* 90:748–756.

- Samygina V.R., Moiseev V.M, Rodina E.V., Vorobyeva N.N., Popov A.N., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Awaeva S.M., Bartunik H.D. (2007).** Reversible Inhibition of *Escherichia coli* Inorganic Pyrophosphatase by Fluoride: Trapped Catalytic Intermediates in Cryo-crystallographic Studies Mol. Bio. J 366 (4), 1305–1317.
- Sanders D, Colin Brownlee, and Jeffrey F. Harper (1999).** Communicating with Calcium The Plant Cell 11: 691–706.
- Shacklock, P.S., Read, N.D., and Trewavas, A.J. (1992).** Cytosolic free calcium mediates red light induced photomorphogenesis. Nature **358**, 153–155.
- Sivula A, Salminen, Parfenyev Alexey N, Pekka Phojanjoki. (1999),** Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. FEBS Letters 454 75-80.
- Stitt M (1998)** Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. Bot Acta 111:167–175.
- Taylor, A.R., Manison, N.F.H., Fernandez, C., Wood, J.W., and Brownlee, C. (1996).** Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. Plant Cell 8, 2015–2031.
- Thomas, M.V. (1982).** Techniques in Calcium Research. (London:Academic Press).
- van Wazer J. R.** Phosphorus and its compounds. New York, NY: Interscience Publishers, Inc.;1958.pp.617-38.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ. (2001)** Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. Plant Cell 13:385–398.
- Volk S E, Baykov A A, Duzhenko V S, Awaeva S M (1982).** Kinetic Studies on the Interactions of Two Forms of Inorganic Pyrophosphatase of Heart Mitochondria with Physiological LigandsEur J Biochem 125: 215-220.
- Weiner H, Stitt M, Held HW.(1987)** Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. Biochimica et Biophysica Acta 893:13-21
- Yang Z, Wensel TG (1992)** Inorganic pyrophosphatase from bovine retinal rod outer segments. J Biol Chem 267: 24634–24640
- Yang L , Liao R , Yu J , & Liu R (2009)** DFT study on the mechanism of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. J Phys Chem B 113: 6505-10.

ANEXO I

El siguiente artículo es un trabajo teórico no publicado, desarrollado por Rogelio Rodríguez Sotres en donde se deducen ecuaciones de velocidad para diferentes modelos cinéticos de inhibición por Ca^{2+} de la enzima AtPPa1.

PROPOSAL FOR A PYROPHOSPHATASE HYDROLYSIS MECHANISM

ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

CONTENTS

1. Introduction	1
2. Mg^{2+} and $Mg \cdot PPI^{2-}$ bind in ordered fashion before catalysis and <i>free</i> Ca^{2+} binds to the free enzyme competing with <i>free</i> Mg^{2+} - the <i>enzyme</i> · <i>Ca</i> complex is inactive	3
2.1. Basic definitions and the corresponding set of differential equations	4
2.2. Derivation of the <i>steady state</i> rate equation	5
2.3. Analysis of the <i>steady state</i> rate equation and considerations	8
3. Binding of $Mg \cdot PPI$ promotes catalysis and <i>free</i> Mg^{2+} is required for product release only - <i>free</i> Ca^{2+} binds in a competitive fashion with <i>free</i> Mg^{2+} to prevent product release	11
3.1. Basic scheme and its corresponding set of differential equations	12
3.2. System solution under steady state conditions	14
3.3. Considerations based on the analysis of the resulting <i>steady state</i> rate equation	15
3.4. Analysis of the <i>steady state</i> rate equation and considerations	16
4. Ordered binding of <i>free</i> Mg^{2+} and $MgPPI$ promotes catalysis - <i>free</i> Ca^{2+} forms a dead end complex during product release	17
4.1. Basic scheme and its corresponding set of differential equations	17
4.2. System solution under steady state conditions	19
4.3. Initial velocity patterns and Ca^{2+} inhibition in the absence of $MgPi^{-}$	21
5. Ordered binding of $Mg \cdot PPI^{2-}$ followed by <i>free</i> Mg^{2+} promotes catalysis. <i>Free</i> Ca^{2+} forms a dead-end complex in competition with <i>free</i> Mg^{2+}	21
5.1. Basic scheme and its corresponding set of differential equations	22
5.2. System solution under steady state conditions	23
5.3. Initial velocity patterns and Ca^{2+} inhibition in the absence of $MgPi^{-}$	26
References	29

1. INTRODUCTION

This document contains the derivation of the equations for a kinetic mechanism of pyrophosphatases of family I from plants. Several cases are considered. The present analysis is an attempt to explain the Ca^{2+} results of Joel Basilio with AtPPa1.

In this mechanisms some general considerations apply to all of them. The solution has a mixture of free and complexed species, because pyrophosphate (PPi) forms stable complexes with magnesium (Mg^{2+}) and calcium (Ca^{2+}) ions. These complexes are in multiple equilibria in solution with the free species forming a system defined by the stability constants (Eq. 1.1 - 1.4).

$$\begin{aligned}
 (1.1) \quad K_{MgPPi} &= \frac{[MgPPi^{2-}]}{[Mg^{2+}][PPi^{4-}]} & K_{CaPPi} &= \frac{[CaPPi^{2-}]}{[Ca^{2+}][PPi^{4-}]} \\
 (1.2) \quad K_{Mg_2PPi} &= \frac{[Mg_2PPi^0]}{[Mg^{2+}]^2[PPi^{4-}]} & K_{Ca_2PPi} &= \frac{[Ca_2PPi^0]}{[Ca^{2+}]^2[PPi^{4-}]} \\
 (1.3) \quad K_{MgHPPi} &= \frac{[MgHPPi^{1-}]}{[Mg^{2+}][HPPi^{3-}]} & K_{CaHPPi} &= \frac{[CaHPPi^{1-}]}{[Ca^{2+}][HPPi^{3-}]} \\
 (1.4) \quad K_{HPPi} &= \frac{[HPPi^{3-}]}{[H^+][PPi^{4-}]} & K_{H_2PPi} &= \frac{[H_2PPi^{2-}]}{[H^+][HPPi^{3-}]}
 \end{aligned}$$

Notice the definitions in (1.2) are cumulative stability constants, while definitions in (1.3) are not.

Now, relying on a careful manipulation of the total concentrations of pyrophosphate, magnesium and calcium added to the assay medium, it is theoretically possible to probe the enzyme properties in a wide enough range of $[MgPPi^{2-}]$, $free[Ca^{2+}]$ and $free[Mg^{2+}]$ in solution. Therefore, these last three ligands would be treated as independent, even if, they clearly are not so. Throughout the document, unless indicated expressly, $[Ca^{2+}]$ and $[Mg^{2+}]$ refer to the free ions in solution. The solutions are assumed to be predominantly aqueous and dilutes, *i.e.* close to ideality, therefore, activity coefficients are assumed to be 1, and are not included in the expressions.

Appropriate rate equations using other combination of ligands as variables may be produced from the equations derived below, by substitution of $[MgPPi^{2-}]$, $[Ca^{2+}]$ and $[Mg^{2+}]$ with other ligand concentrations, as long as algebraic independent expressions can be found for the desired replacements. While, the resulting expression may become rather complex and the expected plots will be non-linear for many of such substitutions, this may be the only option for the analysis of some experiments, either because the design was done without considering the multiple ion equilibria in solution, or due to the limitations imposed by the system itself.

Throughout the document, the system are treated under the *Steady State* assumption, *i.e.* the concentration of the enzyme forms involved in the catalytic mechanism proposed for each case, are considered to reach a point where the rate of formation and the rate of decomposition become equal. Under such conditions, the change in the concentration of all enzyme species becomes negligible and the system of differential equations describing its kinetics becomes algebraic. In addition, the present analysis will only consider the initial velocity conditions, where product formation and substrate consumption are small, thus having only a minor impact on the measurable reaction rate. Consequently, substrate and product concentrations are assumed to remain constant and equal to the values set by

the experimental design. When products are not added explicitly, their concentration is considered zero.

In the particular cases considered here, the thermodynamic properties of the overall reaction make the reverse reaction negligible, accordingly, product formation is treated as irreversible. No attempt was made to model the chemical steps within the kinetic mechanism, all the events taking place in this stage are included in the catalytic rate constant.

The algebraic solution of each system of simultaneous equations was aided by the *MAX-IMA* software, using the *solve* command. The denominator of the equations are expanded using the *expand* command and when convenient, terms in $[Mg^{2+}]$ and $[Mg \cdot PPI^{2-}]$ can be collected to facilitate analysis. From there, some general inferences can be made on the role of the substrate, the free metal activator, the products, and the inhibitor. To increase the equation's clarity, some convenient definitions for these last chemical species, they are abbreviated as defined in equations (1.5) to (1.8)

$$(1.5) \quad mpp = [Mg PPI^{2-}]$$

$$(1.6) \quad mp = [Mg Pi^{-}]$$

$$(1.7) \quad m = [Mg^{2+}]$$

$$(1.8) \quad c = [Ca^{2+}]$$

2. Mg^{2+} AND $Mg \cdot PPI^{2-}$ BIND IN ORDERED FASHION BEFORE CATALYSIS AND *free* Ca^{2+} BINDS TO THE FREE ENZYME COMPETING WITH *free* Mg^{2+} - THE *enzyme \cdot Ca* COMPLEX IS INACTIVE

In the system considered in this current section, the Ca^{2+} inhibition to render a competitive pattern when $Mg^{2+}PPI$ is the variable substrate, M^{2+} is fixed and Ca^{2+} is the fixed-variable inhibitor.

The basic scheme in the Cleland style [1] is depicted in figure 1. In this scheme Mg^{2+} and $Mg PPI^{2-}$ bind in a compulsory order and Ca^{2+} can occupy the Mg^{2+} site on the free enzyme.

This is a variation of the Bi Bi ordered equation with one dead-end inhibitor, but since in this particular case both products are identical, the final rate equation has some peculiarities worthy of analysis. The order of addition can only be distinguished from the product inhibition patterns. Because the classic measurements of activity involve a very sensitive quantification of the Pi released, addition of products strongly interferes with the determination of enzyme activity, not many studies have been published on the subject indeed.

However, the addition of Ca^{2+} with $Mg PPI^{2-}$ as substrate would give a different inhibition pattern if the first substrate to bind would be $Mg PPI^{2-}$. That alternative mechanism will be analyzed in a subsequent section (5).

The mathematical model describing the scheme in figure 1 is shown within the following subsection (2.1).

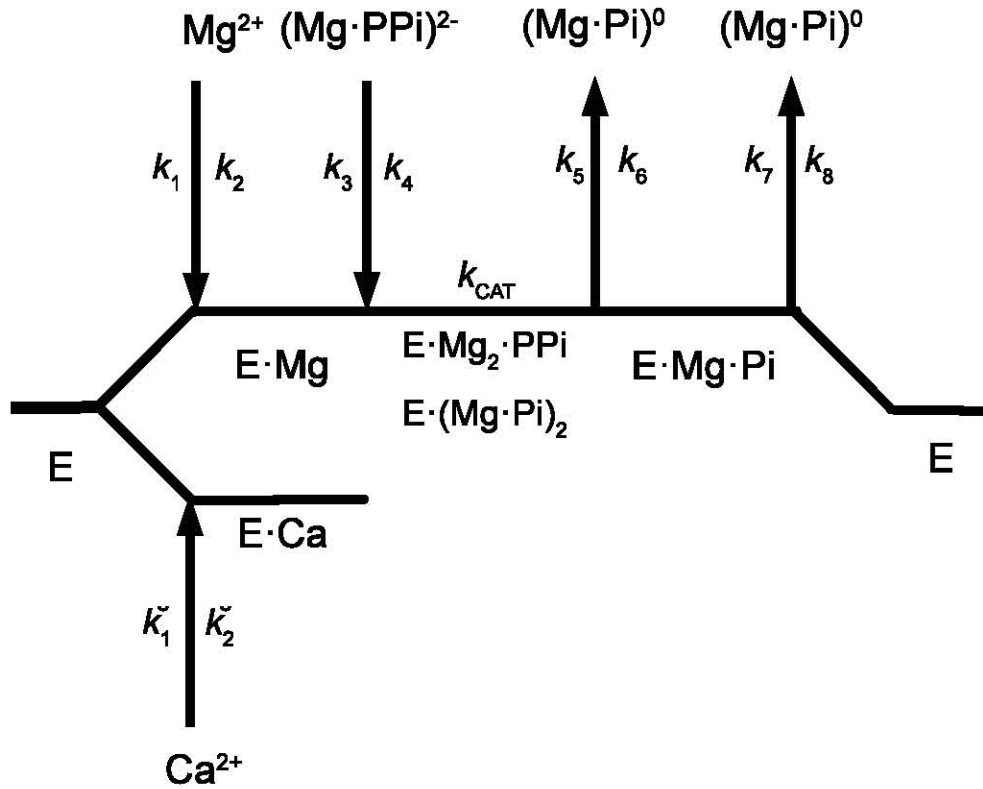


FIGURE 1. Kinetic scheme for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants. In this mechanism Mg^{2+} binds first, followed by $Mg PPI^{2-}$. Ca^{2+} is a competitive inhibitor with Mg^{2+} . The numbering of the rate constants was chosen to coincide with a previously published proposal

