



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

## CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS PIROFOSFATASAS CITOPLASMÁTICAS DE *Rhodospirillum rubrum* Y *Rhodobacter sphaeroides* Caracterización Cinética.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A**

P R E S E N T A:

**MARLENE REZA NOYOLA**



DIRECTOR DE TESIS:  
**Dr. HELIODORO CELIS SANDOVAL**

Ciudad Universitaria, C.D.M.X, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de México por abrirme las puertas al mundo y darme todas las herramientas para cumplir mis metas.

Al Dr. Helidoro Celis Sandoval por darme la oportunidad de iniciar en la ciencia. Por mostrarme que el amor por la ciencia es el motor que debe impulsar a los científicos. Por dirigir mi tesis con paciencia y buen humor.

A mis sinodales el Dr Horacio Reyes Vivas, la Maestra Laura Silvia Salinas Velazquez y el Dr. Emilio Ezpinosa Simón por su tiempo y aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Bióloga Claudia Peña Segura por su apoyo técnico a la elaboración de esta tesis, así como sus aportaciones como sinodal de la misma. Pero sobre todo por siempre apoyarme y consolarme en los malos tiempos, gracias por ser familia, las pláticas de pasillo y tantas risas que compartimos.

A mi familia por siempre creer que podía lograrlo. A mis padres, porque sin ustedes yo no sería nada. Gracias por todos los sacrificios que han hecho por mi.

A Carolina Ricárdez, Violeta Andrade, Martin Sobampo y Julio Moreno, gracias por hacer de la universidad la mejor época. Por motivarme y apoyarme cuando más lo necesitaba, por las mil y un historias que grabaron en mi corazón.

Y a Yair Rodriguez, gracias por ser un colega, un maestro, un amigo y mi más fuerte jurado cuando más lo necesite. Gracias por nunca dejar que me rindiera en mi camino ninja.

## DEDICATORIA

A mi madre.

Porque es un ejemplo de valentía, amor desinteresado y resiliencia. Recuerdo cuando de niña le preguntaba, ¿Qué quiere de regalo de cumpleaños? y solo respondía “que termines una carrera”...Al fin lo logré.  
Feliz cumpleaños mamá.

Al Dr. Celis.

Por ser mi tutor y sobre todo mi amigo. Porque sin usted mi visión de la ciencia no sería la misma. Gracias por todo. QDEP.

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Bacterias Fotosinteticas	7
2. Bacterias púrpura no sulfurosas	7
b. Taxonomía.	8
c. Género Rhodobacter sp.	10
i. Características generales de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	10
d. Género Rhodospirillum	11
i. Características generales de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	11
3. El pirofosfato	11
a. El papel del PPi en el metabolismo celular	12
4. La pirofosfatasa	13
a. Pirofosfatasas membranales.	13
b. Pirofosfatasas citoplasmáticas.	14
i. Pirofosfatasas de la Familia I.	15
ii. Pirofosfatasas de la Familia II,	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
OBJETIVO GENERAL.	18
Objetivos Particulares	18
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS.	19
1. Cultivos de las Bacterias	19
Bacterias utilizadas.	19
Medio de cultivo para <i>R. rubrum</i> y <i>Rba. sphaeroides</i>	20
Medio de cultivo para cepas de <i>E. coli</i>	21
Condiciones de crecimiento	21
2. Obtención del DNA bacteriano.	22
3. Diseño de Oligonucleótidos o primers	23
4. Amplificación de los genes de las sPPiasas	24
5. Digestión de los productos de PCR	26
6. Ligación de los genes de las sPPiasas en el plásmido pJET	26
7. Activación de cepas de <i>E.coli</i> (DH5a y B121)	27

8.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con pJET+Inserto	28
9.	Extracción de plásmido pJET+ Incerto	29
10.	Digestión de pJET+ Incerto.	29
11.	Purificación de los Genes de sPPiasas.	31
12.	Digestión del plásmido de expresión.	31
13.	Ligación de los genes de las sPPiasas en pBAD HisB.	32
14.	Transformación de BL21 con pBAD HisB+Incerto.	33
15.	Extracción de pBAD His B+Inserto	33
16.	Digestión de pBAD His B+Inserto.	34
17.	Secuenciación de plásmidos pBAD His B + Inserto.	36
18.	Almacenamiento de cepas transformantes.	39
19.	Ensayo de inducción.	39
20.	Purificación de las sPPiasas.	40
21.	Cuantificación proteica de las sPPiasas	41
22.	Estimación de la masa molecular de las sPPiasas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	41
23.	Determinación de la Actividad Hidrolítica de las sPPiasas.	42
24.	Caracterización Cinética de las sPPiasas.	43
	RESULTADOS	43
1.	Optimización de la concentración de Inductor en la expresión de las sPPiasas.	43
2.	Sobre expresión de las sPPiasas.	45
3.	Caracterización cinética de las sPPiasas.	46
a.	Determinación de la concentración de sPPiasa a usar.	46
b.	Actividad Hidrolítica a diferentes tiempos.	48
c.	Actividad Hidrolítica con diferente pH.	48
d.	Actividad Hidrolítica en ausencia de cationes divalentes.	49
e.	Requerimiento de cationes divalentes como co-sustrato.	50
	DISCUSIÓN.	53
	CONCLUSIONES	59
	ANEXOS	60
	REFERENCIAS	61

# ABREVIATURAS

- ATP- adenosín trifosfato
- $\text{Co}^{2+}$ - Cobalto divalente
- $\text{Fe}^{2+}$ - Óxido de Hierro divalente
- $\text{MoO}_4^{2+}$ - Molibdato divalente
- Fig-Figura
- *Rba. sphaeroides* - *Rhodobacter sphaeroides*
- ARN o RNA- ácido ribonucleico
- rRNA- ácido ribonucleico ribosomal
- *R. rubrum*- *Rodospirillum rubrum*
- °C- grados centigrados
- CI- Cromosoma 1
- CII- Cromosoma 2
- $\text{O}_2$ - Oxígeno divalente
- pb- pares de bases
- $\text{PPi}$ - Pirofosfato
- $\text{H}^+$  -Proton
- $\text{Mg}_2\text{PPi}$ - Pirofosfato de Magnesio
- $\text{Na}^+$  -Sodio monovalente
- $\text{Pi}$ - Fosfato
- kDa- Kilodaltons
- $\text{PPiase}$ -Pirofosfatasa
- PIXE – Particle-induced X-ray emission
- $\text{Mn}^{2+}$  -Manganeso divalente
- EDTA- Ácido etilendiaminotetraacético
- EGTA- Ácido egtazico,
- $\text{H}^+$ - $\text{PPiase}$ - Pirofosfatasa membranal
- $\text{Zn}^{2+}$  -Zinc divalente
- IDP- Imidodifosfato
- DNA- Acido desoxirribonucleico

# RESUMEN

Las pirofosfatasas son las enzimas encargadas de realizar la hidrólisis de pirofosfato, generando fosfato libre, permitiendo el libre flujo del *pull* termodinámico de la célula. En este trabajo se realizó la producción y caracterización cinética de dos pirofosfatasas recombinantes solubles pertenecientes a dos géneros de alfa proteobacterias (*Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum*). Así como la comparación de parámetros cinéticos entre las pirofosfatasas recombinantes y pirofosfatasas purificadas por métodos tradicionales, encontrando diferencias significativas.



# INTRODUCCIÓN

## 1. Bacterias Fotosintéticas

En la actualidad se sabe que la fotosíntesis puede llevarse a cabo por organismos ajenos a las plantas, por ejemplo, las bacterias. Las bacterias fotosintéticas (verdes y purpuras) pueden realizar fotosíntesis anoxigénica con la ayuda de un único fotosistema (ubicado en los cromatóforos). Para realizar este proceso es necesaria la presencia de un donador de electrones con un potencial redox más bajo que el agua como compuestos de sulfuro, hidrogeno molecular o compuestos orgánicos simples (Pfenning, 1978).

El fotosistema se divide experimentalmente en tres: pigmentos receptores de luz (Pigmentos antena), centros de reacción fotoquímicos y una cadena de transferencia de electrones, donde la energía luminosa se absorbe por los pigmentos antena, esta a su vez es transferida a los centros de reacción que producen una separación de carga al liberar la bacterio-clorofila del centro de reacción un electrón. Al salir los electrones de todos los centros de reacción se crea un flujo de electrones que corre a través de la cadena de electrones acoplada a la síntesis de ATP.

En el presente trabajo se usaron dos ejemplares de Bacterias Purpura no sulfurosas debido a la facilidad que presenta cultivarlas, y la amplia gama de información que existe acerca de sus respectivas pirofosfatasas.

## 2. Bacterias púrpura no sulfurosas

Las bacterias fotosintéticas se dividen en tres grandes grupos: cianobacterias, bacterias sulfurosas y bacterias no sulfurosas. Dejando de lado las cianobacterias, las bacterias fotosintéticas se suelen subdividir dependiendo del donador de electrones que poseen: sulfurosas y no sulfurosas (Gerard. et al., 2007).

Las bacterias púrpura no sulfurosas poseen diferencias morfológicas y fisiológicas que permiten su identificación, caracterización y clasificación en subgrupos (Oda et. al., 2002). Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son más fáciles de estudiar en un laboratorio que las bacterias sulfurosas. Poseen un

metabolismo único, haciendo posible que crezcan en condiciones anaeróbicas, foto-autotróficamente, así como en condiciones aeróbicas por oxidación de sustratos (respiración) y por fermentación. Se ha observado que cuando se crecen de forma respiratoria las membranas son planas, pero cuando se induce el crecimiento fotosintético anaeróbico se desarrollan invaginaciones e la membrana llamadas cromatóforos, donde se localiza el fotosistema (Vega-Villasante et. al. 2015)

### a. Importancia Biológica

Las bacterias purpuras no sulfurosas son capaces de crecer en diversos ambientes, no solamente en cuerpos de agua, también se han encontrado en sedimentos y humedales donde participan en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre (Imhoff y Truper, 1989; Madigan et. al., 2002; Wang et. al., 1993).

Estos organismos son excelentes fijadores de nitrógeno (Madigan, 1998; Pfening, 1989). Además, han exhibido resistencia a metales pesados como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{MoO}_4^{2+}$ , etc, que metabolizan y convierten en formas no tóxicas (Mehrabi et. al., 2001; Giotta et. al., 2006) . Ampliando un poco este tema, en biotecnología ambiental, se ha encontrado que también pueden crecer en medios con compuestos halogenados, sugiriendo que pueden metabolizarlos, disminuyendo o erradicando su presencia en el medio que habitan (McGrath y Harfoot, 1997). En estudios *in vitro* se evidenció su capacidad de bioremediar degradando herbicidas (Muller et. al., 2001), hidrocarburos de aceites minerales (Popp et. al., 2006), latex (Kantachote et. al., 2005), nitro fenoles (Blasco y Castillo, 1992) y benceno (Fahy et. al., 2006) Pasando a otro tema, algunas especies de este grupo pueden producir hidrógeno gaseoso, utilizado como combustible no contaminante y de un costo menor, pues solo se necesita un medio de crecimiento y luz solar (Zurrer y Bachofen, 1979). ahondando en esto, Franchi y colaboradores en el 2004 realizaron una mutante de *Rhodobacter sphaeroides* que tuvo un aumento en la producción de bio Hidrógeno y al cual agregan en su medio de crecimiento desperdicios de comida

### b. Taxonomía.

En la actualidad se sigue respetando esta clasificación y se han dividido todas las bacterias púrpura no sulfurosas dentro 20 géneros mostrados en la Tabla 1. Se trabajo con dos especies de alfa proteobacterias, de géneros distintos (Fig. 1). Primero *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter sphaeroides*, debido a que poseen pirofosfatasa citoplasmáticas de diferente familia (Familia I y Familia II

respectivamente), y son los organismos más estudiados en el tema de las pirofosfatasa citoplasmáticas

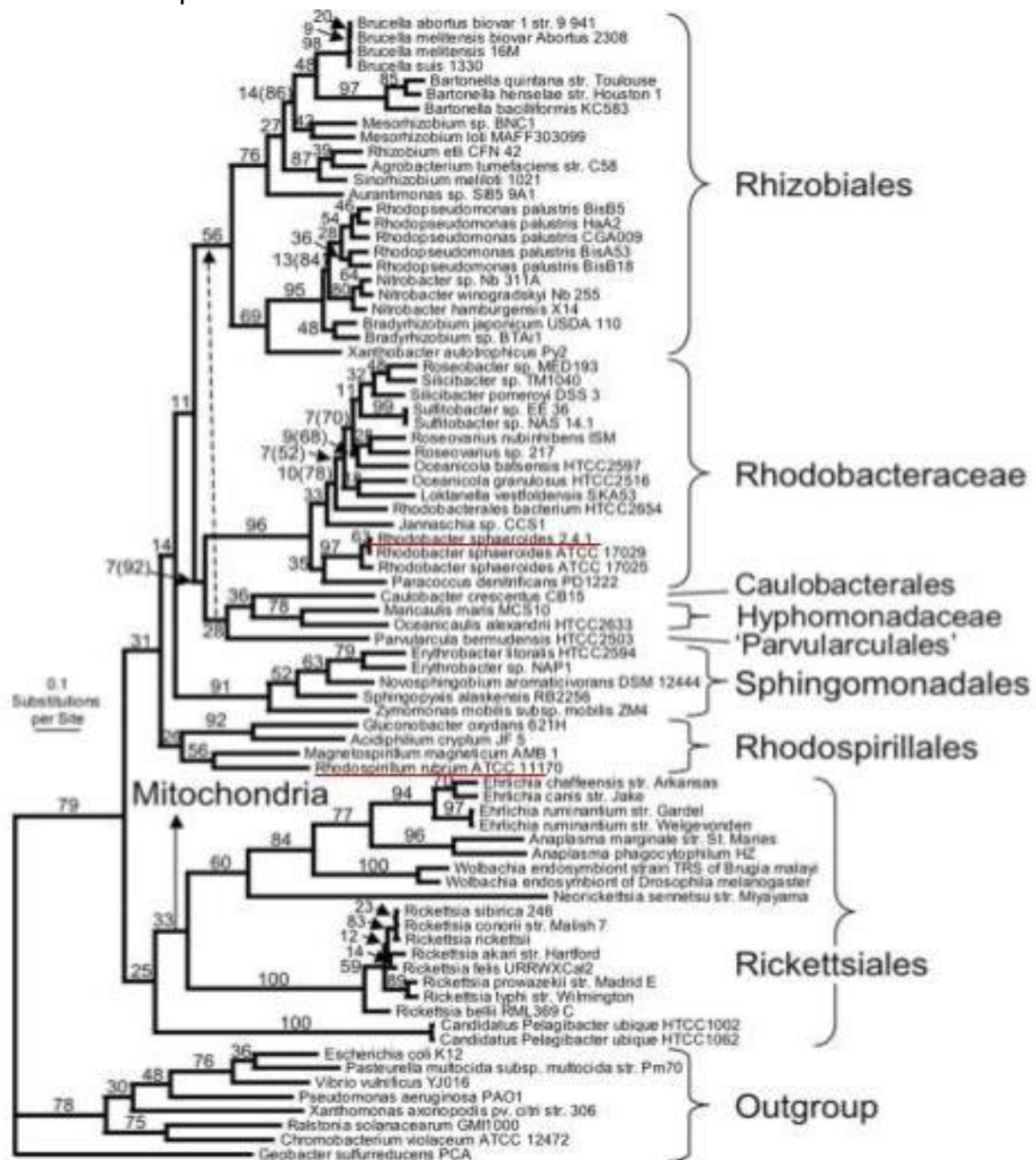


Fig. 1. Árbol filogenético de la Clase alfa proteobacteria. Subrayado con líneas rojas se puede apreciar las especies de alfas proteobacterias modelos de esta tesis. Destacando la distancia filogenética que se encuentra entre *Rba. sphaeroides* y *R. rubrum*. Tomado de Kelly et. al., 2007

### c. Género *Rhodobacter* sp.

El género *Rhodobacter* se encuentra en ambientes marinos o de agua dulce incluye especies que poseen una amplia gama de capacidades metabólicas especialmente en lo que respecta a las fuentes de energía. Alberga a las especies *Rhodobacter apigmentum*, *Rba. azotoformans*, *Rba. blasticus*, *Rba. capsulatus*, *Rba. gluconicum*, *Rba. litoralis*, *Rba. massiliensis*, *Rba. sphaeroides*, *Rba. veldkampii*. Dentro de este género destaca *Rba. sphaeroides*, es el organismo fotosintético más estudiado en términos de reacciones lumínicas estructurales y funcionales.

#### i. Características generales de *Rhodobacter sphaeroides*.

*Rba. sphaeroides* es una bacteria gram negativa de forma bacilar, al igual que otras especies de *Rhodobacter*, *Rba. sphaeroides* es un organismo metabólicamente diverso que es capaz de muchos modos de crecimiento incluyendo la respiración aeróbica, la fotosíntesis anaeróbica anoxigénica en los cromatóforos (Fig 1.) y la fermentación (Blankenship, R. E. Madigan, M. T. y Bauer 1995). En particular, *Rba. sphaeroides* se utiliza como organismo modelo para el estudio de la fotosíntesis anoxigénica y la fijación de carbono. *Rba. sphaeroides* es capaz de producir polihidroxibutirato, un polímero de 3-hidroxibutirato, además de producir hidrógeno molecular, estas características han llevado a los investigadores a evaluar su potencial para la producción de bioplásticos y biocombustibles. Algunos estudios también han discutido su capacidad de biorremediación. Por ejemplo, se ha establecido una cinética dependiente de la biomasa para la precipitación de cadmio cuando se introduce en un cultivo de *Rba. sphaeroides* (Bai, 2006).

El genoma de *Rba. sphaeroides* contiene dos cromosomas circulares, CI (3.19 Mb) y CII (0.94 Mb), y cinco plásmidos endógenos A, B, C, D, E . Dando un tamaño total del genoma de 4,6 Mb. Los genes esenciales de *Rba. sphaeroides* se distribuyen entre los dos cromosomas. Por ejemplo, un operón de ARN ribosomal (rRNA) (*rrnA*) se encuentra en CI, mientras que dos operones de rRNA (*rrnB* y *rrnC*) están en CII. Se ha observado que CI tiene más secuencias evolutivamente conservadas que CII y se cree que la rápida evolución de CII ha contribuido a la versatilidad metabólica de este organismo.

#### **d. Género Rhodospirillum**

En este género se agrupan tradicionalmente las bacterias púrpura no sulfurosas en forma de espiral. Este género comprende siete especies, siendo *Rhodospirillum rubrum*, la especie tipo, reconociendo una gran cantidad de diversidad quimiotaxonomica y filogenética dándole la característica de tener gran heterogeneidad en propiedades fenotípicas y relaciones genéticas (Boone, et. al., 2001) lo que ha llevado a múltiples propuestas de reagrupación de sus integrantes, para darle una mayor congruencia filogenética (Peschek, et. al., 1999).

##### **i. Características generales de *Rhodospirillum rubrum***

*R. rubrum* es una proteobacteria mesófila gram negativa en forma de espiral, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 25-30°C. Posee un metabolismo facultativo, es decir, en presencia de oxígeno, puede someterse a la fermentación (en ausencia de luz) o la respiración aeróbica. Además es capaz de realizar fotosíntesis en condiciones anaeróbicas, en ausencia de oxígeno y presencia de luz y se suprime en presencia de O<sub>2</sub>, gracias a sus bacterioclorofila y carotenoides ubicadas en los cromatóforos al igual que sphaeroides. Estas moléculas absorben la luz y la convierten en electrones, que eventualmente genera energía (ATP), también le dan su distintivo color rojo púrpura en condiciones anaeróbicas. *R. rubrum* es incoloro en condiciones aeróbicas.

