



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA PIROFOSFATASA  
CITOPLÁSMICA DE *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VERÓNICA JAZMÍN SÁNCHEZ ORTIZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Heliodoro Celis Sandoval  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
Dr. Diego González Halphen  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

MÉXICO, D.F., ABRIL DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA PIROFOSFATASA**

**CITOPLÁSMICA DE *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VERÓNICA JAZMÍN SÁNCHEZ ORTIZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Heliodoro Celis Sandoval  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
Dr. Diego González Halphen  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MÉXICO, D.F., ABRIL DE 2014**



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 17 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna, SÁNCHEZ ORTIZ VERÓNICA JAZMÍN con número de cuenta 9931111-1 con la tesis titulada "Características Bioquímicas y Moleculares de la Pirofosfatasa citoplásmica de las Bacterias Púrpura no sulfurosas *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus*", realizada bajo la dirección del DR. HELIODORO CELIS SANDOVAL:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ  
Vocal: DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG  
Secretario: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN  
Suplente: DR. TOMAS NEPOMUCENO MEJÍA  
Suplente: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de marzo de 2014.

*María del Coro Arizmendi Arriaga*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación recibida durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Fisiología Celular por el apoyo y facilidades brindadas durante el proyecto.

Al Dr. Heliodoro Celis Sandoval por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía y al Dr. Diego González Halphen, miembros del Comité Tutorial, que gracias a sus acertadas observaciones y gran experiencia enriquecieron este trabajo.

A los miembros sinodales por sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por todo el apoyo académico, técnico y moral. Dr. Suaste Ud. fue parte fundamental del desarrollo de este proyecto... Muchas gracias.

Al Dr. Alfredo Torres Larios y a los miembros de su laboratorio por incluirme a sus seminarios semanales y por sus valiosos comentarios.

Al apoyo técnico recibido por parte del Dr. Georges Dreyfus, del Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo y de Ma. Teresa Ballado Nava.

A Gabriela Valdéz, secretaria del Departamento de Genética Molecular.

Al Dr. Fernando Lledias y a Salvador Damián Zamacona por el apoyo técnico.

*Dedicatoria*

*Especialmente a mi madre M. Eva Ortiz Robles por ser mi mejor amiga.*

*A mi familia que amo tanto: Javier Sánchez Olivares, Brisa Simandra, Eva María, Francisco Javier, Karla Angélica, Edwin Fernando, Jordán Alexis, Rodrigo Tadeo, Zuri Sofía y Juan Sámano.  
Muchas gracias por existir.*

*A la familia González Guevara por todo el apoyo y cariño que he recibido.*

*A Andrés González Guevara... muchas gracias por todo compañero de vida.*

## Índice

	<u>Pág.</u>
<b>Resumen</b>	<u>1</u>
<b>Abstract</b>	<u>2</u>
<b>Introducción</b>	<u>3</u>
<b>El fósforo en los sistemas biológicos</b>	<u>3</u>
<b>Pirofosfatasa</b>	<u>7</u>
Pirofosfatasa membranal	<u>8</u>
Pirofosfatasa citoplásmica	<u>9</u>
<b>Antecedentes</b>	<u>16</u>
<b>Bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas</b>	<u>18</u>
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	<u>19</u>
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<u>20</u>
<b>Objetivos</b>	<u>22</u>
<b>Material y métodos</b>	<u>23</u>
<b>Cepas y plásmidos utilizados</b>	<u>23</u>
<b>Medios de cultivo y condiciones de crecimiento</b>	<u>24</u>
Bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas	<u>24</u>
<i>Escherichia coli</i>	<u>25</u>
<b>Métodos de biología molecular</b>	<u>26</u>
Extracción de ADN cromosomal	<u>26</u>
Reacción de PCR	<u>26</u>
Purificación del plásmido por estuche comercial	<u>28</u>
Purificación de plásmidos por medio de minipreparaciones hervidas	<u>28</u>
Digestión de ADN	<u>29</u>
Desfosforilación de ADN	<u>29</u>
Ligación de fragmentos de ADN	<u>29</u>
Transformación de <i>E. coli</i> por el método de CaCl <sub>2</sub>	<u>29</u>



Transformación de células de <i>E. coli</i> por electroporación	<u>30</u>
Protocolos de purificación de proteína	<u>31</u>
Purificación de la pirofosfatasa recombinante	<u>31</u>
Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica silvestre	<u>32</u>
a) Familia I	<u>32</u>
b) Familia II	<u>33</u>
Métodos bioquímicos	<u>33</u>
Determinación de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa citoplásmica	<u>33</u>
Electroforesis en geles de poliacrilamida	<u>35</u>
Zimograma	<u>36</u>
Isoelectroenfoque	<u>36</u>
Determinación del peso molecular de una proteína mediante cromatografía de filtración en gel	<u>37</u>
Determinación de proteína	<u>37</u>
Resultados y discusión	<u>38</u>
Alineamientos de las secuencias de las pirofosfatasas	<u>38</u>
Obtención de las pirofosfatasas recombinantes	<u>41</u>
Características bioquímicas de las pirofosfatasas citoplásmicas recombinantes de <i>Rhodomicrobium vannielii</i> y <i>Rhodobacter capsulatus</i>	<u>49</u>
Perfil de pH	<u>52</u>
Efecto de iones divalentes sobre la actividad hidrolítica	<u>54</u>
Termoestabilidad	<u>60</u>
Efecto del Fluoruro sobre la actividad hidrolítica	<u>63</u>
Constantes cinéticas	<u>64</u>
Peso molecular y estructura oligomérica de $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$ y $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$	<u>67</u>
Punto isoeléctrico	<u>73</u>
Conclusiones	<u>75</u>
Referencias bibliográficas	<u>77</u>

## Resumen

El pirofosfato es el polímero de fosfato mas pequeño y es una molecula rica en energía producida en un gran número de reacciones biosintéticas. Las enzimas encargadas de hidrolizar este compuesto se denominan pirofosfatasas (PPiase). Existen dos tipos de estas enzimas, las pirofosfatasas integrales de membrana y las pirofosfatasas citoplásmicas.

Las pirofosfatasas citoplasmáticas han sido agrupadas en 2 familias no homólogas, familia I y familia II, las cuales difieren en la secuencia primaria de aminoácidos y estructura secundaria aunque conservan similitud en su sitio activo constituyendo un ejemplo de evolución convergente. Debido a que son pocas las pirofosfatasas citoplásmicas de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas descritas y caracterizadas hasta el momento, este proyecto tuvo como objetivo el estudiar en detalle las características bioquímicas y moleculares de la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodomicrobium vannielii* (PPiase familia I) y *Rhodobacter capsulatus* (PPiase familia II), bacterias del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias presentes en aguas residuales y pantanos. Para abordar este objetivo se obtuvieron las proteínas recombinantes de las PPiases de ambas especies con un comportamiento hidrolítico similar al que presentan las proteínas silvestres purificadas parcialmente. Utilizando cromatografía de exclusión molecular, se encontró que la pirofosfatasa recombinante de *R. vannielii* presenta 3 estados oligoméricos funcionales con peso molecular aproximado de 242.8, 141.2 y 94.23 kDa (10, 6 y 4 subunidades, respectivamente); esta mezcla oligomérica alcanza su máxima actividad a pH 8.6. Por otro lado, la pirofosfatasa citoplásmica recombinante de *R. capsulatus* es un dímero formado por 2 subunidades de aproximadamente 37 kDa; presenta actividad hidrolítica máxima en el intervalo de pH 8.0- 10.0.

## Abstract

Pyrophosphate is the smallest polymer of phosphate and energy-rich molecule produced in many biosynthetic reactions. The enzymes that hydrolyze this compound are termed pyrophosphatase (PPiase). There are two types of these enzymes integral membrane pyrophosphatase and cytoplasmic pyrophosphatase.

The cytoplasmic pyrophosphatases have been grouped into two non homologous families, family I and family II, which vary in their primary amino acid sequence and secondary structure, but their active site is very similar, constituting this an example of convergent evolution. Due to the few cytoplasmic pyrophosphatases of purple non sulfur photosynthetic bacteria that have been described and characterized so far, this project aims to study in detail the biochemical and molecular characteristics of the cytoplasmic pyrophosphatase of *Rhodomicrobium vannielii* (family I pyrophosphatase) and *Rhodobacter capsulatus* (family II pyrophosphatase), bacteria from the  $\alpha$ -proteobacteria group present in residual waters and swamps. To reach this objective, recombinant proteins of the PPiases of both species were obtained with a similar hydrolytic behavior to that of the wild-partially purified proteins. Using molecular exclusion chromatography, it was found that the recombinant pyrophosphatase of *R. vannielii* presents 3 functional oligomeric states with apparent molecular weight of 242.8, 141.2 and 94.23 kDa approximately (10, 6 and 4 subunits). This oligomeric mixture reaches its maximum activity at a pH 8.6. The recombinant cytoplasmic pyrophosphatase of *R. capsulatus* is a dimer formed of 2 subunits of approximately 37 kDa; it presents maximum hydrolytic activity in the range pH 8-10.

## Introducción

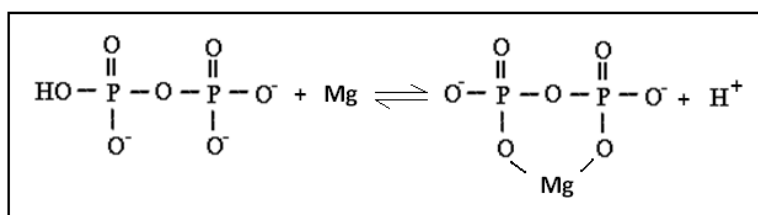
### El fósforo en los sistemas biológicos

Los elementos químicos esenciales que constituyen a los seres vivos son: oxígeno (O, ~ 62.81%), carbono (C, ~ 19.37%), hidrogeno (H, ~ 9.31%), nitrógeno (N, ~ 5.14%), azufre (S, ~ 0.66%) y fósforo (P, ~ 0.64%), este último elemento además de formar parte de ácidos nucleicos, fosfolípidos, lipopolisacaridos, coenzimas y otros solutos citoplásmicos (Kamat *et al.*, 2011), también forma parte de todas las moléculas encargadas de la transferencia de energía dentro de la célula que enlazan al catabolismo con el anabolismo (Romero y de Meis, 1989).

El fósforo no se encuentra en la naturaleza como elemento ya que es muy reactivo con el oxígeno y al estar en contacto con el aire se combina para formar fosfato inorgánico [Ortofosfato, (Pi),  $\text{PO}_4^{3-}$ ]. El fosfato inorgánico en condiciones acuosas alcalinas esta como  $\text{HPO}_4^{2-}$  y en condiciones acuosas ácidas se encuentra como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Busman *et al.*, 2002) y es en estas dos formas que es transportado al interior de la célula (Rao y Torriani, 1990; Losada *et al.*, 1999; van Veen, 1997).

Una vez dentro de la célula, el fosfato puede encontrarse en forma libre (Pi), o esterificado a un grupo carboxilo como en azúcares fosfato y fosfolípidos o unido a otro fosfato por un enlace fosfoanhidro como en los nucleósidos di y tri fosfato, los polifosfatos y el pirofosfato (Losada *et al.*, 1999). Dentro de estas formas estructurales del fosfato, los polifosfatos (poliP) son los polímeros lineales más largos que tienen enlaces fosfoanhidros igual que el ATP; son sintetizados por un grupo de cinasas específicas (poliP). En las células de animales, los poliP son

estructuras de 15 a 750 residuos de longitud que alcanzan concentraciones de 0.15-1.5  $\mu\text{M}$  y están contenidos en vacuolas intracelulares (Bergwitz y Juppner, 2011). Funcionan como reserva de fosfato al formar agregados con cationes multivalentes que ofrecen una gran ventaja sobre el Pi libre por su baja solubilidad en agua (Kulaev y Vaganov, 1983). En bacterias los polifosfatos sirven como recurso de energía en una variedad de procesos celulares, como la patogenicidad (Brown y Kornberg, 2008). El compuesto de fosfato más sencillo se conoce como pirofosfato inorgánico (PPi) y está constituido por dos ortofosfatos unidos por un enlace anhidro (**Figura 1**). Este enlace de alta energía ( $\Delta G^\circ = -22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ó  $-0,22 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$  ó  $-7.0$  a  $-9.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$  en agua) y es conocido como puente pirofosfato. Su potencial químico es muy similar al del ATP ( $\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ó  $-0,31 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$  ó  $-3.0$  a  $-6.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$  en agua) (Lahti, 1983), por lo que se ha sugerido que el PPi pudo ser el antecesor del ATP como molécula energética durante las etapas tempranas de la evolución química (Pérez-Castañeira *et al.*, 2001). Su nombre deriva del proceso de deshidratación del ortofosfato por calor mediante el cual es obtenido industrialmente (Lahti *et al.*, 1988).

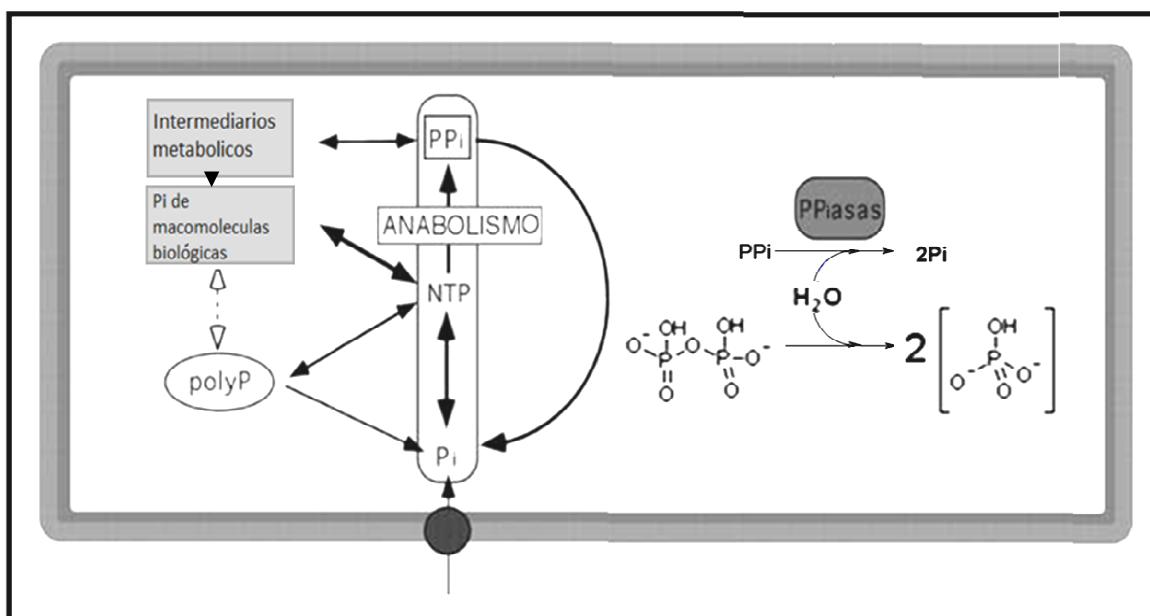


**Figura 1.** Estructura del PPi a pH 8.2. Tomada de Cooperman (1982).

La producción de pirofosfato inorgánico en las células en crecimiento es particularmente alta como consecuencia de los procesos biosintéticos dependientes de nucleótidos trifosfato (NTP's), donde cada vez que se agrega un monómero se produce una molécula de PPI (Klemme, 1976; Lahti, 1983; Lahti *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990). Además el pirofosfato puede ser formado como el ATP, por procesos de fosforilación, (Barltrop *et al.*, 1963; Baltscheffsky *et al.*, 1966) y glicólisis (Mansurova *et al.*, 1976). En células animales se han reportado concentraciones de PPI relativamente bajas (1  $\mu\text{M}$  a 2.2  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, en bacterias la concentración puede llegar a los 300  $\mu\text{M}$  (Lahti *et al.*, 1991).

Los organismos dependen de reacciones químicas que producen y consumen energía. El adenosín 5' trifosfato (ATP) es una molécula que enlaza estos procesos energéticos, está compuesta de una purina (adenina) unida a la D-ribosa y una cadena de 3 grupos fosforilos unidos por enlaces fosfoanhidros. Los últimos dos grupos fosforilo representan el enlace rico en energía conocido como puente pirofosfato. Otros nucleótidos trifosfatados son utilizados también como recurso de energía, por ejemplo, el guanosín trifosfato (GTP) es donador de energía en la gluconeogénesis y en la síntesis de proteínas; la uridina trifosfato (UTP) es utilizada en la síntesis de glucógeno y la citidina trifosfato (CTP) participa en la síntesis de lípidos. El pirofosfato inorgánico es la molécula más sencilla que presenta este tipo de enlace de alta energía, es también más estable y de fácil almacenamiento capaz de sustituir al ATP en muchas reacciones de fosforilación. Por ejemplo, algunas bacterias anaerobias como *Propionibacterium shermanii* o *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* pueden producir energía mediante una glucólisis atípica

dependiente de PPI, donde dos pasos irreversibles catalizados por la fosfofructocinasa (PFK-ATP) y la piruvato cinasa (PK) son llevados a cabo reversiblemente por la PFK-PPI y la piruvato fosfato dicinasa (PPDK), respectivamente (Mertens, 1993; Reeves *et al.*, 1974). A pesar del consumo de PPI en varias reacciones celulares, el principal mecanismo que regula el contenido de pirofosfato intracelular corresponde a una reacción de hidrólisis catalizada por la enzima pirofosfatasa (PPiasa) (Klemme y Gest 1971; Lahti, 1983; Chen *et al.*, 1990) (**Figura 2**). En el trabajo realizado por Stockbridge y Wolfenden en el 2011, se determinó la hidrólisis espontánea a 25°C de diferentes especies de pirofosfato (PPI), como  $\text{PPI}^{2-}$  ( $\sim 5.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) o  $\text{Mg-PPI}^{2-}$  ( $\sim 2.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) y se compararon contra la velocidad de hidrólisis cuando la pirofosfatasa de *E. coli* cataliza la reacción del complejo  $\text{Mg-PPI}^{2-}$  ( $2.0 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ) a pH 8.5.



**Figura 2.** Esquema metabólico que muestra el ciclo del fosfato inorgánico NTP Nucleósidos trifosfatados; PoliP, polifosfatos inorgánicos; PPiasas, pirofosfatasas. (Modificado de Pérez-Castañeira *et al.*, 2001 y <http://bq.unam.mx/~evazquez>).

## Las pirofosfatasa

Las pirofosfatasa inorgánicas (EC 3.6.1.1: PPIasa) son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis exergónica del pirofosfato (PPi), lo que permite que reacciones termodinámicamente desfavorables se lleven a cabo (Kornberg, 1957; Chen *et al.*, 1990).

En 1990 Chen y colaboradores utilizando una mutante de *E. coli* con una inserción en el gen de la pirofosfatasa *ppa::kan<sup>r</sup>*, la cual expresaba el gen silvestre de la pirofosfatasa (*pp<sup>+</sup>*) presente en un plásmido sensible a temperatura. Demostraron que la expresión de éste gen es esencial para el crecimiento de la bacteria a 30 °C, sin embargo, esta cepa fue incapaz de crecer a la temperatura restrictiva (42 °C). En el mismo trabajo, utilizando el mismo fondo genético (*ppa::kan<sup>r</sup>*), se introdujo una copia extra del gen silvestre de la pirofosfatasa bajo el control del promotor *lac* (inducible con IPTG), se observó que en ausencia del inductor la cantidad de pirofosfato intracelular se incrementa y el crecimiento se ve inhibido. Por el contrario, cuando se induce la expresión de la PPIasa con IPTG, se recuperan los niveles de pirofosfato intracelular y el crecimiento se restablece. Mediante este conjunto de experimentos se sugirió que la pirofosfatasa es esencial para el crecimiento celular.

Actualmente se han identificado 3 tipos de PPIasas no homólogas que llevan a cabo esta función fisiológica: la pirofosfatasa membranal o translocadora de protones y 2 familias de pirofosfatasa citoplásmica (PPIasa), familia I y familia II (Klemme y Gest, 1971; Celis *et al.*, 2003).



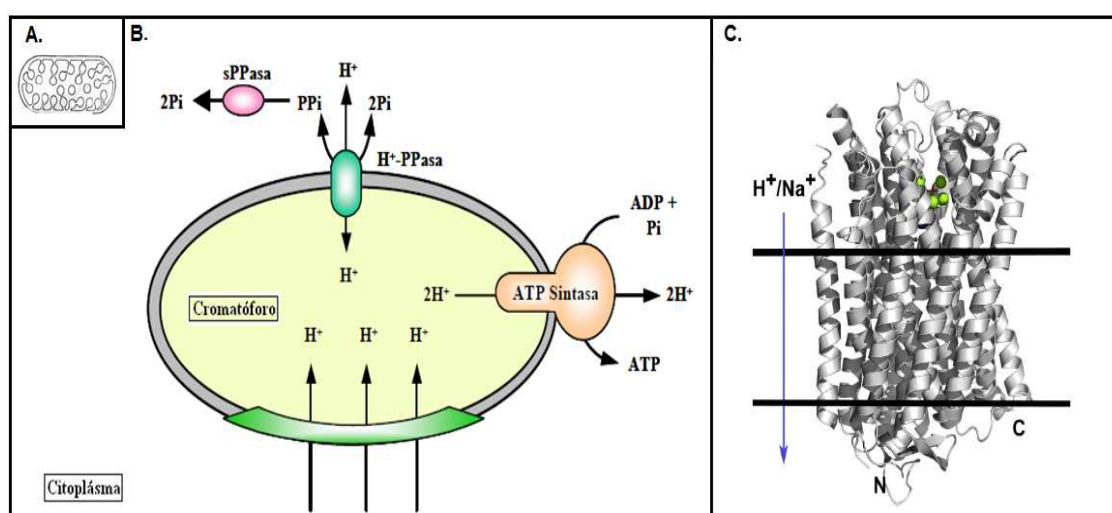
## Pirofosfatasa membranal

Bajo condiciones fisiológicas la pirofosfatasa de membrana ( $H^+PPi$ asa) puede sintetizar e hidrolizar pirofosfato utilizando la energía de la hidrólisis para translocar protones a través de la membrana interna (**Figura 3**) (Baltscheffsky, 1967; Romero y Celis, 1990 y Maeschima, 2000). Estas enzimas se han dividido de acuerdo a la presencia de un aminoácido localizado cerca de la interfase citoplasma-membrana, cuando se trata de una alanina, las  $H^+PPi$ asas son dependientes de  $K^+$  y cuando una lisina ocupa ese lugar, la enzima es independiente de este ion (Belogurov y Lahti, 2002; Luoto *et al.*, 2011).

Diversos trabajos han reportado la presencia de estas enzimas de membrana en organismos de los 3 dominios (eucaria, bacteria y arquea). Todas la  $H^+PPi$ asas conocidas presentan actividad de hidrólisis de  $PPi$  *in vitro* (Rea y Poole, 1993; Baltscheffsky *et al.*, 1999; Maeshima, 2000). Ésta proteína membranal, a pesar de que hidroliza pirofosfato, no guarda relación alguna en secuencia y estructura con la pirofosfatasa citoplásmica. Estructuralmente consiste en un homodímero que contiene el sitio catalítico con 2 sitios de unión para magnesio (Rapoport *et al.*, 1973), uno para pirofosfato (Ridlington y Butler, 1972) y dos para  $Pi$  (Hamm y Cooperman, 1978). Este polipéptido forma un canal de protones que presenta de 15 a 17 helices transmembranales (**Figura 3 C**) (Mimura *et al.*, 2004; Kajander *et al.*, 2013).

En 1991 Nyren y Strid comenzaron a estudiar el papel fisiológico de las  $H^+PPi$ asas dentro del metabolismo celular, pero fue hasta el 2004 cuando el grupo

de Celis demostró que su papel en el metabolismo es colaborar en el crecimiento en condiciones de baja energía, como en el crecimiento aeróbico a bajas concentraciones de oxígeno, la transición del metabolismo respiratorio a fotosintético y en el crecimiento fotosintético a intensidades luminosas bajas o de bajo potencial electroquímico de  $H^+$  y en el caso de las mutantes respiratorias con bajas tensiones de  $O_2$  (García Contreras *et al.*, 2004).