2.1. **Basic definitions and the corresponding set of differential equations.** To simplify equation writing, while using mnemonic names some definitions are given in equations (2.1), (2.2), and the ligands as defined before (Eq. 1.5 to 1.8).

$$(2.1) \quad E = [free \mathbf{E}] \quad E^M = [\mathbf{E} \cdot Mg] \quad E_{MPP}^M = [\mathbf{E} \cdot Mg_2 PPI]$$

$$(2.2) \quad E_{MP}^{MP} = [\mathbf{E} \cdot (Mg Pi)_2] \quad E_{MP} = [\mathbf{E} \cdot Mg Pi] \quad E^C = [\mathbf{E} \cdot Ca]$$

$$(2.3)$$

Then, we present the equations for the product formation rate (Eq. 2.4), the mass balance (Eq. (2.5)) and the disappearance of enzyme species (Eq. 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10 and 2.11).

$$(2.4) \quad v_0 = -\frac{d[PPi]}{dt} = k_{CAT} E_{MPP}^M$$

$$(2.5) \quad E_T = E + E^M + E_{MPP}^M + E_{MP}^{MP} + E_{MP} + E^C$$

$$(2.6) \quad -\frac{dE}{dt} = (k_1 m + \check{k}_1 c + k_8 mp) E - k_2 E^M - \check{k}_2 E^C - k_7 E_{MP}$$

$$(2.7) \quad -\frac{dE^C}{dt} = \check{k}_2 E^C - \check{k}_1 c E$$

$$(2.8) \quad -\frac{dE_M}{dt} = (k_2 + k_3 mpp) E^M - k_1 m E - k_4 E_{MPP}^M$$

$$(2.9) \quad -\frac{dE_{MPP}^M}{dt} = (k_4 + k_{CAT}) E_{MPP}^M - k_3 mpp E_M$$

$$(2.10) \quad -\frac{dE_{MP}^{MP}}{dt} = k_5 E_{MP}^{MP} - k_6 mp E_{MP} - k_{CAT} E_{MPP}^M$$

$$(2.11) \quad -\frac{dE_{MP}}{dt} = (k_6 mp + k_7) E_{MP} - k_8 mp E - k_5 E_{MP}^{MP}$$

$$(2.12) \quad v_0 = k_{CAT} E_{MP}^M$$

2.2. Derivation of the *steady state rate equation*. This system of equations can be solved in *MAXIMA* using the system definition contained in *Maxima_Script.txt*. The solution gives Eq. (2.13), which can be written in a neat form (2.14) after ordering the variables after the constants .

Please see the *Maxima_result.txt* and the *Maxima_Script.txt* files for details in the equation solution using the *MAXIMA* software.

Please see files *_mod.tex* for maxima output in T_EX format.

The next part is a taken from *CaInh/VelRateEq_mod.tex*. Consider the rate of product formation described by Eq. 2.12.

$$(2.13) \quad v_0 = (k_1 k_3 k_5 k_7 E_T m mpp \check{k}_2 k_{CAT}) /$$

$$(\check{k}_2 (m (k_1 k_7 (k_3 mpp (k_{CAT} + k_5) + k_5 k_{CAT} + k_4 k_5) + k_1 k_3 k_5 mpp k_{CAT})$$

$$+ k_7 (k_2 (k_5 k_{CAT} + k_4 k_5) + k_3 k_5 mpp k_{CAT}) + k_1 k_3 k_6 m mp mpp k_{CAT})$$

$$+ \check{k}_2 k_8 (mp^2 (k_2 (k_6 k_{CAT} + k_4 k_6) + k_3 k_6 mpp k_{CAT})$$

$$+ mp (k_2 (k_5 k_{CAT} + k_4 k_5) + k_3 k_5 mpp k_{CAT})) + k_7 (c \check{k}_1 k_2 (k_5 k_{CAT} + k_4 k_5) + c \check{k}_1 k_3 k_5 mpp k_{CAT}))$$

$$\begin{aligned}
(2.14) \quad v_0 = & (k_1 k_3 k_5 k_7 \check{k}_2 k_{CAT} E_T m mpp) / \\
& (\check{k}_2 ((k_1 k_7 (k_5 (k_{CAT} + k_4) + k_3 (k_{CAT} + k_5) mpp) + k_1 k_3 k_5 k_{CAT} mpp) m \\
& + k_7 k_5 (k_2 (k_{CAT} + k_4) + k_3 k_{CAT} mpp) + k_1 k_3 k_6 k_{CAT} mp m mpp) \\
& + \check{k}_2 k_8 (k_5 (k_2 (k_{CAT} + k_4) + k_3 k_{CAT} mpp) mp \\
& + k_6 (k_2 (k_{CAT} + k_4) + k_3 k_{CAT} mpp) mp^2) + k_7 (\check{k}_1 k_2 k_5 (k_{CAT} + k_4) c + \check{k}_1 k_3 k_5 k_{CAT} c mpp))
\end{aligned}$$

The equation can be simplified in appearance by substitution of 2.15 to give 2.16. Next, it can be expanded to give 2.17. Then terms can be reorganized according to the chemical species, with focus on the substrate (mpp *i.e.* $[Mg PPI]$) and the essential activator (m *i.e.* $[Mg^{2+}]$), to give 2.18. In this last form numerator and denominator terms have been divided by \check{k}_2 for convenience.

$$(2.15) \quad k_{c4} = k_{CAT} + k_4 \quad k_{c5} = k_{CAT} + k_5$$

$$\begin{aligned}
(2.16) \quad v_0 = & (k_1 k_3 k_5 k_7 \check{k}_2 k_{CAT} E_T m mpp) / \\
& (\check{k}_2 ((k_1 k_7 (k_5 k_{c4} + k_3 k_{c5} mpp) + k_1 k_3 k_5 k_{CAT} mpp) m \\
& + k_7 k_5 (k_2 k_{c4} + k_3 k_{CAT} mpp) + k_1 k_3 k_6 k_{CAT} mp m mpp) \\
& + \check{k}_2 k_8 (k_5 (k_2 k_{c4} + k_3 k_{CAT} mpp) mp \\
& + k_6 (k_2 k_{c4} + k_3 k_{CAT} mpp) mp^2) + k_7 (\check{k}_1 k_2 k_5 k_{c4} c + \check{k}_1 k_3 k_5 k_{CAT} c mpp))
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(2.17) \quad v_0 = & (k_1 k_3 k_5 k_7 \check{k}_2 k_{CAT} E_T m mpp) / \\
& (\check{k}_2 k_1 k_7 k_5 k_{c4} m + \check{k}_2 k_1 k_7 k_3 k_{c5} m mpp + \check{k}_2 k_1 k_3 k_5 k_{CAT} m mpp \\
& + \check{k}_2 k_7 k_5 k_2 k_{c4} + \check{k}_2 k_7 k_5 k_3 k_{CAT} mpp + \check{k}_2 k_1 k_3 k_6 k_{CAT} mp m mpp \\
& + \check{k}_2 k_8 k_5 k_2 k_{c4} mp + \check{k}_2 k_8 k_5 k_3 k_{CAT} mp mpp \\
& + \check{k}_2 k_8 k_6 k_2 k_{c4} mp^2 + \check{k}_2 k_8 k_6 k_3 k_{CAT} mp^2 mpp + k_7 \check{k}_1 k_2 k_5 k_{c4} c + k_7 \check{k}_1 k_3 k_5 k_{CAT} c mpp)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(2.18) \quad v_0 = & (k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} E_T m mpp) / \\
& (+k_7 k_5 k_2 k_{c4} + k_8 k_5 k_2 k_{c4} mp + k_8 k_6 k_2 k_{c4} mp^2 + \frac{\check{k}_1}{k_2} k_7 k_2 k_5 k_{c4} c \\
& + \frac{\check{k}_2}{k_2} k_1 k_7 k_5 k_{c4} m + k_7 k_5 k_3 k_{CAT} mpp + \frac{\check{k}_1}{k_2} k_7 k_3 k_5 k_{CAT} c mpp \\
& + k_8 k_5 k_3 k_{CAT} mp mpp + k_8 k_6 k_3 k_{CAT} mp^2 mpp + k_1 k_7 k_3 k_{c5} m mpp \\
& + k_1 k_3 k_5 k_{CAT} m mpp + k_1 k_3 k_6 k_{CAT} mp m mpp)
\end{aligned}$$

Equation 2.18 can now be rewritten in terms of kinetic constants. The first evident kinetic constant is the $E \cdot Ca^{2+}$ dissociation constant given in equation 2.19. In addition, the constant coefficients in each term are replaced by short names (definitions 2.19 to 2.24) and divided by the coefficient of the term in $m mpp$ (C_{AB} , Eq. 2.20) to give 2.25.

$$(2.19) \quad K_{Ic} = \frac{\check{k}_1}{k_2}$$

$$(2.20) \quad C_{AB} = k_1 k_3 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT}) \quad C_0 = k_7 k_5 k_2 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(2.21) \quad C_Q = k_8 k_5 k_2 (k_{CAT} + k_4) \quad C_A = k_1 k_7 k_5 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(2.22) \quad C_B = k_7 k_5 k_3 k_{CAT} \quad C_{PQ} = k_8 k_6 k_2 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(2.23) \quad C_{BQ} = k_8 k_5 k_3 k_{CAT} \quad C_{BPQ} = k_8 k_6 k_3 k_{CAT}$$

$$(2.24) \quad C_{ABP} = k_1 k_3 k_6 k_{CAT} \quad N_1 = k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} E_T$$

$$\begin{aligned}
(2.25) \quad \frac{v_0}{E_T} = & \left(\frac{N_1}{C_{AB}} m mpp \right) / \\
& \left(\frac{C_0}{C_{AB}} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) + \frac{C_Q}{C_{AB}} mp + \frac{C_{PQ}}{C_{AB}} mp^2 \right. \\
& \quad \left. + \frac{C_A}{C_{AB}} m + \frac{C_B}{C_{AB}} mpp \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) \right. \\
& \quad \left. + \frac{C_{BQ}}{C_{AB}} mp mpp + \frac{C_{BPQ}}{C_{AB}} mp^2 mpp + m mpp + \frac{C_{ABP}}{C_{AB}} mp m mpp \right)
\end{aligned}$$