En el campo de la biotecnología se le han encontrado varios usos a *R. rubrum*, destacando el uso como modelo en bioenergética, en el estudio de sus vías de fijación de nitrógeno, también es importante en los estudios de resistencia a la radiación (Melnicki, 2009). *R. rubrum* también puede ser útil en la producción de combustibles de hidrógeno (Melnicki, 2009).

Su genoma ha sido secuenciado en su totalidad, mostrando que consiste en un cromosoma circular con 4.352.825 pb, y un plásmido con 53.732 pb. En total posee 3 850 genes que codifican proteínas y 83 genes de ARN (Munk et al, 2011).

### **3. El pirofosfato**

El Pirofosfato (PPi) es el compuesto químico más simple que posee un enlace fosfoanhidrido, dicho enlace es la forma química básica de transmitir energía en la célula, dando como el mejor ejemplo el enlace fosfoanhidrido del ATP, la moneda

de cambio por excelencia en la célula, sin embargo el ATP en algunos casos puede ser sustituido por el PPi (Wood, 1997). Su gran importancia en la bioenergética celular es explicada en los aspectos termodinámicos de la hidrólisis del PPi y ATP. El cambio de energía libre asociado a la hidrólisis ( $\Delta G^0$ ) del PPi es cercano a la energía de la ruptura del enlace gama del ATP. Además la energía liberada de la ruptura del PPi genera un  $\Delta G^0$  muy negativa, cargando la reacción del lado de los productos (Alberty, 1969). A pH fisiológico (pH de 7.0) el PPi se encuentra cargado negativamente ( $^{-1}$  o  $^{-3}$ ) lo que provoca repulsión electrostática entre sus componentes. Al igual que el ATP el PPi requiere de metales divalentes para poder ser utilizado como sustrato, el  $Mg^{2+}$ , es uno de los más comunes, sin embargo en presencia de  $Mg^{2+}$  el  $\Delta G^0$  para el PPi se vuelve menos negativo debido a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no se acompleja fuertemente con el  $Mg^{2+}$ , a diferencia del ATP cuyo producto (ADP) si se une fuertemente al  $Mg^{2+}$  (Smith y Martell, 1981). Tomando en cuenta estas cuestiones termodinámicas, desde años atrás, se ha considerado que el PPi podría ser la molécula donadora de energía más antigua tanto para los sistemas prebióticos como para las primeras formas de vida. A favor de esta idea también se argumenta que dada su simplicidad de estructura, comparada con el ATP, así como su presencia en los minerales de la tierra primitiva, pues se ha observado que el ortofosfato cercano a la lava de los volcanes se une para formar PPi (Holm y Baltschefskey, 2011), nos lleva a pensar que el PPi fue importante en las primeras épocas de la vida (Lipmann, 1965; Miller y Parris, 1964).

### **a. El papel del PPi en el metabolismo celular**

El PPi es producido en muchas reacciones biosintéticas como la síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos, etc. Al principio se decía que el PPi era un mero producto secundario o de desecho de las reacciones celulares que debía ser hidrolizado inmediatamente por la Pirofosfatasa citoplasmática para hacer las reacciones energéticamente favorables (Kornberg, 1957). Sin embargo se ha descubierto que el PPi puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y a veces incluso puede sustituir al ATP (Lahti et. al. 1988). Un ejemplo es la glucosa-6-fosfatasa del hígado que es capaz de llevar a cabo la síntesis de glucose-6-fosfato en una reacción dependiente de PPi (Lawson y Veech, 1979). Además se ha descubierto que estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards et. al., 1985).

Por otro lado el PPi tienen una amplia variedad de rutas de utilización, por ejemplo, puede ser hidrolizado por la PPiase citoplasmática generando calor mediante la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido (Romero y Celis, 1990). Además de la PPiase citoplasmática existe la PPiase de membrana que al hidrolizar el PPi transloca

protones (H<sup>+</sup>) produciendo energía al formar un gradiente electroquímico que puede ser utilizada en la reacción reversa de transporte de electrones (Baltcheffsky, 1967), la trans hidrogenación (Keister y Yike, 1967), la reducción de NAD<sup>+</sup> (Keister y Yike, 1967), la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971). También se ha propuesto que puede ser utilizado como una reserva de energía en *R. rubrum* mediante dos vías; directamente mediante la formación de gránulos de PPI, o indirectamente como un precursor de la síntesis de polifosfatos (Nyren y Strid, 1991).

## **4. La pirofosfatasa**

La pirofosfatasa E.C.3.6.1.1 (PPiase) es la enzima responsable de la hidrólisis del pirofosfato. La reacción de hidrólisis requiere la formación de un complejo entre el PPI y 1 catión divalente (por ejemplo Mg<sub>2</sub>PPI), y la formación de un segundo complejo formado entre la enzima y un segundo dúo de cationes divalentes (por ejemplo Mg<sub>2</sub>-PPiase), una vez formados los complejos, el complejo sustrato y el complejo Mg-PPiase se unen y ocurre el ataque nucleofílico y la ruptura del enlace fosfoanhidrido por una molécula de agua, dando como producto dos moléculas de ortofosfato (Sosa, Ordaz, Romero Y Celis, 1992). Sin embargo se ha observado que alternativamente algunas bacterias púrpuras pueden tener acoplada la energía del gradiente electroquímico de protón a la síntesis de PPI a través de la pirofosfatasa de membrana (H+PPiase) (Baltcheffsky y von Stedingk, 1966)

La PPiase ha sido estudiada durante muchos años y a la fecha se reconocen dos grandes grupos de enzimas; las pirofosfatasas membranales y las pirofosfatasas soluble o citoplasmática.

### **a. Pirofosfatasas membranales.**

Las pirofosfatasas de membrana son proteínas hidrofóbicas responsables de la hidrólisis, y la síntesis de PPI. Este grupo de proteínas poseen una gran diferencia con el grupo de las pirofosfatasas citoplasmáticas, además de su localización en la célula, las pirofosfatasas de membrana pueden generar gradientes transmembranales iónicos utilizando protones (H<sup>+</sup>) o sodio (Na<sup>+</sup>). A mediados de los 60 se demostró la formación de PPI a partir de Pi en reacciones dependientes de luz en los cromatóforos de *R. rubrum*, esto permitió afianzar la relación entre la fotosíntesis y el PPI, que apoyaba la propuesta de Lipmann, donde sugería que el PPI precede al ATP como moneda de cambio en la bioenergética de los primeros sistemas vivos de la tierra (Baltcheffsky, 1996). Con el tiempo se obtuvieron

estructuras de estas enzimas y se observó que poseen de 1 a 16 dominios  $\alpha$ -hélices transmembranales conservados, y una parte con gran similitud a la región sensible DCCD (diciclohexilcarbodiimida) de la ATPasa tipo  $F_1$ , demostrando que son las bombas de protones primarias más simples (Kim, et. al. 1991).

En el 2004 se realizó una mutante de la PPiase de membrana (H+PPiase) de *R. rubrum*, bacteria que posee ambas pirofosfatasas, membranal y citoplasmática, demostrando 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 lumínicas bajas (García-Contreras, et. al. 2004). Además, se ha visto que se induce el gen de la H+PPiase en respuesta a condiciones de estrés, donde posiblemente esta proteína esté generando un gradiente electroquímico de  $H^+$  que podría usarse en la síntesis de ATP (Lopez-Marquez, et. al. 2004).

Hablando de su distribución, no solamente se encuentra en bacterias fotosintéticas, aunque no están tan ampliamente distribuidas como las citoplasmáticas, se han encontrado en bacterias aeróbicas no fotosintéticas (Schöcke y Schink, 1998), arqueas (Baltcheffsky, et. al., 1999), parásitos (Scott, et. al., 1998), vacuolas de algas (Iketa et. al., 1999) y plantas superiores (Sakakibara et. al., 1996)

### **b. Pirofosfatasas citoplasmáticas.**

La pirofosfatasa citoplasmática es una enzima esencial y ubicua, aunque se conoce el caso de un protista (*Entamoeba histolítica*) que carece de ella (Mc Laughlin y Aley, 1985). Como se ha mencionado antes, su papel esencial radica en eliminar el PPi del citoplasma para mantener el flujo termodinámico, cargar la dirección de las reacciones hacia los productos volviéndose irreversibles (Kornberg, 1962). La PPiase citoplasmática difiere en muchos ámbitos de las antes mencionadas PPiases membranales; empezando con su localización en la célula, que al no estar integrada a una membrana no puede crear un gradiente de protones. Comúnmente se dice que las PPiase citoplasmáticas no pueden llevar a cabo la reacción de síntesis de PPi, sin embargo, en 1986 se demostró en levaduras que también las PPiases citoplasmáticas sintetizan PPi sin estar acoplado a un gradiente químico (De Meis, et. al., 1986), sin embargo, la dificultad de los experimentos para medir la reacción de síntesis, al requerir grandes cantidades de fosfato radiactivo y la pequeña cantidad de PPi sintetizado, han limitado la exploración a más organismos.



Las pirofosfatasa s citoplasmáticas han sido divididas en dos familias no homólogas que difieren en muchas propiedades funcionales. Aunque no hay similitudes en su secuencia, teniendo solamente el 1% de similitud (realizando un alineamiento de los genes de las pirofosfatasa s de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*), ni en la estructura proteica general, ambas familias comparten una sorprendente conservación de los residuos del sitio activo, considerándose un notable ejemplo de convergencia evolutiva enzimática (Ahn et. al, 2001).

#### **i. Pirofosfatasa s de la Familia I.**

Las PPIasa s de la Familia I se encuentran representadas en todos los dominios (Bacteria, Arquea y Eucaria). Siendo también las más estudiadas y descritas. Esta familia de PPIasa s son homotetrameros u homohexameros (Fig. 2-A), con subunidades de ~20 kDa. Todas las PPIasa s de Familia I poseen un sitio activo altamente conservado, formado por 13 residuos funcionalmente importantes (Heikinheimo, et. al., 1996). Usando análisis de emisión de rayos X inducidos por protones (PIXE) en *R. rubrum* han mostrado que a enzima posee en su estructura dos átomos de  $Zn^{2+}$  fuertemente unidos ( Hilario, et, al. 1990)

Utilizan el  $Zn^{2+}$  para estabilizar su estructura, dándole protección contra la desnaturalización por calor, ya que a diferencia de las PPIasa s de Familia II, el extracto crudo puede calentarse a 65°C y puede seguir activo.

En 1972 se descubrió en levaduras que el  $Mg^{2+}$  no solo se emplea para expresar el máximo de su velocidad, también es necesaria la presencia del catión libre para activarla antes de unirse al sustrato (Moe y Butler, 1972). En experimentos donde se somete a las PPIasa s de Familia I y Familia II a temperaturas de 0°C a 65°C en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  libre durante la preincubación se mostró que el  $Mg^{2+}$  ejerce protección contra la desnaturalización por calor únicamente sobre la enzima de la familia I (Celis, et. al., 2003)., cuando se pre incuba con  $Zn^{2+}$  la Familia I presenta protección al igual que cuando se incuba la familia II con  $Co^{2+}$ , sin embargo cuando a la familia I se pre incuba con  $Co^{2+}$  la proteína pierde su actividad, y lo mismo pasa cuando a la familia II se pre incuba con  $Zn^{2+}$  (Platica con Celis H. 2018)

En cuanto a inhibidores, la Familia I es una de las pocas enzimas que se ve inhibida por concentraciones micromolares de fluoruro. El Imidodifosfato (IDP) y MDP en concentraciones milimolares inhiben selectivamente a las PPIasa s de Familia I. Otros compuestos quelantes (Nucleótidos pirimidínicos, EDTA y EGTA), que modifican negativamente la actividad, destacando que la Familia I es más susceptible que la Familia II.

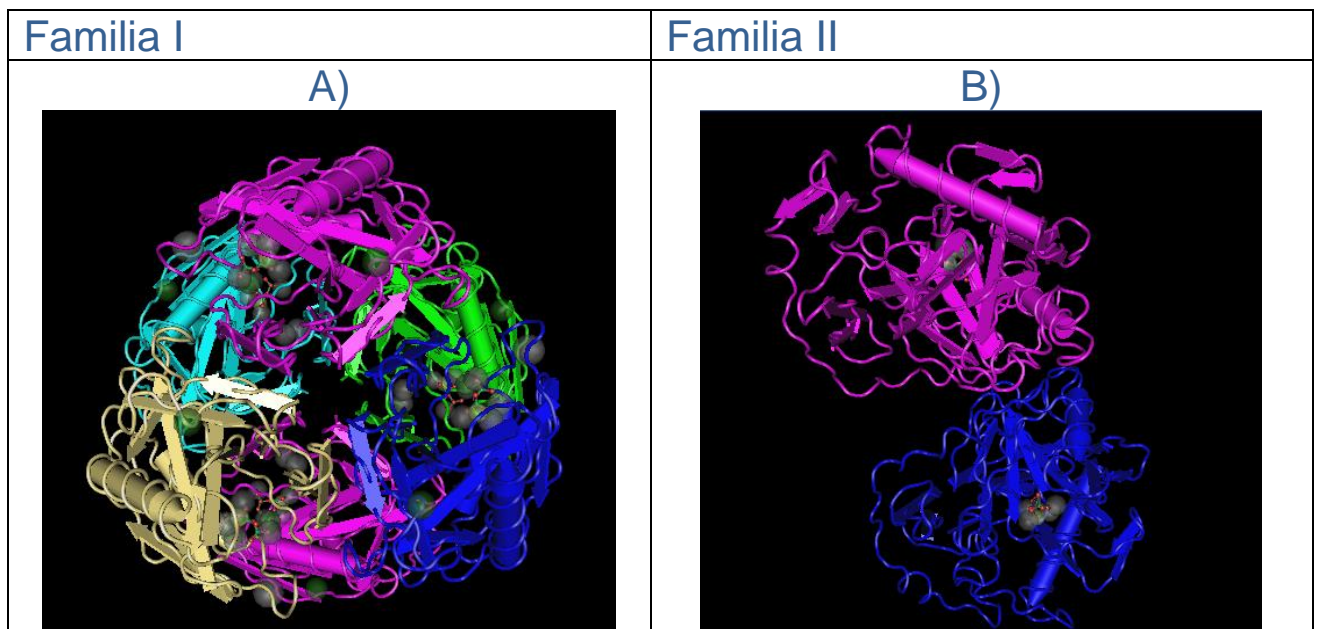


Fig. 2. Estructuras cristalográficas de las sPPiasas. A) Homoexamero de la sPPiase de *Escherichia coli* (Familia 1), obtenida por difracción de rayos X, con una resolución de 1.3 Å. B) Homodímero de la sPPiase de *Saccharomyces Cerevisiae* obtenida por difracción de rayos X, con una resolución de 1.9 Å. Tomado de Samygina, et. al., 2007 y Heikinheimo, et. al., 2001, respectivamente.

### ii. Pirofosfatasas de la Familia II,

Las Ppiasas de la Familia II se han encontrado hasta la fecha solamente en algunos organismos del dominio Arquea y Bacteria. Las Ppiasas de Familia II son típicamente homodímeros (Fig. 2-B), con subunidades de ~34 kDa. El sitio activo localizado en la interfaz de la proteína tiene únicamente seis ligandos conservados con los miembros de las Ppiasas de Familia I. Los estudios con PIXE en *Rba. capsulatus* dieron a conocer la existencia de tres iones de  $\text{Co}^{2+}$  en la estructura proteica los cuales se utilizan como estabilizador de la estructura (Solis, et. al., 2011). En el caso de las Ppiasa de Familia II presentan su máximo de actividad hidrolítica en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$ , seguida del  $\text{Mg}^{2+}$  que solo puede llevar a la mitad

de su actividad hidrolítica a la proteína con respecto al  $Mg^{2+}$  y al final el  $Co^{2+}$  con un poco menos de actividad. A diferencia de la Familia I, a altas concentraciones del catión libre actúa como inhibidor de la reacción. Además de esto, esta familia solo presenta inhibición reversible con compuestos quelantes como el EDTA y el EGTA (Klemme, et. al., 1971).

Con respecto a la eficiencia de la reacción de hidrólisis, ambas familias tienen la misma especificidad por el sustrato, sin embargo, la actividad específica de las enzimas de Familia II son un orden de magnitud mayores con respecto a las de Familia I.

En bacterias fotosintéticas  $\alpha$ -proteobacterias se ha encontrado una correlación entre la presencia simultánea de la  $H^+$ -Ppiasa y la Ppiasa de Familia I, mostrando también que las bacterias que no presentan la pirofosfatasa de membrana tienen la Ppiasa de Familia II (Celis, et. al., 2003)

Característica	Familia I ( <i>R. rubrum</i> )	Familia II ( <i>Rba. sphaeroides</i> )
Peso molecular del monómero (kDa)	20	64
Peso molecular del oligomero (kDa)	120	128
Metal estabilizador	$Zn^{2+}$	$Co^{2+}$
Metal co-sustrato	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$ y menormente $Mg^{2+}$
Efecto de $Mg^{2+}$ libre	Activa	Sin efecto
Efecto del Imidofosfato	Inhibe	No inhibe
Efecto del Fluoruro	Inhibe	No inhibe
$K_m$ ( $\mu M$ )	25.2	350
$V_{max}$ ( $\mu M$ )	2.3	294

Tabla 1. Resumen de las principales características de las sPPiasas de Familia I y Familia II, representadas por *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides* respectivamente.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cinética enzimática clásica se realizaba usando proteínas parcialmente purificadas. Pero en la actualidad existen reportes que sugieren que las enzimas tienen comportamientos diferentes cuando se encuentran parcialmente purificadas en comparación a un mayor grado de pureza (>95%), por ejemplo, Zarco-Zavala en el 2018 demostró el papel inhibitorio de la subunidad épsilon en la actividad de la ATPasa utilizando una construcción de epsilon recombinante, dicha actividad inhibitoria es imposible de notar en muestras parcialmente purificadas de la subunidad épsilon.

Con esto se abre la posibilidad de encontrar cambios en la actividad cinética de las PPiases si se encuentran en un medio libre de otras proteínas que pudieran alterar su comportamiento.

## OBJETIVO GENERAL.

Comparar el comportamiento cinético de dos pirofosfatasas citoplasmáticas de Familia I y Familia II puras, mediante la elaboración de proteínas recombinantes.

### Objetivos Particulares

- Producción de proteínas recombinantes de PPiases citoplasmáticas de *R. rubrum* (Familia I) y *Rba. sphaeroides* (Familia II).
- Purificación de las PPiases citoplasmáticas.
- Caracterización Cinética de las PPiases citoplasmáticas

# HIPÓTESIS

Al encontrarse las sPPiasas totalmente purificadas su comportamiento cinético será distinto, con respecto al que presentan enzimas parcialmente purificadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Cultivos de las Bacterias

#### **Bacterias utilizadas.**

Se utilizaron dos cepas de bacterias púrpura no sulfurosas; como representante de la PPiasa citoplasmática de Familia I se utilizó la cepa ATCC 11170 de *R. rubrum* y representando a la Familia II, la cepa 2. 4. 1 de *Rba. sphaeroides*, ambas obtenidas de la colección *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*.