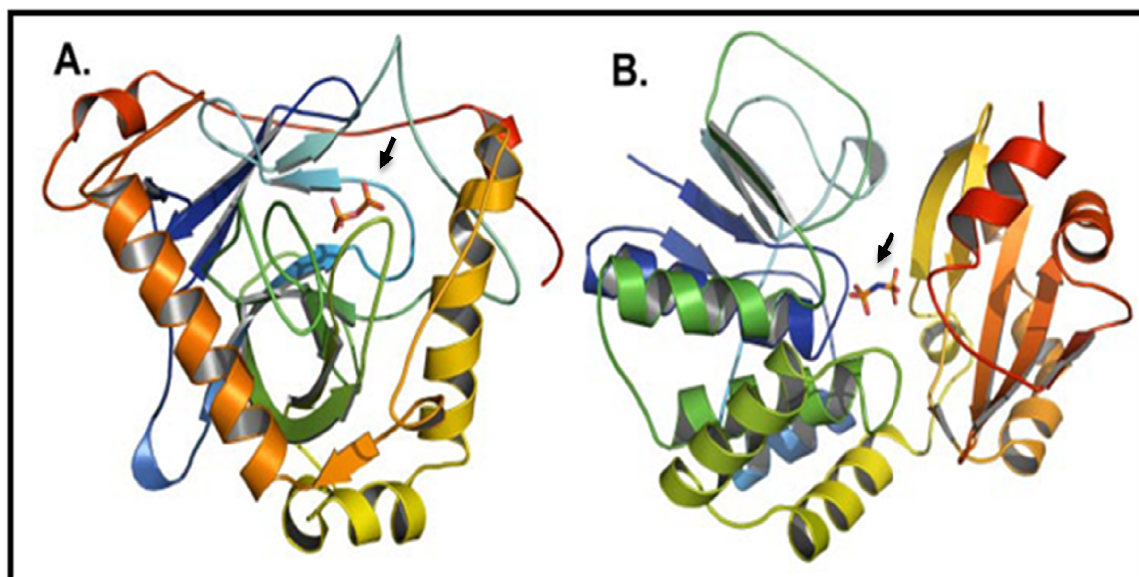
**Figura 3.** Esquema de los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. En **A.** esquema de una célula de *R. rubrum*, mostrando las invaginaciones de la membrana interna que forman los cromatóforos. En **B.** en estas vesículas cerradas está presente toda la maquinaria fotosintética, incluida la ATP-sintasa. Asociada a la membrana se encuentra también la  $H^+PPi$ asa. Tomada de López-Marqués *et al* 2004. En **C.** estructura cristalográfica de la  $H^+PPi$ asa del frijol (Lin *et al.*, 2012; Kajander *et al.*, 2013).

### Pirofosfatasas citoplásmicas

Las pirofosfatasas solubles o citoplásmicas (PPiasas,  $PPi$  hidrolasas) son exclusivamente hidrolíticas, se encuentran distribuidas en prácticamente todos los organismos y son esenciales para la viabilidad celular (Kornberg, 1957; Chen *et al.*, 1990). Generalmente más del 90% de la actividad total de la PPiase es realizada

por las proteínas solubles del citoplasma (Howard y Lungren, 1970) que corresponden a dos familias no homólogas de pirofosfatasa, familia I y familia II (FI y FII, respectivamente). Éstas enzimas han sido caracterizadas hasta la fecha con gran detalle, a pesar de realizar la misma función biológica, difieren en secuencia y en estructura, además de no tener un origen evolutivo común (Zyryanov *et al.*, 2002; Gómez-García *et al.*, 2002).

Por muchos años se pensó que las PPisas citoplásmicas utilizaban mecanismos similares de catálisis, pero análisis bioquímicos y cristalográficos recientes han mostrado que tienen características diferentes (**Figura 4**) (Baykov *et al.*, 1999; Fabrichniy *et al.*, 2007; Heikinheimo *et al.*, 2001; Young *et al.*, 1998; Sivula *et al.*, 1999; Kajander *et al.*, 2013), es por ello que representan un ejemplo de evolución convergente (Zyryanov *et al.*, 2002; Gómez-García *et al.*, 2002).



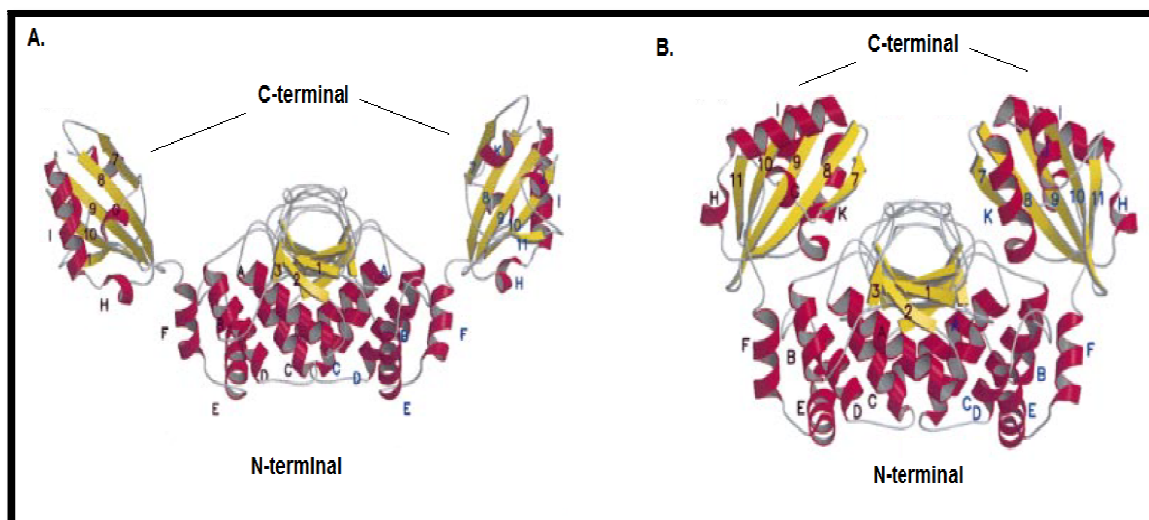
**Figura 4.** Comparación de la estructura cristalográfica de la PPIasa de familia I y la de familia II. En **A.** modelo de la PPIasa de familia I de la levadura (Heikinheimo *et al.*, 2001) y en **B.** se muestra el modelo de la PPIasa de familia II de *Bacillus subtilis* (Fabrichniy *et al.*, 2007). Las estructuras de las enzimas se muestran en una gama de colores donde en azul se representa el N-terminal y en rojo el C-terminal. Los sustratos se indican con una flecha: PPI para la familia I y paranitrofenilfosfato (PNP) para la familia II.

Las pirofosfatasa de familia I han sido las más estudiadas, en un análisis filogenético molecular de diversos organismos con PPiase citoplásmica de familia I pertenecientes a los 3 dominios que realizó el grupo de Serrano (Gómez-García *et al.*, 2006), se sugiere la presencia de dos linajes evolutivamente divergentes en este grupo: el eucariótico y el procariótico. En el eucariótico la PPiase se presenta como monómeros u homodímeros de 31-34 kDa aproximadamente. Por otro lado está el linaje procariota (bacterias, arqueas y algunos eucariotas fotosintéticos) cuya PPiase se presenta como homohexámeros cuyas subunidades están entre los ~19 y 22 kDa. A pesar de las diferencias de tamaño y secuencia, en ambos grupos está presente el arreglo de 13- 17 residuos polares funcionales dentro del sitio activo, lo que lleva a que el mecanismo catalítico se conserve (Heikinheimo *et al.*, 1996; Harutyunyan *et al.*, 1996; Tammenkoski, *et al.*, 2005).

Las subunidades de la PPiase de familia I tienen una estructura barril  $\beta$ , con un solo dominio por unidad, conocido como dominio pirofosfatasa, y el sitio activo se localiza en una cavidad dentro de la estructura compacta (**Figura 4 A**) (Fabrichniy *et al.*, 2007). Las PPiases de familia I poseen un pH óptimo alcalino entre 8.0 y 9.0, son dependientes de magnesio como cofactor y activador (Gómez-García *et al.*, 2007), además de que este catión divalente les confiere máxima especificidad por su sustrato. Sin embargo, cuando los metales de transición, como  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , son usados como cofactor, la especificidad de la enzima disminuye, particularmente con sustratos como el ATP y ADP (Zyryanov *et al.*, 2002). El fluoruro está reportado como inhibidor de la actividad hidrolítica de esta familia de pirofosfatasa y de las  $H^+$ PPiases (Baykov *et al.*, 1977) al formar un

complejo E-PPi-F (1:2:2) que es sumamente estable ( $T_{1/2} \approx 2$  días a 4°C pH 7.5). Baykov y col. (1977) para explicar esta asociación, proponen un mecanismo de interacción simultánea entre fluoruro y del PPi en el sitio activo de la enzima, evento que impide la unión de cationes indispensables para la actividad catalítica de las PPiases.

La familia II de PPiasea citoplásmica, fue identificada por primera vez en la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* (Shintani *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998). Posteriormente, esta pirofosfatasa se ha encontrado solo en algunas especies de bacterias, arqueas (Ahn *et al.*, 2001) y en el eucariota unicelular *Giardia lamblia* (Fabrichniy *et al.*, 2007). Estas proteínas están constituidas por dos subunidades idénticas, que en su cadena polipeptídica tiene dos dominios denominados DHH (N-terminal) y DHHA2 (C-terminal) (**Figura 4 B**). El motivo DHH, que está asociado a una función como fosfoesterasa, juega un papel importante en el arreglo del sitio activo para la catálisis por alojar a los iones metálicos. El dominio DHHA2 tiene un motivo DXK conservado, es el sitio donde se une el pirofosfato y se llama así por estar asociado al motivo DHH. De acuerdo a las estructuras descritas en el trabajo de Ahn y colaboradores (2001), estos dominios están unidos por un asa flexible y el sitio activo se encuentra localizado en la interfase de ambos. La interacción entre las subunidades se lleva a cabo a través de su región N-terminal, quedando la región C-terminal libre. En el dímero de la PPiasea de *Streptococcus gordonii* adopta una conformación abierta cuando no está en contacto con el sustrato (**Figura 5 A**) y cerrada una vez que están el sustrato y los cationes en contacto con la enzima (**Figura 5 B**).



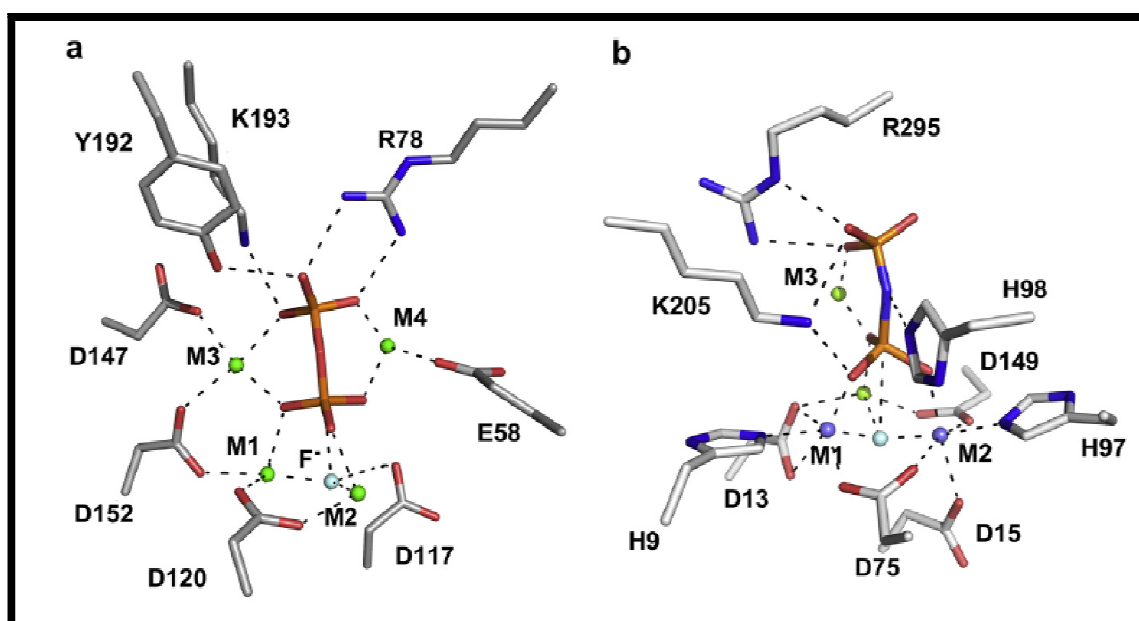
**Figura 5.** Modelo de la conformación catalítica de la PPiase de *S. gordonii*. En **A.** estructura abierta en ausencia de sustrato y en **B.** estructura cerrada en presencia del sustrato (no mostrado). Modificado de Anh *et al.* (2001).

Las PPiasas de familia II tienen un peso molecular entre 33 y 35 kDa. El  $Mn^{2+}$  puede, al igual que el  $Mg^{2+}$ , ser utilizado como activador y sustrato en complejo con  $PPi$  (Kuhn y Ward, 1998; Kuhn *et al.*, 2000; Parfenyer *et al.*, 2001). Estas enzimas resisten concentraciones mayores del inhibidor fluoruro que la Familia I, lo cual pudiera estar mediado por la protección de iones  $Co^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (Shintani *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998).

Recientemente, análisis cristalográficos han mostrado que en las pirofosfatasa de familia I, son 2 iones metálicos los que coordinan la molécula de agua (Heikinheimo *et al.*, 1996), mientras que en las PPiasas de familia II son 3 iones metálicos los que coordinan al nucleófilo (Fabrichniy *et al.*, 2007). La catálisis realizada por enzimas de familia I involucra un mecanismo asociativo en el cual una molécula de agua nucleofílica activada por un par de metales y por un

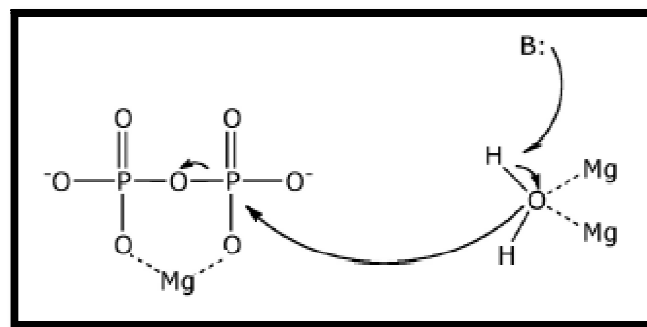
aspártico ataca un grupo fosfato electrofílico del PPi (**Figura 6 a**) (Salminen *et al.*, 1995; Kajander *et al.*, 2013).

La estructura de la PPiase de familia II de *Bacillus subtilis* que se obtuvo con el sustrato unido ha permitido ver que esta enzima tienen 2 sitios de unión al metal, M1 y M2. Los metales unidos a estos dos sitios están coordinados a un aspártico, (al igual que en la familia I) y también por los grupos imidazol de dos histidinas. Estos metales están involucrados en la catálisis al interactuar con el sustrato y con el agua nucleofílica. También está presente otro sitio de unión de metal que es de baja afinidad y que está fuertemente unido al sustrato (**Figura 6 b**) (Fabrichniy *et al.*, 2007; Kajander *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Comparación del sitio activo de la pirofosfatasa de levadura (familia I, **a**), contra el sitio activo de la pirofosfatasa de *Bacillus subtilis* (familia II, **b**). En verde se indican los iones de magnesio, en blanco el fluoruro y los iones manganeso en morado. Los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas son mostradas como líneas punteadas. Tomado de Kajander *et al.*, 2013.

Aunque las PPiases de FI y las de FII lleven a cabo la misma actividad biológica, usan diferente ion metálico como activador y la molécula de agua nucleofílica así como el grupo saliente son activados de manera diferente; tienen además distinta secuencia, estructura y mecanismo catalítico (**Figura 7**) (Stockbridge y Wolfenden, 2011; Kajander *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Diagrama que ilustra la hidrólisis de PPI. En el sitio activo de la PPiase, la molécula nucleofílica del agua es coordinada por 2 iones magnesio, los cuales disminuyen el pKa de la molécula de agua, facilitando la transferencia del protón a una base dentro del sitio activo. Se piensa que la reacción de hidrólisis procede en un mecanismo asociativo, en el cual el ataque por el nucleófilo ocurre primero que la separación del enlace fosfato-fosfato (Stockbridge y Wolfenden, 2011).



## Antecedentes

La pirofosfatasa citoplásmica de bacterias más estudiada es la de  $\gamma$ -proteobacteria *E. coli*. Esta pirofosfatasa es un homohexámero con 175 aminoácidos por monómero perteneciente a la familia I (Oksanen *et al.*, 2007; Heikinheimo *et al.*, 2001; Zyryanov, 2001; Gómez-García *et al.*, 2006; Avaeva *et al.*, 1997). En otro grupo de  $\gamma$ -proteobacterias del género *Vibrio* se encontraron 4 especies que contienen simultáneamente genes de ambas familias de pirofosfatasas. En el caso de los genes provenientes de *Vibrio cholerae* fue demostrado que al ser expresados en *E. coli*, estos codifican para pirofosfatasas funcionales, pero en condiciones estándares de crecimiento de *Vibrio cholerae* solo expresa el gen de la pirofosfatasa de familia I. Se ha propuesto que la PPiase de FII fue adquirida por un ancestro de las *Vibrionales* por transferencia horizontal y que este gen se mantuvo por algún significado funcional que aún no ha sido entendido (Salminen *et al.*, 2006).

Por otro lado, en el grupo de  $\alpha$ -proteobacterias, las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (BFPNS) comenzaron a ser un modelo en el estudio de las PPiases a partir de 1966 cuando el grupo de Baltscheffsky describió la presencia de un tipo de pirofosfatasa membranal, que podía además de hidrolizar y sintetizar pirofosfato, translocar protones a través de la membrana. Previo a la clasificación de las pirofosfatasas citoplásmicas en familia I y familia II, en 1971 Klemme y colaboradores hicieron un estudio comparativo entre las pirofosfatasas de 5 especies de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas donde se describen las

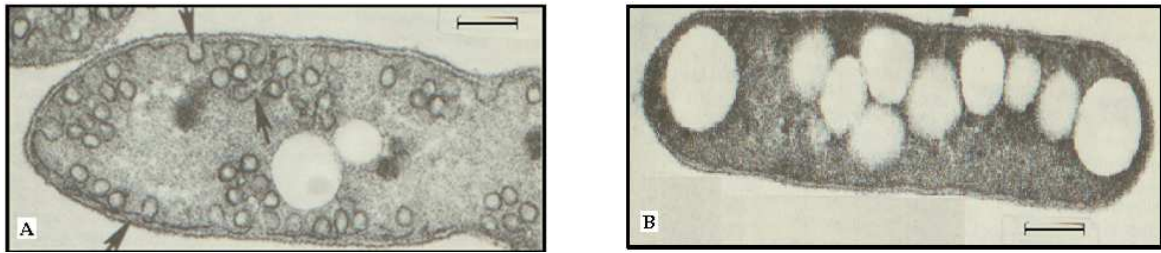
características bioquímicas que permitieron dividir a las pirofosfatasa citoplásmicas en dos grupos: el de la PPiase de *Rhodobacter sphaeroides* y de *Rhodobacter capsulatus* (*R. capsulata*) cuyo peso molecular del oligómero fue calculado en 60 kDa aproximadamente. En éste grupo, el cobalto funciona como estabilizador y el magnesio libre no es un activador. El otro grupo de PPiases es el que comparten las especies *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodopseudomonas gelatinosa*, cuyo peso molecular del oligómero se calculó en 100 kDa aproximadamente. Estas enzimas utilizan al zinc como estabilizador y al magnesio como activador, además de que en las tres especies está presente la H<sup>+</sup>PPiase (Klemme y Gest, 1971; Klemme *et al.*, 1971). En el año 2007, Gómez-García y colaboradores hicieron un estudio comparativo de la PPiase de cuatro especies de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodobacter capsulatus*. En este trabajo relacionaron la diversidad de cationes usados como cofactores de la PPiases de las bacterias púrpuras no sulfurosas con la versatilidad metabólica de este grupo de bacterias.

En el 2003 el grupo de Celis reportó la presencia de la pirofosfatasa citoplásmica de familia II de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. Además de describir las características bioquímicas y moleculares de la PPiase de ésta especie, purificaron parcialmente la PPiase de otras 3 especies, dentro de las que se encuentra *R. vannielii* (Romero *et al.*, 2003; Celis *et al.*, 2003). En los últimos años éste equipo de trabajo se ha interesado en el estudio de las pirofosfatasa membranales y citoplásmicas de distintas especies de BFPNS, en

el presente trabajo nos enfocamos en la caracterización bioquímica de la PPiasea recombinante de dos especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas.

## **Bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas**

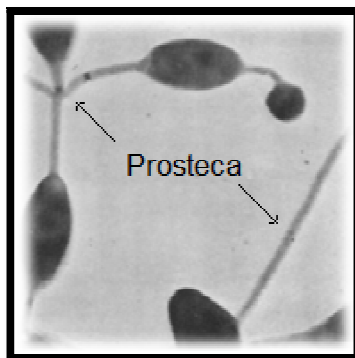
Las bacterias fototróficas púrpuras no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*) llevan a cabo fotosíntesis anóxica, es decir, requieren un donador de electrón de más bajo potencial redox que el agua como el hidrógeno molecular o compuestos orgánicos simples. Estas bacterias se han encontrado prácticamente en todos los hábitats, principalmente en partes anóxicas de lagos eutróficos. Los pigmentos fotosintéticos son bacterioclorofilas *a*, *b*, *c*, *d* y *e* además de una gran variedad de carotenoides. Al inducir el crecimiento fotosintético, se desarrollan invaginaciones de la membrana denominadas cromatóforos, donde se aloja el aparato fotosintético. Sin embargo, en crecimiento respiratorio, la membrana de estos organismos carece de invaginaciones (**Figura 8**) (Trüper y Pfenning, 1978). La cantidad de pigmentos es regulada en función de la intensidad de la luz. En condiciones de baja tensión de oxígeno y en la oscuridad, todas las bacterias fototróficas obtienen la energía para mantenerse por fermentación de sus polisacáridos almacenados. Sin embargo, en situaciones aerobias y en la oscuridad presentan un metabolismo respiratorio (Pfenning, 1978).



**Figura 8.** Micrografía que ilustra la arquitectura de la membrana interna e *R. sphaeroides* en dos diferentes condiciones de crecimiento. En **A** crecimiento fotosintético y en **B** crecimiento respiratorio. La barra corresponde a 0.2 $\mu$ m. (Tomada de Remsen, 1978).

### ***Rhodomicrobium vannielii***

La bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rhodomicrobium vannielii* descrita por Duchow and Douglas (1949) tiene forma ovoide 1.0- 1.2 x 2.0-2.8  $\mu$ m. Es una bacteria Gram negativa perteneciente a las alfa proteobacterias que se mueve por medio de flagelos peritricos. La membrana fotosintética interna esta en forma de lamelas. Sus pigmentos fotosintéticos son la bacterioclorofila a y carotenoides de la serie de la espiroxantina. El color fotosintético es rojo parduzco y el espectro de absorción de las células vivas tiene máximos en 378, 461, 488-490, 522-525, 800-807 y 869-872 nm. Tiene un crecimiento preferentemente fotoheterotrófico en condiciones de baja tensión de oxígeno en la luz a 30 °C y a un pH 6.0 (intervalo de pH entre 5.2 a 7.5). Presenta crecimiento polar por gemación con la formación de células nadadoras a partir de células madres no móviles que forman prostecas (**Figura 9**). Es una bacteria de agua dulce mesofílica. Se ha encontrado en el lodo o agua de estanques y lagos, así como en aguas residuales, agua salobre y agua de mar (Duchow y Douglas, 1949; Imhoft, Trüper and Pfenning, 1984).