Equation 2.36 can be written as a classical rate equation, with a few substitutions. To this aim kinetic constants are defined as defined in equations (2.26) to (2.35)

$$(2.26) \quad \frac{V_f}{E_T} = \frac{N_I}{C_{AB}} = \frac{k_5 k_7 k_{CAT}}{k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT}} = \frac{1}{\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_7} + \frac{1}{k_{CAT}}}$$

$$(2.27) \quad K_{Mmpp} = \frac{C_A}{C_{AB}} = \frac{k_5 k_7 (k_4 + k_{CAT})}{k_3 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.28) \quad K_{Im} \cdot K_{Mmpp} = \frac{C_0}{C_{AB}} = \left(\frac{k_2}{k_1}\right) \frac{k_7 k_5 (k_{CAT} + k_4)}{k_3 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.29) \quad K_{Mm} = \frac{C_B}{C_{AB}} = \frac{k_7 k_5 k_{CAT}}{k_1 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.30) \quad \frac{K_{Im}}{K_{Iq}} K_{Mmpp} = \frac{C_Q}{C_{AB}} = \left(\frac{k_2}{k_1}\right) \left(\frac{k_7}{k_8}\right)^{-1} \frac{k_5 k_7 (k_{CAT} + k_4)}{k_3 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.31) \quad \frac{K_{Im} K_{Mmpp}}{K_{Ip} K_{Iq}} = \frac{C_{PQ}}{C_{AB}} = \left(\frac{k_2}{k_1}\right) \left(\frac{k_5}{k_6}\right)^{-1} \left(\frac{k_7}{k_8}\right)^{-1} \frac{k_5 k_7 (k_{CAT} + k_4)}{k_3 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.32) \quad \frac{K_{Mm}}{K_{Ip} K_{Iq}} = \frac{C_{BPQ}}{C_{AB}} = \left(\frac{k_5}{k_6}\right)^{-1} \left(\frac{k_7}{k_8}\right)^{-1} \frac{k_7 k_5 k_{CAT}}{k_1 (k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT})}$$

$$(2.33) \quad K_{IIp} = \frac{C_{AB}}{C_{ABP}} = \frac{k_7 k_{CAT} + k_7 k_5 + k_5 k_{CAT}}{k_6 k_{CAT}} = \left(\frac{k_5}{k_6}\right) \left(1 + \frac{k_7}{k_5} + \frac{k_7}{k_{CAT}}\right)$$

In addition to the dissociation constant defined by (2.19), the true dissociation constants (2.34) and (2.35) are derived from definitions (2.26) to (2.35).

$$(2.34) \quad K_{Ic} = \check{k}_2 / \check{k}_1 \quad K_{Im} = k_2 / k_1$$

$$(2.35) \quad K_{Ip} = k_5 / k_6 \quad K_{Iq} = k_7 / k_8$$

Finally, after substitution of (2.26) to (2.35) into (2.25), and term collection, a classic rate equation is produced (2.36).

$$(2.36) \quad v_0 = \frac{V_f \frac{m}{K_{Mm}} \frac{mpp}{K_{Mmpp}}}{\left(\frac{K_{Im}}{K_{Mm}} + \frac{mpp}{K_{Mmpp}}\right) \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}}\right) + \frac{m}{K_{Mm}} + \frac{m}{K_{Mm}} \frac{mpp}{K_{Mmpp}} \left(1 + \frac{mp}{K_{Ip}}\right)}$$

2.3. Analysis of the steady state rate equation and considerations. Now let us analyze the behavior of this system when initial velocities are measured at variable $MgPPi^{2-}$ and fixed Mg^{2+} at fixed-varied concentrations of Ca^{2+} .

If equation (2.36) is arranged to take the Michaelis-Menten classic form corresponding to the above conditions (Eq. 2.37), then the $^{APP}K_M$ would be given by (2.38) and the $^{APP}V_{MAX}$ would be given by (2.39).

$$(2.37) \quad v_0 = \frac{^{APP}V_{MAX} mpp}{^{APP}K_M + mpp}$$

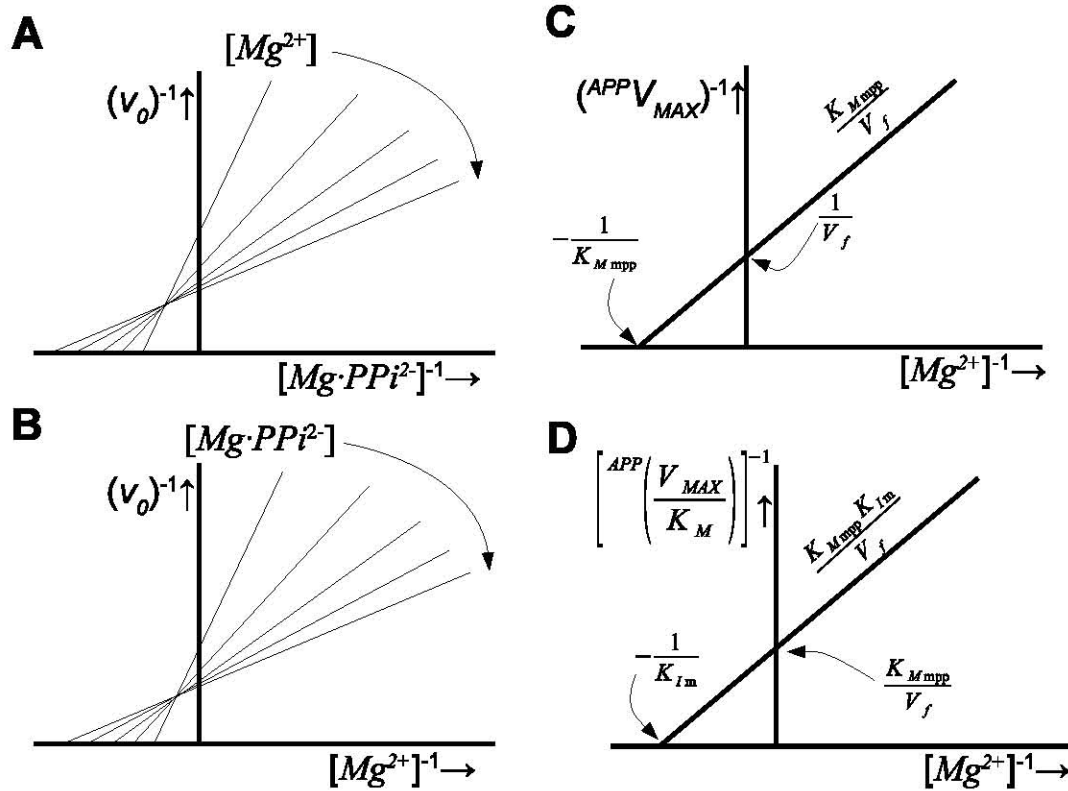


FIGURE 2. Lineweaver-Burk plots for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants, as predicted by the scheme in figure 1. (A) is the resulting initial velocity pattern with $[MgPPi^{2-}]$ as substrate and $[Mg^{2+}]$ is fixed-varied in the absence of Ca^{2+} . (B) is the resulting initial velocity pattern with $[Mg^{2+}]$ as variable activator and if $[MgPPi^{2-}]$ is fixed-varied in the absence of Ca^{2+} . (C) is the replot of the ordinate intercepts from a pattern as in (A) against $[Mg^{2+}]$. (D) is the replot of the slopes from a pattern as in (A) against $[Mg^{2+}]$.

$$(2.38) \quad {}^{APP}V_{MAX} = (V_f) \frac{m}{K_{Mm} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip}K_{Iq}}\right) + m \left(1 + \frac{mp}{K_{Ip}}\right)}$$

$$(2.39) \quad {}^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \left(\frac{V_f}{K_{Mmpp}} \right) \frac{m}{K_{Im} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip}K_{Iq}}\right) + m}$$

From equation (2.38) and (2.39), both the initial velocity patterns in the absence of Ca^{2+} , or the Ca^{2+} inhibition patterns can be predicted. Figure 2, panel A, shows the expected initial velocity patterns predicted at variable $MgPPi^{2-}$ and fixed-varied Mg^{2+} in the absence of Ca^{2+} , and panel B, the corresponding pattern for variable Mg^{2+} and fixed-varied $MgPPi^{2-}$. Lines in both patterns converge, as expected for a Bi-ordered mechanism under Steady state [1]. Figure 2, panel C shows the predicted linear replots of the intercepts from this last initial velocity pattern, while panel D shows the replots of the slopes in panel A. While the currently accepted statistical tool to obtain reliable estimates for the kinetic constants is to fit the raw data to equation (2.36), using multivariate non-linear regression, the predicted replots are a good visual aid for data presentation.

Next, at variable $MgPPi^{2-}$ and fixed Mg^{2+} , with fixed-varied $[Ca^{2+}]$, the expected pattern would be general non-competitive inhibition (mixed-type; Fig. 3, panel A), due to the differential effects of the inhibitor on $^{APP}V_{MAX}$ and $^{APP}(V_{MAX}/K_M)$ (intercept and slope form double reciprocal plots, respectively). In the absence of product ($MgPi^-$), the difference depends on the relative values of the *Michaelis* constant for Mg^{2+} (K_{Mm}) and its true dissociation constant (K_{Im} ; see the point of convergence in Fig. 3, panel A). The corresponding replots for intercepts and slopes of the double reciprocal plots in panel A are shown in panels C and D (Fig. 3), respectively. The converging lines are shown to illustrate the replots dependence on $[Mg^{2+}]$.

At fixed-varied concentrations of Ca^{2+} , equation (2.36) can be arranged to take the corresponding Michaelis-Menten form given by (2.40), where the $^{APP}K_M$ is given by (2.41) and the $^{APP}V_{MAX}$ is given by (2.42). The predicted Ca^{2+} inhibition pattern for this condition is now competitive (3, panel B), the corresponding replot for the slope against Ca^{2+} (not shown) is now dependent on $[MgPPi^{2-}]$.

$$(2.40) \quad v_0 = \frac{^{APP}V_{MAX} m}{^{APP}K_M + m}$$

$$(2.41) \quad ^{APP}V_{MAX} = (V_f) \frac{mpp}{K_{Mmpp} + mpp \left(1 + \frac{mp}{K_{Ip}}\right)}$$

$$(2.42) \quad ^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \left(\frac{V_f}{K_{Mm}} \right) \left(\frac{mpp}{K_{Im} K_{Mmpp} + mpp} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip}K_{Iq}}} \right)$$

For this case, the patterns would be competitive as the intercept of the double reciprocal plots is independent of $[Ca^{2+}]$ (c), while the slope is linearly dependent on this concentration. Worth noting is the predicted pattern of the replot for the slope against $[Ca^{2+}]$, where both its ordinate intercept and its slope are inversely proportional to $[MgPPi^{2-}]$. This pattern is expected to give a set of convergent lines crossing at the point $-K_{Ic}$. In other words, regardless of the $[MgPPi^{2-}]$ employed, the replot should allow the calculation of the true Ca^{2+} dissociation constant.

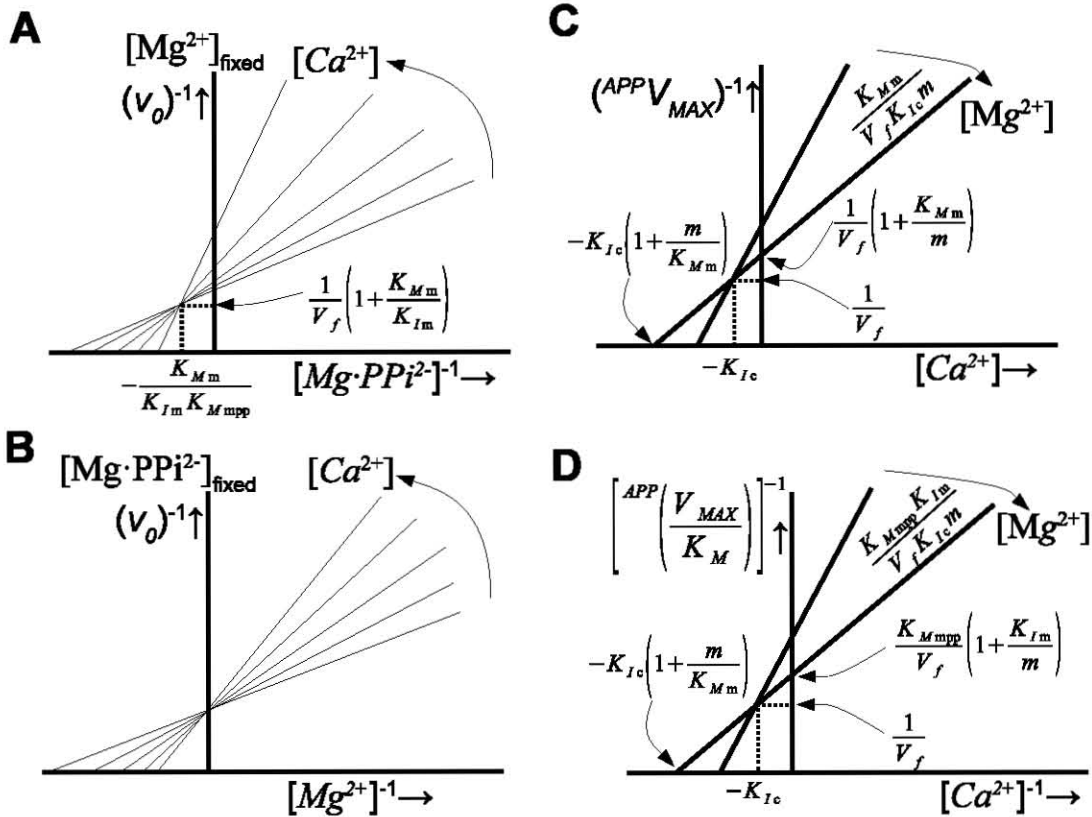


FIGURE 3. Lineweaver-Burk plots for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants, as predicted by the scheme in figure 1. (A) is the resulting pattern of inhibition by Ca^{2+} with $[Mg \cdot PPi^{2-}]$ as substrate and fixed $[Mg^{2+}]$. (B) is the resulting pattern of inhibition by Ca^{2+} with variable $[Mg^{2+}]$ as essential activator and fixed $[Mg \cdot PPi^{2-}]$, as substrate. (C) is the replot of the ordinate intercepts against $[Ca^{2+}]$ from two patterns as the one shown in (A), but performed a two fixed $[Mg^{2+}]$. (D) is the replot of the slopes against $[Ca^{2+}]$ from two patterns as the one shown in (A), but performed a two fixed $[Mg^{2+}]$.