Para el proceso de clonación fueron utilizadas dos cepas de *E. coli*: DH5 $\alpha$  y BL21, provenientes de la colección del Dr. Jose de Jesus García Trejo. DH5 $\alpha$  fue elegida como el hospedero de mantenimiento debido a las propiedades que exhibe su genotipo, principalmente por su incapacidad para reproducirse sexualmente (F-); mutación en la *recA* que previene la recombinación no deseada entre el DNA propio y el externo; mutación en *EndA1* que previene la degradación de DNA foráneo; *RelA1* que permite desarrollar una estructura lipídica más frágil y así prevenir daño al DNA al momento de romper la célula portadora

BL21 se usó como hospedero de expresión tomando en cuenta también sus propiedades genotípicas, principalmente que es incapaz de reproducirse sexualmente (F-); tiene una deleción del gen que metaboliza Arabinosa ( $\Delta$ lac714); el uso de codones de los aminoácidos presentes en las sPPiasas es igual a los usados por las bacterias fotosintéticas; y es indicada para expresión de proteínas solubles.

## Medio de cultivo para *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*

Ambas bacterias púrpura no sulfurosas fueron crecidas en medio Cohem Basire (CB) a pH 6.8 (Ver Tabla 2). Al final de la preparación, fue esterilizado 30 min a 120°C y 15 atm de presión.

Reactivo	Cantidad
❖ Metales 44	---
EDTA	2.5 g
Sulfato Ferroso FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5 g
Sulfato de Zinc ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	11 mg
Sulfato de Manganeso MnSO <sub>4</sub>	1.54 g
Cloruro de Manganeso MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.37 g
Sulfato de Cobre CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.392 g
Nitrato de Cobalto Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.248 g
Para 1 Litro agregar aproximadamente 4 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , esperar a que se disuelvan los metales.	
❖ Base Concentrada	40 mL
Para preparar 1L	
Ac. Nitriloacético N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub>	10 g
Sulfato de Magnesio MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	14.45 g
Cloruro de Calcio CaCl <sub>2</sub> 6h <sub>2</sub> O	4.35 g
Molibdato de amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0935 g
Sulfato Ferroso FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0975 g
Solución de Metales 44	50 mL
❖ KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ó NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ○ 136 g/L ○ pH 6.8	40 mL
❖ Ácido Succínico ○ 100.0 g/L ○ pH 6.8	40 mL
❖ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ○ 100 g/L	10 mL
❖ NaCl ○ 50 g/L	20 mL
❖ Ácido Glutámico ○ 100g/L ○ pH 6.8	4 mL
❖ L-Ácido Aspártico ○ 20 g/L	4 mL
Extracto de Carne	2 g
Ac. nicotínico	Traza
Tiamina (aneurina)	Traza
d-Biotina	Traza

Tabla 2. Preparación del medio CB (2L) --- Esta solución solamente se utiliza en la Preparación de la Base Concentrada.

## Medio de cultivo para cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* (DH5a y BI21) fueron crecidas en todo momento en medio LB líquido o sólido. En el caso de utilizar el medio líquido con antibiótico, tras esterilizarlo, se deja enfriar hasta una temperatura menor a 45°C y se agrega el antibiótico (Ampicilina 50µg/ml).

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Tabla 3. Receta para preparar 1 Litro de medio LB líquido

Para el medio sólido se preparó agregando Agar al 1.5% al medio líquido LB, se esterilizó en autoclave por 30 min a 120°C y 15 atm de presión. Se dejó enfriar el medio a una temperatura menor a 45°C para agregar los antibióticos; Ampicilina a 50 µg/ml, se agitó para homogenizar el antibiótico y se agregaron 30 ml de medio sólido a las cajas petri. una vez que el medio solidificado se incubó por 24 horas a 36°C con la finalidad de corroborar posibles contaminantes.

## Condiciones de crecimiento

Todos los cultivos bacterianos fueron iniciados a partir de gliceroles recientes, puros y guardados a -70°C. Se siguió un proceso común para escalar el volumen del cultivo que consiste en poner un inóculo de 100 µl en 1 ml del medio respectivo y seguir escalando a razón de 1:10 hasta obtener los volúmenes necesarios.

Los cultivos líquidos de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides* fueron incubados primeramente 12 horas en oscuridad para permitir que el crecimiento aeróbico de estos organismos elimina parcialmente el O<sub>2</sub> del medio. Posteriormente los cultivos se expusieron a la luz de focos con filamentos de tungsteno de 40W, colocadas a una distancia de 30 cm y a una temperatura de 25°C, agitándose semanalmente para evitar la formación de biofilms. En el caso de las cepas de *E.coli*, los cultivos líquidos se incubaron a 37°C agitación constante (250 rpm); y los cultivos sólidos se mantuvieron a 37°C en una incubadora estándar.

## 2. Obtención del DNA bacteriano.

Se tomó un cultivo de 3 ml en fase estacionaria, de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*, con una densidad óptica de 2 unidades para el proceso de extracción de DNA bacteriano, utilizando el kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen). Las células fueron tratadas como lo dicta el protocolo del kit de extracción para la purificación de ADN microbiano de alta calidad a partir de cultivos microbianos y muestras de medios de transporte.

Al terminar la extracción del DNA se procedió a correr un gel de Agarosa para corroborar la pureza e integridad del material genético, así como hacer uso de un espectrofotómetro (Nanodrop) para determinar su concentración.

- El gel de agarosa fue hecho al 10% de agarosa en amortiguador TBE 1x (0.089M Tris Base, 0.089M Boric Acid, and 0.002M EDTA), con un volumen total del gel de 30 ml, para cada muestra se agregaron 5 µl de amortiguador de corrida y a la cámara se le agregaron 250 ml de amortiguador TBE 1x. Se utilizó el marcador de peso Lambda DNA/HindIII plus Marker de Bio Basic Inc.
- El gel se corrió a 70 milliamps/volts en una cámara de electroforesis Thermo electron corporation EC105 durante 1 hora y media o hasta que el amortiguador de corrida (TBE 1X, glicerol al 1:1) llegará al final del gel.
- Posteriormente se desmontó el gel y se sumergió en una solución al 1% de Bromuro de etidio durante 10 minutos, al finalizar la incubación se colocó sobre una lámpara de rayos UV y se tomó una fotografía.

Los resultados del gel se aprecian en la Fig. 3, donde se observa solamente dos bandas sin degradar y sin ninguna contaminación. El DNA de *R. rubrum* fue de 5 268 pb y el de *Rba. sphaeroides* de 5 600 pb. En el anexo 1 se muestran los detalles de la gráfica utilizada para obtener los pesos moleculares a partir del gel de agarosa. Al comprobar la integridad del DNA, se procedió a guardar a -20°C.



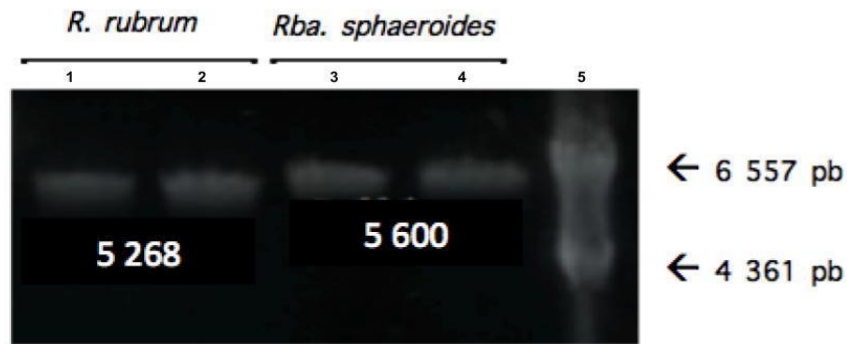


Fig. 3. Gel de Agarosa al 10% revelado con Bromuro de Etidio al 1%. Se muestra el DNA de *R. rubrum* (5 268 pb) y el DNA de *Rba. sphaeroides* ( 5 600 pb); Carril 5, corresponde al marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII plus Marker (Bio Basic Inc.). Las muestras de DNA fueron corregidas por duplicado para evitar errores de medición o interpretación.

### 3. Diseño de Oligonucleótidos o primers

Para el diseño de los oligos, se procedió a revisar la secuencia de aminoácidos de los genes de cada sPPiasa en la base de datos “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) para obtener una secuencia de referencia, estas se pueden encontrar fácilmente con los ID de gene 3834554 para la sPPiasa de *R. rubrum* y 3719838 para *Rba. sphaeroides* o bien con el símbolo genético Rru\_A0146 y RSP\_2307 respectivamente. Se corroboró que la secuencia reportada fuera de la misma cepa a la que se le extrajo previamente el DNA, que el gen estuviera totalmente anotado y fuera la revisión más reciente.

Con la secuencia de referencia se hizo uso del programa NEBcutter V2.0 para buscar la secuencia de todas las enzimas de restricción comerciales dentro del gen de las sPPiasas, con el objetivo de prevenir cortes indeseados dentro del gen. Después con el mismo programa se buscaron las enzimas de restricción que no cortan el gen y que solo cortan en el sitio múltiple de corte. Al terminar la búsqueda se decidió añadir a los oligos los sitios de corte para facilitar el proceso de clonación. El oligo R.rub-forward fue diseñado con una secuencia que permitiera digerirlo con la enzima EcoRI (GAATTC), mientras que el oligo Rba.spha-forward fue diseñado con la secuencia de SacI (GAGCTC). Ambos oligos contienen una base insertada entre el sitio de corte y el codón de inicio para que el gen entre en fase. Los oligos R.rub-reverse y Rba.spha-reverse contienen al final del oligo la secuencia de HindIII (AAGCTT).

Nombre de oligo	Secuencia 5'-3'	Sitio de corte	%GC	TM (°C)
R.rub-forward	<b>GAATTC</b> AATGGATATCAAGAAATTCCCGTGGG	EcoRI	39	69
R.rub-reverse	<b>AAGCTT</b> <u>TT</u> AGACCTTCTTGTGGGCGGC	HindIII	52	73
Rba.spha-forward	<b>GAGCTC</b> TATGAAGGTATTCGGCCAC	SacI	52	69
Rba.spha-reverse	<b>AAGCTT</b> <u>TC</u> AGAGCTTGAGGACCGGAATGAT	HindIII	47	73

En negritas se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción, en cursivas los codones de inicio y subrayado los codones de término.

Tabla 4. Oligos utilizados para la amplificación de los genes de las sPPiasas de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*.

## 4. Amplificación de los genes de las sPPiasas

Se realizó un PCR de punto fijo utilizando las muestras de DNA bacteriano extraído anteriormente y los primers mencionados en la Tabla 6. Ambos DNAs fueron cuantificados anteriormente arrojando una concentración ~70 ng/μl. Los componentes y cantidades usados en la reacción de PCR (ver Tabla 5) fueron comunes a ambas muestras de DNA, así como las condiciones empleadas en el termociclador, donde se probaron dos temperaturas de extensión. Los detalles del procedimiento utilizado para el PCR se pueden observar en el diagrama 2.

Reactivo	Volumen (μl)
ADN (~70 ng/μl)	2
Buffer 10x PCR con MgCl <sub>2</sub>	5
Oligo Forward (0.1 μM)	1
Oligo Reverse (0.1 μM)	1
dNTP's (50 μM)	1
EDTA (50 mM)	1
ADN pol (25 unidades/ml)	0.5
H <sub>2</sub> O	38.5
Volumen Total	50

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR. La receta fue utilizada para realizar un PCR de ambos DNA bacterianos utilizando los primers respectivos para cada bacteria. todos los reactivos son de ThermoFisher.

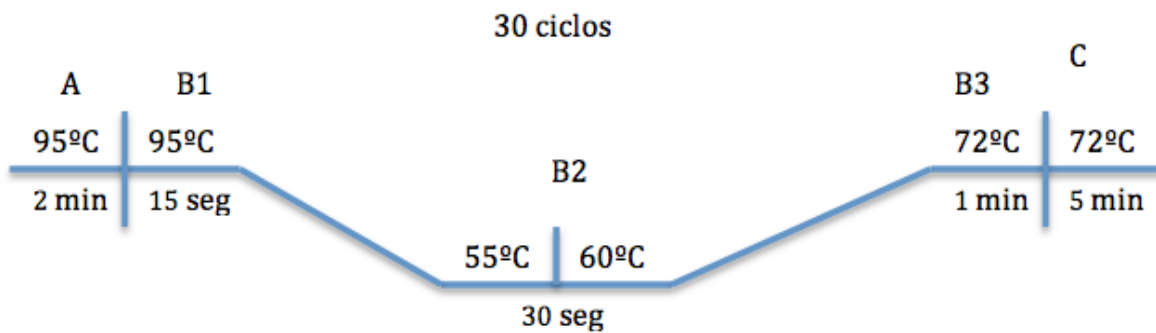


Figura 4. Condiciones utilizadas para el uso del termociclador A-Desnaturalización inicial. B1-Desnaturalización; B2-Extensión; B3-Alineamiento. C-Extensión final

Al terminar los 30 ciclos de PCR para cada muestra, el DNA resultante se corrió en un gel de agarosa preparado de igual manera que en el apartado 5.4 y se tomó una fotografía (Fig. 5), los detalles para la obtención de pesos moleculares se encuentran en el Anexo 2. Además, se cuantificó la concentración de DNA utilizando un Nanodrop.

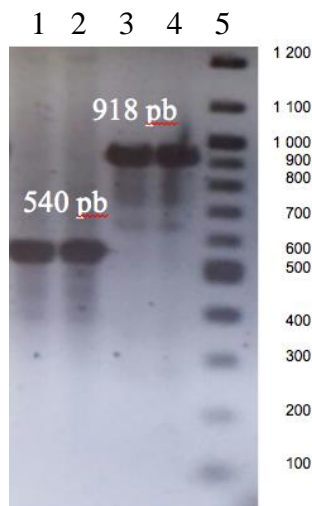


Fig. 5. Gel de Agarosa al 10% revelado con Bromuro de Etidio al 1%. En el carril 1 y 2 se muestra el gen de la sPPiase de *R. rubrum* (540 pb); Carril 3 y 4 muestran el gen de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* (918 pb); Carril 5, corresponde al marcador de peso molecular. Las muestras de DNA tratadas con dos diferentes temperaturas de extensión 55°C (carril 1 y 3) y 60°C (carril 2 y 4) tuvieron los mismos resultados, por lo que en el futuro se utilizó 60 °C para realizar la extensión.

## 5. Digestión de los productos de PCR

Los productos de PCR de los genes de las sPPiasas fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción (digestión doble) para evitar agregar cualquier inserción de nucleótidos extra en el plásmido de mantenimiento. Para ello se utilizó la siguiente receta (ver Tabla 6), dejando la reacción incubarse a 37°C durante 1 hora. Al terminar la reacción se desnaturalizan las enzimas de restricción con un choque térmico (85°C por 2 min) y se guardó a -20°C hasta su uso en la reacción de ligación.

Tabla 6. Reacciones de restricción de DNA		
Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	
	Gen sPPiasa <i>R. rubrum</i>	Gen sPPiasa <i>Rba. sphaeroides</i>
ADN (~50 ng/ $\mu$ l)	10	10
Buffer 10x cutsmart	2	2
Enzima de restricción	Sac I	0.5
	EcoRI	0.5
	HindIII	0.5
H <sub>2</sub> O	7	7
Volumen total	20	20

## 6. Ligación de los genes de las sPPiasas en el plásmido pJET

Como plásmido de mantenimiento se eligió el pJET1.2/blunt, debido a que es un vector linealizado; posee selección mediante gen suicida (*eco47IR*); tiene un promotor T7; acepta insertos de 6 bp a 10kb perfectos para los genes de las sPPiasas; cuenta con un casete de resistencia a Ampicilina; acepta insertos con extremos romos o cohesivos y es compatible con las cepas de *E.coli* usadas durante la clonación.

La ligación se llevó a cabo utilizando los reactivos y volúmenes especificados en la Tabla 9, haciendo hincapié en el uso de una ligasa T4 (Invitrogen) capaz de ligar extremos romos y cohesivos, a fin de facilitar la ligación. La reacción se dejó incubarse durante toda la noche (OVN por sus siglas en inglés) a 16°C, a la mañana siguiente se inactivó la ligasa por un choque térmico (65° por 10 min) y se mantuvo a -20°C hasta su posterior uso. Con fines de comprobar la ligación se realizó una digestión doble del plásmido pJET+sPPiasa *R.rubrum* y pJET+sPPiasa *Rba.sphaeroides* (Datos no mostrados).

pJET		
Reactivo	Volumen (μl)	
	Gen sPPiase <i>R. rubrum</i>	Gen sPPiase <i>Rba. sphaeroides</i>
pJET	10	10
Inserto	5	5
Buffer de ligación	2	2
Ligasa T4	1	1
H <sub>2</sub> O	2	2
Volumen total	20	20

Tabla 7. Ligación de genes de sPPiase con el plásmido

## 7. Activación de cepas de *E.coli* (DH5a y BI21)

Al contar solo con cultivos normales de BI21 y DH5a (no competentes), se procedió a activarlas químicamente.

- Primeramente, se tomó un asado del glicerol de cada cepa y se plaqueo en medio LB+Agar al 1.5% incubando un OVN a 37°C.
- Al día siguiente se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en 1 ml de medio LB, se dejó en OVN a 37°C con agitación constante (250 rpm).
- Todo el contenido de los OVN se inoculó con 99 ml de medio LB y se incubó 2 horas a 37°C y 250 rpm.
- Al finalizar las dos horas se midió su densidad óptica a 600 nm, cuando alcanzó una densidad óptica de 0.4-0.7 unidades se centrifugó 10 min a 10 000 rpm en una centrifuga Beckman J-26 XPI utilizando el rotor JA 25.50 (12 000x g).
- Se descartó el sobrenadante y se agregó 50 ml de cloruro de calcio 0.1 M (a 4°C y esteril), resuspendieron suavemente y en hielo, una vez homogeneizado se incubó en hielo por 2 horas.
- Después se centrifugó a 12 000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de cloruro de calcio 0.1 M (frío y esteril) y 850 μl de glicerol 100% esteril, se homogeneizó por inversión lentamente y se alicuoto, para guardar finalmente a -70°C.

## 8. Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ con pJET+Inserto

Para este paso se llevó a cabo el protocolo estándar con algunas modificaciones hechas en el laboratorio del Dr. Jose de Jesus García Trejo, producto de la experiencia empírica de muchos estudiantes y años de práctica.

- Se descongelaron dos alícuotas de células DH5 $\alpha$  competentes, manteniéndose todo el tiempo en hielo con un poco de agua.
- Al estar totalmente líquidas, se le agrego todo el producto de la reacción de ligación pJET-sPPiasa *R.rubrum* a una alícuota de DH5a competente, lo mismo se hizo con la ligación pJET-sPPiasa *Rba.sphaeroides*; se mezcló suavemente y se puso en hielo por 30 min, cuidando cubrir los tubos en su totalidad.
- Se dio un choque térmico en un termoblock estándar fijado a 42°C durante 1.5 min, inmediatamente después se pusieron las muestras en hielo durante 1 hora, cuidando de cubrirlas en su totalidad.
- En tubos estériles para crecimiento aeróbico, se agregó 1 ml de medio LB y todo el contenido de la mezcla DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasas y se incubó 1 hora a 37°C en agitación constante (250 rpm).
- El contenido de cada transformación se centrifugó 1 minuto a 16000 x g, se resuspendió muy lentamente el pellet con 100  $\mu$ l del sobrenadante y se plaqueo en una caja petri con LB+Agar+Ampicilina (50  $\mu$ g/ml). Las cajas petri se dejaron incubar un OVN a 37°C

A la mañana siguiente se revisaron las cajas petri y se tomaron colonias individuales para ser plaqueadas en otra caja petri con las mismas condiciones. Cada colonia fue picada una sola vez con un palillo de extremos romos y plaqueada en forma de cuadrante como se muestra en la Figura 6; a estas nuevas placas se les llamo 2<sup>da</sup> generación de DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasa *R. rubrum* y DH5a+pJET-sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Las 2<sup>das</sup> generaciones se incubaron en OVN a 37°C.