**Figura 9.** Imagen de *Rhodomicrobium vannielii* en microscopio electrónico (Tomada de Aionon *et al.*, 2006).

### ***Rhodobacter capsulatus***

La bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rhodobacter capsulatus* (Molisch 1907 e Imhoff *et al.*, 1984) tiene forma ovoide de 0.5- 1.2 x 2.0- 2.5  $\mu\text{m}$  (**Figura 10**) y crece en medio Sistro/Cohen-Bazire a pH 7.0 (intervalo de pH entre 6.5-7.5). Cuando *R. capsulatus* crece en condiciones fotosintéticas adquiere una coloración café oscuro, sin embargo, cuando crece en condiciones no fotosintéticas presentan una coloración roja. El espectro de absorción de las células vivas tiene máximos a 376-378, 450-455, 478-480, 508-513, 590-592, 802-805 y 860-863 nm. Sus pigmentos fotosintéticos son la bacterioclorofila a y carotenoides de la serie esferoidena. Es una bacteria mesofílica que tienen su máximo crecimiento entre 30- 35 °C. Se ha encontrado en agua estancada expuesta a la luz, en plantas de aguas residuales y lagos.



**Figura 10.** Imagen de microscopía electrónica de *Rhodobacter capsulatus*, se observan cortes transversales y longitudinales de las células. Tomada de <http://www.pfizer.com/rd/microbes/meet.html>.

Las pirofosfatasas citoplásmicas son enzimas constitutivas y su comportamiento bioquímico ha sido estudiado principalmente en eucariotas (plantas superiores, levaduras y algas). En bacterias, han sido principalmente caracterizadas en *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter sphaeroides*. En los últimos años nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en el estudio de las pirofosfatasas de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas del grupo las alfaproteobacterias que se distinguen por la versatilidad metabólica que presentan, además de su amplia distribución. Con el estudio de la enzima PPiasea en otras especies bacterianas es posible determinar con mayor detalle las características bioquímicas generales (como son: la actividad de hidrólisis, el requerimiento de cofactores, el perfil de pH, el peso molecular, etc.) de las PPiasesas citoplásmicas. Particularmente, en este trabajo se abordará la caracterización bioquímica de la PPiasea de dos especies que habitan en lagos eutróficos y aguas residuales, *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus*.

## Objetivos

### General:

Caracterizar molecular y bioquímicamente a la PPiase citoplásmica de las bacterias púrpuras no sulfurosas *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus* (PPiase de FI y PPiase de FII, respectivamente).

### Objetivos Particulares:

- Clonar, expresar y purificar las pirofosfatasas citoplásmicas de *R. vannielii* y *R. capsulatus*.
- Determinar propiedades bioquímicas de las PPiases recombinantes de *R. vannielii* y *R. capsulatus* tales como peso molecular, actividad específica, requerimiento de cofactores, punto isoeléctrico, termoestabilidad y constantes cinéticas.

## Material y métodos

### Cepas y plásmidos utilizados

En la **Tabla 1** se enlistan las cepas de bacterias y los plásmidos utilizados en este trabajo, con sus respectivas características.

**Tabla 1** Cepas y plásmidos

Nombre	Características	Referencia
<b>Cepa</b>		
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> (ATCC 17100)	Cepa silvestre.	DSMZ
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (SB 1003).	Cepa silvestre	DSMZ
TOP 10 <i>E. coli</i>	Cepa de clonación F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>araA</i> <i>leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
LMG194 <i>E. coli</i>	F- $\Delta$ <i>lacX74 gal E thi rpsL</i> $\Delta$ <i>phoA</i> ( <i>Pvu II</i> ) $\Delta$ <i>ara714 leu::Tn10</i> , resistente a estreptomomicina y a tetraciclina	Invitrogen
<b>Plásmido</b>		
pBAD HisB	Promotor <i>araBAD</i> ( $P_{BAD}$ ), sitio de unión del ribosoma optimizado, ATG iniciación, etiqueta de polihistidina en el amino terminal, epítopo Anti-Xpress, sitio de corte de la enteroquinasa, sitios de clonación múltiples, región de término de la transcripción <i>rrnB</i> , gen de resistencia a ampicilina ( $\beta$ -lactamasa), origen pBR322 y gen <i>arac</i> .	Invitrogen
pPIRL	Vector que codifica tRNAs para codones poco frecuentes, ORF resistencia a cloranfenicol.	Bao y Cohen, 2001
pVS	pBAD HisB + PPiase <i>R. vannielii</i>	En este trabajo
pVO	pBAD HisB + PPiase <i>R. capsulatus</i>	En este trabajo



## Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### Bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas

Las cepas de *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodomicrobium vannielii* fueron cultivadas en condiciones fotosintéticas. Los cultivos líquidos se crecieron anaeróbicamente (muy baja tensión de oxígeno y en presencia de luz) mediante el uso de dos focos con filamentos de Tungsteno de 40 watts a 30 cm de distancia. El medio utilizado fue el CB (Cohen-Bazire), constituido por las disoluciones enlistadas en la **Tabla 2**:

**Tabla 2.** Medio Cohen-Bazire

<b>a)</b> Base concentrada	20 mL
N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub>	52 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	58 mM
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	29 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.074 mM
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.35 mM
Metales 44*	5 %
<b>*Esta disolución contiene lo siguiente:</b>	
EDTA	6.5 mM
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	17.9 mM
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.038 mM
MnSO <sub>4</sub>	10.1 mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	1.5 mM
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.85 mM
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.57 mM
Añadir 4 gotas de ácido sulfúrico para que se disuelvan los metales y se ajusta el pH a 6.8.	
Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH	
<b>b)</b> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
<b>c)</b> Ácido succínico	16.9 mM
<b>d)</b> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.7 mM
<b>e)</b> NaCl	8.5 mM
<b>f)</b> Ácido L-glutámico	1.3 mM
<b>g)</b> Ácido L-aspártico	0.3 mM
<b>h)</b> Extracto de levadura	0.125 %
<b>i)</b> Ácido nicotínico	10 µM
<b>j)</b> Tiamina	1.5 µM
<b>k)</b> Biotina	0.04 µM
<b>l)</b> Bacto- Agar (solo medio sólido)	1.5%.
Ajustar el pH a 6.8 y se afora a un litro. El medio se esteriliza por 20 min a 120°C y 15 atmósferas de presión.	

Para *Rhodomicrobium vannielii*, el medio se preparó a pH 6.0 y sin ácido nicotínico, tiamina y biotina.

Los cultivos de estas cepas de bacterias fueron secuenciales, se iniciaron al inocular medio líquido con una alícuota de las bacterias, se esperó hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmica tardía y se reinoculó medio de cultivo fresco en una proporción 1:10 hasta llegar a un volumen final de 9 litros. Una vez que este cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmico tardío se cosecharon las bacterias centrifugando a 14 340 x g durante 15 minutos a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en amortiguador MOPS-KCl (50 mM MOPS y 50 mM KCl pH 7.0) para lavar restos del medio de cultivo. Las células se colectaron al centrifugarlas a 14 340 x g durante 15 min y el paquete celular fue almacenado a -70°C.

### ***Escherichia coli***

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas aeróbicamente en medio Luria- Bertani (LB) que contiene: 1.0 % bactotripton, 0.5 % extracto de levadura, 1.0 % NaCl a pH 7.0 en agitación constante a 200 rpm y 37 °C. Para preparar medio sólido se agregó Bacto- Agar a una concentración final de 1.5 %. Cuando se requirió, se adicionaron antibióticos a las siguientes concentraciones: kanamicina 50 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 25 µg/mL.

## **Métodos de biología molecular**

### **Extracción de ADN cromosomal**

De un cultivo de 3 mL en fase de crecimiento logarítmico tardío, se tomaron 1.5 mL de cultivo y se centrifugó a temperatura ambiente a 2 500 x g por 10 minutos para recuperar a las células. Posteriormente el paquete celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador TE (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 5 mM de EDTA pH 8.0, y 50 mM de NaCl). Para lisar las células se añadieron a la suspensión 60 µL de SDS al 10%, 50 µL de proteinasa K (20 µg/mL) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Después de éste paso se añadieron 0.25 mL de fenol y 0.25 mL de cloroformo al lisado y se agitó por 5 minutos hasta formar una emulsión de color blanco. Posteriormente, se centrifugó a 20 817 x g por 5 minutos, repitiéndose este paso 2 veces. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL y se precipitó añadiendo 1/100 del volumen de acetato de sodio 3M, un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C por 1 h. Para recuperar el DNA se centrifugó a 20 817 x g 30 minutos a 4 °C. Finalmente la muestra se lavó con etanol al 70% y se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla de DNA se resuspendió en 100 µL de agua desionizada estéril.

### **Reacciones de PCR**

La amplificación de los genes que codifican para la pirofosfatasa citoplásmica de ambos organismos fue hecha mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction). El volumen final de la reacción fue de 100 µL y contenían lo siguiente: 1x de amortiguador, 5 % de la solución Enhancer de

Invitrogen, 0.2 mM de mezcla de dNTP's, 1 µM de oligonucleótido sentido (Fw) , 1 µM de oligonucleótido antisentido (Rv) (**Tabla 3**), 100 ng de ADN, 1 U de polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen) y agua. La mezcla se colocó en un termociclador y se programó la siguiente secuencia de amplificación: (1) Desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, (2) Desnaturalización a 90 °C por 1 minuto, (3) 55°C por 30 segundos para alinear y (4) 72°C para polimerizar (se repite del paso 2-4 por 35 ciclos); (5) el paso final fue una extensión de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa 1% a 100 volts y se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick gel extraction de Qiagen.

**Tabla 3.** Características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes que codifican para la PPIasa de *R. vannielii* y *R. capsulatus*

Nombre	Secuencia	Tm (GC) °C	Contenido GC %	Longitud * pb	Tamaño del fragmento amplificado pb
rva	RvFw 5' <b>gaa ttc</b> atg cgc att gac tcc atc ccg a 3'	59.5	54.5	22	566
	RvRv 5' <b>aag ctt</b> tca gcc ctt ttt ccg gcc gtc c 3'	63.1	60.9	23	
cap	RcFw 5' <b>aag ctt</b> atg atc aag gta ttc ggc 3'	50.9	42.1	18	932
	RcRv 5' <b>ggt acc</b> tca gag ctt gag gac gga 3'	55.4	50.0	18	
sph*	RsFw 5' ct <b>gaa ttc</b> atg atc aag gta ttc ggc cac a 3'	56.2	41.7	22	934
	RsRv 5' cg <b>aag ctt</b> tca gag ctt gag gac gga atg 3'	57.7	50	21	

\* Longitud del oligonucleótido sin tomar en cuenta el sitio de restricción.

Oligonucleótidos sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

\*sph oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la pirofosfatasa de *Rhodospirillum rubrum*.

### **Purificación del plásmido por estuche comercial**

Los plásmidos utilizados en este trabajo se purificaron utilizando el estuche comercial Qiagen Miniprep y se siguieron las condiciones descritas por el fabricante.

### **Purificación de plásmidos por medio de minipreparaciones hervidas**

Para la purificación de plásmido mediante el protocolo de minipreparaciones hervidas se inoculó un cultivo que lleva el plásmido de interés y se incubó toda la noche. Al día siguiente las células se colectaron centrifugando a 20 817 x *g* y se descartó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 300  $\mu$ L de amortiguador STET (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 8% sacarosa y 50 mM EDTA pH 8.0) y 30  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL). Posteriormente la suspensión de células se hirvió por 45 segundos y se centrifugó a 20 817 x *g* por 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se colocó en un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 mL y el DNA se precipitó agregando 300  $\mu$ L de isopropanol e incubando en hielo por 30 minutos a 4°C, después se centrifugó a 20 817 x *g* por 30 minutos. La pastilla de DNA se resuspendió con 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril.

Todos los plásmidos obtenidos fueron cuantificados en el espectrofotómetro leyendo la absorbancia a 260 nm. También se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

### **Digestión de ADN**

Los plásmidos y los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron digeridos utilizando enzimas de restricción comerciales (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Desfosforilación de ADN**

Para la mayoría de las reacciones de clonación, los plásmidos utilizados se defosforilaron usando la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP). Para esto, se adicionó 1  $\mu$ L de SAP a cada plásmido que previamente fue digerido y se volvió a incubar a 37°C por 90 minutos. Para desactivar la fosfatasa se colocó la reacción por 15 minutos a 65 °C.

### **Ligación de fragmentos de ADN**

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen total de 20  $\mu$ L el cual contenía: el inserto y el vector en una proporción molar de 3:1, hasta una concentración de ADN total de 0.1  $\mu$ g, amortiguador de ligación 1x y una unidad de enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen). El tiempo de incubación fue de 12 horas a 13 °C.

### **Transformación de *E. coli* por el método de $\text{CaCl}_2$**

Con un cultivo de toda la noche de la cepa de *E.coli* de interés se reinocularon 10 mL de medio LB y se dejó crecer a las células hasta fase exponencial, incubando a 37 °C en agitación constante a 200 rpm. Las células se colectaron centrifugando

a 2 500 x g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente el sobrenadante se removió y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> estéril y la suspensión de células se incubó en hielo por 5 minutos. Después de este tiempo se colectaron las células por centrifugación a 2 500 x g por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en 700 µL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril. La suspensión se incubó a 4°C de 3 a 24 horas (Cohen *et al.*, 1972). Después se le adicionaron 50 ng de la reacción de ligación a una alícuota de 200 µL de estas células calcio competentes y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo un choque térmico a 42°C por 2 minutos y después las células se colocaron en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800 µL de medio LB y se incubó a 37°C, con una agitación constante de 200 rpm durante 60 minutos. Finalmente las células se colectaron por centrifugación y la selección de transformantes se llevó a cabo en medio selectivo (Sambrook y Russell, 2001).

### **Transformación de células de *E. coli* por electroporación**

Para la electroporación se utilizaron celdas comerciales (BIORAD) de 1 mL previamente enfriadas, se les adicionó 200 µL de cultivo de células competentes más 50 ng de plásmido. Posteriormente se dio un pulso de 1.8 Kv con una resistencia R= 200 Ω e inmediatamente después se transfirió la celda al hielo por 1 minuto. A las células electroporadas se les adicionaron 800 µL de medio LB a temperatura ambiente y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1 mL limpio. La suspensión de células se incubó a 37 °C, con una agitación constante de 200 rpm durante 60 minutos para su recuperación. Por último, se colectaron

las células centrifugando a 2 500 x g durante 5 minutos y se sembraron en cajas Petri con medio selectivo (Sambrook y Russell, 2001).

## **Protocolos de purificación de proteína**

### **Purificación de las pirofosfatasas recombinantes**

Las proteínas recombinantes  $_{His6x}$ PPiasaRvan y  $_{His6x}$ PPiasaR<sub>cap</sub> fueron purificadas a partir de cultivos inoculados con las cepas LMG194/pBADHisB/PPiasaRvan/pPIRL y LMG194/pBADHisB/PPiasaRcap/pPIRL, respectivamente. Para la purificación de ambas proteínas se siguió el procedimiento que se describe a continuación: 3 mL de cultivo de toda la noche de la cepa de interés se diluyó en medio de cultivo selectivo fresco en una proporción 1:10 y se incubó a 37 °C hasta que alcanzó una  $DO_{600}=0.5$ . Posteriormente, al cultivo se le agregó el inductor L-arabinosa a una concentración final de 0.2%, después se llevó el cultivo nuevamente a incubación en condiciones aeróbicas a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante 4 horas. Las células fueron colectadas por centrifugación a 2 500 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 5 mL de amortiguador de lisis (150 mM de Tris-HCl, 15 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de imidazol y 200  $\mu$ g/mL de lisozima) y se colocaron en hielo por 30 minutos. Las células se rompieron sometiéndolas a tres ciclos de sonicación de un minuto cada uno. Después los restos celulares fueron eliminados al centrifugar 3 veces a 20 817 x g durante 10 minutos. Paralelamente, se adicionaron 500  $\mu$ L de agarosa Ni-NTA (Níquel-ácido nitriloacético) de Qiagen a una columna de prolipropileno de 5 mL y se lavó con 5 mL de amortiguador de lavado (150 mM de Tris-HCl, 15 mM de  $MgCl_2$  y 20 mM de



imidazol). El sobrenadante fue vertido en la columna que contenía la agarosa y se lavó con 5 mL de amortiguador de lavado 20 veces. Finalmente la proteína recombinante fue eluída al agregar 500  $\mu$ L de amortiguador de elución (150 mM de Tris-HCl, 15 mM de  $MgCl_2$  y 200 mM de imidazol).

### **Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica silvestre**

Paralelamente a la purificación de las pirofosfatasas recombinantes, se llevó a cabo una purificación parcial de la pirofosfatasa silvestre de estas especies de bacterias fotosintéticas. En el 2003 Celis y colaboradores propusieron los dos métodos de purificación parcial de estas enzimas, para familia I y para familia II. Estas técnicas se siguieron con las siguientes modificaciones:

#### **a) Familia I**

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron en una proporción 1:6 (p/v) en amortiguador A (50 mM Tris-HCl pH 8.6, 10 mM  $MgCl_2$ , 0.4 mM  $ZnSO_4$ ) en un homogeneizador Potter. A la suspensión se le agregó 1 mg de DNAsa por cada 10 g de peso húmedo de bacterias utilizado. El homogeneizado se sonicó dentro de un baño con hielo, en 3 ciclos de 2.5 minutos en un sonicador Branson (sonifier 250). Después se centrifugó a 242 000 x *g* por 80 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 8.6 y se calentó a 60 °C por 5 min. Posteriormente, las proteínas precipitadas fueron eliminadas al centrifugar a 35 850 x *g* durante 20 minutos. El sobrenadante se saturó en un 40 % (p/v) de sulfato de amonio, después se llevo a cabo una saturación al 50 % y finalmente

una saturación al 65 %. Para eliminar las proteínas precipitadas se centrifugó a 35 850 x g durante 20 minutos entre cada saturación. La pastilla resultante de la última precipitación se resuspendió en 1 mL de amortiguador B (20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>) y se dializó en una membrana YM30 contra 4 litros del mismo amortiguador.

## **b) Familia II**

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron y homogeneizaron en amortiguador C (50 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.4 mM CoSO<sub>4</sub> y 10 mM de de MgCl<sub>2</sub>) que contenía 1 mg de DNAsa por cada 10 g de peso húmedo de bacteria. Para sonificarlo y ajustar el pH, el homogeneizado fue tratado como FI. En el método de purificación parcial como familia II las saturaciones con sulfato de amonio se llevan de 0-60% y de 60-80% (p/v), se centrifugó a 35 850 x g durante 20 minutos a 4°C y la pastilla de la última centrifugación se resuspendió en 1 mL de amortiguador D (20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM CoSO<sub>4</sub> y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>). Al final se dializó en una membrana YM30 contra 4 litros del mismo amortiguador durante 12 horas.

## **Métodos bioquímicos**

### **Determinación de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa citoplásmica**

La actividad hidrolítica de la pirofosfatasa citoplásmica se determinó utilizando un método colorimétrico que cuantifica la liberación de fosfato a partir de pirofosfato por unidad de tiempo a 37 °C.

El ensayo de actividad se realizó en un volumen final de 500 µL que contenían como medio de reacción: 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 2 mM de catión

divalente y 1 µg de proteína. Esta mezcla fue preincubada a 37 °C por 10 minutos y la reacción se inició al añadir 2 mM de NaPPi y se incubó durante 10 minutos adicionales a 37 °C. La reacción se detuvo al añadir ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 6%.

El fosfato liberado se cuantificó con el método de Sumner (1944) que se basa en la formación de un complejo fosfomolibdico entre el Pi y el Molibdato-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [5% de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub>\* 4H<sub>2</sub>O; 40% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N] de color amarillo que se torna azul al ser reducido por el ELON (*p*-metilaminofenol sulfato 29 mM + bisulfito de sodio 290 mM). La coloración desarrollada fue cuantificada en un espectrofotómetro a 656 nm. Paralelamente se preparó una curva patrón con disoluciones de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

La concentración final de fósforo inorgánico se expresa en µmol mL<sup>-1</sup> y se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Fósforo en } \mu\text{mol mL}^{-1} = \frac{A}{A_s} * \text{concentracion del estándar}$$

Donde,

A= absorbancia de la muestra desconocida.

A<sub>s</sub>= absorbancia del estándar

La actividad específica se refiere como µmoles Pi min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>. Las modificaciones a este método se especifican en los pies de figura de la sección de resultados.

## Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida (PAGE) con un porcentaje de 10 % de acrilamida-bisacrilamida para el gel separador y 4 % de acrilamida-bisacrilamida para el gel concentrador de acuerdo a la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Composición de los geles de poliacrilamida

Reactivo	Gel separador (10%)		Gel concentrador (4%)	
	mL	Concentración final %	mL	Concentración final %
<b>Agua</b>	A 10 mL		A 5 mL	
<b>Acrilamida 30% -Bisacrilamida 0.8%</b>	3.330	33.30	0.666	13.32
<b>Buffer resolvidor (0.375 M Tris-Cl pH 8.8)</b>	1.250	12.50	-----	-----
<b>Buffer concentrador (0.5 M Tris-Cl pH 6.8)</b>	-----	-----	1.250	25.00
<b>Persulfato de amonio 1.5%</b>	0.500	5.00	0.250	5.00
<b>TEMED</b>	0.010	0.10	0.007	0.14
<b>SDS*</b>	0.100	1.00	0.050	1.00

\*Solo se agrega a geles en condiciones desnaturalizantes

Los geles se corrieron a 40 mA por aproximadamente 2 horas con amortiguador de electroforesis (0.025 M Tris, 0.192 M de glicina, pH 8.3; en el caso de los desnaturalizantes se les agregó 1% de SDS) y se tiñeron sumergiéndolos en una disolución de 0.05 % azul de Coomassie R250, 40% metanol y 10% ácido acético. Posteriormente los geles se destiñeron en una disolución con los mismos porcentajes de metanol y ácido acético.

## Zimograma

Para indicar la presencia de actividad hidrolítica de la pirofosfatasa en gel (Zimograma) se preparó un gel de poliacrilamida al cual se agregaron aproximadamente 0.12 mg de proteína más 15  $\mu$ L de mezcla de digestión (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul bromofenol). Para medir la actividad hidrolítica en el gel se prepararon las disoluciones indicadas en la **Tabla 5**:

**Tabla 5.** Disoluciones para revelar actividad hidrolítica de la pirofosfatasa en gel.

<b>Solución I</b>	<b>Solución II</b>	<b>Solución III</b>
20 mM Tris-HCl pH 8.6	50 mM Tris-HCl pH 8.6	10% Molibdato- $H_2SO_4$ [5% de $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24}^*$ 4 $H_2O$ ; 40% $H_2SO_4$ 10N]
	5 mM $MgCl_2$ 3 mM NaPPi	90% $H_2SO_4$ 0.5 M 1.5 % Ácido ascórbico

El gel se lavó en la solución I y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Después, el gel se transfirió a la solución II y se mantuvo en baño de agua a 37 °C durante 15 minutos e inmediatamente después se lavó con solución I. Por último, se reveló el gel con solución III en baño de agua a 45 °C hasta que se observaron las bandas de actividad.

## Isoelectroenfoque

Esta técnica de isoelectroenfoque se hizo según el procedimiento descrito en el trabajo de Robertson *et al* (1987). Se utilizaron tres anfolitos, uno en un intervalo

de pH de 3.0-10.0 (Ion Biomedicals Inc), el segundo con un intervalo de pH de 4.0-6.5 (Biorad) y el tercero entre los pH 7.0 y 9.0 (Pharmalyte), adicionando 60, 30 y 30  $\mu$ L de anfolitos, respectivamente.

### **Determinación del peso molecular de una proteína mediante cromatografía de filtración en gel**

Para determinar el peso molecular aparente de una proteína se utilizó la cromatografía de filtración en gel en una columna empaquetada comercialmente. La calibración se llevó a cabo utilizando 3 proteínas con peso molecular conocido a una concentración de 2 mg/mL cada una. Se ocupó el equipo de FPLC (Fast protein liquid chromatography; FPLC Controlador Waters 600, detector de absorbancia Waters 486, e Inyector Waters 650E y un colector de fracciones) para coleccionar y obtener el cromatograma, a partir del cual, se obtuvo la ecuación de la recta graficando el logaritmo del peso molecular contra el volumen de elución.