3. BINDING OF $Mg \cdot PPi$ PROMOTES CATALYSIS AND *free* Mg^{2+} IS REQUIRED FOR PRODUCT RELEASE ONLY - *free* Ca^{2+} BINDS IN A COMPETITIVE FASHION WITH *free* Mg^{2+} TO PREVENT PRODUCT RELEASE

The previous mechanism was consistent with the data published in a previous paper, as already mentioned [2], but it does present differences with the one published for the yeast

enzyme [3]. Mainly, in the yeast enzyme the binding of the substrate has been proposed to occur as the $[Mg_2 \cdot PPI^{2-}]$ complex, with two Mg^{2+} atoms tightly bound to the enzyme which seem to stay bound along the catalytic cycle [3]. In the plant enzyme there is no data regarding the presence of Mg^{2+} atoms bound to the enzyme along the catalytic cycle, and the kinetic behavior may not offer information on this issue, however, there seem to be a compulsory ordered binding of Mg^{2+} and the $Mg \cdot PPI^{2-}$ [2], but the published data does not indicate the exact order of binding.

The present scheme considers therefore the possibility of the ordered binding be due to a requirement for Mg^{2+} during the product release steps. Such scheme assumes binding of $MgPPI$ to the enzyme followed by hydrolysis of the PPI , and then the binding of Mg^{2+} is needed to promote conformational changes and the complexation of phosphate facilitating the release of products, which are assumed to be released as $[Mg \cdot Pi^-]$. In such mechanism, Ca^{2+} would be expected to bind to the enzyme product complex and block product release. This scheme may be counterintuitive, since the Ca^{2+} bound to the enzyme would prevent the dissociation of $Ca \cdot Pi^-$, and such thing would require the stability of the $\mathbf{E} \cdot CaPPI$ complex to exceed by orders of magnitude the one from the $\mathbf{E} \cdot MgPPI$ complex. Nevertheless, learning the theoretical properties of such mechanism may become useful later on.

There are alternative possibilities to this mechanism, because the binding of Mg^{2+} is here assumed to occur immediately after hydrolysis and before the release of any product, but it is possible to have the release of a first product before the binding the essential cation and the release of the second phosphate. Ca^{2+} inhibition could also be due to the competitive binding of $Ca \cdot PPI^{2-}$ to the enzyme blocking the binding of substrate and the catalytic step.

3.1. Basic scheme and its corresponding set of differential equations. The basic scheme for this first case is shown in figure 4.

Before the derivation of the basic set of differential equations, we define the abbreviations in 3.1 , 3.2 and 3.3.

$$(3.1) \quad E = [free \mathbf{E}] \quad E_{MPP} = [\mathbf{E} \cdot MgPPI] \quad E_{MP}^P = [\mathbf{E} \cdot MgPi_2]$$

$$(3.2) \quad E_{MP}^{MP} = [\mathbf{E} \cdot (MgPi)_2] \quad E_{MP} = [\mathbf{E} \cdot MgPi] \quad E_{MP}^{CP} = [\mathbf{E} \cdot Ca \cdot MgPi_2]$$

$$(3.3) \quad mpp = [MgPPI] \quad mp = [MgPi] \quad m = [Mg^{2+}] \quad c = [Ca^{2+}]$$

Then, we present the equations for the product formation rate (Eq. 3.4), the mass balance (Eq. (3.5)) and the disappearance of enzyme species (Eq. (3.6) to Eq. (3.11)).

$$(3.4) \quad v_0 = -\frac{d[PPi]}{dt} = k_{CAT} E_{MPP}$$

$$(3.5) \quad E_T = E + E_{MPP} + E_{MP}^P + E_{MP}^{MP} + E_{MP} + E_{MP}^{CP}$$

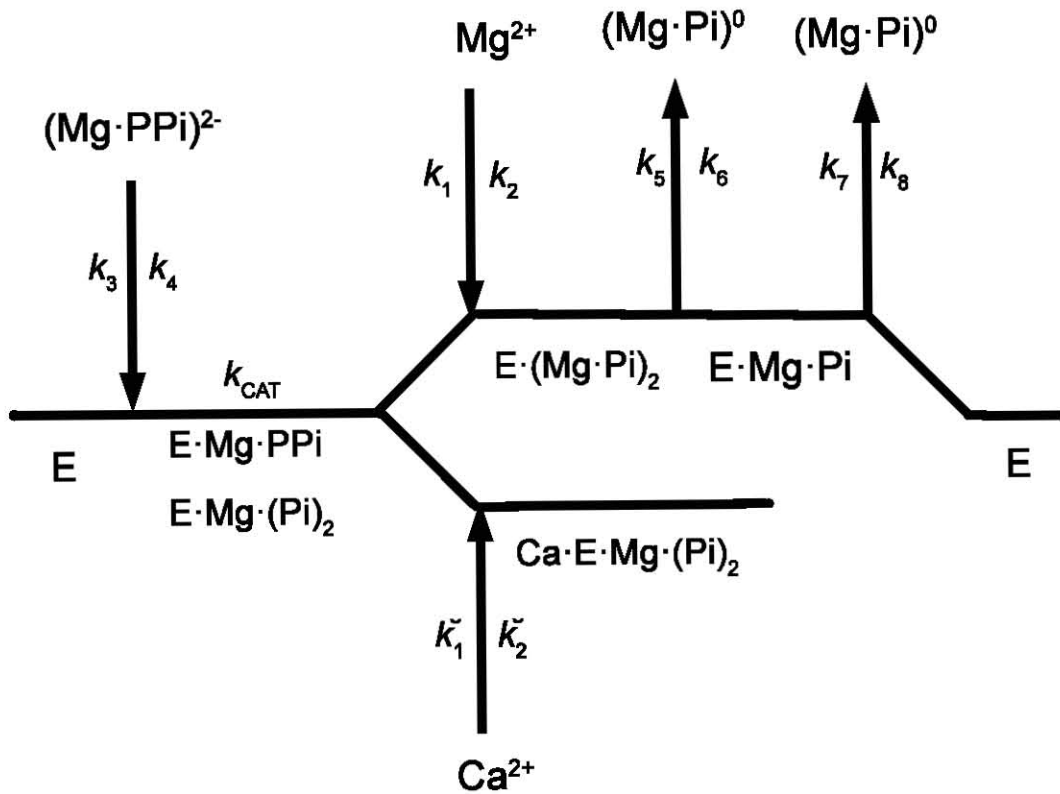


FIGURE 4. **Kinetic scheme for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants.** In this mechanism $Mg PPI^{2-}$ binds first and catalysis takes place. Mg^{2+} is required for product release and Ca^{2+} would replace it and form a dead-end complex. The numbering of the rate constants was chosen to coincide with the previously analyzed versions.

$$(3.6) \quad -\frac{dE}{dt} = k_3 mpp E - k_4 E_{MPP} - k_7 E_{MP} + k_8 E mp$$

$$(3.7) \quad -\frac{dE_{MPP}}{dt} = (k_{CAT} + k_4) E_{MPP} - k_3 mpp E$$

$$(3.8) \quad -\frac{dE_{MP}^P}{dt} = (k_1 m + \check{k}_1 c) E_{MP}^P - k_2 E_{MP}^{MP} - \check{k}_2 E_{MP}^{CP} - k_{CAT} E_{MPP}$$

$$(3.9) \quad -\frac{d E_{MP}^{MP}}{dt} = (k_2 + k_5) E_{MP}^{MP} - k_1 m E_{MP}^P - k_6 mp E_{MP}$$

$$(3.10) \quad -\frac{d E_{MP}}{dt} = (k_6 mp + k_7) E_{MP} - k_5 E_{MP}^{MP} - k_8 mp E$$

$$(3.11) \quad -\frac{d E_{MP}^{CP}}{dt} = \check{k}_2 E_{MP}^{CP} - \check{k}_1 c E_{MP}^P$$

3.2. System solution under steady state conditions. Under steady state conditions, the concentration of enzyme species listed in 3.1 and 3.2 should remain constant, and the respective disappearance rates become negligible.

Then equation (3.5), and equations (3.7) to (3.11) form a fully determined system of algebraic equations (3.6 is not independent, as in can be obtained from (3.5) and (3.7) to (3.11)). The determinant is non-zero because all rate constants are real and positive, and the concentrations are zero of higher. The system can be solved for all enzyme forms and the solution for E_{MS}^{MS} can be substituted in (3.4) to obtain the final rate equation (Eq. (3.12)).

$$(3.12) \quad v_0 = k_{CAT} E_{MPP} = k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m mpp E_T / (\\ (k_3 k_{CAT} (\check{k}_2 (k_2 (k_6 mp + k_7) + k_5 k_7) + k_1 \check{k}_2 m (k_6 mp + k_7 + k_5) \\ + c \check{k}_1 \check{k}_2 (k_6 mp + k_7) + c \check{k}_1 \check{k}_5 k_7) + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 m) mpp \\ + k_{CAT} (k_1 \check{k}_2 m (k_6 k_8 mp^2 + k_5 k_8 mp + k_5 k_7) + k_2 \check{k}_2 k_6 k_8 mp^2 + c \check{k}_1 \check{k}_2 k_6 k_8 mp^2) \\ + k_4 (k_1 \check{k}_2 m (k_6 k_8 mp^2 + k_5 k_8 mp + k_5 k_7) + k_2 \check{k}_2 k_6 k_8 mp^2 + c \check{k}_1 \check{k}_2 k_6 k_8 mp^2))$$

The solution for this system was generated by the *MAXIMA* software, using the *solve* command. Equation 3.12 can be expanded and terms in *mpp* and *m* can be collected to give a more orthodox form (Eq. 3.13).

$$(3.13) \quad v_0 = k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m mpp E_T / \\ ((k_2 \check{k}_2 \check{k}_3 k_6 k_{CAT} mp + c \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_3 k_6 k_{CAT} mp + \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} \\ + c \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_7 k_{CAT} + c \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_7 k_{CAT}) mpp \\ + m (k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 k_6 k_{CAT} mp + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_7 k_{CAT} + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 k_{CAT} + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7) mpp \\ + m (k_1 \check{k}_2 k_6 k_8 k_{CAT} mp^2 + k_1 \check{k}_2 k_4 k_6 k_8 mp^2 + k_1 \check{k}_2 \check{k}_5 k_8 k_{CAT} mp + k_1 \check{k}_2 k_4 k_5 k_8 mp \\ + k_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} + k_1 \check{k}_2 k_4 k_5 k_7) + k_2 \check{k}_2 k_6 k_8 k_{CAT} mp^2 + c \check{k}_1 \check{k}_2 k_6 k_8 k_{CAT} mp^2 \\ + k_2 \check{k}_2 k_4 k_6 k_8 mp^2 + c \check{k}_1 \check{k}_2 k_4 k_6 k_8 mp^2)$$

3.3. Considerations based on the analysis of the resulting *steady state* rate equation. From there, inferences on the role of the substrate (mpp) and the free metal (m) can be made by inspection.