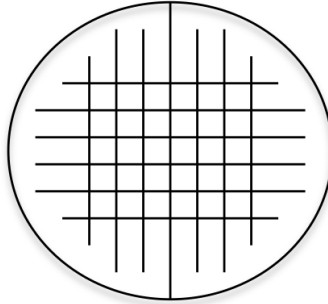


Figura 6. Patrón de plaqueo utilizado para hacer las 2<sup>das</sup> Generaciones de DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasa *R. rubrum* y DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Cada cuadrante fue plaqueado con una colonia individual y cuidando no tocar los bordes ni mezclar colonias.

## 9. Extracción de plásmido pJET+ Incerto

Se tomaron 10 colonias individuales de las 2<sup>das</sup> Generaciones de DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasa *R. rubrum* y DH5 $\alpha$ +pJET-sPPiasa *Rba. sphaeroides*; cada una fue inoculada en 1 ml de medio LB+Amp (50  $\mu$ g/ml), se dejaron incubar en OVN a 37°C. A la mañana siguiente se centrifugaron las células 2 minutos a 14 000 rpm. Para extraer el DNA plasmídico se utilizó el kit “QIAprep® Spin Miniprep” (Qiagen), Las células fueron tratadas de aquí en adelante como lo sugiere el Protocolo oficial del kit.

Al terminar la extracción se corrió un gel de Agarosa con las muestras (Datos no mostrados) y se cuantificó la concentración de DNA en el Nanodrop.

## 10. Digestión de pJET+ Incerto.

Los plásmidos (pJET-sPPiasa *R. rubrum* y pJET-sPPiasa *Rba. sphaeroides*) fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción, con el fin de comprobar la correcta ligación de los insertos y discernir cuáles colonias contienen el plásmido e incerto intactos. Para ello se realizó una digestión doble (ver Tabla 8), dejando la reacción incubar a 37°C durante 1 hora.

Reactivo		Volumen (μl)	
		pJET-sPPiasa <i>R. rubrum</i>	pJET-sPPiasa <i>Rba. sphaeroides</i>
ADN (~50 ng/μl)		10	10
Buffer 10x cutsmart		2	2
Enzima de restricción	Sac I		0.5
	EcoRI	0.5	
	HindIII	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O		7	7
Volumen total		20	20

Tabla 8. Reacciones de restricción del plásmido pJET+Incerto.

Al terminar la reacción se desnaturalizan las enzimas de restricción con un choque térmico (85°C por 2 min) y se cargó todo el contenido de la digestión en un gel de Agarosa al 10%.

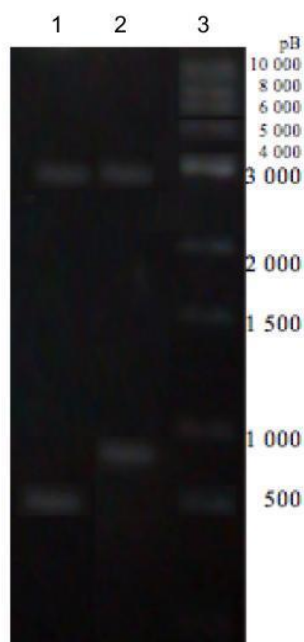


Fig. 7. Gel de Agarosa al 10% revelado con Bromuro de Etidio al 1%. En el carril 1 se muestra el plásmido pJET1.2/blunt+ sPPiasa de *R. rubrum* digerido con EcoRI y HindIII; Carril 2- plásmido pJET1.2/blunt+ sPPiasa de *Rba. sphaeroides* digerido con SacI y HindIII; Carril 3 corresponde al marcador de peso molecular.



## **11. Purificación de los Genes de sPPiasas.**

De las colonias que resultaron tener el inserto en el peso reportado (540 pb para la sPPiasa de *R. rubrum* y 918 pb para la sPPiasa de *Rba. sphaeroides*) se volvió a extraer DNA plasmídico y se digirió como se mencionó en el apartado 13 y 14, respectivamente. Igualmente se corrió un gel de Agarosa al 10% con las digestiones de pJET-sPPiasa *R. rubrum* y pJET-sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Dicho gel, se reveló con una solución de Bromuro de etidio al 1%, y se cortaron las bandas de los genes de las sPPiasas con un bisturí esteril. Las bandas se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y fueron tratadas conforme lo dicta el protocolo oficial del kit "QIAquick® Gel Extraction Kit" (Qiagen). Al terminar la extracción del DNA se cuantificó en el Nanodrop. Después, todas las muestras fueron guardadas a -20°C para su posterior uso.

## **12. Digestión del plásmido de expresión.**

Para la segunda parte del proceso de clonación, se utilizó el plásmido pBAD His B (Invitrogen), como plásmido de expresión. Dicho plásmido se encuentra circular; tiene resistencia a ampicilina; expresión de la proteína recombinante dependiente de dosis del inductor; promotor araBAD; plásmido de bajo número de copias y agrega una cola de Histidinas N- Terminal de 3 kDa lo que facilitará la posterior purificación proteica.

Al encontrarse circularizado, fue necesario linealizar antes de poder ligarle los insertos. Se hizo una ligación doble, con el fin de eliminar los sitios de corte presentes entre EcoRI y HindIII (en el pBAD HisB usado para insertar la sPPiasas de *R. rubrum*) y entre Sac I y Hind III (en el pBAD HisB usado para insertar la sPPiasas de *Rba. sphaeroides*). La receta usada para la digestión se muestra en la Tabla 11. La reacción se dejó incubar a 37°C durante 1 hora. Al terminar la reacción se desnaturalizan las enzimas de restricción con un choque térmico (85°C por 2 min).

Reactivo		Volumen ( $\mu$ l)	
		Plásmido para ligar la sPPiasa <i>R. rubrum</i>	Plásmido para ligar la sPPiasa <i>Rba. sphaeroides</i>
pBAD His B (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)		2	2
Buffer 10x cutsmart		2	2
Enzima de restricción	Sac I		0.5
	EcoRI	0.5	
	HindIII	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O		15	15
Volumen total		20	20

Tabla 9. Reacciones de restricción del plásmido pBAD His B

### 13. Ligación de los genes de las sPPiasas en pBAD HisB.

La ligación se llevó a cabo utilizando los reactivos y volúmenes especificados en la Tabla 10. La reacción se dejó incubar en OVN a 16°C, a la mañana siguiente se inactivó la ligasa por un choque térmico (65° por 10 min) y se mantuvo a -20°C hasta su posterior uso. Con el fin de comprobar la ligación se realizó una digestión doble del plásmido pJET+sPPiasa *R. rubrum* y pJET+sPPiasa *Rba. sphaeroides*.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	
	Gen sPPiasa <i>R. rubrum</i>	Gen sPPiasa <i>Rba. sphaeroides</i>
pBAD His B digerido (0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	10
Gen sPPiasa	5	5
Buffer de ligación	2	2
Ligasa T4 ThermoFisher (5 unidades/ $\mu$ L)	1	1
H <sub>2</sub> O	2	2
Volumen total	20	20

Tabla 10. Ligación de genes de sPPiasa con el plásmido pBAD HisB

## 14. Transformación de BL21 con pBAD HisB+Incerto.

La transformación de BL21 con pBAD His B+sPPiasas se llevó a cabo usando el protocolo estándar con algunas modificaciones hechas en el laboratorio del Dr. Jose de Jesus García Trejo como se explica a continuación:

- Se descongelaron dos alícuotas de células BL21 competentes, manteniéndose todo el tiempo en hielo con un poco de agua.
- Al estar totalmente líquidas, se le agrego todo el producto de la reacción de ligación pBAD His B-sPPiasa *R.rubrum* a una alícuota de DH5a competente, lo mismo se hizo con la ligación pBAD His B-sPPiasa *Rba.sphaeroides*; se mezcló suavemente y se puso en hielo por 30 min, cuidando cubrir los tubos en su totalidad.
- Se dio un choque térmico en un termoblock estándar fijado a 42°C durante 1.5 min, inmediatamente después se pusieron las muestras en hielo durante 1 hora, cuidando de cubrirlas en su totalidad.
- En tubos estériles para crecimiento aeróbico, se agregó 1 ml de medio LB y todo el contenido de la mezcla BL21+pBAD His B-sPPiasas y se incubó 1 hora a 37°C en agitación constante (250 rpm).
- El contenido de cada transformación se centrifugó 1 minuto a 14 000 rpm en una centrifuga Eppendorf, se resuspendió muy lentamente el pellet con 100 µl del sobrenadante y se plaqueo en una caja petri con LB+Agar+Ampicilina (50 µg/ml). Las cajas petri se dejaron incubar un OVN a 37°C

A la mañana siguiente se revisaron las cajas petri y se tomaron colonias individuales para ser plaqueadas en otra caja petri con las mismas condiciones. Cada colonia fue picada una sola vez con un palillo de extremos romos y plaqueada en forma de cuadrante como se muestra en la Figura 2; a estas nuevas placas se les llamo 2<sup>da</sup> generación de BL21+pBAD HisB-sPPiasa *R. rubrum* y BL21+pBAD His B-sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Las 2<sup>das</sup> generaciones se incubaron en OVN a 37°C.

## 15. Extracción de pBAD His B+Inserto

Se tomaron 10 colonias individuales de las 2<sup>das</sup> Generaciones de BL21+pBAD HisB-sPPiasa *R. rubrum* y BL21+pBAD His B-sPPiasa *Rba. sphaeroides*; cada una fue inoculada en 1 ml de medio LB+Amp (50 µg/ml), se dejaron incubar en OVN a 37°C. A la mañana siguiente se centrifugaron las células 2 minutos a 14 000 rpm. Para

extraer el DNA plasmídico se utilizó el kit “QIAprep® Spin Miniprep” (Qiagen). Las células fueron tratadas de aquí en adelante como lo sugiere el Protocolo oficial del kit.

Al terminar la extracción se corrió un gel de Agarosa (Fig. 8) con las muestras y se cuantificó la concentración de DNA en el Nanodrop. Los detalles de la gráfica utilizada para obtener los pesos moleculares se muestran en el anexo 3. Al salir los plásmidos en peso, se procedió a hacer una doble digestión para corroborar la correcta inserción de las sPPiasas.

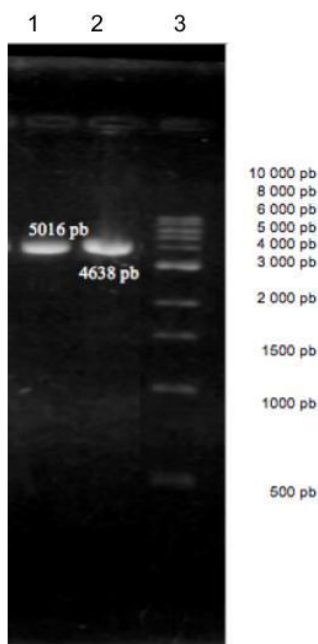


Fig. 8. Gel de Agarosa al 10% revelado con Bromuro de Etidio al 1%. En el carril 1 (de derecha a izquierda) se muestra a pBAD His B+sPPiasa de *R.ba sphaeroides* (5016 pb); Carril 2 muestra a pBAD His B+sPPiasa de *R. rubrum* ( 4638 pb); Carril 3, corresponde al marcador de peso molecular.

## 16. Digestión de pBAD His B+Inserto.

Los plásmidos pBAD HisB-sPPiasa *R. rubrum* y pBAD His B-sPPiasa *Rba. sphaeroides* fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción, con el fin de comprobar la correcta ligación de los insertos y discernir entre las colonias seleccionadas. Se realizó una digestión doble, con la receta explicada en la Tabla 11, dejando la reacción incubar a 37°C durante 1 hora.

Reactivo		Volumen ( $\mu$ l)	
		pBAD HisB-sPPiase R. rubrum	pBAD His B-sPPiase Rba. sphaeroides
ADN (~50 ng/ $\mu$ l)		10	10
Buffer 10x cutsmart		2	2
Enzima de restricció n	Sac I		0.5
	EcoRI	0.5	
	HindIII	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O		7	7
Volumen total		20	20

Tabla 11. Reacciones de restricción del plásmido pBAD His B+Inserto.

Al terminar la reacción se desnaturalizan las enzimas de restricción con un choque térmico (85°C por 2 min) y se cargó todo el contenido de la digestión en un gel de Agarosa al 10%. Los detalles de la gráfica usada para obtener el peso molecular de este gel se encuentran en el anexo 3

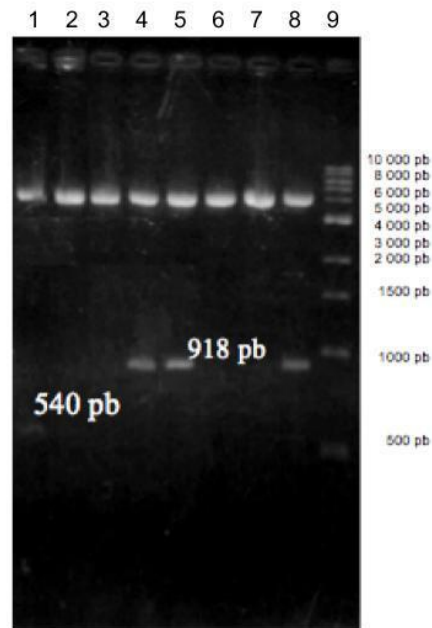


Fig. 9. Gel de Agarosa al 10% revelado con Bromuro de Etidio al 1%. En el carril 1 (de derecha a izquierda) se muestra el plásmido pBAD His B+sPPiase de *Rba. sphaeroides* digerido con Sac I y Hind III; Carril 2-7 el plásmido pBAD His B+sPPiase de *R. rubrum* digerido con EcoRI y Hind III; Carril 8, marcado de peso.

Los carriles 2, 4 y 5 fueron positivos para la digestión doble con EcoRI y HindIII lo que nos indica una correcta inserción de los fragmentos, así como el carril 1 que fue positivo para la digestión doble con Sac I y Hind III (Fig. 9). Dados estos resultados

se eligió la colonia positiva para la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* y una de las 3 positivas para *R. rubrum*.

## 17. Secuenciación de plásmidos pBAD His B + Inserto.

De las colonias que resultaron tener el inserto en peso, se eligió una para representar la sPPiasa de *R. rubrum* y otra para la sPPiasa de *Rba. sphaeroides*. Se extrajo DNA plasmídico hasta alcanzar una concentración ~200 ng/μl y se mandó a secuenciar en el módulo de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La secuenciación se corrió utilizando los primers recomendados por el fabricante del plásmido pBAD His B (mostrados en el Tabla 12) que flanquean al inserto en sentido 5'-3' y 3'-5'.

Nombre	Secuencia (5'-3')
pBAD forward primer	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD reverse primer	GATTTAATCTGTATCAGG

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de los genes de las sPPiasas.

Al recibir la secuenciación en formato ab1, se procedió a convertir en formato Fasta. Haciendo uso de la base de datos de NCBI se hizo un alineamiento de la secuencia de ADN reportada en NCBI para cada gen de las sPPiasas, contra las obtenidas de la secuenciación.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
998 bits(540)	0.0()	540/540(100%)	0/540(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	ATGGATATCAAGAAAATTC	CCCGTGGGCAAGAACC	CGCCCAGGATGTGAACGT	CATCATC	60
Sbjct 187	ATGGATATCAAGAAAATTC	CCCGTGGGCAAGAACC	CGCCCAGGATGTGAACGT	CATCATC	246
Query 61	GAGATTCGGCTGCTCGCCGATCCGGTGAAGTACGAGGTCGATAAGGAATCGGGGGCGATG				120
Sbjct 247	GAGATTCGGCTGCTCGCCGATCCGGTGAAGTACGAGGTCGATAAGGAATCGGGGGCGATG				306
Query 121	TTCTGTCGATCGCTTCCGTCACACCGCCATGCACTACCCCTGCAACTACGGCTTCGTCCC				180
Sbjct 307	TTCTGTCGATCGCTTCCGTCACACCGCCATGCACTACCCCTGCAACTACGGCTTCGTCCC				366
Query 181	CATACCCGTCCGACGACGGTGATCCGGTGGACGTGATGGTGGTCGGCCGTAATCCGGTG				240
Sbjct 367	CATACCCGTCCGACGACGGTGATCCGGTGGACGTGATGGTGGTCGGCCGTAATCCGGTG				426
Query 241	GCGGTGGGCTCGGTGATGCGCACCCGCGCCGGTCGGCGTGCTGTACATGGAAGACGAAGCC				300
Sbjct 427	GCGGTGGGCTCGGTGATGCGCACCCGCGCCGGTCGGCGTGCTGTACATGGAAGACGAAGCC				486
Query 301	GGCCCGCAGCAGAAAGATCCTGGGCGTGCCCAACAGCAAGCTCTACCCCTATCACGACAAC				360
Sbjct 487	GGCCCGCAGCAGAAAGATCCTGGGCGTGCCCAACAGCAAGCTCTACCCCTATCACGACAAC				546
Query 361	GTGAACAAATTCGGCGACCTGCGGCCGATCGAGCTGCGGCGGATCGAGCAATTCCTCGCC				420
Sbjct 547	GTGAACAAATTCGGCGACCTGCGGCCGATCGAGCTGCGGCGGATCGAGCAATTCCTCGCC				606
Query 421	CACTACAAGGACCTTGAAGAGGGCAAGTGGTGAAGATCCTGGGCTGGGGCAATACAAG				480
Sbjct 607	CACTACAAGGACCTTGAAGAGGGCAAGTGGTGAAGATCCTGGGCTGGGGCAATACAAG				666
Query 481	GAAAGCTGGGACGTATCGAAAGGGGCATCGCCGCGAGGCGCCCAAGAAGGCTAA				540
Sbjct 667	GAAAGCTGGGACGTATCGAAAGGGGCATCGCCGCGAGGCGCCCAAGAAGGCTAA				726
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
998 bits(540)	0.0()	540/540(100%)	0/540(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	ATGGATATCAAGAAAATTC	CCCGTGGGCAAGAACC	CGCCCAGGATGTGAACGT	CATCATC	60
Sbjct 499	ATGGATATCAAGAAAATTC	CCCGTGGGCAAGAACC	CGCCCAGGATGTGAACGT	CATCATC	558
Query 61	GAGATTCGGCTGCTCGCCGATCCGGTGAAGTACGAGGTCGATAAGGAATCGGGGGCGATG				120
Sbjct 559	GAGATTCGGCTGCTCGCCGATCCGGTGAAGTACGAGGTCGATAAGGAATCGGGGGCGATG				618
Query 121	TTCTGTCGATCGCTTCCGTCACACCGCCATGCACTACCCCTGCAACTACGGCTTCGTCCC				180
Sbjct 619	TTCTGTCGATCGCTTCCGTCACACCGCCATGCACTACCCCTGCAACTACGGCTTCGTCCC				678
Query 181	CATACCCGTCCGACGACGGTGATCCGGTGGACGTGATGGTGGTCGGCCGTAATCCGGTG				240
Sbjct 679	CATACCCGTCCGACGACGGTGATCCGGTGGACGTGATGGTGGTCGGCCGTAATCCGGTG				738
Query 241	GCGGTGGGCTCGGTGATGCGCACCCGCGCCGGTCGGCGTGCTGTACATGGAAGACGAAGCC				300
Sbjct 739	GCGGTGGGCTCGGTGATGCGCACCCGCGCCGGTCGGCGTGCTGTACATGGAAGACGAAGCC				798
Query 301	GGCCCGCAGCAGAAAGATCCTGGGCGTGCCCAACAGCAAGCTCTACCCCTATCACGACAAC				360
Sbjct 799	GGCCCGCAGCAGAAAGATCCTGGGCGTGCCCAACAGCAAGCTCTACCCCTATCACGACAAC				858
Query 361	GTGAACAAATTCGGCGACCTGCGGCCGATCGAGCTGCGGCGGATCGAGCAATTCCTCGCC				420
Sbjct 859	GTGAACAAATTCGGCGACCTGCGGCCGATCGAGCTGCGGCGGATCGAGCAATTCCTCGCC				918
Query 421	CACTACAAGGACCTTGAAGAGGGCAAGTGGTGAAGATCCTGGGCTGGGGCAATACAAG				480
Sbjct 919	CACTACAAGGACCTTGAAGAGGGCAAGTGGTGAAGATCCTGGGCTGGGGCAATACAAG				978
Query 481	GAAAGCTGGGACGTATCGAAAGGGGCATCGCCGCGAGGCGCCCAAGAAGGCTAA				540
Sbjct 979	GAAAGCTGGGACGTATCGAAAGGGGCATCGCCGCGAGGCGCCCAAGAAGGCTAA				1038