### **Determinación de proteína**

Se utilizó el método desarrollado por Bradford en 1976 para el cálculo de la concentración de proteína, para esto se empleó el estuche comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

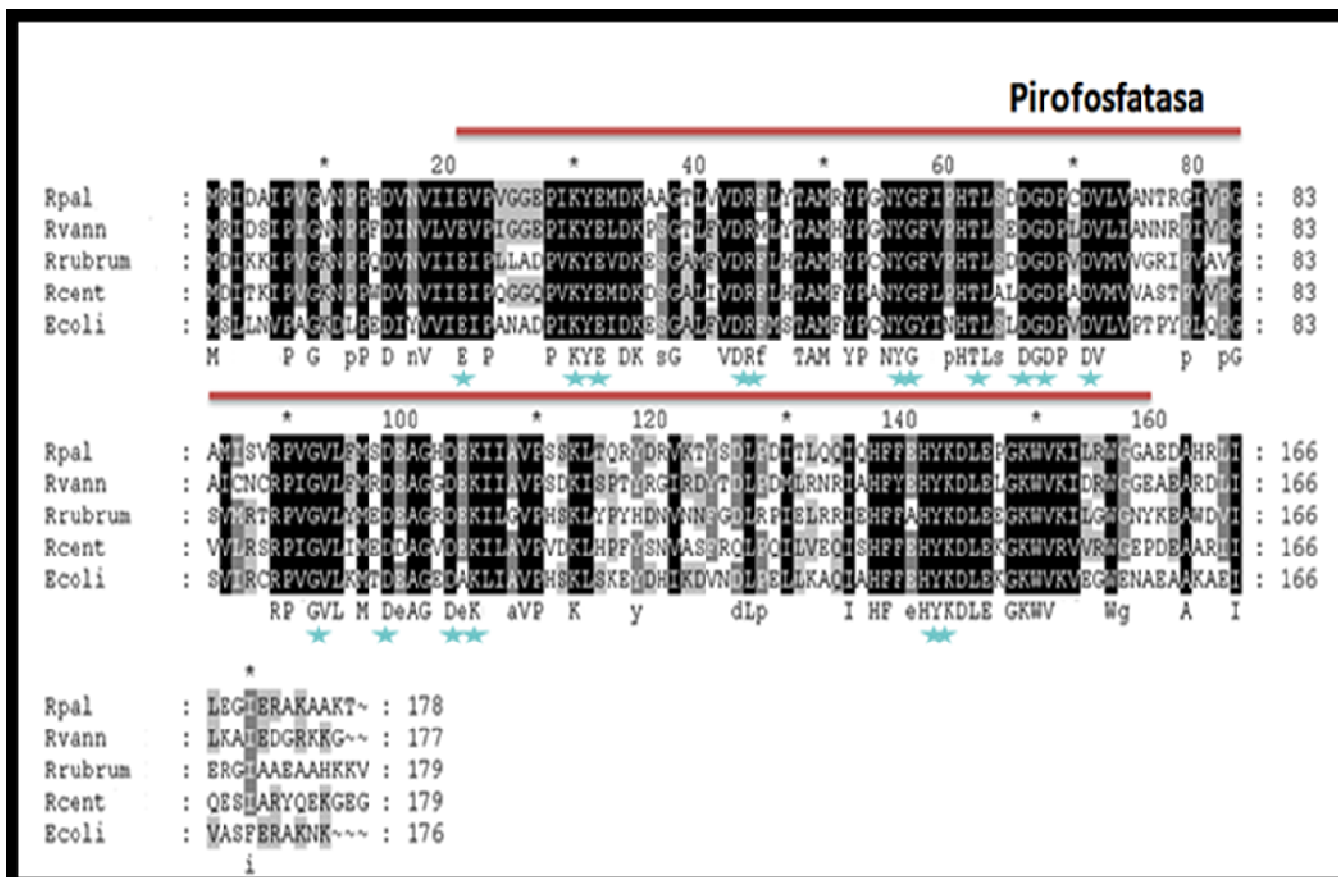
## Resultados y discusión

La mayoría de las pirofosfatasa de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas han sido caracterizadas a partir de muestras purificadas parcialmente. Es recomendable contar con una muestra homogénea de proteína en estudios bioquímicos con el fin de obtener la mayor información posible de una enzima tal como la reacción que lleva a cabo, su especificidad, sus inhibidores, sus cofactores y activadores. Así como su estabilidad, sus constantes cinéticas y su estructura. En este trabajo se clonó, sobreexpresó, purificó y caracterizó la pirofosfatasa recombinante de dos especies de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas, *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus*. Para este propósito se utilizaron las cepas tipo *Rhodomicrobium vannielii* ATCC 17100 y *Rhodobacter capsulatus* SB 1003.

### Alineamientos de las secuencias de las pirofosfatasa

Para determinar el tipo de pirofosfatasa citoplásmica presente en ambas especies de bacterias púrpuras, se utilizó el buscador BLAST y el software MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, Cambridgeshire 2011) para hacer un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la pirofosfatasa de varias especies de bacterias. Cuando se comparan las secuencias seleccionadas de las pirofosfatasa de familia I se observa que mantienen una identidad de al menos 60%, la más alta se presenta cuando se examina la secuencia de la PPIasa de *R. vannielii* contra la secuencia de aminoácidos de *R. palustris*. Todas

tienen el dominio PIROFOSFATASA aunque no todas conservan todos los aminoácidos involucrados en el sitio activo que han sido reportados en *E. coli* (E 20, K 29, E 31, R 43, Y 55, D 65, D 67, D 70, D 97, D 102, K 104, Y 141, K 142, D 42, G 56, T 61 y G 91, **Figura 11**) (Sivula *et al.*, 1999; Hekinhemo *et al.*, 1996).

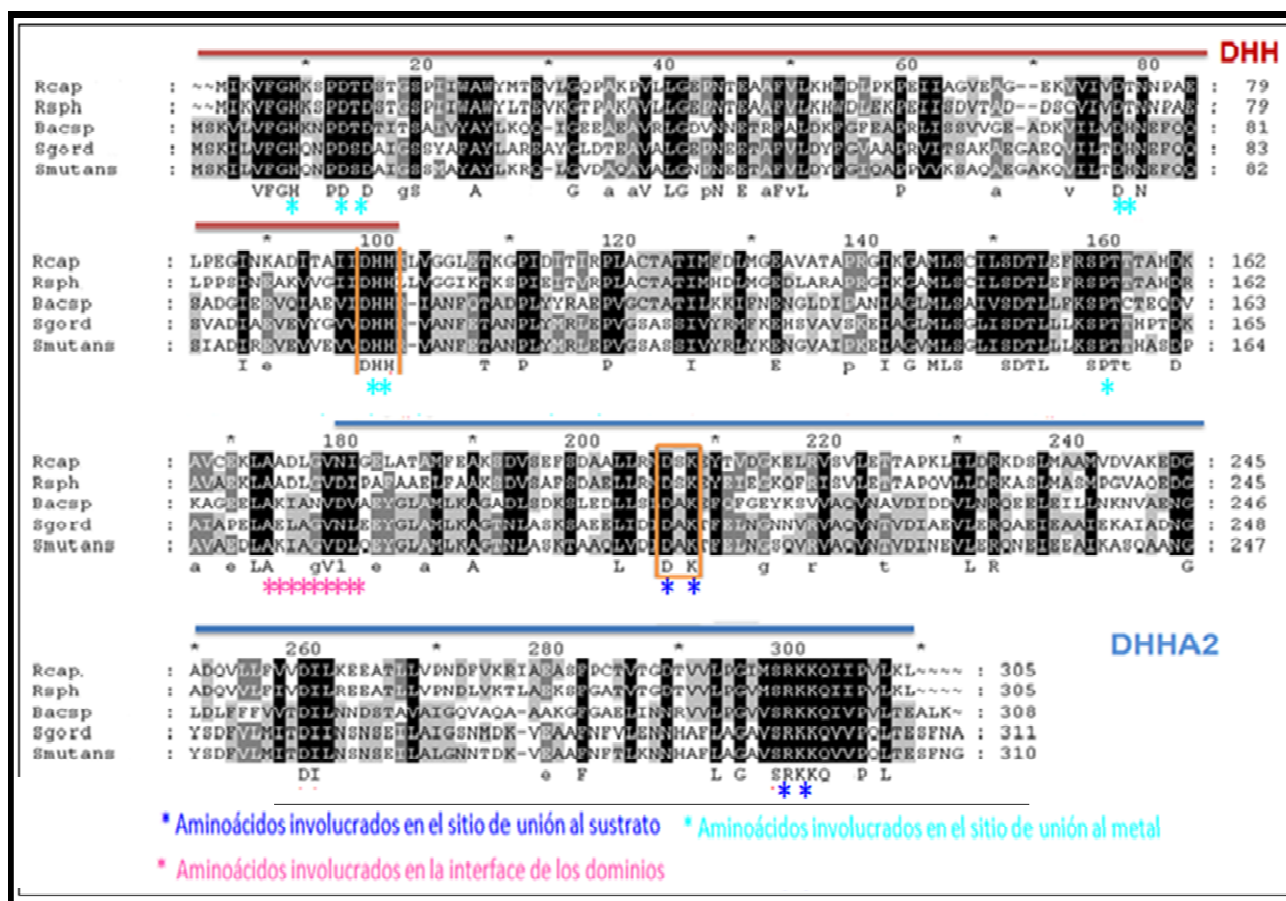


**Figura 11.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la PPIasa de *Rhodomicrobium vannielii* con otras 4 secuencias de aminoácidos de PPIasas de familia I. Las secuencias fueron obtenidas de GenBank y procesadas con el software de alineamiento MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, Cambridgeshire 2011). *Rhodomicrobium vannielii* (*Rvann*), *Rhodospirillum rubrum* (*Rrubrum*), *Rhodospirillum centenum* (*Rcent*), *Rhodopseudomonas palustris* (*Rpal*) y *Escherichia coli* (*Ecoli*). Con una estrella se marcan los aminoácidos que forman el sitio activo.

Celis y colaboradores (2003) compararon en un alineamiento la secuencia de aminoácidos de la PPIasa de *Rhodobacter capsulatus* contra otras 7 secuencias



de aminoácidos de PPIasas de familia II entre las que se encuentran la PPIasa de *Rhodobacter sphaeroides*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* (Celis *et al.*, 2003). Aquí se muestra un alineamiento hecho con la secuencia de la pirofosfatasa de 5 especies de bacterias, marcando los dominios conservados de la PPIasa de familia II y los aminoácidos que participan en la formación del sitio activo, incluyendo a los residuos que unen los metales y los que participan en la unión del pirofosfato. También se muestran los aminoácidos que forman el asa flexible entre los dominios (Shintani *et al.*, 1998; Konopka *et al.*, 2002; Halonen *et al.*, 2005; Fabrichiy *et al.*, 2007) (Figura 12).



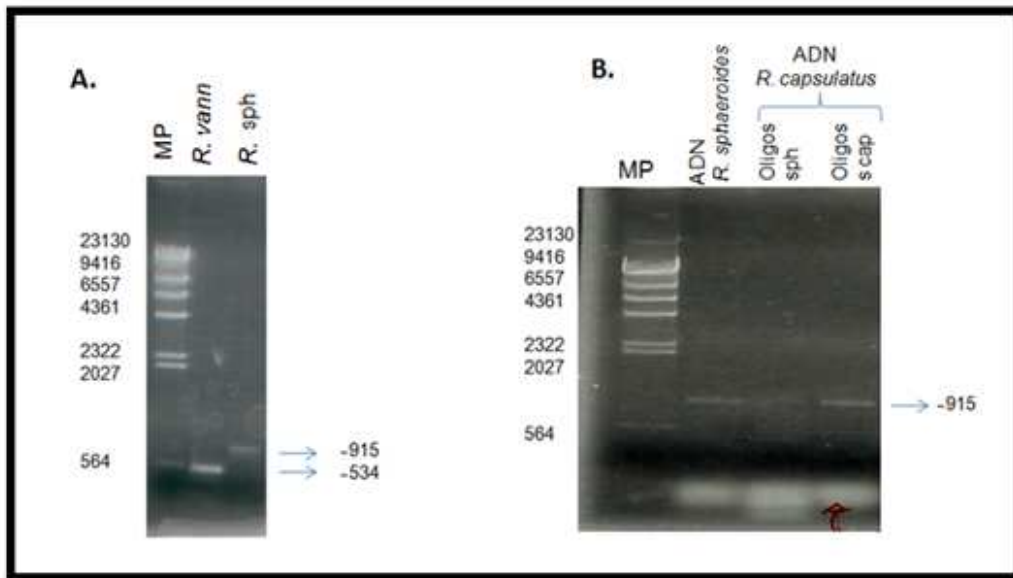
**Figura 12.** Alineamiento de la secuencia de la PPIasa de *Rhodobacter capsulatus* con otras 4 secuencias de PPIasas de familia II. Las secuencias fueron obtenidas de GenBank y procesadas con el software de alineamiento MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, Cambridgeshire 2011). *Rhodobacter capsulatus* (Rcap), *Rhodobacter sphaeroides* (Rsph), *Bacillus subtilis* (Bacsp), *Streptococcus gordonii* (Sgord) y *Streptococcus mutans* (Smutans).

### Obtención de las pirofosfatasas recombinantes

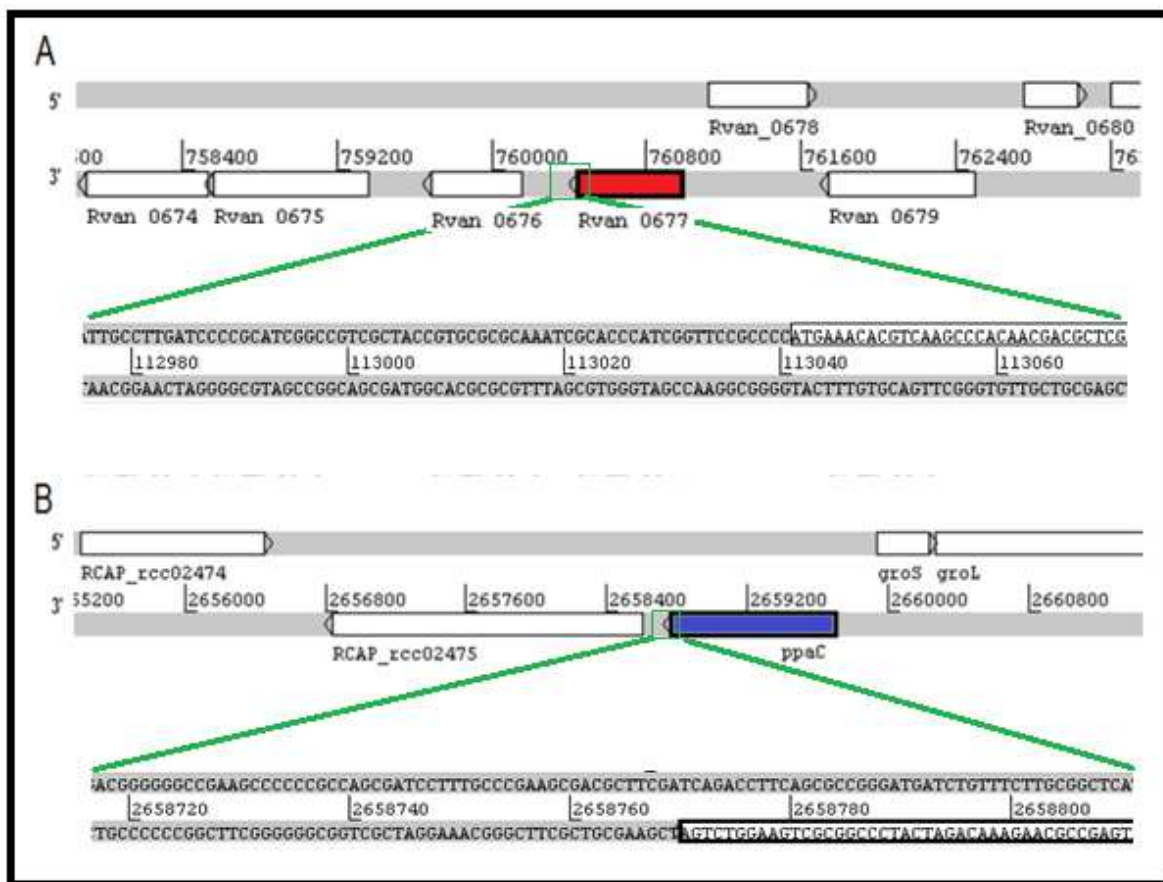
Para la amplificación del gen que codifica para la pirofosfatasa de *R. vannielii* se siguió un protocolo de PCR convencional y se utilizaron los oligonucleótidos específicos RvFw 5' **gaa ttc** atg cgc att gac tcc atc ccg a 3' y RvRv 5' **aag ctt** tca gcc ctt ttt ccg gcc gtc c 3' que incluyen los sitios de restricción de la enzima *Eco* RI y *Hind* III, respectivamente. En la **Figura 13 A** se observa en el gel de agarosa (1%) que la banda del PCR mas enriquecida corresponde a un tamaño aproximado de 550 pb que concuerda con el tamaño del gen de la pirofosfatasa de *R. vannielii*.

Para amplificar el gen que codifica la pirofosfatasa de *R. capsulatus* se utilizaron el par de oligonucleótidos específicos RcFw 5' **aag ctt** atg atc aag gta ttc ggc 3' y RcRv 5' **ggt acc** tca gag ctt gag gac gga 3' que incluyen los sitios de restricción *Eco*RI y *Hind*III, respectivamente. En la **Figura 13 B** se observan en el gel de agarosa (1%) tres amplicones con un tamaño aproximado de 930 pb. Debido a que el gen que codifica para la pirofosfatasa citoplásmica de *R. capsulatus* se encuentra en un contexto con alto contenido de guaninas y citocinas consecutivas (**Figura 14**), la amplificación del gen se llevó a cabo a través de un protocolo de PCR llamado TOUCH-DOWN en donde se empleó una temperatura de alineamiento inicial superior a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los

oligonucleótidos, y después progresivamente se baja hasta una temperatura menos restrictiva (Korbie y Mattick, 2008).



**Figura 13.** Productos de PCR de los genes de la pirofosfatasa. En **A.** el gen de la pirofosfatasa de *R. vannielii* y el gen de la pirofosfatasa de *R. sphaeroides* como control. En **B.** se amplificó el gen que codifica para la PPIasa de *R. capsulatus* utilizando los oligos RsFw y RsRv; y en otro carril, el gen de la PPIasa de *R. capsulatus* amplificado con el par de oligos RcFw y RcRv con una modificación de la técnica de PCR llamada TOUCH-DOWN.



**Figura 14.** Contexto génico de la secuencia codificante de la PPIasa en **A** de *R. vannielii* (cuadro rojo) y en **B** de *R. capsulatus* (cuadro azul). En ambas se incluye el detalle de la secuencia de nucleótidos que rodea al codón de inicio (Analizado con Artemis; Rutherford *et al.*, 2000).

Ambos productos de PCR correspondientes al gen amplificado de la pirofosfatasa de *R. vannielii* y al gen amplificado de la pirofosfatasa de *R. capsulatus*, fueron secuenciados y posteriormente se hizo una búsqueda en BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la identidad de estos genes. En la **Figura 15** se muestra el alineamiento producto de esta búsqueda en BLAST de la secuencia obtenida del gen de la pirofosfatasa de *R. vannielii* con una identidad del 99% contra el gen NCBI: YP\_004011052.1 que

corresponde también al gen de la pirofosfatasa de *R. vannielii* (NCBI: YP\_004011052.1).

### Rhodomicrobium vannielii ATCC 17100, complete genome

Sequence ID: [gb|CP002292.1](#) Length: 4014469 Number of Matches: 1

Range 1: 760444 to 760977 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

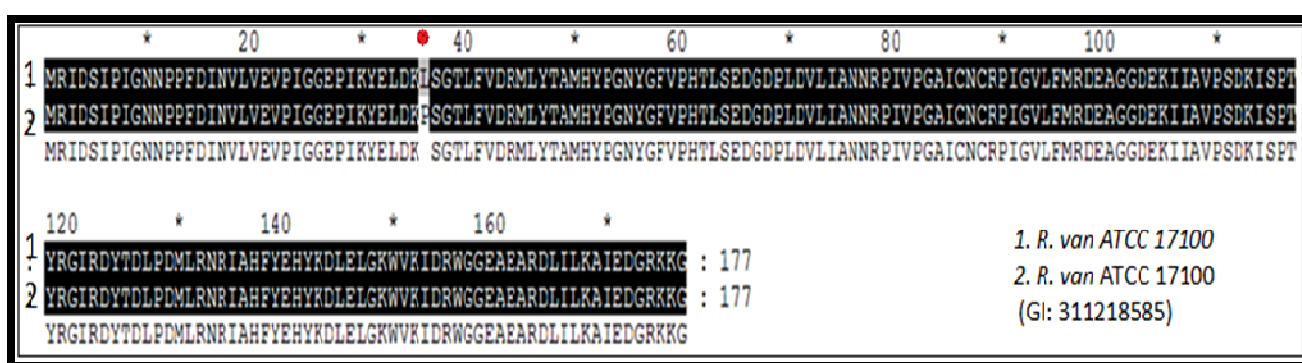
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
981 bits(531)	0.0	533/534(99%)	0/534(0%)	Plus/Minus

Features: [Inorganic diphosphatase](#)

Query	1	ATGCGCATTGACTCCATCCCGATCGGCAACAACCCGCCTTTCGATATCAACGTGCTCGTC	60
Sbjct	760977	ATGCGCATTGACTCCATCCCGATCGGCAACAACCCGCCTTTCGATATCAACGTGCTCGTC	760918
Query	61	GAGGTTCCCATTTGGCGGCGAACCGATCAAGTACGAACTCGACAAGCTGTCGGGAACGCTG	120
Sbjct	760917	GAGGTTCCCATTTGGCGGCGAACCGATCAAGTACGAACTCGACAAGCCGTTCGGGAACGCTG	760858
Query	121	TTCGTCGACCGCATGCTGTACACCGCGATGCACTATCCGGGCAATTACGGCTTGTGCCG	180
Sbjct	760857	TTCGTCGACCGCATGCTGTACACCGCGATGCACTATCCGGGCAATTACGGCTTGTGCCG	760798
Query	181	CACACGCTGTCGGAAGACGGCGATCCGCTCGACGTGCTCATCGCGAATAACCGGCCGATC	240
Sbjct	760797	CACACGCTGTCGGAAGACGGCGATCCGCTCGACGTGCTCATCGCGAATAACCGGCCGATC	760738
Query	241	GTGCCGGGCGCGATCTGCAACTGCCGCCGATCGGCGTTCTTTTCATGCGCGACGAAGCA	300
Sbjct	760737	GTGCCGGGCGCGATCTGCAACTGCCGCCGATCGGCGTTCTTTTCATGCGCGACGAAGCA	760678
Query	301	GGCGGCGACGAAAAGATCATCGCGGTGCCTTCGGACAAGATTTGCGCGACCTATCGCGGC	360
Sbjct	760677	GGCGGCGACGAAAAGATCATCGCGGTGCCTTCGGACAAGATTTGCGCGACCTATCGCGGC	760618
Query	361	ATCAGAGATTACACCGACCTGCCGGACATGCTTCGCAACCGCATCGCCATTTCTATGAG	420
Sbjct	760617	ATCAGAGATTACACCGACCTGCCGGACATGCTTCGCAACCGCATCGCCATTTCTATGAG	760558
Query	421	CACTACAAGGATCTCGAACTTGGCAAGTGGGTGAAGATCGACCGTTGGGGCGGCGAAGCG	480
Sbjct	760557	CACTACAAGGATCTCGAACTTGGCAAGTGGGTGAAGATCGACCGTTGGGGCGGCGAAGCG	760498
Query	481	GAAGCGCGCGACCTCATTCTGAAGGCGATCGAGGACGGCCGGAAAAAGGGCTGA	534
Sbjct	760497	GAAGCGCGCGACCTCATTCTGAAGGCGATCGAGGACGGCCGGAAAAAGGGCTGA	760444

**Figura 15.** Alineamiento de la secuencia del gen amplificado de la pirofosfatasa de *R. vannielii* contra la secuencia registrada en GenBank (referencia NCBI: YP\_004011052.1). Con una estrella se enfatiza el nucleótido que no coincide.

En cuanto al alineamiento hecho de la secuencia de pirofosfatasa de *R. vannielii* contra la secuencia de nucleótidos publicada en el GenBank se encontró que difieren en un nucleótido, encontrado en la segunda posición del codón por lo que cambia el aminoácido para el que codifica, encontramos una lisina en la posición 36 en lugar de prolina presente en la secuencia publicada en el GenBank (P36K) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la pirofosfatasa citoplásmica de *R. vannielii* y la secuencia publicada en GenBank.