The last equation (3.13) might explain our experimental data because in the absence of product $MgPi$ there would be no competitive component against $MgPPi$. But in the absence of products there seem to be no independent term in the denominator; thus, it is convenient to write this rate equation in an orthodox form. First some terms are collected and a few simplifications lead to equation 3.14.

(3.14)

$$v_0 = k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} m mpp E_T / (k_3 k_{CAT} (k_7 (k_5 + k_2) + k_2 k_6 mp) (1 + \frac{\check{k}_1}{k_2} c) mpp + k_1 k_3 (k_7 k_{CAT} + k_5 k_{CAT} + k_5 k_7 + k_6 k_{CAT} mp) m mpp + k_1 (k_{CAT} + k_4) (k_5 k_7 + k_5 k_8 mp + k_6 k_8 mp^2) m + k_2 k_6 k_8 (k_{CAT} + k_4) (1 + \frac{\check{k}_1}{k_2} c) mp^2)$$

A few definitions (Eq. 3.15 to 3.19) help to make up the previous equation (3.14), thus giving (3.20).

$$(3.15) \quad Num_1 = k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} \quad K_{Ic} = \frac{\check{k}_2}{\check{k}_1}$$

$$(3.16) \quad C_A = k_3 k_{CAT} k_7 (k_5 + k_2) \quad C_{AB} = k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} \left(\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_7} + \frac{1}{k_{CAT}} \right)$$

$$(3.17) \quad C_{ABP} = k_1 k_3 k_6 k_{CAT} \quad C_{AP} = k_2 k_3 k_6 k_{CAT}$$

$$(3.18) \quad C_B = k_1 k_5 k_7 (k_{CAT} + k_4) \quad C_{PQ} = k_2 k_6 k_8 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(3.19) \quad C_{BQ} = k_1 k_5 k_8 (k_{CAT} + k_4) \quad C_{BPQ} = k_1 k_6 k_8 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(3.20) \quad v_0 = \frac{Num_1}{C_{AB}} E_T m mpp / \left(\frac{C_{PQ}}{C_{BPQ}} \frac{C_{BPQ}}{C_{BQ}} \frac{C_{BQ}}{C_B} \frac{C_B}{C_{AB}} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) mp^2 + \frac{C_A}{C_{AB}} \left(1 + \frac{C_{AP}}{C_A} mp \right) \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) mpp + \frac{C_B}{C_{AB}} \left(1 + \frac{C_{BQ}}{C_B} mp + \frac{C_{BPQ}}{C_{BQ}} \frac{C_{BQ}}{C_B} mp^2 \right) m + \left(1 + \frac{C_{ABP}}{C_{AP}} \frac{C_{AP}}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} mp \right) m mpp \right)$$

Next, from (3.20) and its associated definitions (Eq. 3.15 to 3.19), in addition to K_{Ic} , the orthodox kinetic constants can be defined as shown in definitions (3.21) to (3.24).

$$\begin{aligned}
(3.21) \quad \frac{V_f}{E_T} &= \frac{Num1}{C_{AB}} = \left(\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_7} + \frac{1}{k_{CAT}} \right)^{-1} & K_{Iq} &= \frac{C_B}{C_{BQ}} = \frac{k_7}{k_8} \\
(3.22) \quad K_{Mm} &= \frac{C_A}{C_{AB}} = \frac{(k_2 + k_5) V_f}{k_1 k_5 E_T} & K_{Mmpp} &= \frac{C_B}{C_{AB}} = \frac{(k_{CAT} + k_4) V_f}{k_3 k_{CAT} E_T} \\
(3.23) \quad K_{Im} &= \frac{C_{PQ}}{C_{BPQ}} = \frac{C_{AP}}{C_{ABP}} = \frac{k_2}{k_1} & K_{Ip} &= \frac{C_{BQ}}{C_{BPQ}} = \frac{k_5}{k_6} \\
(3.24) \quad K_{Mp} &= \frac{C_A}{C_{AP}} = \frac{k_7 (k_5 + k_2)}{k_2 k_6}
\end{aligned}$$

Substitution of (3.21) to (3.24) into (3.20) gives the rate equation for the system depicted in figure 4 *i.e.* equation 3.25.

$$\begin{aligned}
(3.25) \quad v_0 &= V_f m mpp / (K_{Im} K_{Mmpp} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} \\
&\quad + K_{Mm} \left(1 + \frac{mp}{K_{Mp}} \right) \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) mpp \\
&\quad + K_{Mmpp} \left(1 + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} \right) m + \left(1 + K_{Im} K_{Mmpp} \frac{mp}{K_{Mp}} \right) m mpp)
\end{aligned}$$

3.4. Analysis of the steady state rate equation and considerations. Now it becomes clear the unusual form of this equation (3.14). In the absence of products there is no constant term in the denominator, and initial velocity saturation isotherms *vs.* $[Mg \cdot PPI^{2-}]$, as variable substrate and $[Mg^{2+}]$ as fixed-varied ligand would be parallel. The data published by Navarro de la Sancha *et al.* [2] would not be consistent with this system.

If (3.14) is written in the MM form with $[Mg \cdot PPI^{2-}]$ as variable substrate (*cfr.* 2.37), the corresponding $^{APP}V_{MAX}$ would be given by (3.26), and the apparent specificity constant would be (3.27).

$$(3.26) \quad ^{APP}V_{MAX} = \frac{V_f m}{K_{Mm} \left(1 + \frac{m}{K_{Mp}} \right) \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) + m \left(1 + K_{Im} K_{Mmpp} \frac{mp}{K_{Mp}} \right)}$$

$$(3.27) \quad ^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \frac{V_f m}{K_{Im} K_{Mmpp} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} + m K_{Mmpp} \left(1 + \frac{mp}{K_{Iq}} \left(1 + \frac{mp}{K_{Ip}} \right) \right)}$$

In this last set of equations, in the absence of products, the specificity constant reduces to V_f/K_{Mmpp} *i.e.* the true specificity constant for $Mg \cdot PPI^{2-}$, while the apparent V_{MAX} would show a hyperbolic response to $[Mg^{2+}]$, with an asymptote at V_f .

When $[Mg^{2+}]$ becomes variable and $[Mg \cdot PPI^{2-}]$ becomes fixed-varied (*cfr.* 2.40), $^{APP}V_{MAX}$ and the $^{APP}(V_{MAX}/K_M)$ would be given by (3.28) and (3.29).

(3.28)

$${}^{APP}V_{MAX} = \frac{V_f mpp}{K_{Mmpp} \left(\left(1 + \frac{mp}{K_{Iq}} \left(1 + \frac{mp}{K_{Ip}} \right) \right) + mpp K_{Mm} \left(1 + K_{Im} K_{Mmp} \frac{mp}{K_{Mp}} \right) \right)}$$

(3.29)

$${}^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \frac{V_f mpp}{K_{Im} K_{Mmpp} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right) \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} + mpp \left(1 + \frac{m}{K_{Mp}} \right) \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}} \right)}$$

In this second case, in the absence of products and saturating $[Mg \cdot PPi^{2-}]$, the specificity constant reduces to V_f/K_{Mm} *i.e.* the true specificity constant for Mg^{2+} , while the apparent V_{MAX} approaches $V_f K_{Mm}/K_{Mmpp}$.

4. ORDERED BINDING OF *free* Mg^{2+} AND $MgPPi$ PROMOTES CATALYSIS - *free* Ca^{2+} FORMS A DEAD END COMPLEX DURING PRODUCT RELEASE

As the paper published in 2007 [2], this scheme assumes the ordered binding of Mg^{2+} and $MgPPi$ to the enzyme followed by hydrolysis of the PPi . Then the products are released as $[Mg \cdot Pi^-]$, but as in the mechanism shown before (see section 3), in this mechanism Ca^{2+} binding to the enzyme product complex blocks product release. As before, the scheme may be counterintuitive, since Ca^{2+} binding should result in a very stable stable $\mathbf{E} \cdot Ca \cdot MgPPi$ complex and the structural properties known to these enzymes do not predict such behavior. Again, the theoretical properties of such mechanism may become useful later on.

Alternative schemes may be envisaged where the $\mathbf{E} \cdot Ca \cdot MgPPi$ complex is not so stable and $Mg \cdot Pi^-$ or $Ca \cdot Pi^-$ can dissociate slowly, leading to a slow catalytic branch. Such mechanism would result in partial inhibition. However, partial inhibition by Ca^{2+} has not been reported in these family of hydrolases.

4.1. Basic scheme and its corresponding set of differential equations. The scheme for this new case is depicted in figure 5

Before the derivation of the basic set of differential equations, we should redefine convenient abbreviations, shown in 4.1 , 4.2 and 4.2.

$$(4.1) \quad E = [free E] \quad E_M = [E Mg] \quad E_{MPP}^M = [E Mg_2 PPi]$$

$$(4.2) \quad E_{MP}^{MP} = [E (Mg Pi)_2] \quad E_{MP} = [E Mg Pi] \quad E_{MP}^C = [Ca E Mg Pi]$$

$$(4.3) \quad mpp = [Mg PPi] \quad mp = [Mg Pi] \quad m = [Mg^{2+}] \quad c = [Ca^{2+}]$$

Then, we present the equations for the product formation rate (Eq. 4.4), the mass balance (Eq. 4.5) and the disappearance of enzyme species (Eq. 4.6 to Eq. 4.11). Again, under steady state conditions, the system becomes algebraic. Its solution is presented in section 4.2.

$$(4.4) \quad v_0 = -\frac{d[PPi]}{dt} = k_{CAT} E_{MPP}^M$$

$$(4.5) \quad E_T = E + E_M + E_{MPP}^M + E_{MP}^{MP} + E_{MP} + E_{MP}^C$$

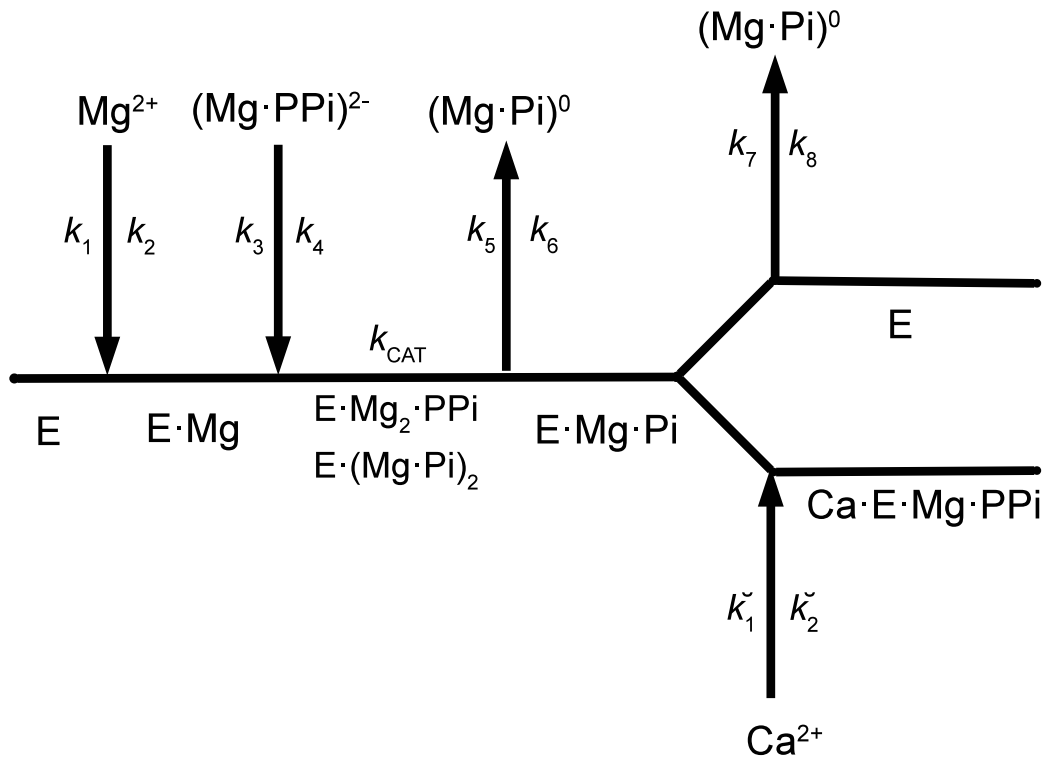


FIGURE 5. **Kinetic scheme for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants.** In this case, Mg^{2+} binds before $Mg PPI^{2-}$ and then catalysis can occur. Ca^{2+} bind after the first step of product release forming a dead-end complex. The numbering of the rate constants was chosen to coincide with previously analyzed schemes.

$$(4.6) \quad -\frac{dE}{dt} = (k_1 m + k_8 mp) E - k_2 E_M - k_7 E_{MP}$$

$$(4.7) \quad -\frac{dE_M}{dt} = (k_2 + k_3 mpp) E_M - k_1 m E - k_4 E_{MPP}^M$$

$$(4.8) \quad -\frac{dE_{MPP}^M}{dt} = (k_{CAT} + k_4) E_{MPP}^M - k_3 mpp E_M$$

$$(4.9) \quad -\frac{dE_{MP}^{MP}}{dt} = k_5 E_{MP}^{MP} - k_{CAT} E_{MPP}^M - k_6 mp E_{MP}$$

$$(4.10) \quad -\frac{dE_{MP}}{dt} = (k_6 mp + k_7 + \check{k}_1 c) E_{MP} - k_5 E_{MP}^{MP} - k_8 mp E - \check{k}_2 E_{MP}^C$$

$$(4.11) \quad -\frac{dE_{MP}^C}{dt} = \check{k}_2 E_{MP}^C - \check{k}_1 c E_{MP}$$

4.2. System solution under steady state conditions. Again, under steady state conditions, enzyme species listed in 4.1, 4.2 and 4.3 reach a constant concentration, and their rate of change approaches zero.