Fig. 10. Alineación de la secuencia reportada de *R. rubrum* (Query) contra la secuencia obtenida (Subject) del primer Forward (derecha) y reverse (izquierda)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1500 bits(812)	0.0()	821/828(99%)	1/828(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 157	ATGATCAAGGTATTTCGGCCACAAGTCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	216			
Sbjct 1	ATGATCAAGGTATTTCGGCCACAAGTCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	60			
Query 217	TGGGCTTGGTATCTGACCGAGGTGAAGGGCACCCCGCAAGGCGGTCTCTCTGGGCGAG	276			
Sbjct 61	TGGGCTTGGTATCTGACCGAGGTGAAGGGCACCCCGCAAGGCGGTCTCTCTGGGCGAG	120			
Query 277	CCGAACACCGAAGCGGCTTCGTGCTGAAGCACTGGGATCTCGAGAAGCCCGAGATCATC	336			
Sbjct 121	CCGAACACCGAAGCGGCTTCGTGCTGAAGCACTGGGATCTCGAGAAGCCCGAGATCATC	180			
Query 337	TCGGACGTGACGGCCGACGACAGCTGCGTGATCGTTCGACACCAACAACCCGGCCGAGCTG	396			
Sbjct 181	TCGGACGTGACGGCCGACGACAGCTGCGTGATCGTTCGACACCAACAACCCGGCCGAGCTG	240			
Query 397	CCGCCCTCGATCAACGAGGCGAAGGTGGTGGGCATCATCGACCACCACTGCTCGTGGGC	456			
Sbjct 241	CCGCCCTCGATCAACGAGGCGAAGGTGGTGGGCATCATCGACCACCACTGCTCGTGGGC	300			
Query 457	GGGATCAAGACCAAGTCCCCCATCGAGATCACCGTGCCTGGCTGGCTGCACCGCCACG	516			
Sbjct 301	GGGATCAAGACCAAGTCCCCCATCGAGATCACCGTGCCTGGCTGGCTGCACCGCCACG	360			
Query 517	ATCATGCACGACCTGATGGGAGAAGACCTCGCCCGCGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCC	576			
Sbjct 361	ATCATGCACGACCTGATGGGAGAAGACCTCGCCCGCGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCC	420			
Query 577	ATGCTCTCTGCACTCTCCGACACGCTGGAGTCCGCTCGCCACCAACGACGGCGCAT	636			
Sbjct 421	ATGCTCTCTGCACTCTCCGACACGCTGGAGTCCGCTCGCCACCAACGACGGCGCAT	480			
Query 637	GACCGGGCAGTGGCCGAGAAGCTGGCGGCCGATCTGGGCGTCGACATCCCGGCCCTTGGC	696			
Sbjct 481	GACCGGGCAGTGGCCGAGAAGCTGGCGGCCGATCTGGGCGTCGACATCCCGGCCCTTGGC	540			
Query 697	GCCGAGCTTCGCGCGGAAGTCGGATGCTCCGCCCTCTCCGATGCCGAGCTCTGCGC	756			
Sbjct 541	GCCGAGCTTCGCGCGGAAGTCGGATGCTCCGCCCTCTCCGATGCCGAGCTCTGCGC	600			
Query 757	ATGGAATCGAAGGAATACGAGATCGAGGGCAAGCAGTCCGCATCTCGGTGCTCGAGACC	816			
Sbjct 601	ATGGAATCGAAGGAATACGAGATCGAGGGCAAGCAGTCCGCATCTCGGTGCTCGAGACC	660			
Query 817	ACCGCGCCGCAAGTGTGCTCGACCGCAAGGCGAGCCTGATGGCCTCGATGCCCGGCGTG	876			
Sbjct 661	ACCGCGCCGCAAGTGTGCTCGACCGCAAGGCGAGCCTGATGGCCTCGATGCCCGGCGTG	720			
Query 877	GCGCANGAGGATGGCGCGGATCANGTGGTCTCTCACTCGTCGACATCTTGCAGGAA	936			
Sbjct 721	GCGCANGAGGATGGCGCGGATCANGTGGTCTCTCACTCGTCGACATCTTGCAGGAA	780			
Query 937	GCGACGCTGCTCGNGCCGAACGACCTCGNGAANACGCTGGGCGGAAAA 984				
Sbjct 781	GCGACGCTGCTCGNGCCGAACGACCTCGNGAANACGCTGGGCGGAAAA 827				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1692 bits(916)	0.0()	917/918(99%)	0/918(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 110	ATGATCAAGGTNTTCGGCCACAAGTCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	169			
Sbjct 1	ATGATCAAGGTATTTCGGCCACAAGTCCCCGACACCGACTCGACCGGCTCGCCCATCATC	60			
Query 170	TGGGCTTGGTATCTGACCGAGGTGAAGGGCACCCCGCAAGGCGGTCTCTCTGGGCGAG	229			
Sbjct 61	TGGGCTTGGTATCTGACCGAGGTGAAGGGCACCCCGCAAGGCGGTCTCTCTGGGCGAG	120			
Query 230	CCGAACACCGAAGCGGCTTCGTGCTGAAGCACTGGGATCTCGAGAAGCCCGAGATCATC	289			
Sbjct 121	CCGAACACCGAAGCGGCTTCGTGCTGAAGCACTGGGATCTCGAGAAGCCCGAGATCATC	180			
Query 290	TCGGACGTGACGGCCGACGACAGCTGCGTGATCGTTCGACACCAACAACCCGGCCGAGCTG	349			
Sbjct 181	TCGGACGTGACGGCCGACGACAGCTGCGTGATCGTTCGACACCAACAACCCGGCCGAGCTG	240			
Query 350	CCGCCCTCGATCAACGAGGCGAAGGTGGTGGGCATCATCGACCACCACTGCTCGTGGGC	409			
Sbjct 241	CCGCCCTCGATCAACGAGGCGAAGGTGGTGGGCATCATCGACCACCACTGCTCGTGGGC	300			
Query 410	GGGATCAAGACCAAGTCCCCCATCGAGATCACCGTGCCTGGCTGGCTGCACCGCCACG	469			
Sbjct 301	GGGATCAAGACCAAGTCCCCCATCGAGATCACCGTGCCTGGCTGGCTGCACCGCCACG	360			
Query 470	ATCATGCACGACCTGATGGGAGAAGACCTCGCCCGCGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCC	529			
Sbjct 361	ATCATGCACGACCTGATGGGAGAAGACCTCGCCCGCGCGCCGCGGGCATCAAGGGCGCC	420			
Query 530	ATGCTCTCTGCACTCTCCGACACGCTGGAGTCCGCTCGCCACCAACGACGGCGCAT	589			
Sbjct 421	ATGCTCTCTGCACTCTCCGACACGCTGGAGTCCGCTCGCCACCAACGACGGCGCAT	480			
Query 590	GACCGGGCAGTGGCCGAGAAGCTGGCGGCCGATCTGGGCGTCGACATCCCGGCCCTTGGC	649			
Sbjct 481	GACCGGGCAGTGGCCGAGAAGCTGGCGGCCGATCTGGGCGTCGACATCCCGGCCCTTGGC	540			
Query 650	GCCGAGCTTCGCGCGGAAGTCGGATGCTCCGCCCTCTCCGATGCCGAGCTCTGCGC	709			
Sbjct 541	GCCGAGCTTCGCGCGGAAGTCGGATGCTCCGCCCTCTCCGATGCCGAGCTCTGCGC	600			
Query 710	ATGGAATCGAAGGAATACGAGATCGAGGGCAAGCAGTCCGCATCTCGGTGCTCGAGACC	769			
Sbjct 601	ATGGAATCGAAGGAATACGAGATCGAGGGCAAGCAGTCCGCATCTCGGTGCTCGAGACC	660			
Query 770	ACCGCGCCGCAAGTGTGCTCGACCGCAAGGCGAGCCTGATGGCCTCGATGCCCGGCGTG	829			
Sbjct 661	ACCGCGCCGCAAGTGTGCTCGACCGCAAGGCGAGCCTGATGGCCTCGATGCCCGGCGTG	720			
Query 830	GCGCAGGAGGATGGCGCGGATCAGGTGGTCTCTCACTCGTCGACATCTTGCAGGAA	889			
Sbjct 721	GCGCAGGAGGATGGCGCGGATCAGGTGGTCTCTCACTCGTCGACATCTTGCAGGAA	780			
Query 890	GCGACGCTGCTCGTGGCCGAACGACCTCGTGAAGACGCTGGCGGAAAAGAGCTTCGGCGCG	949			
Sbjct 781	GCGACGCTGCTCGTGGCCGAACGACCTCGTGAAGACGCTGGCGGAAAAGAGCTTCGGCGCG	840			
Query 950	ACCGTCACCGGCGATACCGTCTGCTGCCGGGCGTCAAGAGCCGAAAGGAGAGATCA	1009			
Sbjct 841	ACCGTCACCGGCGATACCGTCTGCTGCCGGGCGTCAAGAGCCGAAAGGAGAGATCA	900			
Query 1010	CCGGTCTCAAGCTCTGA 1027				
Sbjct 901	CCGGTCTCAAGCTCTGA 918				

Fig. 11. Alineación de la secuencia reportada de *Rba. sphaeroides* (Subject) contra la secuencia obtenida (Query) del primer Forward (derecha) y reverse (izquierda).



En el caso de la sPPiasa de *R rubrum* la identidad fue del 100% con ambos primers, pero en la secuencia de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* hubo un error en la secuenciación al final de la secuencia corrida con el primer forward, y al inicio de la secuenciación con el primer revers, sin embargo, al comparar con el primer contrario, dicho error no existe. lo que no llevó a pensar que dicho error fue un artefacto de la secuenciación.

Al comprobar la correcta inserción y ausencia de mutaciones, se empezaron los ensayos de inducción con estas proteínas recombinantes.

## **18. Almacenamiento de cepas transformantes.**

Las colonias transformadas, con pJET+sPPiasas ó pBAD His B+ sPPasas, que fueron confirmadas con la digestión doble del inserto, se inocularon en 1 mL de LB+Ampicilina (50 µg/ml) incubando OVN a 37°C. A la mañana siguiente se le agregó 15% de glicerol (al 100%) puro y estéril; se mezcló suavemente por inversión; se alicuotaron en tubos de criogénesis y se guardó a -70°C.

## **19. Ensayo de inducción.**

Como lo sugiere el manual de plásmido pBAD His B, se hizo un primer ensayo de expresión para determinar la concentración de inductor que mayor rendimiento proporcione. Para ello se hizo lo siguiente:

- En 2 ml de medio LB+ampicilina (50 µg/ml) se inoculó 1 colonia de BL21+pBAD His B-sPPiasa *R. rubrum*, lo mismo se hizo con BL21+pBAD His B-sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Se incubó en OVN a 37 °C y en agitación constante (250 rpm)
- A la mañana siguiente se agregó 10 ml de medio LB+Ampicilina (50 µg/ml) a 10 tubos estériles. Se hicieron dos grupos de 5 tubos y en cada grupo se inocularon 0.1 ml del OVN. Se incubó a 37°C y agitación constante, hasta que llegaron a OD<sub>600</sub>≈0.5. En este punto se retiró 1 ml de cada muestra y se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se les nombró “punto 0”
- Se preparó una solución madre de Arabinosa al 10% y cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica mencionada se agregó el inductor como se muestra en la Tabla 13.
- Se creció a 37°C por 4 horas; se centrifugó el resto del cultivo a 16 000x g; se descartó el sobrenadante y se incubó 30 min a 4°C, en una Solución de

Lisis (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Imidazol 10 mM y lisozima 200 µg/ml), homogeneizando despacio y sin hacer burbujas.

- Las células homogeneizadas se rompieron por ultrasonido en un convertidor piezoeléctrico Branson (Sonifer 250), para evitar calentar las muestras, la sonicación se hizo en 3 series de 40 segundos por 1 minuto de descanso en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 16 000x g por 10 minutos a 4°C.
- Se colectaron los sobrenadantes, teniendo extremo cuidado de no levantar las pastillas. A estos sobrenadantes se les nombró Extracto crudo, y fueron utilizados para la purificación proteica.

sPPiasa	Tubo	Volumen agregado de Arabinosa al 10% (µl)	Concentración final de Arabinosa
BL21+pBAD His B-sPPiasa <i>Rba. sphaeroides</i>	1	0.02	0.00002%
	2	0.2	0.0002%
	3	2	0.002%
	4	20	0.02%
	5	200	0.2%
BL21+pBAD His B-sPPiasa <i>R. rubum</i>	6	0.02	0.00002%
	7	0.2	0.0002%
	8	2	0.002%
	9	20	0.02%
	10	200	0.2%

Tabla 13. Administración del inductor en el proceso de expresión.

## 20. Purificación de las sPPiasas.

Se tomaron todos los extractos crudos y se pasaron por una columna Ni-NTA Agarose (Qiagen).

- Con el objetivo de una mayor captación de sPPiasas los extractos crudos fueron pasados 3 veces por la columna, a lo que resultó de esto se llamó Lavado con proteína.
- Al terminar de pasar el extracto crudo por tercera vez se pasaron 10 ml de una solución de lavado (Tris-HCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM de Imidazol 20 mM).

- Para despegar las sPPiasas de la resina se paso 1 mL de una solución de elución (Tris-HCl 120 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM de Imidazol 200 mM), lo que se recolectó contenía la sPPiasa y se llamó Elusión.

Se tomaron todos los volúmenes de Extracto crudo, Lavado con proteína (fracción obtenida de pasar el extracto crudo por la columna de Níquel) y Elusión (Fracción que contiene la sPPiasa) después de salir de la columna, y se guardaron a -20°C para su posterior uso.

## **21. Cuantificación proteica de las sPPiasas**

Las muestras obtenidas de la purificación proteica fueron cuantificadas utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). y referenciada con una curva de Albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés).

## **22. Estimación de la masa molecular de las sPPiasas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico**

Con el fin de verificar el peso molecular de las sPPiasas recombinantes y comprobar visualmente su pureza se hizo un gel de Acrilamida desnaturalizante de dos fases. La primera fase "Gel separador" (12.5 % de Acrilamida) permitió separar las proteínas por su peso, y la segunda fase "Gel concentrador" (5% de Acrilamida), que como su nombre lo dice concentra las proteínas para su posterior migración diferencial.

El volumen agregado a cada pozo del gel, fue determinado basándose en la anterior cuantificación proteica, ajustando los volúmenes para obtener la misma concentración de proteína en cada pozo y a cada muestra se le agrego 5 µl de amortiguador de corrida. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD) a 100 V hasta que el amortiguador de corrida (TBE+glicerol) llegó al límite inferior del gel.

## 23. Determinación de la Actividad Hidrolítica de las sPPiasas.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en el medio descrito por Klemme y Gest (Klemme y Gest en 1971). El medio de reacción consistió en Tris-HCl 50 mM, pH 8.6, MgCL<sub>2</sub> 6 mM y PPI<sub>Na</sub> 4 mM. La reacción de Hidrólisis del PPI, se llevó a cabo en tubos de vidrio sumergidos en un baño de temperatura constante, fijada a 37°C. Para iniciar la reacción se agregó la enzima y se contaron 10 min para detener la reacción, agregando ácido tricloroacético (concentración final 6%) y se incubó en hielo por 10 min. Como control positivo se tenían muestras con 100 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a una concentración de 2.5 mM disueltos en 500 µL de H<sub>2</sub>O destilada, como control negativo se encontraban muestras con el medio de reacción a utilizar y se agregaba ácido tricloroacético, una vez homogeneizado se agregaba la muestra de sPPiasa correspondiente. Tanto el control positivo como el negativo, fueron sometidos a las mismas condiciones de tiempo, temperatura y exposición al vortex que las muestras problema.

Para cuantificar el fosfato hidrolizado se utilizó el método colorimétrico descrito por Sumner (Sumner, 1944). Aprovechando la formación de los complejos fosfomolibdicos de color amarillo que se dan en este metodo, se agrego p-metilaminofenol sulfato+ bisulfito de sodio que actua como substancia reductora y se forma fosfomolibdato de amonio, esta substancia tiñe de azul el medio y de esta manera se puede cuantificar mediante un lector ELISA la intensidad de la señal del complejo que es emitida a 656nm.

Para determinar la actividad de la enzima. se obtienen las densidades ópticas de los controles negativos y se les resta a cada muestra problema. La actividad total se calcula con la siguiente fórmula:

$$\frac{(250 \times \text{densidad óptica})}{\text{Tiempo de reacción}} = \text{nmol Pi} \cdot \text{min}^{-1}$$

La actividad total se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Actividad total}}{(\text{mg/ml de proteína}) (\mu\text{L utilizados})} = \mu\text{moles Pi} \cdot \text{mon}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}$$

Todos los experimentos se hicieron por triplicado biológico, con tres muestras por cada experimento de actividad, por lo que los resultados mostrados en las gráficas son un promedio de las repeticiones.

## **24. Caracterización Cinética de las sPPiasas.**

Se realizaron varias cuantificaciones de actividad hidrolítica con las sPPiasas, utilizando diferentes concentraciones de sPPiasa, diferentes tiempos de reacción, modificadores de la actividad enzimática como; NaF, Mg<sub>2+</sub> libre y PPI libre. Además, se modificó el pH del medio de reacción en un intervalo de 6 a 11 unidades de pH y se sustituyó el Mg<sub>2+</sub> del medio de reacción por; Mn<sub>2+</sub>, Co<sub>2+</sub> y Zn<sub>2+</sub>. Cada experimento se realizó tres veces, cada uno por triplicado, de manera que los resultados expresados en las gráficas son un promedio de las repeticiones hechas en cada experimento.