El análisis del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de 5 especies de bacterias (**Figura 11**) muestra que la posición número 36 corresponde a un aminoácido no conservado, por lo que se determinó continuar trabajando con el gen amplificado de la pirofosfatasa de *R. vannielii*.

En la **Figura 17** se muestra el alineamiento producto de esta búsqueda en BLAST de la secuencia obtenida del gen de la pirofosfatasa de *R. capsulatus* contra el gen NCBI: AY126339.1 con una identidad de 100%.

Rhodospirillum rubrum pyrophosphate phosphohydrolase family II gene, partial cds

Sequence ID: [gb|AY126339.1](#) Length: 915 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 915		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1690 bits(915)	0.0	915/915(100%)	0/915(0%)	Plus/Plus	
Query	1	ATGATCAAGGTATTGGCCACAAATCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	60		
Sbjct	1	ATGATCAAGGTATTGGCCACAAATCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	60		
Query	61	TGGGCTGGTACATGACCGAGGTGCTGGGCCAGCCCGCAAACCGGTGCTTTTGGGCGAG	120		
Sbjct	61	TGGGCTGGTACATGACCGAGGTGCTGGGCCAGCCCGCAAACCGGTGCTTTTGGGCGAG	120		
Query	121	CCCAACACCGAAGCGGCTTTCTGTGCTGAAACACTGGGATCTGCCGAAACCCGAGATCATC	180		
Sbjct	121	CCCAACACCGAAGCGGCTTTCTGTGCTGAAACACTGGGATCTGCCGAAACCCGAGATCATC	180		
Query	181	GCGGGCGTCGAAGCCGGTGAAGAGGTCGTTCATCGTTCGACACGAACAACCCGGCCGAAGT	240		
Sbjct	181	GCGGGCGTCGAAGCCGGTGAAGAGGTCGTTCATCGTTCGACACGAACAACCCGGCCGAAGT	240		
Query	241	CCCAGGGGCATCAACAAGGCCGACATCACCGCGATCATCGACCACCACAAGCTGGTCGGC	300		
Sbjct	241	CCCAGGGGCATCAACAAGGCCGACATCACCGCGATCATCGACCACCACAAGCTGGTCGGC	300		
Query	301	GGTCTGGAAACCAAGGGCCCGATCGACATCACCATCCCGTCCGCTGGCCTGCACCGCCACG	360		
Sbjct	301	GGTCTGGAAACCAAGGGCCCGATCGACATCACCATCCCGTCCGCTGGCCTGCACCGCCACG	360		
Query	361	ATCATGTTTCGACCTGATGGGCGAAGCCGTGGCAACGGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCG	420		
Sbjct	361	ATCATGTTTCGACCTGATGGGCGAAGCCGTGGCAACGGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCG	420		
Query	421	ATGCTCTCGTGCATCCTGTCCGACACGCTCGAGTTCGCGAGCCACCACCACCGCGCAT	480		
Sbjct	421	ATGCTCTCGTGCATCCTGTCCGACACGCTCGAGTTCGCGAGCCACCACCACCGCGCAT	480		
Query	481	GACAAGGCCGTGTGCGAGAAACTGGCCGCCGATCTGGGCGTGAACATCGGCGAACTCGCC	540		
Sbjct	481	GACAAGGCCGTGTGCGAGAAACTGGCCGCCGATCTGGGCGTGAACATCGGCGAACTCGCC	540		
Query	541	ACCGCATGTTTCGAGGCGAAATCCGACGTGTGCGAGTTCTCGGATGCCGCGCTGCTGCGC	600		
Sbjct	541	ACCGCATGTTTCGAGGCGAAATCCGACGTGTGCGAGTTCTCGGATGCCGCGCTGCTGCGC	600		
Query	601	ATGGATTGAAAGAATACACCGTCCGACGGCAAGGAACTGCGCGTTTCGGTGTGGAAACC	660		
Sbjct	601	ATGGATTGAAAGAATACACCGTCCGACGGCAAGGAACTGCGCGTTTCGGTGTGGAAACC	660		
Query	661	ACCGCGCCGAAAGCTGATCCTGGACCGGAAAGACAGCCTGATGGCCGCGATGGTCGATGTG	720		
Sbjct	661	ACCGCGCCGAAAGCTGATCCTGGACCGGAAAGACAGCCTGATGGCCGCGATGGTCGATGTG	720		
Query	721	GCCAAGGAAGACGGCGCCGATCAGGTGCTGCTGTTTCGTGTCGACATCCTGAAGGAAGAA	780		
Sbjct	721	GCCAAGGAAGACGGCGCCGATCAGGTGCTGCTGTTTCGTGTCGACATCCTGAAGGAAGAA	780		
Query	781	GCGACGCTGCTGGTGCCGAATGATTTTCGTCAAGCGCATCGCCGAGGCCAGCTTCCCCGTC	840		
Sbjct	781	GCGACGCTGCTGGTGCCGAATGATTTTCGTCAAGCGCATCGCCGAGGCCAGCTTCCCCGTC	840		
Query	841	ACCGTGACCGGCGACACCGTGGTTCTGCCGGGCATCATGAGCCGGAAAAAGCAGATCATT	900		
Sbjct	841	ACCGTGACCGGCGACACCGTGGTTCTGCCGGGCATCATGAGCCGGAAAAAGCAGATCATT	900		
Query	901	CCGGTCCTCAAGCTC 915			
Sbjct	901	CCGGTCCTCAAGCTC 915			

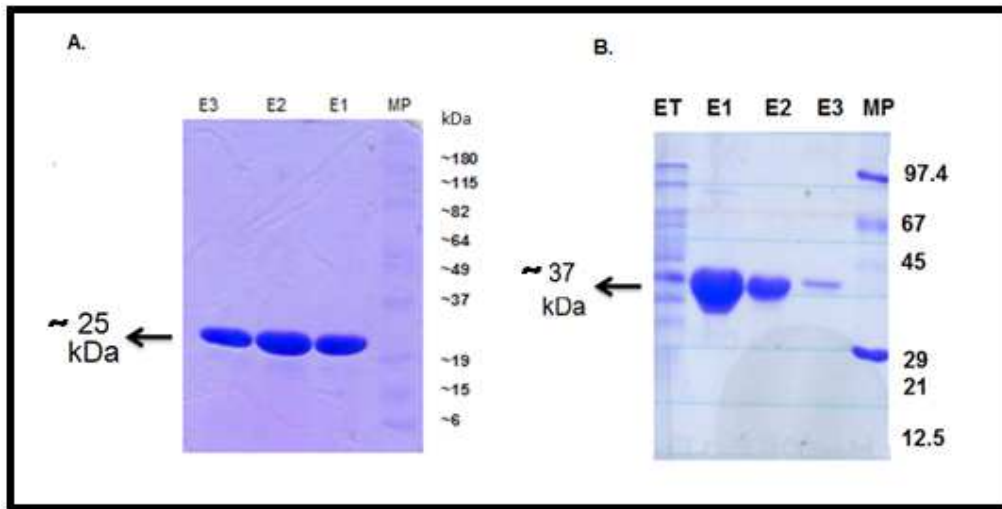
**Figura 17.** Alineamiento de la secuencia del gen amplificado de la pirofosfatasa de *R. capsulatus* contra la secuencia registrada en GenBank (referencia NCBI: AY126339.1).

Los genes de las pirofosfatasas de *R. vannielii* y *R. capsulatus* amplificados fueron digeridos y purificados (como se detalló en material y métodos). Después fueron clonados independientemente en el vector de expresión pBAD HisB que permite la adición de una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Los vectores resultantes, pBAD HisB + pirofosfatasa *R. vannielii* y pBAD HisB + pirofosfatasa *R. capsulatus* se nombraron pVS y pVO, respectivamente. A continuación se transformó en la cepa LMG194 de *E. coli* con el plásmido pVS más el plásmido pPIRL que codifica para tRNAs de uso raro en *E. coli* como: AAA (Lisina), CGC (Arginina) y ATT (Isoleucina), pero presentes en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (Bao and Cohen, 2001; Chen y Texada, 2006; Suaste-Olmos *et al.*, 2010). El plásmido pVO fue transformado junto con el plásmido pPIRL en la cepa LMG194 de *E. coli*.

La proteína pirofosfatasa recombinante de *R. vannielii* ( $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$ ) y la pirofosfatasa recombinante de *R. capsulatus* ( $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$ ) fueron purificadas como se describe en la sección de material y métodos a partir de cultivos de las cepas LMG194/pVS/pPIRL y LMG194/pVO/pPIRL, respectivamente. Para ambas proteínas se obtuvo una pureza superior al 90 % estimada por los geles de poliacrilamida- SDS (**Figura 18**) y un rendimiento de  $0.045\pm 0.009$  mg de proteína/mL para la  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  y de  $0.040\pm 0.004$  mg de proteína/mL para la  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$ , partiendo de un cultivo de 30 mL. Las pirofosfatasas citoplásmicas de *Rhodomicrobium vannielii* y de *Rhodobacter capsulatus* fueron sobreexpresadas y se obtuvieron en un estado de aparente homogeneidad



haciendo posible el estudio de sus propiedades catalíticas sin la interferencia de otros sistemas enzimáticos contaminantes.



**Figura 18.** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10 % teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente las eluciones de resina de Niquel-Qiagen, en **A.** la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y en **B.** la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$ . ET: extracto total, E1, 2 y 3: eluciones y MP es el marcador de peso molecular.

Adicionalmente, se hicieron purificaciones parciales de la pirofosfatasa citoplásmica silvestre de *R. vannielii* y de *R. capsulatus* con el objetivo de comparar la actividad de la pirofosfatasa no recombinantes contra las pirofosfatasa recombinantes. De la pirofosfatasa de *Rhodomicrobium vannielii* y de *Rhodobacter capsulatus* purificadas parcialmente se obtuvo un rendimiento aproximado de 11.982 mg de proteínas/mL por cada litro de cultivo (5 g de bacterias peso húmedo). De acuerdo a Gómez-García y colaboradores (2006), la concentración de pirofosfatasa citoplásmica representa aproximadamente del 0.1 al 0.5 % del total de proteínas celulares, pero en esta muestra se favoreció el enriquecimiento de la pirofosfatasa debido a las modificaciones realizadas en el proceso de purificación.

## **Características bioquímicas de las pirofosfatasas citoplásmicas recombinantes de *Rhodomicrobium vannielii* y *Rhodobacter capsulatus***

La principal forma de corroborar que una enzima es funcional es midiendo su actividad biológica, que en el caso de las pirofosfatasas citoplásmicas es la hidrólisis del pirofosfato. Ambas familias de pirofosfatasas citoplásmicas requieren de la presencia de cationes divalentes, tanto para mantener la estabilidad de la enzima, como para formar parte del sustrato. Los cationes divalentes que predominantemente se han reportado como cofactores son: el magnesio para familia I y el magnesio o manganeso para familia II. Posiblemente el pirofosfato forma un complejo 1:1 con el magnesio debido a la alta concentración de este metal en la célula aproximadamente en el orden de  $10^{-6}$  M a  $10^{-2}$  M en *E. coli* (Hurwitz y Rosano, 1967; Lahti, 1983). Otros factores influyen en la funcionalidad de una enzima, como el pH, la temperatura, la concentración de sustrato, la presencia de estabilizadores, activadores o inhibidores en el medio de reacción, así como la presencia de otros sistemas enzimáticos. La determinación del efecto de estos factores sobre la actividad biológica de la enzima constituye parte de la caracterización bioquímica (Allison, 2001; Benkovic y Hammes-Schiffer, 2003; Rogers y Gibon, 2009).

Para determinar la funcionalidad de las enzimas  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{Rvan}$  y  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{Rcap}$  se midió la actividad hidrolítica, además se comparó esta actividad contra la que presentan las pirofosfatasas citoplásmicas silvestres de *R. vannielii* y de *R. capsulatus* purificadas parcialmente.

La enzima  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  presentó una actividad hidrolítica aproximadamente 5 veces superior a la actividad que presentó la pirofosfatasa silvestre purificada parcialmente utilizando al magnesio como cofactor (**Tabla 6**). El comportamiento de estos dos extractos es similar. Para la actividad de este tipo de enzimas es indispensable la presencia de un catión divalente preferentemente magnesio, en nuestros ensayos se observa que cuando no se adiciona algún catión divalente al medio de reacción la actividad hidrolítica baja un 95%.

La actividad hidrolítica de  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  es de  $161.18 \pm 2.83 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  cuando el sustrato es  $\text{Mg-PPi}^{2-}$ , es comparable con la actividad hidrolítica de pirofosfatasas recombinantes de familia I reportadas para otros organismos, por ejemplo, la actividad de *E. coli* (Sitnik y Avaeva en el 2007) es de  $82 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , o la actividad de la pirofosfatasa citoplásmica recombinante con la etiqueta de polihistidinas de *Ascaris suum* reportada por Islam y colaboradores (2005) que es de  $940 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

Con respecto a la  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$  y la pirofosfatasa silvestre purificada parcialmente de *R. capsulatus* se observó que ambas enzimas presentaron actividad hidrolítica cuando ningún catión es adicionado al medio de reacción. Al añadir manganeso como cofactor, la proteína recombinante presenta casi la mitad de actividad en comparación con la actividad presentada con  $\text{Mg-PPi}^{2-}$ . La actividad de  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$  es baja ( $171.15 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) en comparación con la actividad que se ha reportado para otras enzimas recombinantes de familia II, por ejemplo, la pirofosfatasa de *Bacillus subtilis* es de  $5375 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

(Kunh y Ward en 1998) o la pirofosfatasa de *Methanococcus jannaschii* que presenta una actividad específica a de  $600 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (Kuhn *et al.*, 2000).

En resumen, se obtuvieron las enzimas  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  activas y con un comportamiento hidrolítico similar al de las proteínas silvestres purificadas parcialmente. Este comportamiento concuerda con las características reportadas para las pirofosfatasas de familia I y familia II de bacterias fotosintéticas, respectivamente (Klemme *et al.*, 1971; Celis *et al.*, 2003).

**Tabla 6. Actividad hidrolítica específica**

	Actividad específica $\mu\text{mol Pi (min mg proteína)}^{-1}$		
	Sin catión	Magnesio	Manganeso
<i>R. vannielii</i>			
<b>PPiase*</b>	0.96± 0.35	29.38± 2.4	2.17± 0.58
$\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$	3.38± 0.22	161.18± 2.83	30.97± 1.96
<i>R. capsulatus</i>			
<b>PPiase*</b>	5.54± 0.27	10.02± 1.08	24.97± 0.75
$\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$	166.45± 0.77	171.15± 3.77	91.11± 7.42

Medio de reacción: 50 mM Tris-HCl, 2 mM NaPPi, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, de 1.0 µg de proteína.  
 \*Purificación parcial.

## Perfil de pH

El sitio activo de una enzima está compuesto generalmente de grupos ionizables que suelen estar en la forma ionizable correcta para: mantener la conformación de la proteína, interactuar con el sustrato y catalizar la reacción. El pH puede afectar esta conformación y/o actuar sobre los sustratos que tienen grupos ionizables impidiendo que la catálisis se lleve a cabo de la forma adecuada (Segel, 1975).

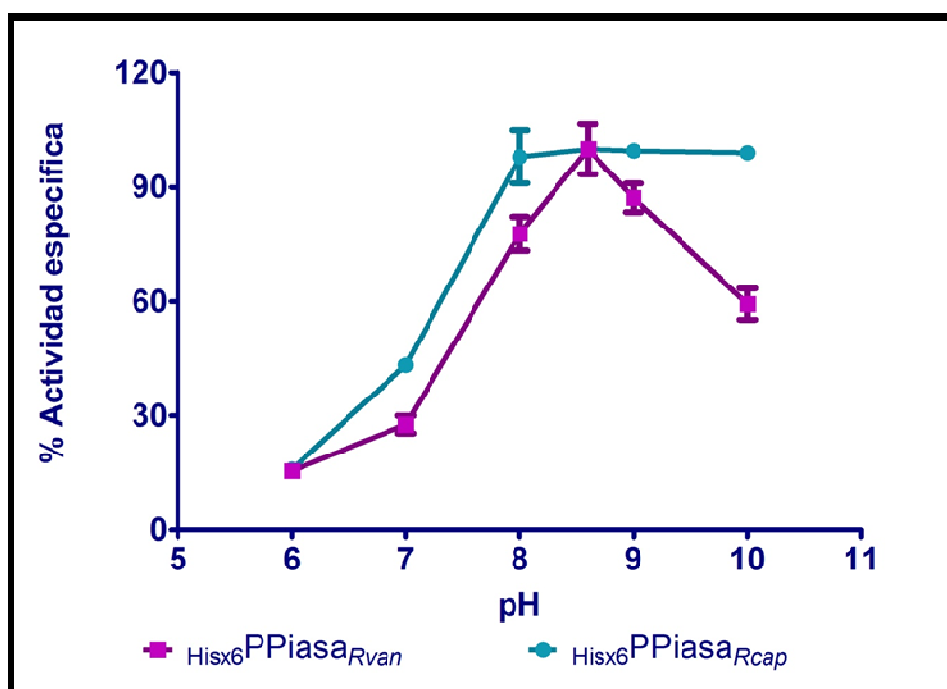
El intervalo de pH en el que las pirofosfatasas citoplásmicas mantienen su actividad hidrolítica se ha reportado entre los valores de pH 7.5 y pH 10.0 (Klemme *et al.*, 1971; Hachimori *et al.*, 1975; Vainonen *et al.*, 2005; Celis *et al.*, 2003). Hay también especies cuya pirofosfatasa funciona con valores extremos de pH como es *Sulfobulus acidocaldarius*, cuyo intervalo de actividad se encuentra entre pH 2.5 y 4.5 (Amano *et al.*, 1993).

Para determinar el intervalo de pH óptimo de la reacción de  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  y  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$ , se determinó la actividad hidrolítica utilizando seis medios con diferente valor de pH (entre 6.0 y 10.0). Para lograr estos intervalos de pH se utilizaron 3 diferentes amortiguadores, el Tris-HCl amortigua en un intervalo de pH entre 7.0 y 9.0, el Tris- maleíco amortigua en un intervalo de 5.8 a 8.2 y la Glicina-NaOH que amortigua entre pH 8.6 y pH 10.6 (Harris, 1989).

En la **Figura 19** se observa que la máxima actividad de la  $_{\text{His6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  se alcanza a un pH de 8.6, manteniendo más del 50% de actividad hidrolítica entre un pH de 8.0 y 10.0 (máximo valor de pH ensayado). Cuando el pH es menor a 8.0 la actividad disminuye de forma importante. De acuerdo a Segel (1975), el declive

en la actividad enzimática puede ser resultado de la formación de una modalidad iónica inapropiada del sustrato, la enzima o ambos.

Por otra parte, la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  alcanza una máxima actividad a pH 8.0, manteniéndola así en un intervalo de pH alcalino (pH 8.0-10.0). En este experimento al comparar la estabilidad de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  frente a los diferentes valores de pH, se observa que la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  es más estable a valores de pH alcalinos y tiene mayor intervalo de tolerancia (pH 8.0-10.0) que la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  que mantiene su máxima actividad hidrolítica entre pH 8.0 y 9.0. Esta disminución en la actividad hidrolítica con pH alcalino se puede deber a la inhibición por iones hidroxilo o bien a la formación de un complejo iónicamente inapropiado de la enzima, el sustrato o ambos.



**Figura 19.** Perfil de pH de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$ . Las condiciones de reacción fueron: 50 mM de amortiguador, 2 mM de NaPPi, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  a 37 °C por 10 minutos.

## Efecto de iones divalentes sobre la actividad hidrolítica

El cofactor es un componente no proteico necesario para la actividad de una enzima. Generalmente los cationes divalentes funcionan como cofactores formando parte del sitio catalítico, formando el complejo de coordinación y /o como agentes estabilizantes de la estructura enzimática.

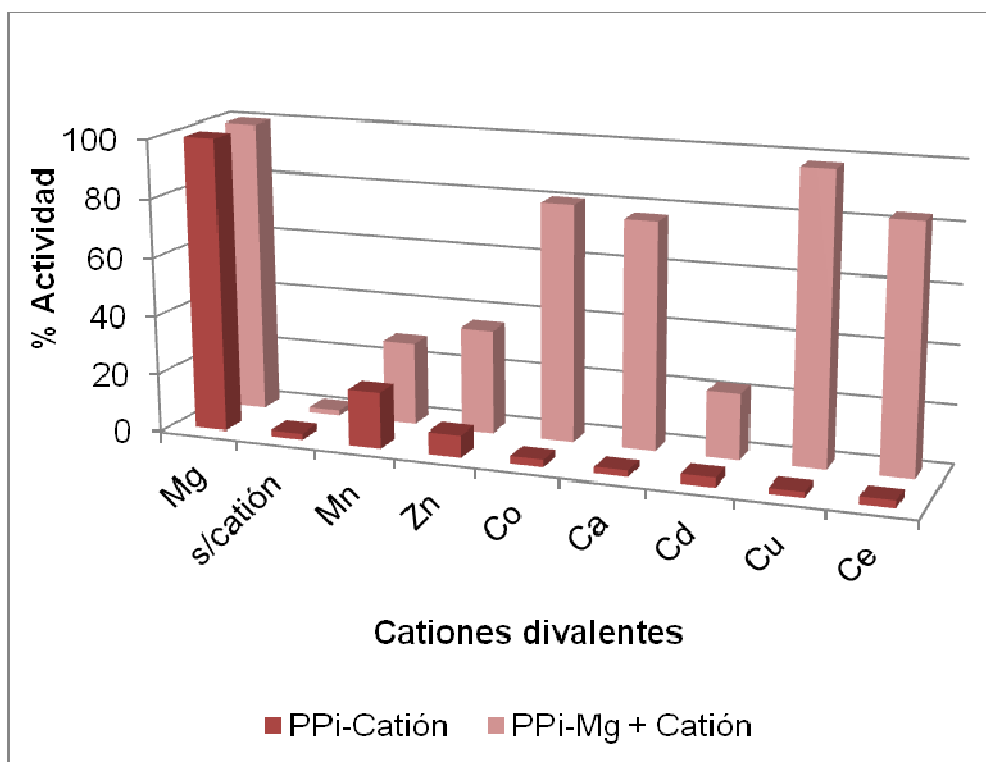
El grupo de Serrano (Gómez-García *et al.*, 2007) describió el comportamiento de la PPiase citoplásmica de distintas bacterias fotosintéticas y con ello mostró una marcada variabilidad sobre la dependencia de cationes. Por ejemplo, las PPiases de *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas viridis* son dependientes al  $Mg^{2+}$ ; la PPiase de *Rhodobacter capsulatus* prefiere al  $Mn^{2+}$  para llevar a cabo la hidrólisis del  $PPi^{4-}$  o en *Rhodopseudomonas palustris*, cuyo sustrato óptimo es el que se forma con el catión  $Fe^{2+}$  y el  $PPi^{4-}$  (de acuerdo a Schwarm *et al.*, 1986, el cofactor óptimo de esta pirofosfatasa es el calcio). En este trabajo buscamos evaluar el efecto de diferentes cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Cs^{2+}$ ) sobre la actividad hidrolítica de las pirofosfatasas recombinantes en dos formas: en la primera se agregaron de forma independiente diferentes cationes divalentes al medio de reacción y se determinó si se requerían como cofactores, en el caso de que se formara el complejo Metal- $PPi^{2-}$ . En el segundo grupo de ensayos, para observar si había un efecto antagónico entre los dos cationes, se utilizó como sustrato el complejo  $Mg-PPi^{2-}$  (a una concentración de 2 mM cada uno) y además se agregó al medio de reacción en forma independiente otro de los cationes divalentes antes mencionados en una concentración de equimolecular.

Los resultados del primer ensayo con la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  se observan en la **Figura 20** en barras oscuras se encuentra el porcentaje de actividad hidrolítica de la pirofosfatasa con cada uno de los cationes adicionados de forma independiente. De todos los cationes divalentes probados solo con magnesio, manganeso y zinc se presenta actividad enzimática, aunque la actividad mostrada con manganeso y zinc constituye menos del 20% de la actividad presentada con magnesio. Al igual que en los ensayos hechos por Josse en 1966 con la pirofosfatasa de *E. coli*, la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  no presenta actividad detectable en ausencia de cationes divalentes.