Equations 4.5, and 4.6 to 4.10 form a fully determined system of algebraic equations, while equation 3.6 is not independent, as in can be obtained from 4.5 and 4.6 to 4.10. The determinant is non-zero since all rate constants are real and positive, and the concentrations are zero of higher. The system can be solved for all enzyme forms and the solution for E_{MS}^{MS} can be substituted in 4.4 to obtain the final rate equation (Eq. 4.12). This last solution was also generated using the *solve* command in *MAXIMA*, followed by expansion of the denominator and collecting of the terms in mpp (substrate) and m (essential activator).

$$(4.12) \quad v_0 = k_{CAT} m E m p p = (k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m m p p E_T) / ($$

$$\check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 \check{k}_8 k_{CAT} m p^2 m p p + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 k_{CAT} m m p m p p + \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} m p m p p$$

$$+ \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} m p m p p c + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_7 k_{CAT} m m p p + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 k_{CAT} m m p p$$

$$+ k_1 \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 k_{CAT} m m p p c + k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 m m p p + \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m p p$$

$$+ k_2 \check{k}_2 \check{k}_6 \check{k}_8 k_{CAT} m p^2 + k_2 \check{k}_2 \check{k}_4 \check{k}_6 \check{k}_8 m p^2 + k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} m p$$

$$+ c \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} m p + k_2 \check{k}_2 \check{k}_4 \check{k}_5 \check{k}_8 m p + c \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_4 \check{k}_5 \check{k}_8 m p$$

$$+ k_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m + k_1 \check{k}_2 \check{k}_4 \check{k}_5 \check{k}_7 m$$

$$+ k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 \check{k}_4 \check{k}_5 \check{k}_7)$$

The terms in the denominator of this equation (4.12) can be grouped as before, collecting those containing the substrate ($[MgPPi] = mpp$) and the essential activator ($Mg^{2+} = m$) concentrations. The resulting expression (4.13) can now be simplified and the coefficients of different terms can be identified.

$$\begin{aligned}
(4.13) \quad v_0 = k_{CAT} mEmpp &= (k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} m mpp E_T) / (\\
&+ k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 (k_{CAT} + k_4) + k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4) mp + \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4) mp c \\
&+ k_2 \check{k}_2 \check{k}_6 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4) mp^2 + k_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 (k_{CAT} + k_4) m + \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} mpp \\
&+ \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} mp mpp + \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} mp mpp c + \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 \check{k}_8 k_{CAT} mp^2 mpp \\
&+ k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 (k_7 k_{CAT} + k_5 k_{CAT} + k_5 k_7) m mpp \\
&+ k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 k_{CAT} mp m mpp + k_1 \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 k_{CAT} m mpp c)
\end{aligned}$$

Definitions in (4.14) to (4.20) can be used to write equation (4.13) in a compact form, division of all terms in the righthand side on both numerator and denominator by C_{AB} (4.20), followed by term collection and appropriate substitutions give us (4.21) from which the definition of classic kinetic constants is straightforward.

$$(4.14) \quad N_1 = k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} \quad C_0 = k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(4.15) \quad C_P = k_2 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4) \quad C_{PI} = \check{k}_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(4.16) \quad C_{PQ} = k_2 \check{k}_2 \check{k}_6 \check{k}_8 (k_{CAT} + k_4) \quad C_A = k_1 \check{k}_2 \check{k}_5 \check{k}_7 (k_{CAT} + k_4)$$

$$(4.17) \quad C_B = \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_7 k_{CAT} \quad C_{BQ} = \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT}$$

$$(4.18) \quad C_{BQI} = \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 \check{k}_8 k_{CAT} \quad C_{BPQ} = \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 \check{k}_8 k_{CAT}$$

$$(4.19) \quad C_{ABI} = k_1 \check{k}_1 \check{k}_3 \check{k}_5 k_{CAT} \quad C_{ABP} = k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 \check{k}_6 k_{CAT}$$

$$(4.20) \quad C_{AB} = k_1 \check{k}_2 \check{k}_3 (k_{CAT} k_7 + k_{CAT} k_5 + k_5 k_7)$$

$$\begin{aligned}
(4.21) \quad v_0 = k_{CAT} mEmpp &= \left(\frac{N_1}{C_{AB}} E_T m mpp \right) / (\\
&+ \frac{C_0}{C_A C_{AB}} \left(1 + \frac{C_P}{C_0} mp \left(1 + \frac{C_{PI}}{C_P} c + \frac{C_{PQ}}{C_P} mp \right) \right) + \frac{C_A}{C_{AB}} m + \frac{C_B}{C_{AB}} mpp \\
&+ \frac{C_{BQ}}{C_B} \frac{C_B}{C_{AB}} mp mpp \left(1 + \frac{C_{BQI}}{C_{BQ}} c + \frac{C_{BPQ}}{C_{BQ}} mp \right) + m mpp \left(1 + \frac{C_{ABI}}{C_{AB}} c + \frac{C_{ABP}}{C_{AB}} mp \right)
\end{aligned}$$

Using the coefficient ratios in the above equation (4.21), definitions for all kinetic constants are defined in (Eq. 4.22 to 4.26).

$$(4.22) \quad \frac{V_f}{E_T} = \frac{N_1}{C_{AB}} = \left(\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_7} + \frac{1}{k_{CAT}} \right)^{-1} \quad K_{Mm} = \frac{C_B}{C_{AB}} = \frac{V_f}{E_T k_1}$$

$$(4.23) \quad K_{Mmpp} = \frac{C_A}{C_{AB}} = \frac{V_f k_{CAT} + k_4}{E_T k_{CAT} k_3} \quad K_{Im} = \frac{C_0}{C_A} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$(4.24) \quad K_{Ip} = \frac{C_P}{C_{PQ}} = \frac{C_{BQ}}{C_{BPQ}} = \frac{k_5}{k_6} \quad K_{Iq} = \frac{C_0}{C_P} = \frac{C_B}{C_{BQ}} = \frac{k_7}{k_8}$$

$$(4.25) \quad K_{Ic} K_{IIp} = \frac{C_{AB}}{C_{ABI}} = \left(\frac{k_2}{k_1} \right) \left(\frac{V_f}{E_T k_7} \right) \quad K_{Ic} = \frac{C_P}{C_{PI}} = \frac{C_{BQI}}{C_{BQ}} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$(4.26) \quad K_{Ip} K_{IIp} = \frac{C_{AB}}{C_{ABP}} = \left(\frac{k_5}{k_6} \right) \left(\frac{V_f}{E_T k_7} \right)$$

Finally, after the appropriate substitutions, an orthodox rate equation (4.27) is obtained for the mechanism in figure 5.

$$(4.27) \quad v_0 = (V_f m mpp) / (\\ + K_{Im} K_{Mmpp} (1 + \frac{mp}{K_{Iq}} (1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Ip}})) + K_{Mmpp} m + K_{Mm} mpp \\ + \frac{K_{Mm}}{K_{Iq}} mp mpp (1 + \frac{c}{K_{Ic}} + \frac{mp}{K_{Ip}}) + m mpp (1 + \frac{c}{K_{Ic} K_{IIp}} + \frac{mp}{K_{Ip} K_{IIp}}))$$

In the next section we derive some basic predictions for this system, only the kinetic behavior in the absence of products is to be considered here.

4.3. Initial velocity patterns and Ca^{2+} inhibition in the absence of $MgPi^-$. This mechanism should explain the Ca^{2+} uncompetitive inhibition pattern against variable $MgPPi^{2-}$, only as long as the product is absent, but would not support the apparent uncompetitive inhibition response to Ca^{2+} against variable Mg^{2+} .

5. ORDERED BINDING OF $Mg \cdot PPI^{2-}$ FOLLOWED BY *free* Mg^{2+} PROMOTES CATALYSIS. *Free* Ca^{2+} FORMS A DEAD-END COMPLEX IN COMPETITION WITH *free* Mg^{2+}

This case is analogous to the one presented in section 4. However, in this section, the binding order of substrates is reversed, while the addition of Ca^{2+} is still competitive with Mg^{2+} , meaning, it has to bind to an *enzyme*. $MgPPi^{2-}$ complex.

Given the known structure to this family of enzymes, this new scheme is intuitive, because the catalytic nucleophile is a water molecule exquisitely placed in between two Mg^{2+} atoms which make contacts with the PPI with a geometry distinct to that of the $Mg_2 PPI^0$ complex found inside inorganic crystals. It is therefore the order of binding may be necessary for the assembly of the complex with productive geometry. In such scheme, the replacement of Mg^{2+} by Ca^{2+} would lead to a distorted geometry, because Ca^{2+} and

Mg^{2+} complexes are known to have important differences in geometrical and electronic features.

5.1. **Basic scheme and its corresponding set of differential equations.** The scheme representing the order of kinetic steps in this mechanism is shown in figure 6.

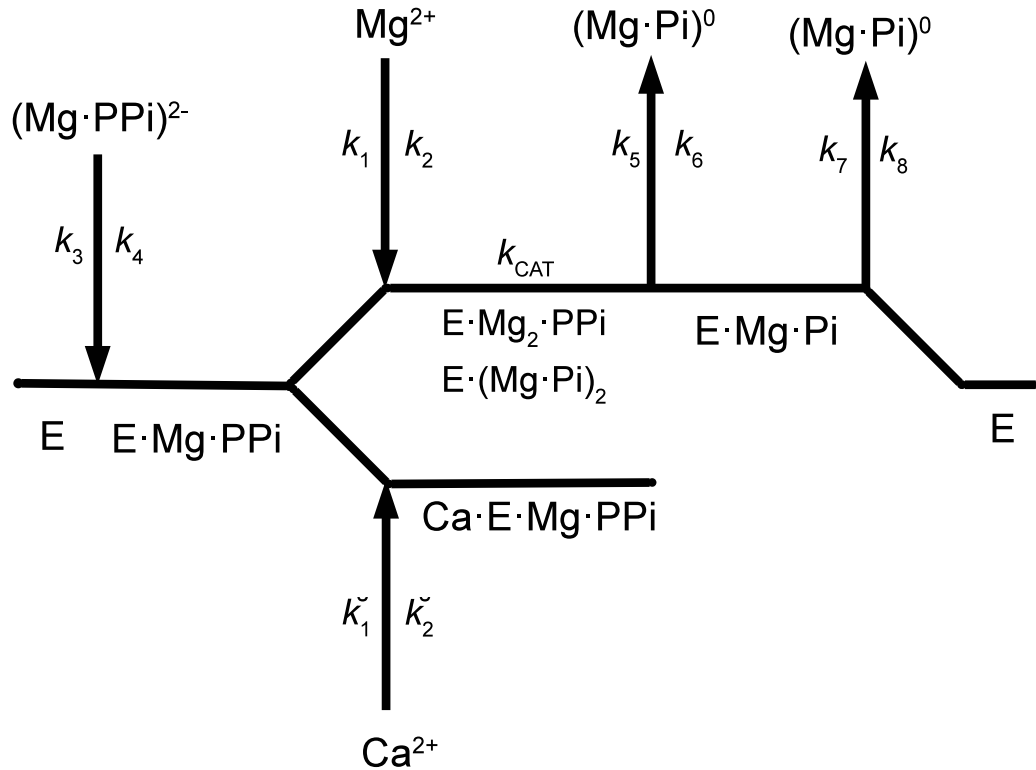


FIGURE 6. **Kinetic scheme for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants.** In this scheme $MgPPi^{2-}$ binds first, and Ca^{2+} bind competitively with Mg^{2+} to the resulting $E \cdot MgPPi$ complex. The numbering of the rate constants was chosen to coincide with previously analyzed versions.