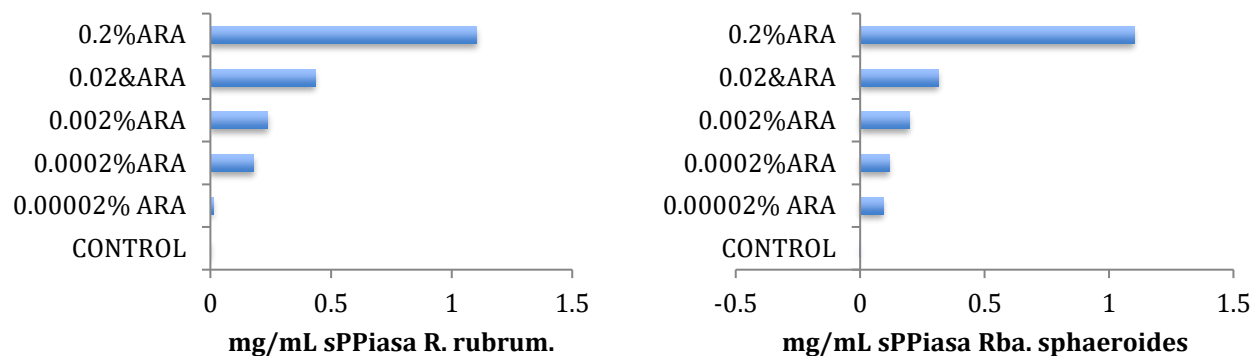
# **RESULTADOS**

## **1. Optimización de la concentración de Inductor en la expresión de las sPPiasas.**

Al utilizar un plásmido de inducción cuya tasa de expresión proteica depende de la concentración del inductor, se realizó un primer ensayo de expresión variando la concentración de Arabinosa según lo sugiere el manual del plásmido. En la gráfica 1 A y 1B se muestran los resultados de dicho ensayo. Como se puede observar los tratamientos control no presenta expresión, y en ambos casos, el tratamiento con 0.2% de Arabinosa presentan la mayor expresión, tanto para la sPPiasas de *R. rubrum*, como para *Rba. sphaeroides*.

A)

B)



Gráfica 1. A) Concentración de sPPiase de *R. rubrum* contra la concentración de Arabinosa. B) Concentración de sPPiase de *Rba. sphaeroides* contra la concentración de Arabinosa.

Una vez cuantificada la concentración de proteína, se procedió a correr un gel de Acrilamida para comprobar visualmente la pureza de las sPPiases (Fig 12), mostrando que la concentración de sPPiases efectivamente aumenta conforme se agrega más inductor, y además que solo la sPPiase es expresada en cada caso, obteniéndose fracciones muy puras tanto para *R. rubrum* como para *Rba. sphaeroides*.

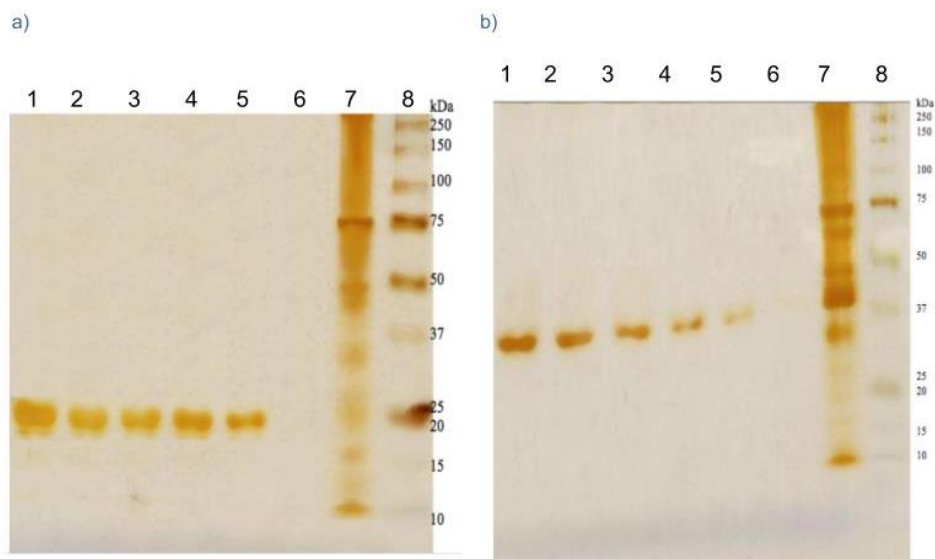


Figura 12. Geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes teñidos con plata. a) Sobreexpresión de la sPPiase de *Rba. sphaeroides*; b) Sobreexpresión de la sPPiase de *R. rubrum*. Para ambos geles: Carril 1 (de derecha a izquierda)- Marcador de peso molecular All Blue, Carril 2; Extracto crudo de BI21 transformada, Carril 3; Lavado de columna, Carril 4; 0.00002% de Arabinosa, Carril 5; 0.0002% de Arabinosa, Carril 6; 0.002% de Arabinosa, Carril 7; 0.02% de Arabinosa, Carril 8; 0.2% de Arabinosa

Los primeros ensayos de expresión arrojaron resultados similares para ambas sPPiasas, por eso se escogió inducir los cultivos de BL21 de ahora en adelante con 0.2% de Arabinosa y seguir el protocolo antes mencionado.

## 2. Sobre expresión de las sPPiasas.

Se indujeron 200 ml de BL21+pBAD His B+ sPPiasa *R. rubrum* y BL21+pBAD His B+ sPPiasa *Rba. sphaeroides*. Se cuantificó la concentración de proteína y se midió actividad. Asimismo se corrió un gel de Acrilamida para corroborar visualmente la pureza de las eluciones. Con los datos de la cuantificación proteica y la medición de Actividad hidrolítica se realizó la tabla de purificación de las sPPiasas (Tabla 15). En esta purificación se puede observar que se obtuvo más sPPiasa de *R. rubrum* (2.12 mg) que de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* (1.25 mg), sin embargo la actividad específica de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* ( 789.3  $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ ) es superior a la sPPiasa de *R. rubrum* (30.58  $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ ) por poco más de un orden de magnitud. En el caso del rendimiento y veces de purificación, la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* es superior a la sPPiasa de *R. rubrum*.

Paso de purificación	Volumen	Proteína total		a	b	Rendimiento	Purificación (No. De veces)
		mg/ml	%				
<b>sPPiasa <i>Rba. Sphaeroides</i></b>							
Extracto crudo	9,45	5,8	100	893,92	3.2	100	1
Elusión	1	1,25	21.55	19.95	789.3	2.23	246.6
<b>sPPiasa <i>R.rubrum</i></b>							
Extracto crudo	10,65	5,33	100	865,49	3.08	100	1
Elusión	1	2.12	20,63	5.96	30.58	0.68	9.92

**Tabla 15. Tabla de purificación de las sPPiasas *Rba. Sphaeroides* y *R. rubrum*. a= Actividad total (nmol Pi $\cdot$ min $^{-1}$ ) , b= Actividad específica ( $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ )**

Además, se corrió un gel desnaturalizante de acrilamida (Fig. 9). En este gel se corrieron la muestra de obtenida tras pasar el extracto crudo por la columna de Níquel y las soluciones que contienen las sPPiasas, se tiñó por plata, y se ve claramente como ambas sPPiasas están totalmente puras y expresadas en gran cantidad, esto se afirma basándonos en que la tinción de plata es una técnica muy sensible capaz de detectar de 0.5 ng de proteína. Tras calcular los pesos

moleculares (Detalles en Anexo 4) se determinó que el monómero de la sPPiasa de *R. rubrum* pesa 23 kDa, aunque el peso reportado por Celis, et. al. 2002 es de 20 kDa, se atribuye los 3 kDa extras al oligomero que le agrega el plásmido (cola de histidinas) para facilitar su purificación. En el caso de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* pesa 35 kDa, contrario a lo que publico Celis et, al, 2003 en donde se menciona que el dimero pesa 32.5 kDa, sin embargo, como en el caso de la sPPiasa, en cuando se le restan los 3 kDa que agrega el plásmido queda un peso aproximado de 32 kDa. Para ambas sPPiasas se descarta el aumento de peso causado por mutaciones o inserción de bases, ya que la secuenciación en ambas direcciones comprueba que la secuencia de aminoácidos está correcta.

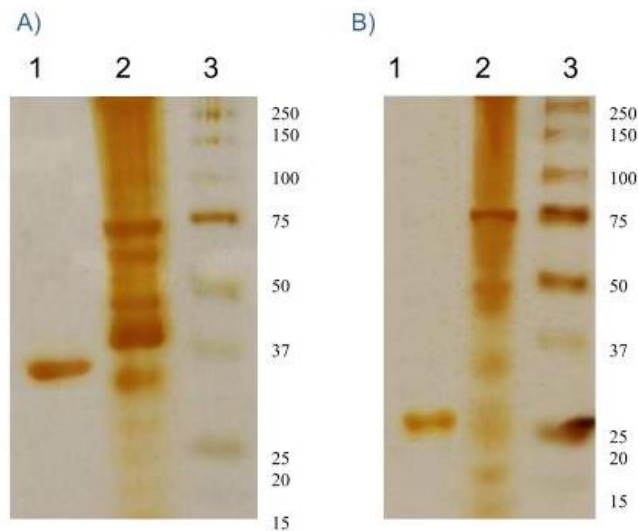


Fig. 9. Gel desnaturalizante de Acrilamida al 12.5% con SDS 1% , teñido con plata. A) sPPiasa de *R. rubrum*. Carril 1 (De izquierda a derecha): Elusión de sPPiasa de *R. rubrum*, Carril 2: Lavado con proteínas, Carril 3: Marcador de peso molecular. B) sPPiasa de *Rba. sphaeroides*. Carril 1 (De izquierda a derecha): Elusión de sPPiasa de *Rba. sphaeroides*, Carril 2: Lavado con proteínas, Carril 3: Marcador de peso molecular.

### 3. Caracterización cinética de las sPPiasas.

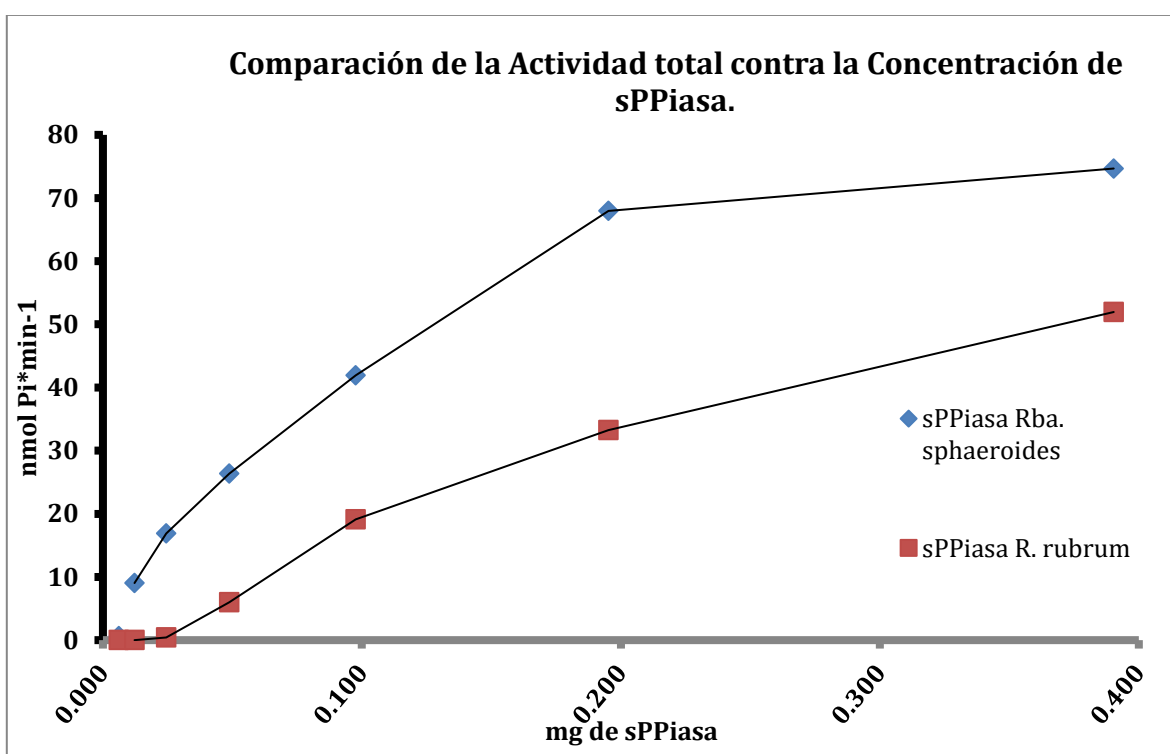
#### a. Determinación de la concentración de sPPiasa a usar.

Una característica de las proteínas recombinantes es que se obtienen grandes cantidades de proteína, sin embargo la actividad hidrolítica de las proteínas puede verse modificada por la concentración proteica (Abdul, et. al. 2014), por lo que se realizó un experimento de determinación de la concentración proteica ideal (Gráfica 2). Cuando se revisó la cuantificación proteica de las sPPiasas, se notó que había



diferencias en la concentración que se obtuvo de la purificación, sin embargo, para este experimento se igualaron concentraciones aunque los volúmenes de muestra fueran diferentes.

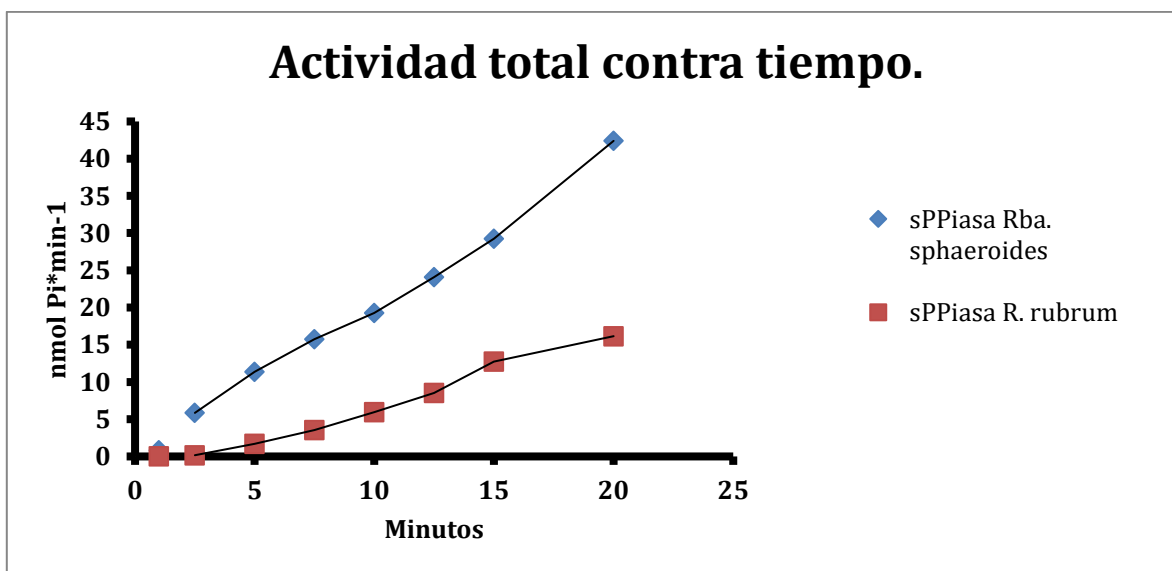
En la gráfica 2 se puede ver que la actividad total de ambas sPPiasas es diferente, aunque poseen un comportamiento similar. De todas las concentraciones utilizadas, se decidió escoger la concentración que tuviera alrededor de  $\frac{1}{4}$  parte de la actividad total máxima, con el fin de poder monitorear futuros cambios de actividad, ya que, cuando se trabaja con la actividad total máxima, los cambios son más difíciles de detectar. Siguiendo este razonamiento se decidió trabajar con  $0.024 \mu\text{g} / \text{ml}$  para la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* y  $0.195 \mu\text{g}/\text{ml}$  con la sPPiasa de *R. rubrum*.



Graf. 2. Determinación de la concentración de sPPiasa a usar en la caracterización cinética. Ensayo de Actividad Hidrolítica realizado con Tris-HCl 50 mM (pH8);  $\text{MgCl}_2$  3mM;  $\text{NaPPi}_4$  2 mM; a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min. Se gráfico la Actividad específica ( $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína) contra las diferentes concentraciones de sPPiasa utilizadas; en cuadrados se encuentra la sPPiasa de *R. rubrum* y en rombos la sPPiasa de *Rba. sphaeroides*. Las concentraciones usadas fueron disminuidas a razón de  $\frac{1}{2}$  de la concentración mayor en ambas sPPiasas.

## b. Actividad Hidrolítica a diferentes tiempos.

La actividad hidrolítica de las sPPiasas fue monitoreada a diferentes tiempos, como se puede ver en la gráfica 3 ambas proteínas tienen un comportamiento similar a través del tiempo aunque la actividad total de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* es visiblemente mayor a la de *R. rubrum* en cualquier punto del eje de las x. Además, a diferencia de la sPPiasa de *R. rubrum*, desde 1 minuto, la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* ya presenta actividad. Al observar este comportamiento, se decidió que el tiempo de reacción sería 10 min.

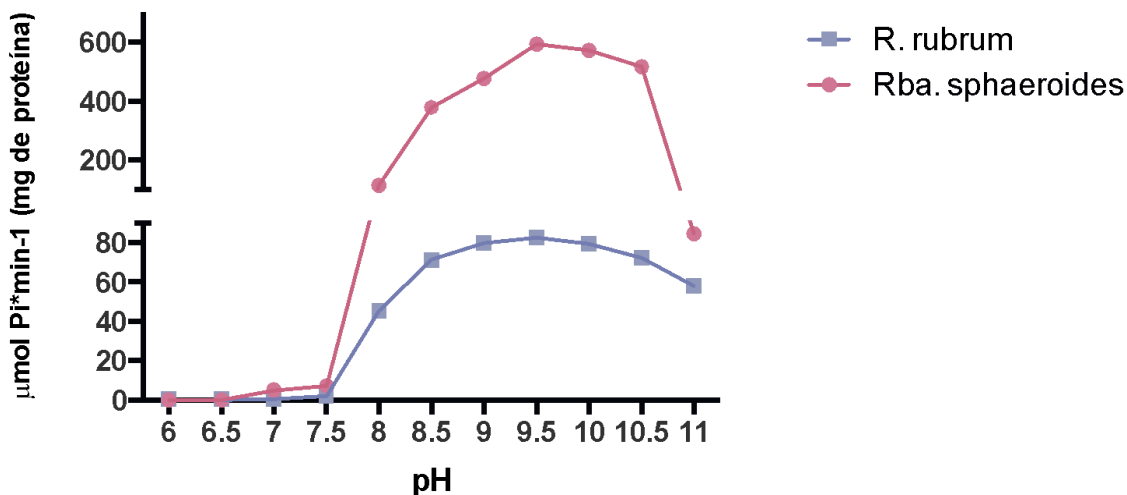


Graf. 3. Determinación del tiempo de reacción de las sPPiasas. El ensayo de Actividad Hidrolítica consistió en: Tris-HCl 50 mM (pH 8); MgCl<sub>2</sub> 3 mM; NaPPi<sub>4</sub> 2 mM; 0.024 µg/ml para la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* y 0.195 µg/ml con la sPPiasa de *R. rubrum*; a 37°C por tiempo variable. Se gráfico la Actividad específica (µmol Pi\*min<sup>-1</sup>\*mg de proteína) contra los diferentes tiempos especificados en el eje de las X. En cuadrados se encuentra la sPPiasa de *R. rubrum* y en rombos la sPPiasa de *Rba. sphaeroides*.