Como se observó que el magnesio es el catión con el que la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  es más activa, como se ha reportado para las pirofosfatasas de familia I, entonces en otra serie de experimentos se abordó el efecto de la presencia de otros cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica cuando el sustrato es  $\text{Mg-PPi}^{2-}$ . Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 20** en barras claras. La presencia de cobre en el medio de reacción no afecta la actividad de la enzima; con manganeso, zinc y cadmio se observa una disminución significativa y un menor efecto se observa con cobalto, calcio y cesio. No está claro si este efecto inhibitorio se debe a un antagonismo de estos cationes y el magnesio interfiriendo en la formación del complejo  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  o a que estos cationes actúan como modificadores de la estructura de la proteína imposibilitando la unión del sustrato. Con ninguno de los cationes ensayados a la concentración utilizada (2 mM) se observó un efecto activador de la actividad de la pirofosfatasa, este comportamiento es similar al reportado Josse en 1966 con la pirofosfatasa de *E.*



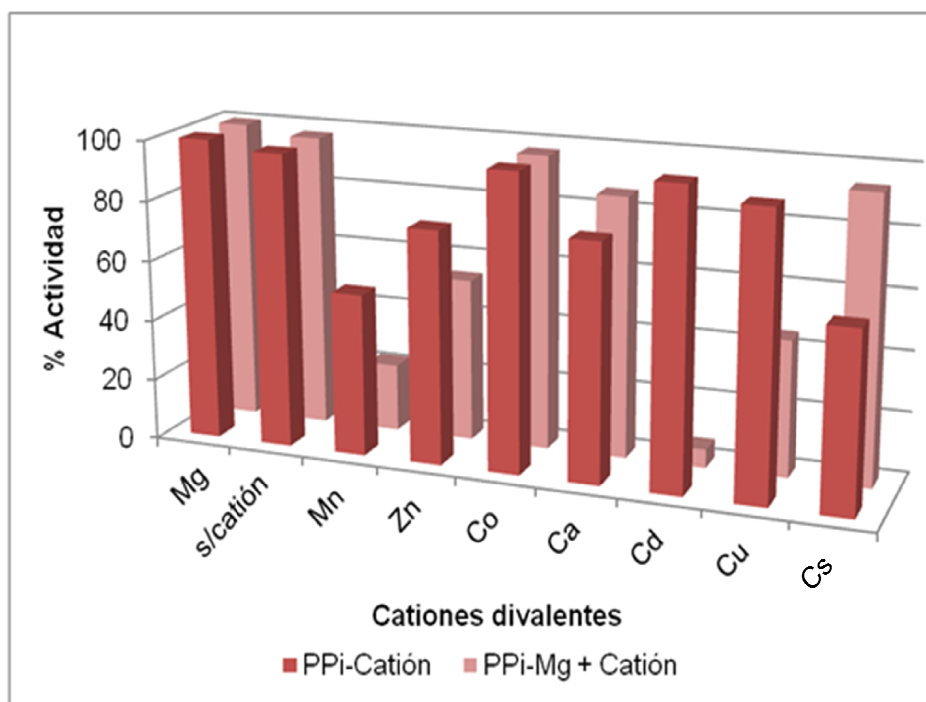
*coli*, al adicionar dos de estos cationes al medio de reacción en una concentración mayor de 0.5 mM, se observó un efecto antagónico sobre la actividad de la enzima.



**Figura 20.** Efecto de diferentes cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica de  $Hisx6PPiase_{Rvan}$

Por otra parte, la misma serie de ensayos se realizaron con la  $Hisx6PPiase_{Rcap}$ , se determinó la actividad de esta enzima agregando de forma independiente cada uno de los cationes a una concentración de 2 mM. Aunque la máxima actividad registrada se presenta cuando el magnesio es utilizado como cofactor (100%), un porcentaje cercano de hidrolisis es observado en presencia de cobalto, cadmio y cobre, la actividad baja ligeramente en presencia de manganeso, zinc, cadmio y cesio. Sin embargo, aun cuando ningún catión es adicionado al medio de reacción

se observó actividad hidrolítica (**Figura 21**, barras oscuras). El evento observado es similar al reportado por Celis y colaboradores (2003) en la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Al presentarse actividad hidrolítica sin catión en el medio de reacción no queda claro si la actividad que se presenta con los cationes divalentes es por la formación del complejo PPI-catión o solo estamos viendo el resultado de una inhibición por parte de estos iones. Para explorar esta posibilidad, se llevó a cabo un experimento en donde se adicionó al medio de reacción 2 mM de magnesio mas 2 mM de otro catión divalente y entonces se observó que cuando además del magnesio se adiciona cobalto o cobre, no se presenta un efecto importante sobre la actividad hidrolítica de  $_{Hisx6}PPIasa_{Rcap}$ . El cobalto posiblemente no interviene ni como cofactor ni modifica la estructura de la enzima aunque Klemme y colaboradores (1971) lo reportaron como estabilizador de este grupo de enzimas. Los cationes que ejercen un efecto inhibitorio en la actividad de esta pirofosfatasa en presencia de  $Mg-PPI^{2-}$  son  $Cd > Mn > Cu > Zn > Ca$  (**Figura 21**, barras claras).



**Figura 21.** Efecto de cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica de  $_{Hisx6}PPIase_{Rcap}$ .

Las dos familias de pirofosfatasa difieren en su especificidad por los metales, lo cual se puede deber a que las pirofosfatasas de familia II tienen en su sitio activo 3 histidinas que se unen preferentemente al manganeso sobre el magnesio mientras que las de familia I no las tienen. Solo se ha reportado una pirofosfatasa de familia I (*Mycobacterium tuberculosis*) con 2 histidinas (His21 e His80) en el sitio activo (Tammenkoski *et al.*, 2005).

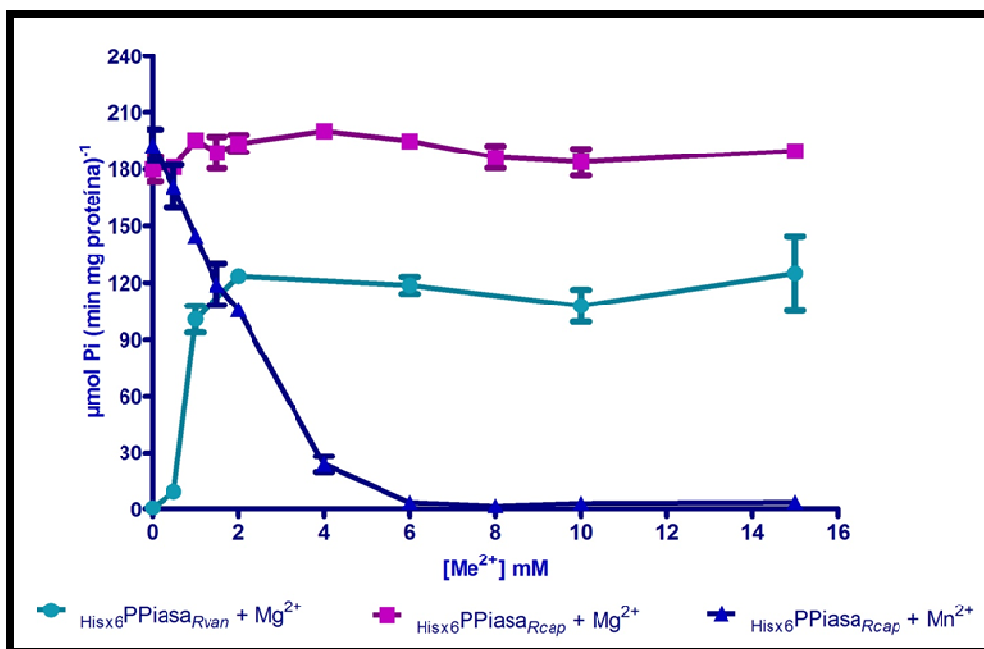
Estudios hechos sobre el efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad de la pirofosfatasa citoplásmica de otras bacterias, por ejemplo *Rhodospseudomonas palustris* (pirofosfatasa de familia I) o *Bacillus subtilis* (pirofosfatasa de familia II), muestran que el efecto activador de estos cationes se obtiene con bajas concentraciones de ellos en el medio de reacción (menos de 1

mM). Con concentraciones mayores se inhibe la actividad de la enzima (Klemme *et al.*, 1971; Schwarm *et al.*, 1986; Kuhn y Ward, 1998). Incluso algunas pirofosfatasas de familia I, como la de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) cambia la especificidad de su sustrato en presencia de cobalto, con el que puede hidrolizar ATP y tripolifosfato (Zyryanov *et al.*, 2002).

Como se observó que ambas pirofosfatasas presentan su máxima actividad en presencia de magnesio, entonces se exploró el efecto de diferentes concentraciones de este catión sobre la actividad enzimática de  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rvan}}$  y  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$ . Las concentraciones utilizadas de magnesio estuvieron entre 0 y 15 mM en el medio de reacción. La máxima actividad hidrolítica de estas enzimas se alcanza cuando la concentración del catión es igual a la concentración del pirofosfato (concentración equimolecular) y se mantiene mostrando la máxima actividad hasta una concentración de 15 mM de  $\text{MgCl}_2$ . En ninguna de las dos enzimas se observó el efecto activador del magnesio libre reportado en el trabajo de Celis y colaboradores (2003). Contrastando con los resultados obtenidos por Klemme y colaboradores (1971), la pirofosfatasa de *Rhodobacter capsulatus* no disminuye su actividad hidrolítica en presencia de magnesio libre (**Figura 22**).

En este ensayo también se determinó el efecto inhibitorio que tienen las altas concentraciones de manganeso sobre la actividad hidrolítica de  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$  cuando éste catión es adicionado como cofactor (**Figura 23**). A diferencia de los datos reportados para las pirofosfatasas de familia II (Shintani *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998; Parfenyer *et al.*, 2001 Celis *et al.*, 2003 y Zyryanov *et al.*, 2004) para  $_{\text{Hisx6}}\text{PPiase}_{\text{Rcap}}$ , este catión no es el cofactor principal y en concentraciones de 2

mM mantiene solo el 50% de la actividad hidrolítica que se presenta con magnesio o incluso sin catión en el medio de reacción.



**Figura 22.** Efecto de magnesio libre sobre la actividad hidrolítica de Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub> y del magnesio y manganeso libre sobre la actividad hidrolítica de Hisx6PPiase<sub>Rcap</sub>. Medio de reacción: 50 mM Tris-HCl, 2 mM NaPPi, .0-15 mM de MgCl<sub>2</sub> o MnCl<sub>2</sub>, de 1 μg de proteína. Preincubado por 10 min a 37 °C. Actividad medida a 37 °C por 10 min.

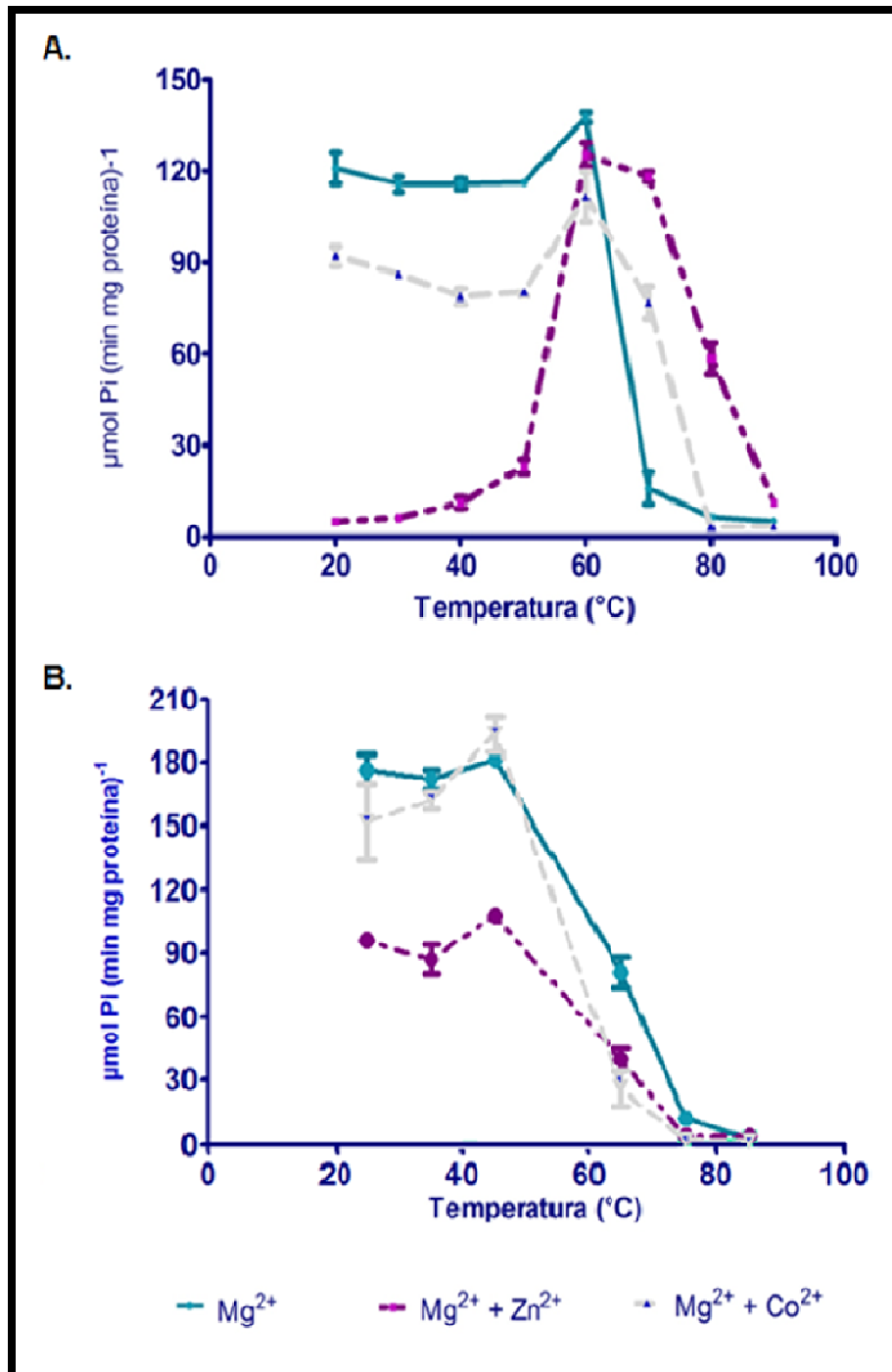
### Termoestabilidad

Para la determinación del intervalo de temperatura en el que la enzima se mantiene activa se cuantificó la hidrólisis del pirofosfato en presencia de la enzima preincubando por 10 minutos entre 20-90 °C para Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub> y entre 25-85 °C para Hisx6PPiase<sub>Rcap</sub>. La Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub>, muestra una alta termoestabilidad con el complejo Mg-PPi<sup>2-</sup>. Se observó que la enzima tiene un intervalo de temperatura en el que puede permanecer relativamente estable (20-60 °C) manteniendo una actividad máxima, ligeramente mayor al acercarse a los 60 °C (**Figura 23 A**).

Cuando en el medio de reacción además de incluir  $MgCl_2$  se adiciona  $ZnCl_2$ , el intervalo de estabilidad incrementa hasta los  $75\text{ }^\circ\text{C}$  y se mantiene en cerca del 50 % a los  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . La actividad de  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  en estas condiciones de contenido de cationes (2 mM cada uno) es aparentemente dependiente de la temperatura ya que a temperaturas menores de  $50\text{ }^\circ\text{C}$  la presencia de zinc inhibe casi en su totalidad la actividad hidrolítica de la enzima. Adicionalmente, el cobalto, a pesar de disminuir la actividad hidrolítica en aproximadamente 25% cuando el sustrato es  $MgPPi^{2-}$ , su presencia en el medio de reacción incrementa  $10\text{ }^\circ\text{C}$  la estabilidad de la enzima. Parte de la tolerancia y estabilidad frente a altas temperaturas se observó en uno de los pasos de la purificación como familia I, donde se somete al extracto crudo a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min., en ese caso es atribuible a la protección que ejerce el catión  $Zn^{2+}$  sobre la enzima (Klemme y Gest, 1971).

La  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  es menos tolerante a temperaturas mayores a  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . A  $65\text{ }^\circ\text{C}$  solo se conserva un 50% de la actividad hidrolítica cuando en el medio de reacción está presente solo el magnesio. Como se observa en la **Figura 23 B**, la adición de zinc o cobalto no incrementa la estabilidad de la enzima como en el caso de  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$ .

Lahti observó que las enzimas termoestables son en general menos flexibles que sus contrapartes termolábiles (Lahti *et al.*, 1990). Al analizar algunas de las estructuras cristalográficas reportadas de ambas familias (**Figura 4**) vemos que el asa flexible que une los dominios DHH y DHHA2 de las pirofosfatasas de familia II constituye una estructura lábil que posiblemente está involucrada en la inestabilidad de  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  a altas temperaturas.



**Figura 23.** Efecto de la temperatura sobre la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa en A.  $His_{x6} PPIasa_{Rvan}$  y en B.  $His_{x6} PPIasa_{Rcap}$ , realizando una incubación previa de 10 minutos a la temperatura correspondiente. Las condiciones de reacción fueron pH 8.6, 50 mM de Tris- HCl, 2 mM de catión, 2 mM de NaPPi a 37 °C por 10 minutos.

## Efecto del fluoruro sobre la actividad hidrolítica

El fluoruro es el inhibidor clásico de las pirofosfatasa citoplásmica de FI y de la membranal, más no inhibe a las pirofosfatasa de FII (Klemme *et al.*, 1971; Schwarm *et al.*, 1986). El efecto inhibitorio del NaF (10 mM) sobre  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  se expresa en una reducción del 97% de la actividad hidrolítica en presencia del sustrato Mg-PPi<sup>2-</sup>. Cuando se adiciona NaF al medio de reacción, la actividad de  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  solo disminuye un 13%. El inhibidor típico de las fosfatasa, molibdato de sodio (NaMo; Weil-Malherbe y Green, 1951), fue utilizado para probar que ninguna fosfatasa inespecífica estuviera presente. Al adicionar al medio de reacción NaMo (10 mM), se encontró que incrementa cerca del 20% la actividad de  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  y de  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  (**Tabla 7**). Estos resultados indican que ninguna fosfatasa inespecífica está hidrolizando el sustrato de estas enzimas. Este efecto de activación no se ha reportado antes, sólo se ha reportado que este compuesto actúa inhibiendo ligeramente la actividad de la pirofosfatasa del cartílago del cerdo (Felix y Fleisch, 1975), pero en la mayoría de los trabajos donde se incluye el molibdato de amonio al medio de reacción de las pirofosfatasa no se ha observado algún efecto sobre la actividad hidrolítica a las concentraciones utilizadas (Gross y Ap, 1986; Celis *et al.*, 2003).

**Tabla 7 Efecto de NaF y de NaMo sobre la actividad específica de**

$_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  y de  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$

S/inhibidor	% de actividad	
	$_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$	$_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$
	100.00 ± 0.24	99.99 ± 0.57
NaMo	125.63 ± 1.13	119.10 ± 28.07
NaF	2.98 ± 0.63	87.91 ± 2.68



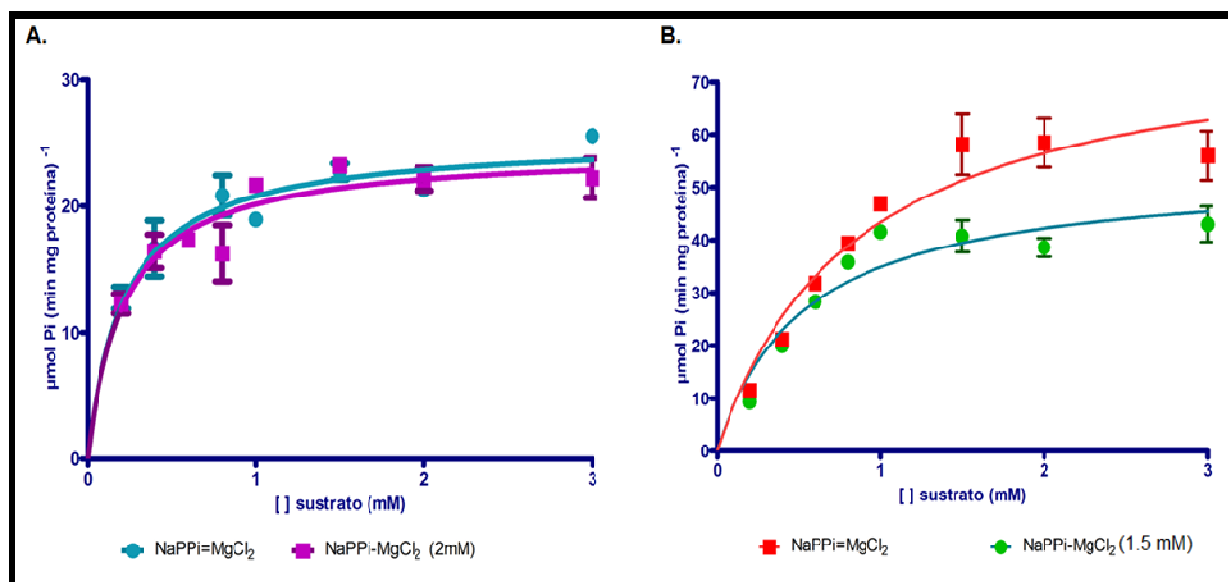
## Constantes cinéticas

Con el objetivo de determinar el comportamiento cinético de  $\text{Hisx6PPiase}_{Rvan}$  y  $\text{Hisx6PPiase}_{Rcap}$ , además de calcular las constantes cinéticas de Michaelis-Menten correspondientes, se tomaron dos condiciones, la primera fue utilizando concentraciones equimoleculares de  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  y la segunda fue manteniendo la concentración de catión constante y variando la concentración del pirofosfato. Los datos se procesaron para su análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 5 Project (versión 5, 2007).

En el caso de  $\text{Hisx6PPiase}_{Rvan}$  cuando  $[\text{Mg}^{2+}] = [\text{PPi}]$ , la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) es  $25.38 \pm 1.02 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y la  $K_M$  se calculó en  $0.22 \pm 0.04 \text{ mM}$ . Por otro lado, manteniendo la concentración de magnesio en 2 mM y variando la concentración de PPI, la  $V_{\max}$  es de  $24.49 \pm 1.13 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) es de  $0.21 \pm 0.04 \text{ mM}$ , por lo que se observa que a estas concentraciones de sustrato no hay un efecto evidente del pirofosfato libre sobre la actividad hidrolítica de la enzima con las condiciones de reacción ensayadas (**Figura 24 A, Tabla 8**). Esto contrasta con los reportes del efecto inhibitorio del PPI libre sobre la actividad hidrolítica de las pirofosfatasas de familia I (Schwarm *et al.*, 1986; Celis *et al.*, 2003).

En la **Figura 24 B** se observa la curva de velocidad de hidrólisis de  $\text{Hisx6PPiase}_{Rcap}$  en dos sistemas donde se compara, por un lado, la curva de saturación del sustrato cuando  $[\text{Mg}^{2+}] = [\text{PPi}]$  la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) fue de  $53.45 \pm 3.65 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y la  $K_M$  se calculó en  $0.53 \pm 0.10 \text{ mM}$ . Por otro lado, en el segundo sistema, se comparó la actividad manteniendo fija la

concentración del catión magnesio en 1.5 mM y variando la concentración de PPI, la  $V_{max}$  es de  $80.83 \pm 6.88 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) es de  $0.86 \pm 0.18 \text{ mM}$ . Al comparar la actividad a través del intervalo de concentración estudiado se observa que la velocidad es relativamente independiente cuando  $[\text{Mg}^{2+}] > [\text{PPI}]$  ya que la curva de velocidad incrementa de una manera similar a como lo hace la curva en condiciones de equimolecularidad. Sin embargo, cuando la condición de saturación cambia a  $[\text{Mg}^{2+}] < [\text{PPI}]$  la velocidad no aumenta e incluso se ve ligeramente afectada. Para las pirofosfatasa de familia II no se ha reportado un efecto inhibitorio del pirofosfato libre, esto se ha considerado como una característica de las pirofosfatasa de familia I, ya que el pirofosfato libre actúa como un competidor del sustrato  $\text{Mg-PPI}^{2-}$  (Khandelwal y Hamilton, 1982).