Again, some definitions are given to simplify equation writing. These are presented in equation's sets 5.1, 5.2 and 5.3.

$$(5.1) \quad E = [\textit{free } E] \quad E_{MPP} = [E \textit{ Mg } P P i^{2-}] \quad E_{MPP}^M = [E \textit{ Mg}_2 P P i^0]$$

$$(5.2) \quad E_{MP}^{MP} = [E (\textit{Mg } P i)_2] \quad E_{MP} = [E \textit{ Mg } P i] \quad E_{MPP}^C = [C a^{2+} E \textit{ Mg } P P i^{2-}]$$

$$(5.3) \quad m_{pp} = [\textit{Mg } P P i^{2-}] \quad m_p = [\textit{Mg } P i^0] \quad m = [\textit{Mg}^{2+}] \quad c = [C a^{2+}]$$

Then, we present the equations for the product formation rate (Eq. 5.4), the mass balance (Eq. 5.5) and the disappearance of enzyme species (Eq. 5.6 to Eq. 5.11). Again, under steady state conditions, the system becomes algebraic. Its solution is presented in section 5.2.

$$(5.4) \quad v_0 = -\frac{d[PPi]}{dt} = k_{CAT} E_{MPP}^M$$

$$(5.5) \quad E_T = E + E_{MPP} + E_{MPP}^M + E_{MPP}^C + E_{MP}^{MP} + E_{MP}$$

$$(5.6) \quad -\frac{dE}{dt} = (k_3 m_{pp} + k_8 m_p) E - k_4 E_{MPP} - k_7 E_{MP}$$

$$(5.7) \quad -\frac{dE_{MPP}}{dt} = (k_4 + k_1 m + \check{k}_1 c) E_{MPP} - k_3 m_{pp} E - k_2 E_{MPP}^M - \check{k}_2 E_{MPP}^C$$

$$(5.8) \quad -\frac{dE_{MPP}^M}{dt} = (k_{CAT} + k_2) E_{MPP}^M - k_1 m E_{MPP}$$

$$(5.9) \quad -\frac{dE_{MP}^{MP}}{dt} = k_5 E_{MP}^{MP} - k_{CAT} E_{MPP}^M - k_6 m_p E_{MP}$$

$$(5.10) \quad -\frac{dE_{MP}}{dt} = (k_7 + k_6 m_p) E_{MP} - k_5 E_{MP}^{MP} - k_8 m_p E$$

$$(5.11) \quad -\frac{dE_{MPP}^C}{dt} = \check{k}_2 E_{MPP}^C - \check{k}_1 c E_{MPP}$$

5.2. System solution under steady state conditions. Again, under steady state conditions, enzyme species contained in 5.2 reach a constant concentration, and their rate of change approaches zero.

Equations 4.5, and 5.7 to 5.11 form a fully determined system of algebraic equations, while equation 5.6 is not independent, as in can be obtained from 4.5 and 5.7 to 5.11. The determinant is non-zero since all rate constants are real and positive, and the concentrations are zero of higher. The system can be solved for all enzyme forms and the solution for E_{MS}^{MS} can be substituted in 5.4 to obtain the final rate equation (Eq. 5.12). This last solution was also generated using the *solve* command in *MAXIMA*, followed by expansion of the denominator and collecting of the terms in *mpp* (substrate) and *m* (essential activator).

$$\begin{aligned}
(5.12) \quad v_0 = k_{CAT} m E m p p &= (k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} m m p p E_T) / (\\
&k_1 \check{k}_2 k_3 k_6 k_{CAT} m m p m p p + k_1 \check{k}_2 k_3 k_7 k_{CAT} m m p p + k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_{CAT} m m p p \\
&+ k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7 m m p p + \check{k}_2 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} m p p + c \check{k}_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} m p p \\
&+ k_2 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7 m p p + c \check{k}_1 k_2 k_3 k_5 k_7 m p p + k_1 \check{k}_2 k_6 k_8 k_{CAT} m m p^2 \\
&+ \check{k}_2 k_4 k_6 k_8 k_{CAT} m p^2 + k_2 \check{k}_2 k_4 k_6 k_8 m p^2 + k_1 \check{k}_2 k_5 k_8 k_{CAT} m m p \\
&+ \check{k}_2 k_4 k_5 k_8 k_{CAT} m p + k_2 \check{k}_2 k_4 k_5 k_8 m p + k_1 \check{k}_2 k_5 k_7 k_{CAT} m \\
&+ \check{k}_2 k_4 k_5 k_7 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 k_4 k_5 k_7)
\end{aligned}$$

After term collection, we have the orthodox form (Eq. 5.13), which can be simplified dividing numerator and denominator terms by \check{k}_2 using definitions (5.14, 5.15, 5.16, 5.17) and (5.18) to give equation (5.20).

$$\begin{aligned}
(5.13) \quad v_0 &= (k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} m m p p E_T) / (\\
&+ k_1 \check{k}_2 k_3 k_6 k_{CAT} m p m m p p + (k_1 \check{k}_2 k_3 k_7 k_{CAT} + k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_{CAT} + k_1 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7) m m p p \\
&\quad + (\check{k}_2 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 k_3 k_5 k_7) m p p \\
&\quad + (\check{k}_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} + \check{k}_1 k_2 k_3 k_5 k_7) c m p p \\
&\quad + k_1 \check{k}_2 k_6 k_8 k_{CAT} m m p^2 + k_1 \check{k}_2 k_5 k_8 k_{CAT} m m p + k_1 \check{k}_2 k_5 k_7 k_{CAT} m \\
&+ (\check{k}_2 k_4 k_6 k_8 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 k_4 k_6 k_8) m p^2 + (\check{k}_2 k_4 k_5 k_8 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 k_4 k_5 k_8) m p \\
&\quad + \check{k}_2 k_4 k_5 k_7 k_{CAT} + k_2 \check{k}_2 k_4 k_5 k_7)
\end{aligned}$$

$$(5.14) \quad C_{AB} = k_1 k_3 (k_7 k_{CAT} + k_5 k_{CAT} + k_5 k_7) \quad C_{ABP} = k_1 k_3 k_6 k_{CAT}$$

$$(5.15) \quad C_A = k_3 k_5 k_7 (k_2 + k_{CAT}) \quad C_{AI} = k_3 k_5 k_7 (k_2 + k_{CAT}) \frac{\check{k}_1}{\check{k}_2}$$

$$(5.16) \quad C_{BPQ} = k_1 k_6 k_8 k_{CAT} \quad C_{BQ} = k_1 k_5 k_8 k_{CAT}$$

$$(5.17) \quad C_B = k_1 k_5 k_7 k_{CAT} \quad C_{PQ} = k_4 k_6 k_8 (k_2 + k_{CAT})$$

$$(5.18) \quad C_Q = k_4 k_5 k_8 (k_2 + k_{CAT}) \quad C_0 = k_4 k_5 k_7 (k_2 + k_{CAT})$$

$$(5.19) \quad Num_1 = k_1 k_3 k_5 k_7 k_{CAT} \quad (- . - . -)$$

$$\begin{aligned}
(5.20) \quad v_0 &= (Num_1 E_T m m p p) / (C_{ABP} m p m m p p + C_{AB} m m p p + C_A m p p \\
&+ C_{AI} c m p p + C_{BPQ} m m p^2 + C_{BQ} m m p + C_B m + C_{PQ} m p^2 + C_Q m p + C_0)
\end{aligned}$$

This last equation (5.20) is now divided by C_{AB} and then, with the introduction of a few unitary ratios where convenient (5.21), kinetic constants can be defined in terms of coefficient ratios as shown in definitions (5.22, 5.23, 5.24, 5.25, 5.26) and (5.27).

(5.21)

$$v_0 = \left(\frac{Num_1}{C_{AB}} E_T m mpp \right) / \left(\frac{C_{ABP}}{C_{AB}} mp m mpp + m mpp + \frac{C_A}{C_{AB}} mpp + \frac{C_{AI}}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} c mpp \right. \\ \left. + \frac{C_{BPQ}}{C_B} \frac{C_B}{C_{AB}} m mp^2 + \frac{C_{BQ}}{C_B} \frac{C_B}{C_{AB}} m mp + \frac{C_B}{C_{AB}} m \right. \\ \left. + \frac{C_{PQ}}{C_Q} \frac{C_Q}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} mp^2 + \frac{C_Q}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} mp + \frac{C_0}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} \right)$$

$$(5.22) \quad K_{M mpp} = \frac{C_B}{C_{AB}} = \frac{1/k_3}{1/k_5 + 1/k_7 + 1/k_{CAT}} \quad K_{I mpp} = \frac{C_0}{C_A} = \frac{k_4}{k_3}$$

$$(5.23) \quad K_{M m} = \frac{C_A}{C_{AB}} = \frac{k_2 + k_{CAT}}{k_1 k_{CAT}} K_{M mpp} \quad K_{I c} = \frac{C_A}{C_{AI}} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$(5.24) \quad K_{IIp} = \frac{C_{AB}}{C_{ABP}} = \frac{1/K_{M mpp}}{1 + k_7/k_5 + k_7/k_{CAT}} \quad \frac{K_{I mpp}}{K_{Iq}} = \frac{C_Q}{C_A} = \frac{k_4}{k_3} \frac{k_8}{k_7}$$

$$(5.25) \quad \frac{K_{I mpp} K_{Im}}{K_{Ip} K_{Iq}} = \frac{C_{PQ}}{C_Q} \frac{C_Q}{C_A} \frac{C_A}{C_{AB}} \quad K_{Ip} = \frac{C_Q}{C_{PQ}} = \frac{k_5}{k_6}$$

$$(5.26) \quad K_{Ip} K_{Iq} = \frac{C_B}{C_{BPQ}} = \frac{k_5 k_7}{k_6 k_8} \quad K_{Iq} = \frac{C_B}{C_{BQ}} = \frac{k_7}{k_8}$$

$$(5.27) \quad \frac{V_f}{E_T} = \frac{Num_1}{C_{AB}}$$

Then, after substituting back ligand definitions (5.3), the final rate equation is obtained (5.28), which in a classic form becomes (5.29)

$$(5.28) \quad v_0 = (V_f m mpp) / \left(\frac{mp m mpp}{K_{IIp}} + m mpp + K_{M m} mpp + \frac{K_{M m}}{K_{I c}} c mpp \right. \\ \left. + \frac{K_{M mpp}}{K_{Iq} K_{Ip}} m mp^2 + \frac{K_{M mpp}}{K_{Iq}} m mp + K_{M mpp} m \right. \\ \left. + \frac{K_{I mpp} K_{M m}}{K_{Ip} K_{Iq}} mp^2 + \frac{K_{I mpp} K_{M m}}{K_{Iq}} mp + K_{M mpp} K_{M m} \right)$$

$$(5.29) \quad v_0 = \left(V_f \frac{m}{K_{M m}} \frac{mpp}{K_{M mpp}} \right) / \left(1 + \frac{K_{I mpp}}{K_{M mpp}} \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{K_{I mpp}}{K_{M mpp}} \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} \right. \\ \left. + \frac{m}{K_{M m}} \left(1 + \frac{mp}{K_{Iq}} + \frac{mp^2}{K_{Ip} K_{Iq}} \right) + \frac{mpp}{K_{M mpp}} \left(1 + \frac{c}{K_{I c}} \right) + \frac{m}{K_{M m}} \frac{mpp}{K_{M mpp}} \left(1 + \frac{mp}{K_{IIp}} \right) \right)$$