## c. Actividad Hidrolítica con diferente pH.

Se procedió a variar el pH del medio de reacción y se observaron los cambios en la actividad hidrolítica. En la gráfica 4 se puede observar que ambas proteínas presentan actividad a partir de un pH básico de 8, en pH ácido y neutro su actividad específica y total es igual a 0. Viendo el comportamiento de ambas proteínas se puede notar que la sPPiasa de *R. rubrum* tiene un aumento de actividad más discreto y uniforme, mientras que la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* presenta un pico más cerrado, lo que no evita que el máximo de actividad para ambas proteínas se

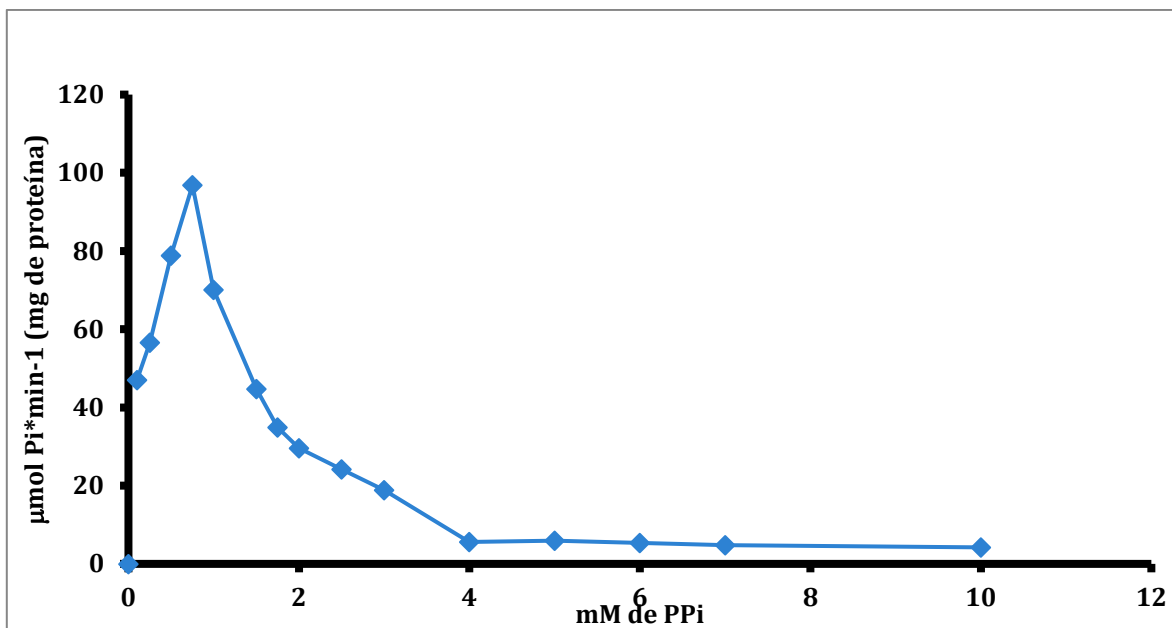
encuentre en 9.5 de pH (9.23  $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg sPPi}$ asa *R. rubrum* y 171.95  $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg sPPi}$ asa *Rba. sphaeroides*). Este hallazgo llevó a decidir que el pH del medio de reacción de los siguientes experimentos sería fijado en 9.5.



Graf. 4. Determinación del pH de reacción óptimo de las sPPiase. El ensayo de Actividad Hidrolítica consistió en: Tris-Maleico 50 mM (pH variable);  $\text{MgCl}_2$  3mM;  $\text{NaPPi}_4$  2mM; 0.024  $\mu\text{g /ml}$  para la sPPiase de *Rba. sphaeroides* y 0.195  $\mu\text{g/ml}$  con la sPPiase de *R. rubrum*; a 37°C por 10 min. Se gráfico la Actividad específica ( $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}$ ) contra los diferentes pH especificados en el eje de las X. En cuadrados se encuentra la sPPiase de *R. rubrum* y en círculos la sPPiase de *Rba. sphaeroides*.

#### d. Actividad Hidrolítica en ausencia de cationes divalentes.

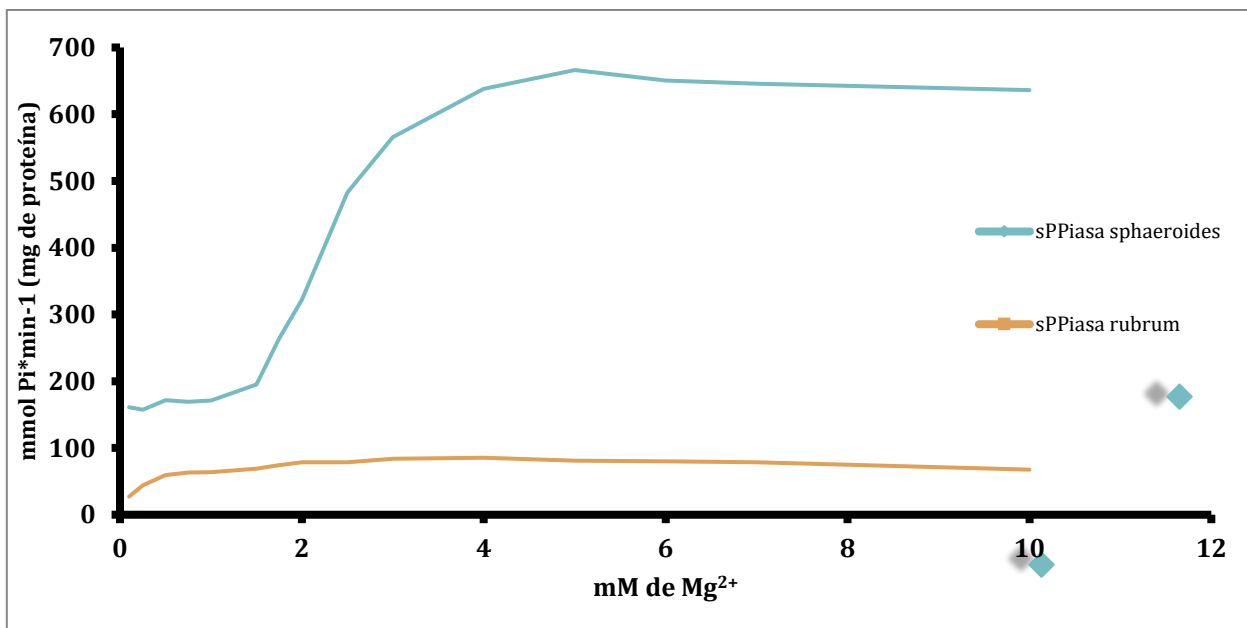
En trabajos previos se observó que las sPPiase de Familia II (*Rba. sphaeroides*) presentan actividad en ausencia de cationes divalentes (Sarmina et. al., 2017). Sin embargo dichos experimentos fueron realizados a una concentración fija de PPI (2mM), en este trabajo se planteó ver el comportamiento de actividad hidrolítica con diferentes concentraciones de PPI (Gráfica 5). Al variar la concentración de PPI de 0 a 10 mM, se observa que en cantidades menores a 0.75 mM la actividad específica va en aumento, teniendo un pico de actividad en 0.75 mM (98.8  $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ ) y al seguir aumentando la concentración se observa un decrecimiento en la actividad, inhibiendo completamente en 10 mM, se hace hincapié en que estos experimentos fueron hechos en ausencia de cualquier catión divalente, los mismos experimentos se hicieron con la sPPiase de *R. rubrum*, sin embargo, no se observó actividad (Datos no mostrados).



Gráfica 5. Actividad hidrolítica de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* con diferentes concentraciones de PPI. Condiciones de la reacción: Tris-Maleico 50 mM (pH 9.5);  $\text{NaPPi}_4$  variable; 0.024  $\mu\text{g/ml}$  para la sPPiase de *Rba. sphaeroides* y 0.195  $\mu\text{g/ml}$  con la sPPiase de *R. rubrum*; a 37°C por 10 min.

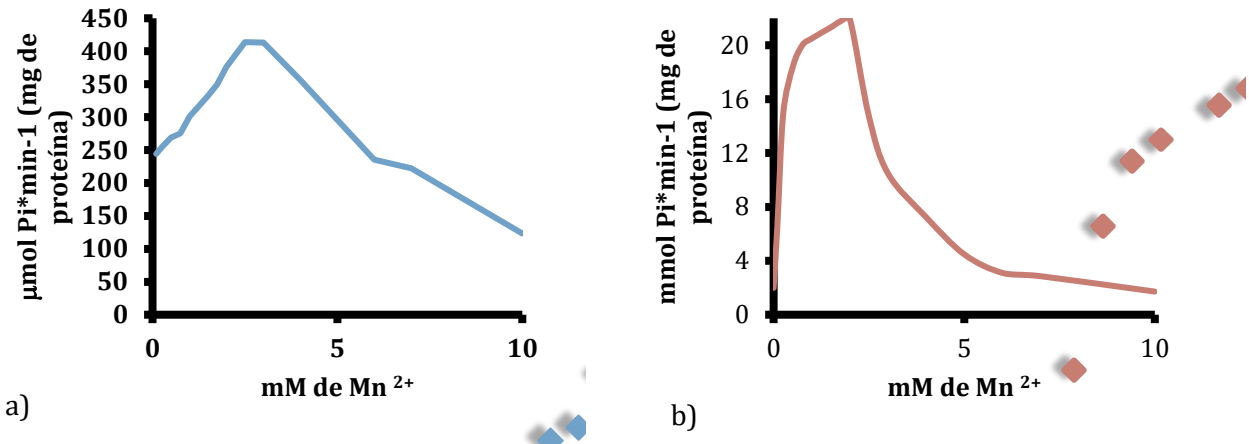
#### e. Requerimiento de cationes divalentes como co-sustrato.

Se varió la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  desde 0mM hasta 10 mM y se midió la actividad hidrolítica de las sPPiasas, observando que no hay actividad sin catión en la sPPiase de *R. rubrum*, sin embargo la sPPiase de *Rba. sphaeroides* presenta actividad sin catión, concordando con el estudio hecho por Sarmina et. al. en el 2017 y como se mostró anteriormente en este trabajo. Cabe destacar que en cualquier punto de la gráfica la actividad específica de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* es superior a la exhibida por la sPPiase de *R. rubrum*. Otro dato a resaltar es el tipo de comportamiento que exhiben ambas sPPiasas, mientras que la sPPiase de *R. rubrum* presenta una curva hiperbólica, con cinética tipo Michaelis-menten, la sPPiase de *Rba. sphaeroides* presenta un comportamiento sigmoideo, evidenciando un efecto alostérico en donde la unión de un  $\text{Mg}^{2+}$  ajeno al sitio activo influye en la unión del sustrato (Mg-PPi). Gran cantidad de trabajos han probado que la sPPiase parcialmente purificada de *R. rubrum* tienen mayor actividad hidrolítica cuando el PPI está asociado con  $\text{Mg}^{2+}$  y la sPPiase *Rba. sphaeroides* con  $\text{Mn}^{2+}$ . Lo anterior se confirma al ver las Gráficas 6 y 7.



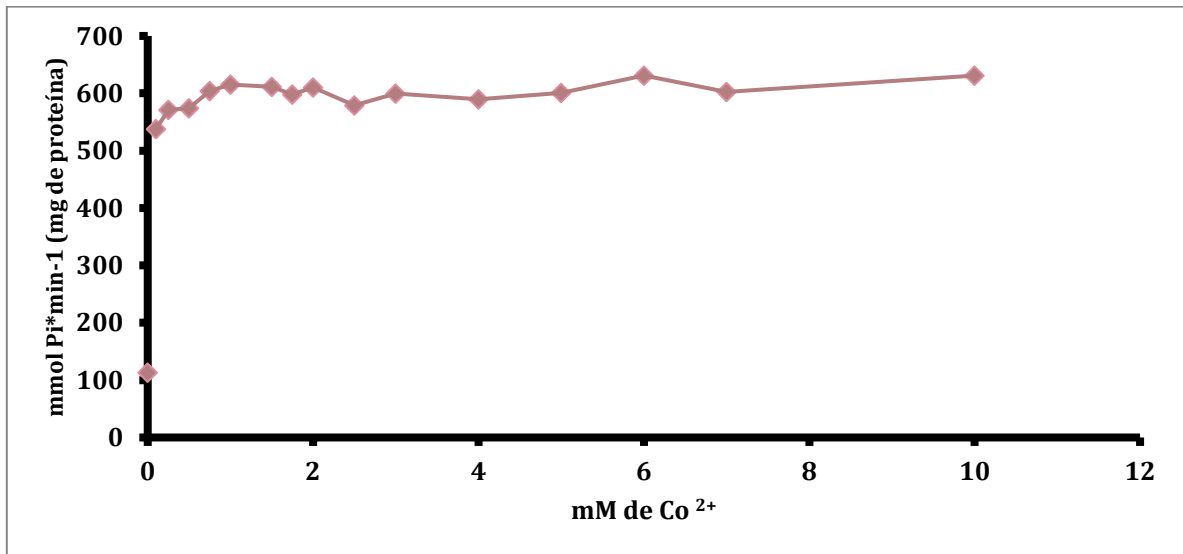
Gráfica 6. Actividad hidrolítica de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* y *R. rubrum* con diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup>. Condiciones de la reacción: Tris-Maleico 50 mM (pH 9.5); NaPPi<sub>4</sub> 2 mM; 0.024 µg /ml para la sPPiase de *Rba. sphaeroides* y 0.195 µg/ml con la sPPiase de *R. rubrum*; a 37°C por 10 min. Se gráfico la Actividad específica (µmol Pi\*min<sup>-1</sup>\*mg de proteína) contra las diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> especificadas en el eje de las X. En cuadrados se encuentra la sPPiase de *R. rubrum* y en rombos la sPPiase de *Rba. sphaeroides*.

Al variar los cationes divalentes se observó que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* presenta más plasticidad que la sPPiase de *R. rubrum*, ya que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* presenta actividad con Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y un poco con Zn<sup>2+</sup>, sin embargo la sPPiase de *R. rubrum* solo presenta actividad con Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>. cabe destacar que la actividad con Mn<sup>2+</sup> aumenta brutalmente desde 0.1 mM, y va en aumento hasta que tiene una caída brusca en 4 mM, lo que podría hablarnos de una inhibición por Mn<sup>2+</sup>, al grado que, con 10 mM la actividad de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* es prácticamente 0.



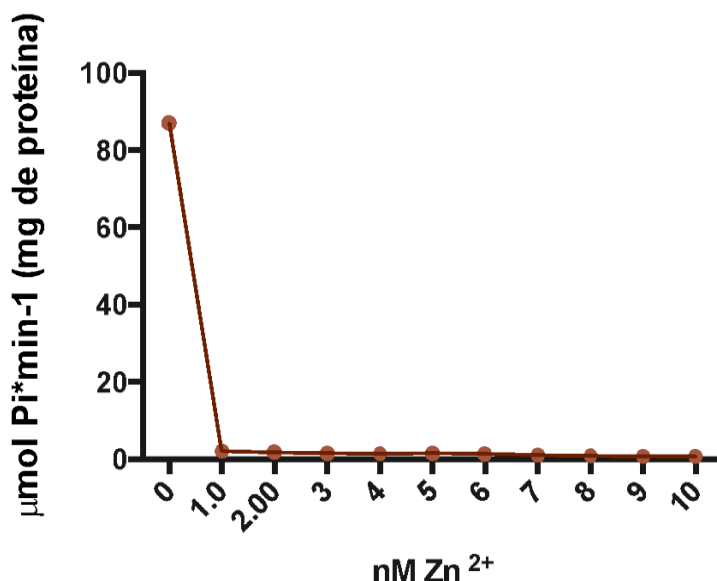
Grafica 7. Actividad hidrolítica de la sPPiase de a) *Rba. sphaeroides* y b) *R. rubrum* con diferentes concentraciones de  $Mn^{2+}$ . Condiciones de la reacción: Tris-Maleico 50 mM (pH 9.5);  $\text{NaPPi}_4$  2 mM;  $Mn^{2+}$  variable, 0.024  $\mu\text{g/ml}$  sPPiase de *Rba. sphaeroides*. La reacción se llevo a cabo a 37°C por 10 min.

Al realizar los ensayos de actividad enzimática con Cobalto  $2^+$ , se observó una activación inmediata sin ninguna clase de inhibición, pues a 10 mM, la actividad aún se mantiene en su máximo, aunque cabría la posibilidad de que al seguir aumentando la concentración de  $\text{Co}^{2+}$ , se pudiera observar una inhibición. La gráfica evidencia un comportamiento michaeliano, por sí sola, sin embargo mediciones intermedias entre 0 y 0.1 mM permitirían ver si realmente la sPPiase de *Rba. sphaeroides* tiene un comportamiento michaeliano o sigmoidal.



Gráfica 8. Actividad hidrolítica de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* con diferentes concentraciones de  $\text{Co}^{2+}$ . Condiciones de la reacción: Tris-Maleico 50 mM (pH 9.5);  $\text{NaPPi}_4$  2 mM;  $\text{Co}^{2+}$  variable, 0.024  $\mu\text{g/ml}$  sPPiase de *Rba. sphaeroides*. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 10 min.

Cuando se realizó los ensayos de actividad con el  $Zn^{2+}$ , la actividad basal sin catión que posee la sPPiase de *Rba. sphaeroides* (que suele ser la más baja) decayó a poco más de la mitad en presencia de 0.1 mM de  $Zn^{2+}$ , pero ni en concentraciones de 10 mM, la actividad decayó totalmente como en el caso del  $Mn^{2+}$  10 mM mostrando un fenómeno interesante de estudiar.



Gráfica 9. Actividad hidrolítica de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* con diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ . Condiciones de la reacción: Tris-Maleico 50 mM (pH 9.5);  $NaPPi_4$  2 mM;  $Zn^{2+}$  variable, 0.024  $\mu\text{g}$  /ml sPPiase de *Rba. sphaeroides*. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 10 min.

## DISCUSIÓN.

Las PPiasas inorgánicas citoplasmáticas se encargan de catalizar la hidrólisis del PPI, producto de numerosas reacciones metabólicas, que de no ser hidrolizadas provocan concentraciones insostenibles de PPI, que comprometerían el equilibrio metabólico orientado hacia los productos en las reacciones químicas, llevando a la muerte celular (Serrano-Bueno, et. al., 2013). Además se ha observado que en organismos que poseen sPPiasas y PPiasas de membrana, el mayor efecto se observa al bloquear la expresión de las PPiasas citoplasmáticas (Pérez-Castineira et. al., 2002), evidenciando el papel fundamental que esta proteína tienen en la homeostasis celular. De manera que, no es raro que la evolución haya convergido en dos sPPiasas completamente diferentes que llevan a cabo la misma reacción química pese a solo compartir el 1% de su secuencia de aminoácidos.

Pero dicho esto, ¿cómo dos proteínas tan diferentes pueden llevar a cabo la misma reacción?, esa es una pregunta que aún falta resolver en el mundo de la bioenergética. Por años se han investigado muchas sPPiasas de ambas familias provenientes de muchos organismos y se han hecho consensos de lo que caracteriza a cada Familia, así mismo se han cristalizado sPPiasas y se han buscado similitudes en estructuras, pero la pregunta sigue sin contestarse.

Aunado a este problema, las investigaciones basadas en las sPPiasas de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides* fueron hechas utilizando enzimas parcialmente purificadas, lo que puede significar la obtención de datos inválidos debido al ruido que generan componentes extraños en la muestra. Aunque la literatura no tiene casos explícitos que reporten las diferencias entre la cinética obtenida de una proteína parcialmente purificada y una totalmente pura, podría ponerse por ejemplo el caso de la subunidad  $\epsilon$  de la ATPasa de *E. coli*, la cual, en el primer estudio hecho por Futai en 1974, con una purificación parcial, fue omitida su función inhibitoria (Futai, et. al, 1974). No fue hasta el 2018 con estudios in vitro que se ha demostrado que la subunidad  $\epsilon$  tiene un papel inhibitorio en la actividad de ATPasa de varias enzimas bacterianas (Zarco-Zavala, et. al., 2018).