**Figura 24.** Cinética de Michaelis-Menten de  $\text{Hisx6PPiase}_{Rvan}$  (A) y  $\text{Hisx6PPiase}_{Rcap}$  (B) Medio de reacción: 50 mM Tris-HCl, diferentes [ ] NaPPI, 2 o 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , más 1  $\mu\text{g}$  de proteína. Preincubado por 10 min a 37 °C. Actividad medida a 37 °C por 2.5 min.

En la **Tabla 8** se resumen los parámetros cinéticos de ambas enzimas, particularmente al comparar el número de recambio ( $k_{cat}$ ) de las enzimas, que se refiere a el número de moléculas de sustrato transformadas por minuto por cada centro catalítico (Rogers y Gibon, 2009). Observamos que los valores obtenidos de  $k_{cat}$  cuando  $[Mg] = [PPi]$  y cuando  $[Mg]$  es diferente a  $[PPi]$  para la Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub> son entre 5 y 10 veces menores a los valores de  $k_{cat}$  que se obtienen bajo las mismas condiciones para la Hisx6PPiase<sub>Rcap</sub>. Esto indica que la catálisis llevada a cabo por Hisx6PPiase<sub>Rcap</sub> ocurre con mayor eficiencia que la presentada con Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub>. Específicamente los valores de  $k_{cat}$  obtenidos para Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub> son bajos en comparación con los que se han reportado para otras enzimas, como la PPiase recombinante de *E. coli* cuya  $k_{cat}$  es de  $86 \text{ s}^{-1}$  (Käpylä *et al.*, 1995; Vainonen *et al.*, 2003). Los valores de  $k_{cat}$  reportados para pirofosfatasas recombinantes de familia II se encuentran entre  $48 \text{ s}^{-1}$  (PPiase de *Streptococcus gordonii*, Ilias *et al.*, 2011),  $109 \text{ s}^{-1}$  para *Vibrio cholera* (Salminen *et al.*, 2006) y  $160 \text{ s}^{-1}$  (con magnesio) o  $3125 \text{ s}^{-1}$  (con manganeso) para la pirofosfatasa de *Bacillus subtilis* (Halonen *et al.*, 2005).

De acuerdo a Rogers y Gibon (2009) la eficiencia catalítica puede ser tomada como una medida de la especificidad y la capacidad de la enzima de unirse al sustrato, un referente que se acerca a la eficiencia perfecta es la fumarasa, tiene un valor de  $k_{cat}/k_M$  de  $2.3 \times 10^8 \text{ s}^{-1} (\text{mol l}^{-1})^{-1}$ . En cuanto a la eficiencia catalítica calculada para la Hisx6PPiase<sub>Rvan</sub> y la Hisx6PPiase<sub>Rcap</sub> obtuvimos valores menores a los descritos para la fumarasa fumarasa, pero comparables con los reportados para otras pirofosfatasas, por ejemplo, para la pirofosfatasa de *Bacillus subtilis* con

manganeso como cofactor el valor de  $k_{cat}/k_M$  es de  $19.5 \text{ s}^{-1}(\text{mol. l}^{-1})^{-1}$  y con magnesio de cofactor es de  $5.5 \text{ s}^{-1}(\text{mol. l}^{-1})^{-1}$  o para la pirofosfatasa de *Streptococcus gordonii* (familia II) que reporta Ilias y colaboradores (2011) el valor de  $k_{cat}/k_M$  es de  $67.5 \text{ s}^{-1}(\text{mol. l}^{-1})^{-1}$ . No se encontraron reportes de valores de  $k_{cat}/k_M$  de pirofosfatasas de familia I para poder comparar la eficiencia catalítica de la  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$ . Sin embargo, comparando los valores de eficiencia catalítica de la  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$  y de la  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rcap}$  obtenemos que la  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$  es más eficiente para unirse a su sustrato que la pirofosfatasa de familia II  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rcap}$ .

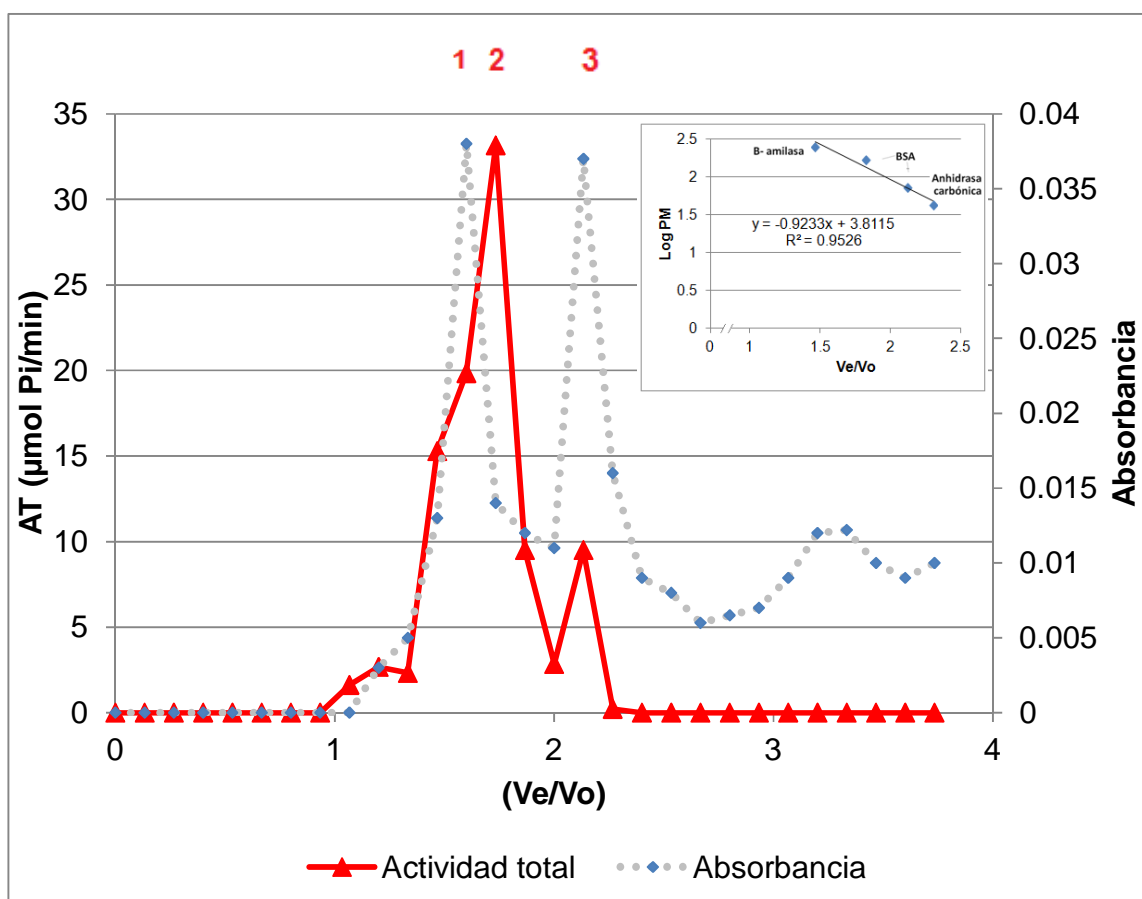
**Tabla 8.** Parámetros cinéticos

$\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$	NaPPi=MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> (2mM)- NaPPi
$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	4.22 ± 0.17	4.08 ± 0.18
$k_M (\text{mM})$	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.04
$V_{max}$	25.38 ± 1.02	24.49 ± 1.13
$k_{cat}/k_M (\text{s}^{-1}(\text{mol} \cdot \text{l}^{-1})^{-1})$	50.16	46.78
$\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rcap}$	NaPPi=MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM)- NaPPi
$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	40.41 ± 3.44	26.72 ± 1.82
$k_M (\text{mM})$	0.86 ± 0.18	0.53 ± 0.10
$V_{max}$	80.83 ± 6.88	53.45 ± 3.65
$k_{cat}/k_M (\text{s}^{-1}(\text{mol} \cdot \text{l}^{-1})^{-1})$	18.82	19.07

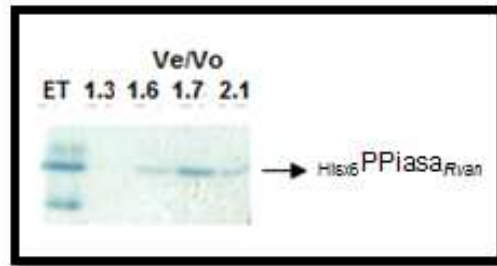
### Peso molecular y estructura oligomérica de $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$ y $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$

El peso molecular de  $\text{His}_{x6}\text{PPiase}_{Rvan}$  fue estimado utilizando una columna de exclusión molecular FPLC de Superdex 200 10/300 GL de 24 cm<sup>3</sup> equilibrada con buffer D (20 mM Tris-HCl pH 8.6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 150 mM de NaCl), colectando fracciones de 2 minutos a un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. El patrón de elución y las fracciones con actividad son mostrados en la **Figura 25**, en donde se distingue la

presencia de 3 fracciones con actividad hidrolítica. Utilizando la ecuación de la curva de los estándares moleculares se calculó que el peso molecular aparente de estas fracciones corresponden a 242.8, 141.2 y 94.29 kDa aproximadamente, lo que podría corresponder a oligómeros constituidos por 10, 6 y 4 subunidades idénticas, respectivamente. Las fracciones activas fueron colectadas y su pureza se examinó en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El perfil electroforético indica que la muestra de proteína cargada en la columna de exclusión molecular no es homogénea (**Figura 26**).

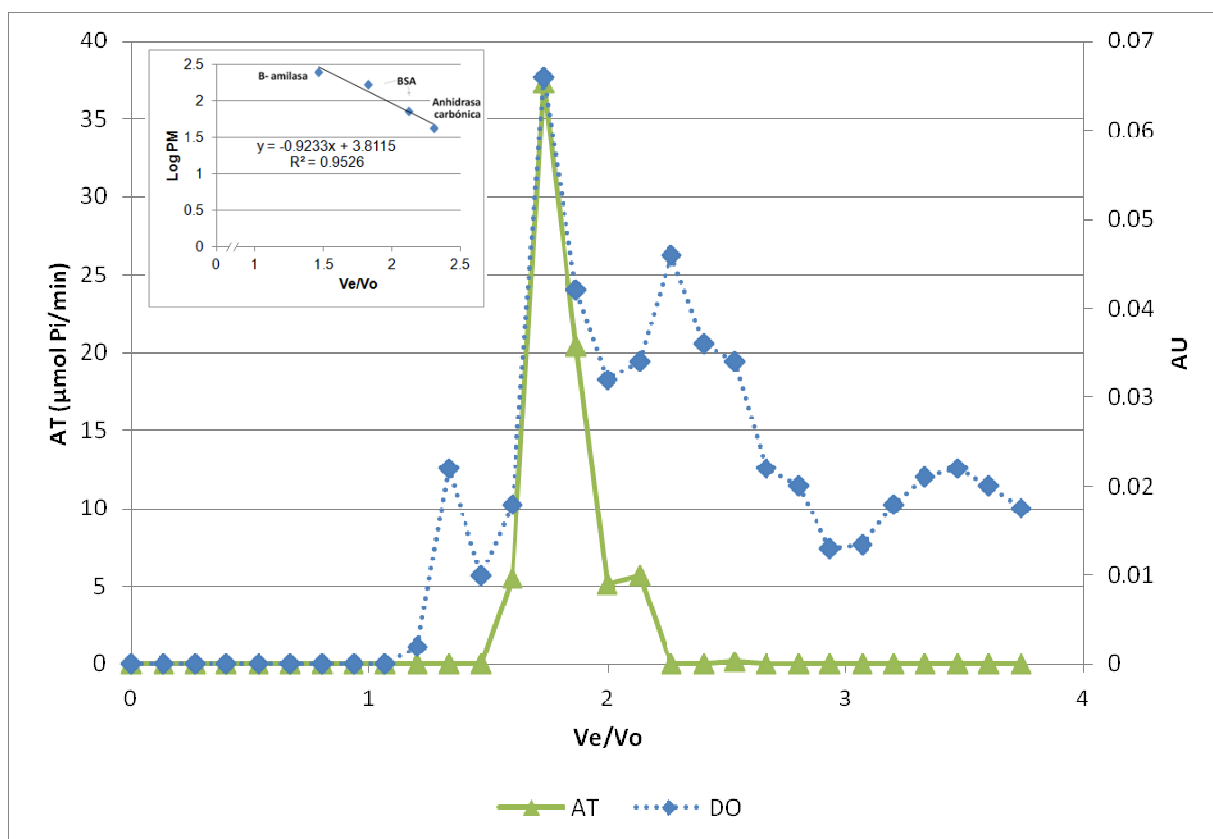


**Figura 25.** Cromatograma de  $_{His6}PPiase_{Rvan}$  de la columna de Superdex 200 con un flujo de elución de 0.5 mL/min. Los números superiores en rojo corresponden a 242.8, 141.2 y 94.29 kDa, respectivamente. En el recuadro se encuentra la curva de estándares.  $Ve/Vo$  es Volumen de elución/ Volumen vacío.



**Figura 26.** Zimograma de las fracciones colectadas de la columna Superdex 200 de la  $\text{His}_6\text{PPIasa}_{Rvan}$ . ET corresponde a la muestra total cargada en la columna Superdex 200 y las siguientes columnas corresponden a las eluciones indicadas en la gráfica 7 como 1, 2 y 3 (1= 1.6, 2= 1.7 y 3= 2.1  $\text{Ve}/\text{Vo}$ ).

Para determinar si esta mezcla de poblaciones oligoméricas diferentes se presentaba también en la pirofosfatasa silvestre de *R. vannielii*, se colocó una muestra de la proteína purificada parcialmente en la columna cromatográfica de exclusión molecular Superdex 200. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 27**. En el cromatograma se observa que la actividad hidrolítica se presenta mayoritariamente en una fracción que corresponde a un peso molecular aproximado de 141.2 kDa (hexámero), aunque también está presente una fracción con menor actividad correspondiente a 94.3 kDa aproximadamente (tetramero).



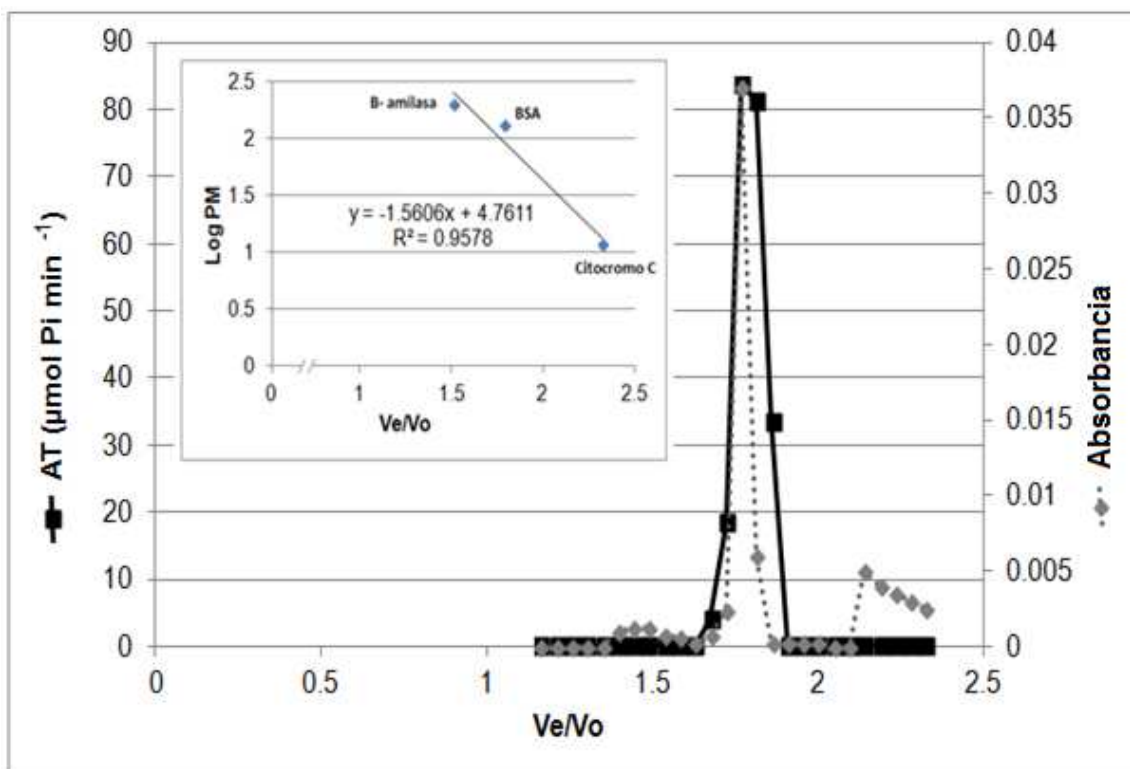
**Figura 27.** Cromatograma de la pirofosfatasa citoplásmica silvestre de *Rhodomicrobium vannielii* purificada parcialmente de la columna de Superdex 200 con un flujo de elución de 0.5 mL/min. En el recuadro se encuentra la curva de estándares. Ve/Vo es Volumen de elución/ Volumen vacío.

Como se mencionó en la introducción, las pirofosfatasa citoplásmicas de familia I que pertenecen al linaje procariota (bacterias, arqueas y algunos eucariotas fotosintéticos) se presentan generalmente como homohexámeros cuyas unidades están entre los ~19 y ~22 kDa (Heikinheimo *et al.*, 1996; Harutyunyan *et al.*, 1996; Tammenkoski, *et al.*, 2005; Gómez-García *et al.*, 2006). Gómez García y colaboradores (2007) reportaron que la pirofosfatasa de *Rhodospirillum viridis* presenta una masa molecular de  $240 \pm 15$  kDa, sugiriendo que es un dodecámero, siendo el reporte del mayor estado oligomérico funcional

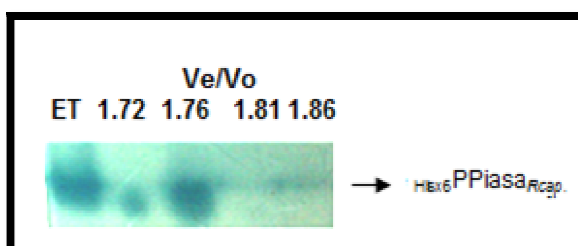
de una pirofosfatasa y en donde se aportan antecedentes de oligómeros activos de diferente número de subunidades a los reportados para las pirofosfatasa de familia I. De acuerdo a Park y colaboradores (2002) algunas modificaciones de una enzima, como la delección o las mutaciones puntuales de aminoácidos, pueden influir en las interacciones moleculares asociadas con la oligomerización de la enzima. En el caso de la  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  existe un aminoácido mutado entre dos regiones que se han reportado estabilizan la formación hexamérica de la pirofosfatasa de *E. coli* (Asn 24- Asp 26 y Ser 46-Phe 50; Avaeva 2000) pero que no son regiones conservadas en el dominio pirofosfatasa. Sin embargo, la  $_{Hisx6}PPiase_{Rvan}$  conserva otros aminoácidos reportados como estabilizadores de la estructura oligomérica (His 136, Asp 143 formando pares iónicos e His 140 involucrado en el contacto hidrofóbico) (**Figura 16**).

Utilizando cromatografía de exclusión molecular FPLC en una columna con Sephacryl s300 HR se determinó la fracción con máxima actividad hidrolítica. Esta correspondió a la  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  con un peso molecular de 78 kDa aproximadamente. Este es un peso molecular del doble del calculado usando un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para el monómero de esta proteína (**Figura 18 B**). Estos resultados revelan que la  $_{Hisx6}PPiase_{Rcap}$  forma un homodímero muy estable que corresponde al estado oligomérico reportado para las PPiases de FII (**Figura 28**). Complementando estos resultados, se corrió un gel de actividad de las fracciones colectadas y se confirmó que todas las muestras de estas fracciones migran a la misma altura, lo que indica que se trata de la misma proteína (**Figura 29**).





**Figura 28.** Cromatograma de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rcap</sub> de la columna de exclusión molecular Sephacryl s300 con un flujo de elución de 0.5 mL/min. En el recuadro se encuentra la curva de estándares. Ve/Vo es Volumen de elución/ Volumen vacío.



**Figura 29.** Zimograma de las fracciones colectadas de la columna Sephacryl s300 de la His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rcap</sub>. ET corresponde a la muestra total cargada en la columna.

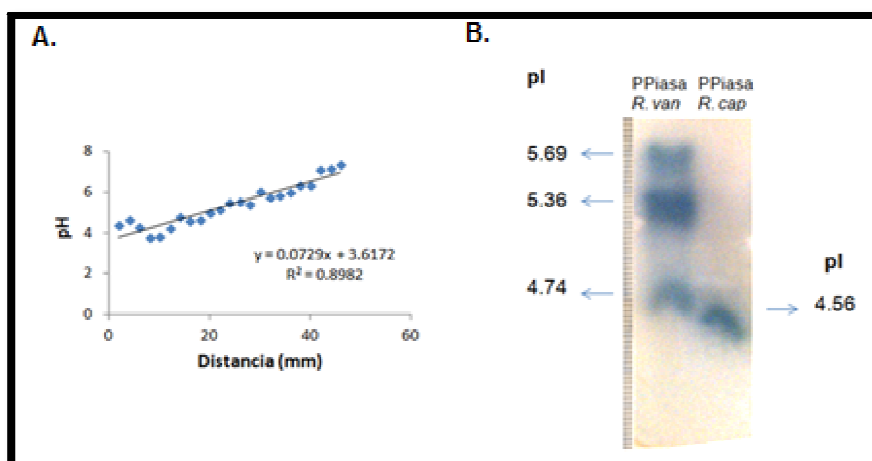
## Punto isoeléctrico

Las proteínas son moléculas anfóteras debido a los residuos de aminoácidos que contienen en su estructura y el pH en el que una sustancia anfótera tiene carga neta de cero se conoce como punto isoeléctrico. Además de la suma de sus cargas positivas y negativas, la conformación de la proteína tiene un papel importante sobre su punto isoeléctrico. Las proteínas se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH, por lo tanto, a través de un gel de isoelectroenfoque se puede deducir cual es el punto isoeléctrico de una proteína, valor característico de cada molécula (Robertson *et al.*, 1987; Lipskaya, 2001).

Con las proteínas recombinantes se realizó un isoelectroenfoque para determinar su punto isoeléctrico de acuerdo al método seguido en el trabajo de Robertson *et al.* (1987), mientras que el punto isoeléctrico teórico obtenido para His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rvan</sub>, incluyendo la etiqueta de polihistidinas es de 6.86 (sin etiqueta de polihistidinas es de 5.08). En el zimograma correspondiente al gel de isoelectroenfoque en condiciones nativas con límites de pH de 3.0 a 9.0 se observaron 3 bandas con actividad hidrolítica (**Figura 30**). Los valores de punto isoeléctrico (pI) determinados para cada una de las bandas fueron de 5.69, 5.36 y 4.74. Esto sugiere la presencia de tres poblaciones de la enzima con diferentes propiedades electroforéticas, datos que apoyan los resultados obtenidos en el cromatograma de la columna de exclusión molecular. La conformación oligomérica permite que se expongan o que se oculten algunas cargas de los grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos (Asp, Glu, Lys, Arg,

His, Tyr y Cys) así como los grupos COOH y NH<sub>2</sub> terminales. Entonces la presencia de 3 grupos de oligómeros en la muestra de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rvan</sub> se ve reflejada en el gel de isoelectroenfoque en tres bandas diferentes con distinto punto isoeléctrico debido a la diferente exposición de los aminoácidos cargados. No fue posible determinar a qué conformación oligomérica pertenece cada banda, por lo que es recomendable explorar con más detalle la presencia de estas tres poblaciones funcionales en la muestra de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rvan</sub>.

Con respecto al punto isoeléctrico de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rcap</sub> en el gel de isoelectroenfoque se obtuvo un valor de 4.56. El valor obtenido de pI, tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos reportada en GenBank más la etiqueta de polihistidinas de la proteína recombinante, fue de 5.58 y de 4.61 sin la etiqueta de histidinas.