In the absence of products and after back-substitution of ligand definitions (1.5, 1.6, 1.7 and 1.8), equation (5.29) becomes (5.30).

$$(5.30) \quad v_0 = \frac{V_f \frac{[Mg^{2+}]}{K_{Mm}} \frac{[MgPPi^{2-}]}{K_{Mmpp}}}{1 + \frac{[Mg^{2+}]}{K_{Mm}} + \frac{[MgPPi^{2-}]}{K_{Mmpp}} \left(1 + \frac{[Ca^{2+}]}{K_{Ic}}\right) + \frac{[Mg^{2+}]}{K_{Mm}} \frac{[MgPPi^{2-}]}{K_{Mmpp}}}$$

5.3. Initial velocity patterns and Ca^{2+} inhibition in the absence of $MgPi^-$. Now, as before, equation (5.29) can be arranged into the classic MM form with $Mg \cdot Ppi^{2-}$ as variable substrate, constant Mg^{2+} and fixed-varied Ca^{2+} (see Eq. 2.37). The the apparent maximum velocity and the apparent specificity constants would be given, respectively, by (5.31) and (5.32).

$$(5.31) \quad {}^{APP}V_{MAX} = (V_f) \frac{m}{K_{Mm} \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}}\right) + m \left(1 + \frac{mp}{K_{IIP}}\right)}$$

$$(5.32) \quad {}^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \left(\frac{V_f}{K_{Mmpp}} \right) \frac{m}{K_{Mm} \left(1 + \frac{K_{Impp}}{K_{Mmpp}} F_{Imp}\right) + m (1 + F_{Imp})}$$

$$(5.33) \quad F_{Imp} = \frac{mp}{K_{Iq}} \left(1 + \frac{mp}{K_{IP}}\right)$$

In this case, the double reciprocal patterns would be parallel (uncompetitive), and the apparent V_{MAX} would be linearly dependent of $[Ca^{2+}]$ and would shown and hyperbolic dependence on $[Mg^{2+}]$. Figure 7 shows the shape of the expected double reciprocal plots (panel A) and the corresponding replots (panel B) from two experiments, at two fixed levels of $[Mg^{2+}]$ (panel B). Panel C on the same figure (7) shows the expected replot of the slopes from a series of experiments at fixed varied $[Mg^{2+}]$, the slope would not be affected by the presence of $[Ca^{2+}]$.

Equation (5.29) can also be arranged into the MM form with variable $[Mg^{2+}]$ and fixed-varied $[MgPPi^{2-}]$, with Ca^{2+} as inhibitor (see Eq. 2.40). The resulting equation has an ${}^{APP}V_{MAX}$ and ${}^{APP}(V/K)$ given by equations (5.34) and (5.36), respectively.

$$(5.34) \quad {}^{APP}V_{MAX} = (V_f) \frac{mpp}{K_{Mmpp} (1 + F_{Imp}) + mpp \left(1 + \frac{mp}{K_{IIP}}\right)}$$

$$(5.35) \quad F_{Imp} = \frac{mp}{K_{Iq}} \left(1 + \frac{mp}{K_{IP}}\right)$$

$$(5.36) \quad {}^{APP} \left(\frac{V_{MAX}}{K_M} \right) = \left(\frac{V_f}{K_{Mmpp}} \right) \frac{mpp}{K_{Mmpp} \left(1 + \frac{K_{Impp}}{K_{Mmpp}} F_{Imp}\right) + m \left(1 + \frac{c}{K_{Ic}}\right)}$$

These last equations (5.34 and 5.36) predict a clear competitive pattern of inhibition by $[Ca^{2+}]$ against $[Mg^{2+}]$. This pattern may appear equivalent to the one presented in

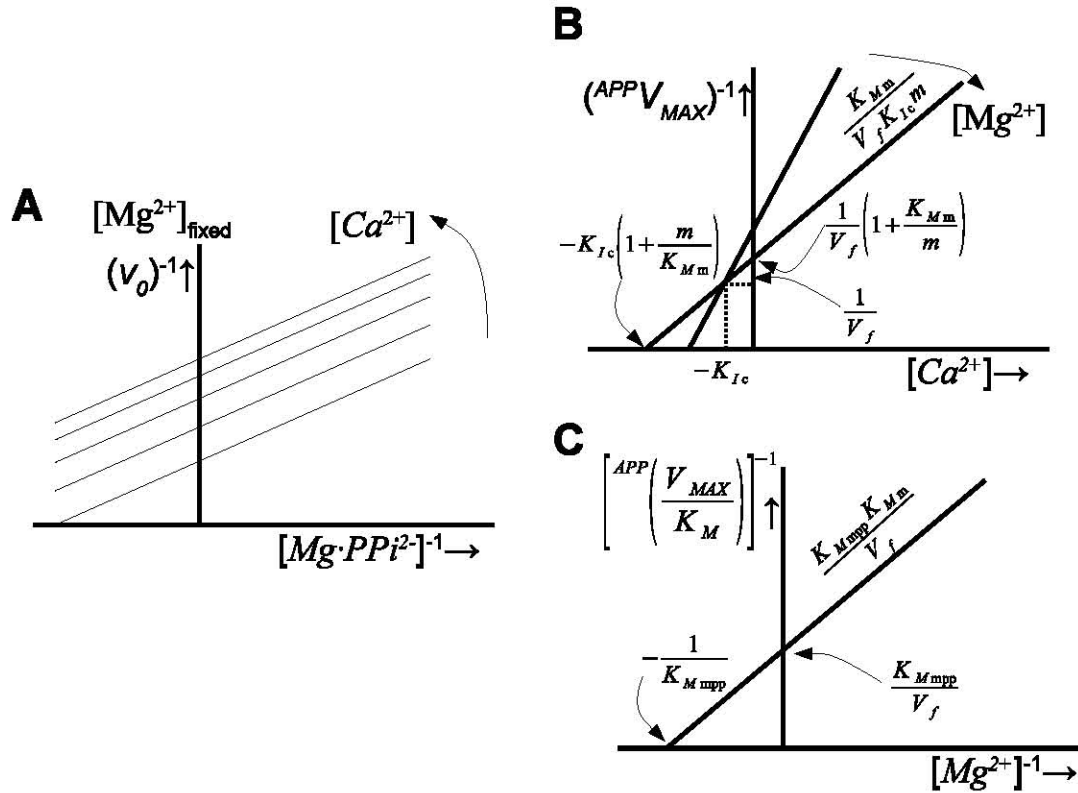


FIGURE 7. Lineweaver-Burk plots for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants, as predicted by the scheme in figure 6. (A) is the resulting inhibition pattern with $[Mg \cdot PPi^{2-}]$ as substrate and $[Ca^{2+}]$ is fixed-varied at a constant $[Mg^{2+}]$. (B) is the replot of the ordinate intercept from two plots as in (A) but performed at different level of fixed $[Mg^{2+}]$. (C) The replot of the slope from a series of experiments as in (A) performed at different level of fixed $[Mg^{2+}]$.

section 2, for the same experimental conditions, however, the pattern against $[Mg \cdot PPi^{2-}]$ presented in figure 7 presents clear differences, which can be indicative of the sequence of addition of Mg^{2+} and $Mg \cdot PPi^{2-}$ to the enzyme. In other words, is the $[Ca^{2+}]$ inhibition against $[Mg^{2+}]$ is competitive, and given a ordered addition of Mg^{2+} and $Mg \cdot PPi^{2-}$, supported by the initial velocity patters, a non-competitive inhibition pattern of Ca^{2+} against $Mg \cdot PPi^{2-}$ is expected if Mg^{2+} binds first and an uncompetitive pattern is predicted if $Mg \cdot PPi^{2-}$ binds first.

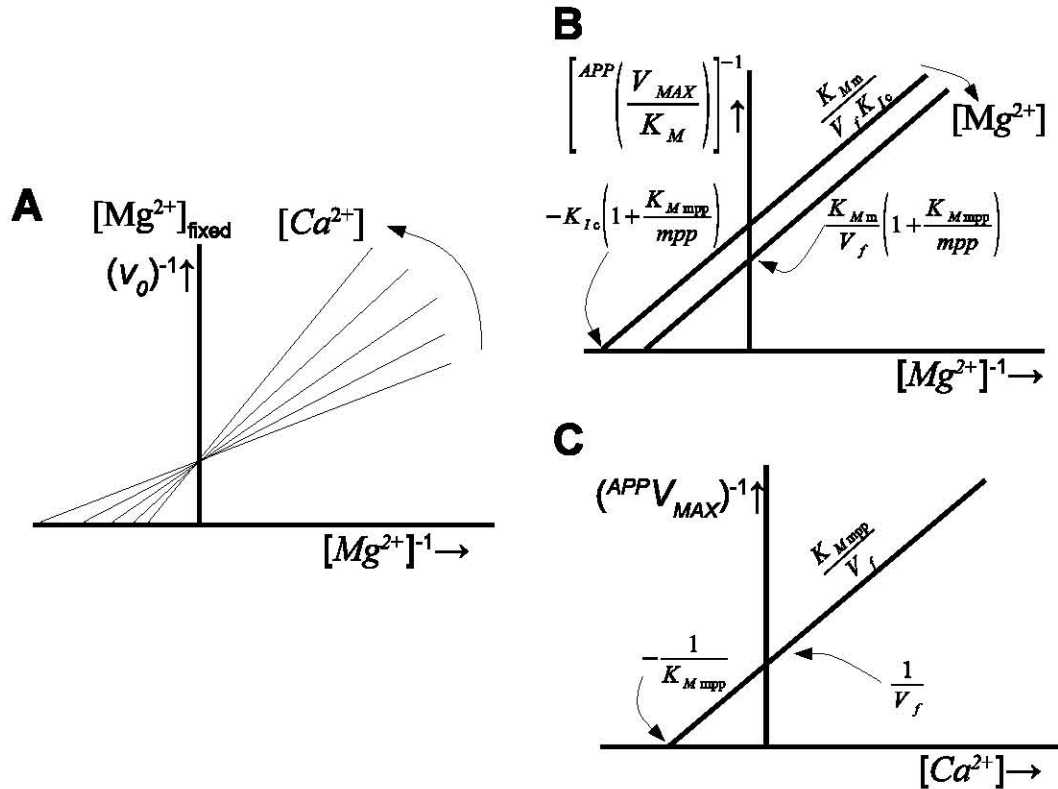


FIGURE 8. **Lineweaver-Burk plots for the pyrophosphate hydrolysis by Mg^{2+} -dependent inorganic pyrophosphatases from plants, as predicted by the scheme in figure 6.** (A) is the resulting inhibition pattern with $[Mg^{2+}]$ as variable activator and $[Ca^{2+}]$ is fixed-varied inhibitor, at a constant $[MgPPi^{2-}]$. (B) is the replot of the slope form two plots as in (A) but performed at different level of fixed $[MgPPi^{2-}]$. (C) The replot of the intercepts to the ordinate from a series of experiments as in (A) performed at different level of fixed $[MgPPi^{2-}]$.

The replot of the Lineweaver-Burk slopes against $[Ca^{2+}]$ would be linear, but the line is predicted to show an hyperbolic dependence of the $[Mg^{2+}]$ employed for the experiment. At high $[Mg^{2+}]$ the inhibition by $[Ca^{2+}]$ becomes negligible. The corresponding plots and replots are shown in figure 8. The replots in (C) for figure 7 and (B) for figure 8 are the replots from the initial velocity patterns, as these two replots are independent of $[Ca^{2+}]$, as indicated in these figure panels, the true kinetic parameters for the enzyme can be obtained from them.

REFERENCES

1. W. W. Cleland. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67(0):104–137, 1963.
2. E. Navarro-De la Sancha, M. P. Coello-Coutiño, L. G. Valencia-Turcotte, E. E. Hernández-Domínguez, G. Trejo-Yepes, and R. Rodríguez-Sotres. Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 172(4):796–807, 2007.
3. Esko Oksanen, Anna-Karoliina Ahonen, Heidi Tuominen, Vesa Tuominen, Reijo Lahti, Adrian Goldman, and Pirkko Heikinheimo. A complete structural description of the catalytic cycle of yeast pyrophosphatase. *Biochemistry*, 46(5):1228–39, Feb 2007.