**Figura 30.** Isoelectroenfoque de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rvan</sub> y de His<sub>6</sub>PPiase<sub>Rcap</sub>. En **A.** la curva estándar de anfolitos y en **B.** el zimograma que muestra la migración de las proteínas con el respectivo punto isoeléctrico calculado con la ecuación de la recta obtenida con los estándares.

## Conclusiones

- El alineamiento realizado con la secuencia de la pirofosfatasa de *R. vannielii* reportada en el GenBank mostró que esta enzima pertenece al grupo de pirofosfatasas de familia I, mientras que el alineamiento de la secuencia de la pirofosfatasa de *R. capsulatus* reportada en el GenBank indica que esta enzima está dentro del grupo de las PPiasas citoplásmicas de familia II.
- Se obtuvieron las proteínas recombinantes  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$  y de  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  funcionales y con un comportamiento hidrolítico similar al de las PPiasas citoplásmicas de *R. vannielii* y de *R. capsulatus*, respectivamente, purificadas parcialmente.
- El perfil de pH de  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$  y de  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  muestra que la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  presenta actividad hidrolítica máxima en el intervalo de pH 8.0-10.0, mientras que la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$  alcanza su máxima actividad a pH 8.6.
- A diferencia de la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$ , la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  presenta actividad hidrolítica aún cuando ningún catión es adicionado al medio de reacción.
- El principal cofactor para  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$  y de  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  es el magnesio.
- El magnesio, zinc y cadmio actúan como inhibidores de la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rvan}$  cuando el sustrato es  $Mg-PPi^{2-}$ .
- A diferencia de los reportes sobre el uso indistinto del magnesio y del manganeso como cofactor en las PPiasas de familia II, la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  utiliza menos eficientemente al manganeso como cofactor.
- El manganeso, el zinc, el cadmio y el cobre actúan como inhibidores de la  $_{Hisx6}PPiasa_{Rcap}$  cuando el sustrato es  $Mg-PPi^{2-}$ .

- Cuando el sustrato es  $\text{Mg-PPi}^{2-}$ , la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  presenta una máxima actividad y termoestabilidad hasta los 60 °C. Cuando además del magnesio se adiciona zinc o cobalto, aunque la actividad hidrolítica es ligeramente menor, la enzima incrementa entre 10 y 15 °C su estabilidad.
- La  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  es menos estable al incremento en la temperatura, mantiene su actividad máxima cuando es preincubada hasta los 50 °C y disminuye drásticamente la actividad a temperaturas mayores aún en presencia de zinc y cobalto.
- El NaF inhibe hasta en un 97% la actividad de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y solo un 13% la actividad de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$ , ésto es una característica de las PPiases de familia I y de familia II, respectivamente.
- En cuanto a los parámetros cinéticos se encontró al comparar el número de recambio de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  y de  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$ , que la catálisis llevada a cabo por la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  ocurre con mayor eficiencia que la realizada por  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$ . Pero al comparar la eficiencia catalítica observamos que la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  es más eficiente para unirse al sustrato que la  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$ .
- La  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rvan}$  se encontró en tres estados oligoméricos funcionales (10, 6 y 4 subunidades, respectivamente), que presentan 3 puntos isoeléctricos diferentes (5.69, 5.36 y 4.74, respectivamente).
- La  $\text{His}_6\text{PPiase}_{Rcap}$  es un homodímero formado por subunidades de 37 kDa aproximadamente (incluyendo la cola de polihistidinas) y presenta un pI de 4.56.

## Referencias bibliográficas

- **Ahn S, Milner AJ, Fütterer K, Konopka M, Ilias M, Young TW and White SA.** (2011). The "open" and "closed" structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J Mol Biol.*;313 (4):797-811.
- **Ainon, H., C. J. Tan, and S. Vikineswary.** (2006). Biological characterization of *Rhodospirillum vannielii* isolated from a hot spring at Gadek, Malacca, Malaysia." *Malaysian Journal of Microbiology* 2.(1): pp. 15-21.
- **Allison, R.** (2001). Kinetic Assay Methods. *Current Protocols in Protein Science*. 5: 3.5.1-3.5.11. University of Florida, Gainesville Florida.
- **Amano T, Wakagi T, Oshima T.** (1993). An ecto-enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* strain 7 which catalyzes hydrolysis of inorganic pyrophosphate, ATP, and ADP: purification and characterization. *J Biochem.*; 114(3):329-33.
- **Avaeva S, Kurilova S, Nazarova T, Rodina E, Vorobyeva N, Sklyankina V, Grigorjeva O, Harutyunyan E, Oganessyan V, Wilson K, Dauter Z, Huber R, Mather T.** (1997). Crystal structure of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with  $\text{SO}_4^{2-}$ : Ligand-induced molecular asymmetry." *FEBS letters* 410.2 502-508.
- **Avaeva, S. M.** (2000). Active Site Interactions in Oligomeric Structures of Inorganic Pyrophosphatases. *Biochemistry*. 65: 361-372.
- **Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.-V., Heidt, H. W. and Klingenberg, M.** (1966). Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153:1120-1122.
- **Baltscheffsky, M.** (1967). Inorganic pyrophosphatase as energy donor in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature*. 216: 241-243.
- **Baltscheffsky, M., Schultz, A. y Baltscheffsky, H.** (1999).  $\text{H}^+$ -PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett.* 457: 527-533.
- **Bao K, Cohen SN.** (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.*; 15(12):1518-27.
- **Barltrop, J. A., Grubb, P. W. and Hesp. B.** (1963). Mechanisms for oxidative phosphorylation at the pyridine nucleotide/flavoprotein level. *Nature* 199 (1963): 759.
- **Baykov, A., Artjukov, A. and Avaeva.** (1977). Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. III. Dependence on the nature of substrate and metal ion cofactor. *Biochim Biophys Acta*. 481:195-201.
- **Baykov, A., Cooperman, B., Goldman, A. and Lahti, R.** (1999). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23: 127-150.
- **Belogurov, Georgiy A., and Reijo Lahti.** (2002). A lysine substitute for K+ A460K mutation eliminates K+ dependence in  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Journal of Biological Chemistry* 277.51: 49651-49654.
- **Benkovic SJ, Hammes-Schiffer S.** (2003). A perspective on enzyme catalysis. *Science*; 301(5637):1196-202.
- **Bergwitz C. and Jüppner, H.** (2011). Phosphate sensing. *Adv Chronic Kidney Dis.* 18 (2): 132-14.
- **BLAST**, Basic Local Alignment Search Tool [en línea] 1997 [8 febrero 2008] URL disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- **Brown, M.RW, and Kornberg, A.** (2008): The long and short of it–polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends in biochemical sciences.* 33.6. 284-290.
- **Busman, L., J. Lamb, G. Randall, G. Rehm and M.Schimtt.** (2002). The nature of phosphorus in soils. In Phosphorus in agriculture environment. Online available at [http://www.extension.umn.edu/distribution/crops\\_systems/DC\\_6795.html](http://www.extension.umn.edu/distribution/crops_systems/DC_6795.html).
- **Celis, H., Franco, B., Escobedo, S. and Romero, I.** (2003). *Rhodobacter sphaeroides* has a family II pyrophosphatase: comparison with other species of photosynthetic bacteria. *Arch Microbiol.* 179: 368-376.
- **Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmitter JM, Blanquet S and Plateau P.** (1990) Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 5686-9.
- **Chen, D. and Texada, D.** (2006). Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. Mini Review. *Gene Therapy and Molecular Biology.* Vol. 10, 1-12.
- **Cohen, S., Chang, A. and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69.8: 2110-2114.
- **Cooperman BS.** (1982). The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods Enzymol.* ;87: 526-48.
- **Dassa, E.** (2000) ABC transport. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 1. Leddenberg J. ed. San Diego, CA: Elsevier, pp. 1–12.
- **DSMZ, *Rhodobacter capsulatus*** (Molisch 1907) Imhoff *et al.* 1984 [en línea] 2005 [22 febrero 2011] URL disponible en: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-157.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-157.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- **DSMZ, *Rhodomicrobium vannielii*** Duchow and Douglas 1949 [en línea] 2005 [22 febrero 2011] URL disponible en: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-725.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-725.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- **Duchow, Esther, and Douglas, H. C.** (1949) *Rhodomicrobium vannielii*, a new photoheterotrophic bacterium. *Journal of bacteriology* 58.4. 409.
- **Fabrichniy, I., Lehtio, L., Tammenkoski, M., Zyryanov, A., Oksanen, E., Baykov, A., Lahti, R. and Goldman, A.** (2007). A Trimetal Site and Substrate Distortion in a Family II Inorganic Pyrophosphatase. *The Journal of Biological Chemistry.* 282: 1422–1431.
- **Felix, R. and Fleisch, H.** (1975). Properties of inorganic pyrophosphatase of pig scapula cartilage. *Biochem J.*; 147(1): 111–118.
- **García-Contreras, R., Celis, H. and Romero, I.** (2004). Importance of *Rhodospirillum rubrum*  $H^+$ -Pyrophosphatase under Low-Energy Conditions. *Journal of Bacteriology.* 186: 6651-6655.
- **Gómez-García, M., Losada, M. and Serrano, A** (2006). A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *Biochem. J* 395: 211-221.
- **Gómez-García, M., Losada, M. and Serrano, A.** (2002). Expression studies of two paralogous ppa genes encoding distinct Family I pyrophosphatases in marine unicellular cyanobacteria reveal inactivation of the typical cyanobacteria gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 302: 284-292.

- **Gómez-García, M., Losada, M. and Serrano, A.** (2007). Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *FEBS Journal*. 274: 3948-3959.
- **Gross P, Ap Rees T.** (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta*. 167(1):140-5.
- **Hachimori A, Takeda A, Kaibuchi M, Ohkawara N, Samejima T.** (1975). Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem*; 77(6):1177-83.
- **Halonen P, Tammenkoski M, Niiranen L, Huopalahti S, Parfenyev AN, Goldman A, Baykov A, Lahti R.** (2005). Effects of active site mutations on the metal binding affinity, catalytic competence, and stability of the family II pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. 2005 Mar 15; 44(10):4004-10.
- **Hamm, D and Cooperman, B.** (1978). Nuclear magnetic resonance studies of inorganic phosphate binding to yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*. 17: 4033- 4040.
- **Harris, E. L. V.** (1989). Chapter 3 "Concentration of the extract" in *Protein Purification methods*. Edit. Harris E. L. V. and Angal S. Ed. IRL PRESS. Oxford. pp. 155.
- **Harutyunyan EH, Kuranova IP, Vainshtein BK, Höhne WE, Lamzin VS, Dauter Z, Teplyakov AV, Wilson KS.** (1996). X-ray structure of yeast inorganic pyrophosphatase complexed with manganese and phosphate. *Eur J Biochem*. 239(1):220-8.
- **Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B. and Goldman, A.** (1996). The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure* 1996, Vol 4 No. 12. 1491-1508.
- **Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A. K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A.** (2001). Towards a Quantum-mechanical description of Metal Assisted Phosphoryl Transfer in Pyrophosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3121–3126.
- **Howard, A. and Lungren D. J.** (1970). Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem*. 48: 1302-1307.
- [http://ecoserver.imbb.forth.gr/microbiology/IMAGES/Rhodobacter\\_capsulatus.jpg](http://ecoserver.imbb.forth.gr/microbiology/IMAGES/Rhodobacter_capsulatus.jpg)
- **Hurwitz C, Rosano CL.** (1967). The intracellular concentration of bound and unbound magnesium ions in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. ; 242 (16):3719-22.
- **Ilias M, White SA, Young TW.** (2011). Isoleucine 259 and isoleucine 260 residues in *Streptococcus gordonii* soluble inorganic pyrophosphatase play an important role in enzyme activity. *J Biosci Bioeng*.; 112(1):8-13. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.02.011. Epub 2011 Mar 29.
- **Imhoff, J.** (2005). **Rhodobacter** Imhoff, Trüper and Pfennig, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp 161-167 342
- **Imhoff, JF.** (2004). Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria." *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Springer Netherlands. 1-15.
- **Invitrogen**, pBAD/His A, B, C and pBAD/Myc-his A, B, C [en línea] 2008 [08 febrero 2011] URL disponible en: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pbad\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pbad_man.pdf)
- **Invitrogen**, TOPO® TA Cloning® kit [en línea] 2011 [08 febrero 2011] URL disponible en: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)
- **Islam MK, Miyoshi T, Yamada M, Tsuji N.** (2005). Pyrophosphatase of the roundworm *Ascaris suum* plays an essential role in the worm's molting and development. *Infect Immun*.; 73(4):1995-2004.



- **Josse, J.** (1966). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 241: 1938-1947.
- **Kajander T, Kellosalo J, Goldman A.** (2013). Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *BS Lett.* 27;587(13):1863-9.
- **Kamat, Siddhesh S., Howard J. Williams, and Frank M. Raushel.** (2011). Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria. *Nature.* 480.7378: 570-573.
- **Käpylä J, Hyytiä T, Lahti R, Goldman A, Baykov AA, Cooperman BS.** (1995). Effect of D97E substitution on the kinetic and thermodynamic properties of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry.*;24;34(3):792-800.
- **Khandelwal RL, Hamilton IR.** (1982). Inorganic pyrophosphatase activity in oral *streptococci*: purification and properties of the enzyme from *Streptococcus salivarius*. *Can J Biochem.*; 60(4):452-62.
- **Klemme, J. and Gest, H.** (1971). Regulatory Properties of inorganic pyrophosphatase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad.* 68: 721-725.
- **Klemme, J. H.** (1976). Regulation of intracellular pyrophosphatase-activity and conservation of the phosphoanhydride-energy of inorganic pyrophosphate in microbial metabolism. *Z. Naturforsch. Teil C* 31:544-550.
- **Konopka MA, White SA, Young TW.** (2002). *Bacillus subtilis* inorganic pyrophosphatase: the C-terminal signature sequence is essential for enzyme activity and conformational integrity. *Biochem Biophys Res Commun.*;290 (2):806-12.
- **Korbie DJ, Mattick JS.** (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc.*;3 (9):1452-6.
- **Kornberg, A.** (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions, en *Avances in Enzimology.* Interscience 18: 191-240.
- **Kuhn, N. J. and Ward, S.** (1998). Purification, properties, and multiple forms of a manganese-activated inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 354: 47-56.
- **Kuhn, N. J., Wadson, A., Ward, S. and Young, T. W.** (2000). *Methanococcus jannaschii* OR Fmj0608 codes for a class C inorganic pyrophosphatase protected by  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  ions against fluoride inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 292-298.
- **Kulaev, IGOR S., and Vladimir M. Vagabov.** (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 24: 83-171.
- **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):338-45.
- **Lahti R, Perälä M, Heikinheimo P, Pitkäranta T, Kukko-Kalske E and Heinonen J.** (1991). Characterization of the 5' flanking region of the *Escherichia coli* ppa gene encoding inorganic pyrophosphatase: mutations in the ribosome- binding site decrease the level of ppa mRNA. *J Gen Microbiol.* 137:2517-23.
- **Lahti, R.** (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 47: 169-179.
- **Lahti, R., Pitkäranta, 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.
- **Lin, S. Tsai, J., Hsiao, C., Huang, Y., Chiu, C., Liu, M., Tung, J., Liu, T., Pan, R. and Sun, Y.** (2012). Crystal structure of membrane-embedded H<sup>+</sup>- translocating pyrophosphatase. *Nature* 484, 399 403.

- **Lipskaya, T.** (2001). Mitochondrial creatine kinase: properties and function. *Biochemistry (Mosc.)*; 66(10):1098-111.
- **López-Marqués, R., Pérez-Castiñeira, J., Losada, M. and Serrano, A.** (2004). Differential Regulation of Soluble and Membrane-Bound Inorganic Pyrophosphatases in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* Provides Insights into Pyrophosphate-Based Stress Bioenergetics. *Journal of Bacteriology*. 186: 5418-5426.
- **Losada M, Vargas MA, de la Rosa MA y Florencio FJ.** (1999). Los elementos y moléculas de la vida. Vols I y II, Editorial rueda, Madrid.
- **Luoto HH, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM.** (2011). Na<sup>+</sup>-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 286.24: 21633-21642.
- **Maeschima, M.** (2000). Vacuolar H<sup>+</sup>- Pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*. 1465: 37-51.
- **Mansurova, S. E., Y. A. Ermakova, and I. S. Kulaev.** (1976). Extramitochondrial energy-dependent synthesis of inorganic pyrophosphate in yeast. (In Russian) *Biokhimiya* 41:1716-1719.
- **Merckel, M. C., Fabrichniy, I. P., Salminen, A., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A.** (2001) *Structure (Camb.)*, 9: 289-297.
- **Mertens, E.** (1993). ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitology Today* 9.4: 122-126.
- **Mimura H, Nakanishi Y, Hirono M, Maeshima M.** (2004). Membrane topology of the H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* determined by cysteine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem*. 13; 279(33):35106-12.
- **Molisch, H.** (1907). Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen, Fischer Verlag. Jena, 95 Pgs.
- **MUSCLE**, multiple Sequence Comparison by Log Expectation, Cambriggeshir [en línea] 2008 [16 agosto 2011]. URL disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
- **Nyrén, P and Strid, A.** (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototropic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77:265-270.
- **Oksanen E, Ahonen AK, Tuominen H, Tuominen V, Lahti R, Goldman A, Heikinheimo P.** (2007). A complete structural description of the catalytic cycle of yeast pyrophosphatase. *Biochemistry* 46.5: 1228-1239.
- **Parfenyev, A. N., Salminen, A., Halonen, P., Hachimori, A., Baykov, A. A., and Lahti, R.** (2001). Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* 276: 24511-24518.
- **Park, K., Lee, H., Kim, T., Cheong, K., Nguyen, V., Min, M., Cho, H., Kim, Y., Park, C., Oh, B. and Kim, J.** (2002). N- and C-terminal region mediated oligomerization of the cyclodextrin-/ pullulan degrading enzymes. *Biologia, Bratislava*, 57/ Suppl. 11: 87- 92, 2002.
- **Pérez-Castiñeira JR, Gómez-García R, López-Marqués RL, Losada M, Serrano A.** (2001). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? *Int Microbiol.* 4(3):135-42.
- **Pfennig, N.** (1978). Chapter 1: General Physiology and Ecology of Photosynthetic Bacteria. *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. Plenum Press. New York and London, pp. 3-18.

- **Rao, N. N., and A. Torriani.** (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 4.7: 1083-1090.
- **Rapoport, T., Hohne, E., Heitmann, P. and Rapoport, S.** (1973). Binding of ligands to the inorganic pyrophosphatase of bakers' yeast. *Eur. J. Biochem.* 33, 341-347.
- **Rea, P. y Poole, R.** (1993). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44: 157-180.
- **Reeves RE, South DJ, Blitt HJ & Warren LG.** (1974) Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. *J Biol. Chem* 249:7737-7741.
- **Reeves, R. E.** (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphate." *Trends Biochem. Sci* 1: 53-55.
- **Remsen, C.** (1978). "Chapter 3 Comparative Subcellular Architecture of Photosynthetic Bacteria". *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. New York and London. Plenum Press, pp 31-40.
- **Ridlington, J. and Butler, L.** (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. I. Binding of pyrophosphate, metal ion, and metal ion-pyrophosphate complexes. *J. Biol. Chem.* 247, 7303- 7307.
- **Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC.** (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical biochemistry* 167.2: 290-294.
- **Rogers A, Gibon Y** (2009) Enzyme kinetics: theory & practice. In: *Plant Metabolic Networks* (J Schwender Ed.) pp 71-103. ISBN 978-0-38-778744-2. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- **Romero, I. and Celis H.** (1990). El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bioenergética. *Ciencia.* 41: 297-305.
- **Romero, I., García-Contreras, R. and Celis, H.,** (2003). *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and secuencing. *Arch. Microbiol.* 173: 377-380.
- **Romero, P. J., and L. De Meis.** (1989). "Role of water in the energy of hydrolysis of phosphoanhydride and phosphoester bonds." *Journal of Biological Chemistry* 264.14: 7869-7873.
- **Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B.** (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* (10):944-5.
- **Salminen A, Ilias M, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R, Young T.** (2006). Two soluble pyrophosphatases in *Vibrio cholerae*: Transient redundancy or enduring cooperation?. *Biochemistry (Moscow)* 71.9: 978-982.
- **Salminen T, Käpylä J, Heikinheimo P, Kankare J, Goldman A, Heinonen J, Baykov AA, Cooperman BS, Lahti R.** (1995). Structure and function analysis of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: is a hydroxide ion the key to catalysis? *Biochemistry.* 24; 34(3):782-91.
- **Sambrook, J. and Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ra ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York. USA. 2344 págs.
- **Schwarm HM, Vigneschow H, Knobloch K.** (1986). Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Biol Chem Hoppe Seyler.* ;367(2):119-26.
- **Segel, IH.** (1975) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.* Wiley-Interscience, New York, 957 pp.
- **Shintani, T., Uchiumi, T., Yonezawa, T., Salminen, A., Baykov, A., Lahti, R. and Hachimori, A.** (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Lett.* 439: 263-266.

- **Sitnik TS, Avaeva SM.** (2007). Binding of substrate at the effector site of pyrophosphatase increases the rate of its hydrolysis at the active site. *Biochemistry (Mosc)*;72(1):68-76.
- **Sivula, T., Salminen, A., Parfenyev, A., Pohjanjoki, P., Goldman, A., Cooperman, B., Baykov, A. and Lahti, R.** (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters*. 454: 75-80.
- **Stadtman, E. R.** (1970). Mechanism of enzyme regulation in metabolism, in P. D. Boyer (ed.). *The enzymes*, 3rd ed., vol. 1. Academic Press, Inc., New York. pp. 397-459
- **Stockbridge RB, Wolfenden R.** (2011). Enhancement of the rate of pyrophosphate hydrolysis by nonenzymatic catalysts and by inorganic pyrophosphatase. *J Biol Chem*. 27; 286:18538-46.
- **Suaste-Olmos F, Domenzain C, Mireles-Rodríguez JC, Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L.** (2010). The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*. 192 (23):6230-9.
- **Sumner, James B.** (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science (New York, NY)* 100.2601: 413.
- **Tammenkoski M, Benini S, Magretova NN, Baykov AA, Lahti R.** (2005). An unusual, His-dependent family I pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 280(51):41819-26.
- **Trüper, H. and Pfenning, N.** (1978). Chapter 2: Taxonomy of the Rhodospirillales. *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. New York and London. Plenum Press, pp. 19-26.
- **Vainonen JP, Vorobyeva NN, Rodina EV, Nazarova TI, Kurilova SA, Skoblov JS, Avaeva SM. Source.** (2005). Metal-free PPI activates hydrolysis of MgPPI by an *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*;70(1):69-78.
- **Vainonen YP, Vorobyeva NN, Kurilova SA, Nazarova TI, Rodina EV, Avaeva SM. Source.** (2003). Active dimeric form of inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)*; 68(11):1195-9.
- **van Veen, Hendrik W.** (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72.4: 299-315.
- **Weil-Malherbe, H. and Green, H.** (1951). The Catalytic Effect of Molybdate on the Hydrolysis of Organic Phosphate Bonds. *Biochem*. 49: 286-292.
- **Wood, H. G.** (1977). Some reactions in which inorganic pyrophosphatase replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proc*. 36: 2197-2205.
- **Young, T.W., Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S. Burges. D. and Cooke, G.D.** (1998). *Bacillus subtilis* ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?. *Microbiology*. 144: 2563- 2571.
- **Zyryanov AB, Pohjanjoki P, Kasho VN, Shestakov AS, Goldman A, Lahti R, Baykov AA.** (2001). The electrophilic and leaving group phosphates in the catalytic mechanism of yeast pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 276.21: 17629-17634.
- **Zyryanov AB, Tammenkoski M, Salminen A, Kolomyitseva GY, Fabrichniy IP, Goldman A, Lahti R, Baykov AA.**(2004). Site-specific effects of zinc on the activity of family II pyrophosphatase. *Biochemistry*;43 (45):14395-402.
- **Zyryanov, A., Shestakov, A., Lahti, R. and Baykov, A.** (2002). Mechanism by which metal cofactors control substrate specificity in pyrophosphatase. *J. Biochem*. 367: 901-906.