Antes la obtención de una proteína totalmente pura era un objetivo casi irreal, debido a la dificultad de encontrar un método que aprovechara al máximo las diferencias físicas y químicas que la proteína de interés tuviera con el resto, y así excluir a todas las proteínas ajenas de la proteína deseada. Pero con todos los años de diferencia que separan a los estudios cinéticos hechos en las sPPiasas de *R. rubrum* y *Rba sphaeroides* de la actualidad, se puede decir que la ciencia ha avanzado a un ritmo muy favorable para los fines de este trabajo gracias a las técnicas de biología molecular.

La biología molecular es una herramienta que en las últimas décadas ha venido a revolucionar la forma en la que se hace investigación básica y aplicada. Gracias a diversas técnicas como las proteínas recombinantes, que permite una producción superior a la que naturalmente se da en el organismo de origen, además la unión a anticuerpos o colas de Histidina facilita la purificación, haciendo los tiempos de obtención de proteínas puras mucho más cortos y aumentando la cantidad de proteína por 2 o 3 órdenes de magnitud con volúmenes más pequeños. Desde su invención, las técnicas de recombinación genética han permitido salvar muchas vidas por su aplicación en vacunas y producción de insulina, sin embargo, el mayor uso se encuentra en la ciencia básica, como en el caso de este trabajo, donde se



utilizó para dilucidar las características cinéticas de una sPPiasa pura, que se piensa difieren de una sPPiasa parcialmente purificada.

Muchos años y muchos trabajos han permitido un amplio conocimiento de la cinética de las sPPiasas de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*, sin embargo, todos los trabajos publicados han sido realizados en sPPiasas parcialmente purificadas, hasta ahora. En los trabajos clásicos el método de purificación de las sPPiasas era uno de los puntos claves a la hora de clasificar las sPPiasas por familias (Familia I y Familia II), lo que ahora no es un problema con las proteínas recombinantes, ya que el protocolo de purificación va mediado por la unión de una cola de Histidina a una resina de Níquel, que fue unida de igual manera en ambas sPPiasas. Sin embargo, en este trabajo se tuvo que enfrentar el problema de estandarizar el protocolo de sobreexpresión, al grado que la proteína producida por *E. coli* recombinantes fuera abundante y totalmente pura.

Se decidió utilizar los mismos plásmidos de mantenimiento y de expresión, por lo que se esperaba que la expresión de ambas sPPiasas fuera muy similar. Hipótesis que fue cumplida, pues ambas sPPiasas tuvieron su mayor expresión al utilizar 0.2% del inductor (Arabinosa). Así mismo se comprobó por tinción de plata de geles SDS la pureza de las proteínas inducidas, dando como resultado su total pureza.

Con el fin de corroborar la integridad de los monómeros procedió a calcular los pesos moleculares, que en el caso de *R. rubrum* concordó perfectamente con el reportado por Romero, et. al. en el 2003, después de restarle los 3 kDa que añade el plásmido al unir la cola de Histidinas. Con la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* fue un caso similar, pues en el trabajo de Celis, et. al. en el 2003 reportaron un peso de 32.5 kDa, y el peso reportado en este trabajo es de 35 kDa, que restando los 3 kDa de la cola de Histidinas queda un peso aproximado de 32 kDa. La diferencia mínima de 0.5 kDa podría deberse a un artefacto del trabajo actual o un error del trabajo anterior, sin embargo, dada la pequeña diferencia se puede decir que el peso de la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* también concuerda con los estudios antes reportados. Apoyando a la idea de que el peso reportado en este trabajo es el correcto, se encuentra la secuenciación bidireccional realizada durante el proceso de clonación, donde se corroboró que la secuencia insertada era exactamente la misma que la reportada para las sPPiasas de las cepas de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides* utilizadas (Datos mostrados en métodos).

Al analizar la tabla de purificación de ambas sPPiasas, se puede ver que en ambos casos se obtuvo el ~20% del porcentaje total de proteína en las diluciones de las sPPiasas, a su vez la sPPiasa de *Rba. sphaeroides* resento 246 veces de

purificación y la sPPiase de *R. rubrum* 10 veces de purificación. Aunque al ver los geles se puede decir que ambas sPPiases están totalmente puras, hay que recordar que para obtener las veces de purificación se debe de dividir la actividad específica de cada paso de purificación por la obtenida en el extracto crudo, tras hacer esto, cabe destacar que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* difiere enormemente a la actividad específica de la sPPiase de *R. rubrum* por poco más de un orden de magnitud (789.3  $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  para la sPPiase de *Rba. sphaeroides* y 30. 58  $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  para la sPPiase de *R. rubrum*) dando como resultado la gran diferencia en las veces de purificación aunque el porcentaje de sPPiase obtenida es similar.

Tras corroborar la integridad de las proteínas de interés se procedió a estandarizar la concentración de proteína que sería utilizada en los experimentos, dado que las proteínas recombinantes se obtienen en grandes cantidades y basándonos en experimentos previos, vimos que al agregar 10  $\mu\text{l}$  de la elusión de sPPiases, se sobrepasaba el límite del método impidiendo ver cambios en los diferentes tratamientos (Datos no mostrados), tras realizar diferentes diluciones de sPPiase se llegó a la concentración óptima en la que los cambios eran claramente vistos (Gráfica 2).

Se notaron diversas variaciones cinéticas al comparar los datos obtenidos en este trabajo con los reportados anteriormente (Romero et. al., 2003 y Celis et. al., 2003), por ejemplo, en el caso del pH, se determinó que el pH óptimo para ambas sPPiases, es 9.5 utilizando un amortiguador de Tris-Maleico, sin embargo en estudios anteriores realizados con pirofosfatasas parcialmente purificadas se encontró que, en el caso de *R. rubrum* cuando se lleva a cabo la reacción en un buffer de Tris-HCl con  $\text{Mg}^{2+}/\text{PPi}$  a un ratio de 1.5 la actividad específica con un pH de 9.5 es de  $\sim 70 \mu\text{moles Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$  y en el caso de pH 8.6 es de  $80 \mu\text{moles Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$  (Klemme y Gest, 1971). mostrando que en el caso de las proteínas parcialmente purificada el pH óptimo es diferente al obtenido en la purificación por proteínas recombinantes. Además se observó que la actividad de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* tiene un claro pico de actividad a 9.5, sin embargo la sPPiase de *Rba. sphaeroides* tiene cambios de actividad más sutiles en el intervalo de pH de 8.5 a 10.5, esto podría reflejar una mayor tolerancia a cambios de pH, y en el caso de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* se puede especular que al tener un claro pico de actividad máxima a 9.5, el pH podría fungir como un fuerte regulador de la actividad enzimática en el ambiente celular.

En la caracterización clásica de las sPPiases de *Rba. sphaeroides* y *R. rubrum* se probaron diferentes cationes divalentes que al unirse al PPi forman el sustrato de

las pirofosfatasa. En la literatura se mencionaba que la enzima debe tener un catión divalente como parte de su sustrato para que dicho catión apantalle las cargas del PPI y le permita entrar al sitio activo de la enzima. Sin embargo, confirmando lo observado en Sarmina, et. al. 2017, la sPPiase de *Rba. sphaeroides* tiene actividad en ausencia de cationes divalentes. Entre las cosas que saltan a la vista es que hay un pico de actividad a 0.75 mM de PPI, que cae para inhibir completamente a la enzima, cuando se realizó el ensayo de activación a 2 mM de NaPPI, concentración estándar para los ensayos de actividad, se puede ver que sin cationes la actividad enzimática está disminuida en un 70% con respecto a la que se observa con 0.75 mM de NaPPI planteando la idea de que los cationes tienen un efecto protector ante concentraciones altas de PPI.

Cuando se midió la actividad enzimática de ambas sPPiases con diferentes cationes se observaron comportamientos interesantes, por ejemplo, el efecto de  $Mg^{2+}$  en la sPPiase de *R. rubrum* fue concordante con lo antes reportado por Klemme y Gest, 1971, sin embargo en el caso del  $Mg^{2+}$ , hay una clara diferencia de comportamiento, mientras que la sPPiase de *R. rubrum* tiene un comportamiento Michaeliano, la sPPiase de *Rba. sphaeroides* exhibe un comportamiento sigmoideo, hablando de un efecto alosterico o cooperativo del  $Mg^{2+}$ , dicho fenómeno no se había reportado con anterioridad en caracterizaciones de sPPiases parcialmente purificadas, dando fundamentos para proponer que el estudio de las enzimas puras exhibe propiedades antes ignoradas. La actividad hidrolítica comienza en niveles basales, siendo muy similar a la observada sin catión, hasta que el  $Mg^{2+}$  alcanza la concentración de 1.5 mM, a partir de aquí la concentración umbral es de 1.75 - 2.5 para después triplicar su actividad, este aumento de actividad coincide con sobrepasar la concentración 1:1 de  $Mg^{2+}$ -PPI.

El efecto alostérico del  $Mg^{2+}$  en la sPPiase de *Rba. sphaeroides* resulta interesante, si se recuerda que la proteína nativa es un dímero cuyo sitio activo se encuentra en medio de ambos monómeros, en las pirofosfatasa inorgánica de levadura se reportó que se necesitan 3  $Mg^{2+}$  por sitio activo (Cooperman, 1982) y que dentro del sitio activo se repartían en dos sitios de unión, si nos guiamos por el trabajo de Cooperman, podríamos decir que además de esos tres  $Mg^{2+}$  en el sitio activo se requeriría otro  $Mg^{2+}$  en otro sitio fuera del sitio activo, el cual es el responsable del efecto alostérico observado en la gráfica 6. Anteriormente se habían observado comportamientos similares en sPPiases de la Familia II, en un subtipo especial llamado CBS-Pasas, debido a que en su estructura contienen un dominio CBS, que se caracteriza por beta-alfa-beta-beta-alfa que se pliega en una estructura terciaria globular, conteniendo una lámina  $\beta$  antiparalela de tres cadenas con dos hélices  $\alpha$  en un lado. Abriendo la posibilidad de que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* sea reclasificada, sin embargo dicha afirmación sería elegantemente probada realizando un cristal de la proteína, además de experimentos de confirmación, ya

que se sabe que las proteínas CBS-PPiases son las únicas PPiases que están reguladas por un mecanismo universal bien establecido basado en la unión de nucleótidos de adenina a los dominios CBS auxiliares. El AMP y el ADP inhiben, mientras que el ATP activa.

Anteriormente se había determinado que la familia II de sPPiases, como la presente en *Rba. sphaeroides*, además del  $Mg^{2+}$  necesitaban la presencia de metales de transición como  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  para alcanzar su velocidad máxima a diferencia de la Familia I que con el  $Mg^{2+}$  alcanza su máxima actividad. Sin embargo, en este trabajo decidimos probar el efecto de sustituir al  $Mg^{2+}$ , por  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , como único catión divalente, con la premisa de que el sustrato verdadero (complejo Mg-PPi) sería sustituido por el complejo MnPPi, ZnPPi o CoPPi. Cuando se realizó el ensayo de actividad se observó que el  $Mn^{2+}$  en la sPPiase de *Rba. sphaeroides*, desde concentraciones bajas (0.1-1.75 mM) muestra una mayor actividad si se compara con la observada con Mg, sin embargo, en 2 mM de  $Mn^{2+}$ , la actividad es muy similar a la obtenida con  $Mg^{2+}$ , para mantenerse o bajar a diferencia de el efecto sigmoideo que provoca el  $Mg^{2+}$ , por lo que se piensa que el  $Mn^{2+}$  es más afín a la sPPiase, que en bajas concentraciones estimula muy bien, pero pasando la relación 1:1 con el PPi, comienza a detener la actividad, sin llegar a inhibir completamente ya que a 10 mM de  $Mn^{2+}$  presenta la actividad basal que solo se observa en el caso de no haber ningún catión en el medio. En el caso de la sPPiase de *R. rubrum* se pudo ver que como se había reportado anteriormente (Jeon y Ishikawa, 2005), el Mn, puede permitir la hidrólisis de PPi, sin embargo dicha actividad es muy inferior a la obtenida con  $Mg^{2+}$

El efecto del  $Co^{2+}$  en la sPPiase de *R. rubrum* fue concorde a lo esperado (Jeon y Ishikawa, 2005), activando la hidrólisis pero solo alrededor de un sexto de su actividad máxima con  $Mg^{2+}$ . En cambio el  $Co^{2+}$  como único catión divalente, desde concentraciones tan pequeñas como 0.1 mM, logro llevar al 85 % de su actividad máxima a la sPPiase de *Rba. sphaeroides*, incrementando levemente y manteniendo actividades máximas aun en concentraciones de 10 mM, la preferencia de  $Co^{2+}$  sobre  $Mn^{2+}$ , es una característica de las CBS-PPiases, por lo que hay una razón más para pensar que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* pertenece a este subtipo de la Familia II, y con ello la etiqueta de una fuerte regulación por nucleótidos de Adenina, como el ATP, mostrando una red metabólica en respuesta al estado energético.

Anteriormente se había probado el efecto de  $Zn^{2+}$  en la actividad de la sPPiase de Levadura (Familia II) en presencia de Mg-PPi en relación 1.5:1, y se había observado que en concentraciones menores a 0.6 mM inhibe a la enzima (Styer et. a., 1979), sin embargo, en el presente trabajo se probó el efecto del  $Zn^{2+}$  como

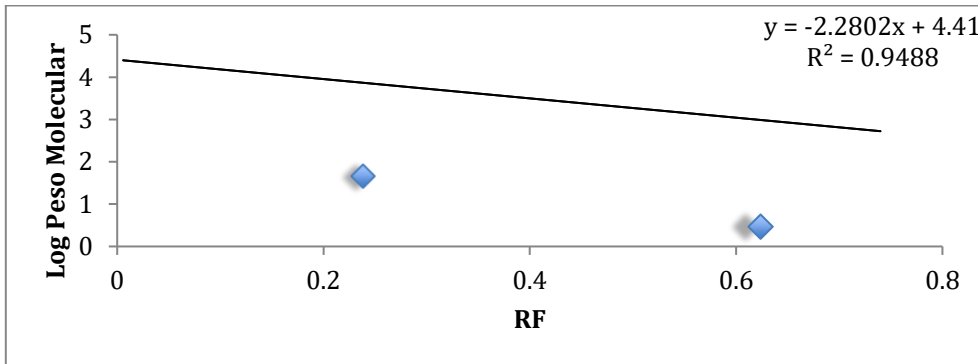
único catión divalente encontrando que la sPPiase de *R. rubrum* no presenta actividad, y la actividad de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* decae de la basal sin catión cuando se agregó 0.1 mM de  $Zn^{2+}$ , hasta llegar a inhibir casi completamente. Entre ambos trabajos hay una diferencia fundamental, que es la presencia de  $Mg^{2+}$  en el medio, se puede ver que en el trabajo realizado por Styer et. a., 1979 la inhibición de la sPPiase de levadura es más lenta, mostrando un efecto protector por parte del  $Mg^{2+}$ , pues a concentraciones de 0.6 mM conserva más del 20% de actividad, en cambio en el presente trabajo la actividad de la sPPiase de *Rba. sphaeroides* decae un 55% de la actividad basal sin catión y un 95% si se compara con a actividad máxima alcanzada en presencia de  $Mn^{2+}$ .

## CONCLUSIONES

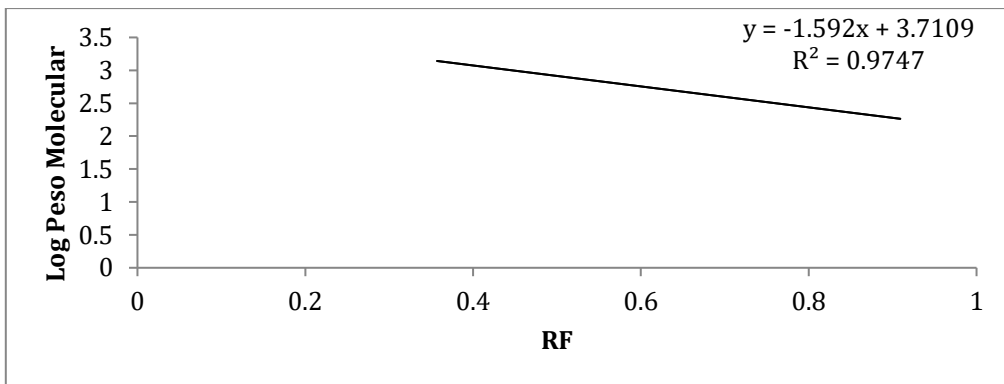
Se clonó y purificó exitosamente las sPPiases de *R. rubrum* y *Rba. sphaeroides*, sin mutaciones y con una total pureza confirmando que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* puede tener actividad en ausencia de cationes, sin embargo a altas concentraciones resulta inhibitorio.

Se dieron las primeras evidencias de que la sPPiase de *Rba. sphaeroides* podría pertenecer al subtipo CBS-PPiases de la Familia II debido a el efecto alostérico provocado por  $Mg^{2+}$  y la preferencia de  $Co^{2+}$  sobre  $Mn^{2+}$

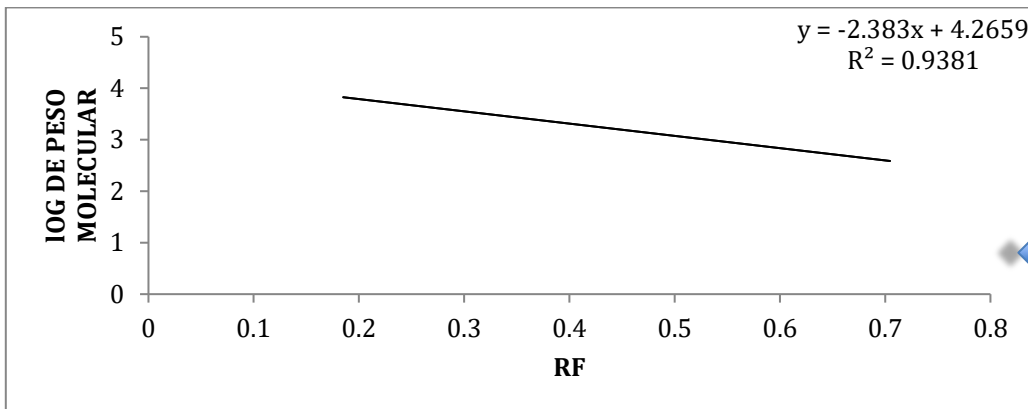
# ANEXOS



Anexo 1. El eje de las X se obtuvo al tomar la distancia que había entre cada banda y la línea de los pozos, después se dividió entre la distancia del Frente de Corrida (hasta donde se corrió el gel). El eje de las Y muestra el logaritmo del peso molecular del "marcador de peso". Para calcular los pesos del DNA bacteriano, se sustituyó el RF de cada banda problema en la ecuación de la recta mostrada en la gráfica, dando el log Peso molecular, y por último se elevó  $10^{\text{Log Peso Molecular}}$  para obtener el peso en pares de bases.



Anexo 2. Para calcular los pesos de las sPPiasas de *R. rubrum* y *Rba. spheroides*, se sustituyó el RF de cada banda problema en la ecuación de la recta mostrada en la gráfica, dando el log Peso molecular, y por último se elevó  $10^{\text{Log Peso Molecular}}$  para obtener el peso en pares de bases.



Anexo 3. Para calcular los pesos de los plásmidos pBAD His B+sPPiasas de *R. rubrum* y pBAD His B+*Rba. esferoides*, se sustituyó el RF de cada banda problema en la ecuación de la recta mostrada en la gráfica, dando el log Peso molecular, y por último se elevó  $10^{\text{Log Peso Molecular}}$  para obtener el peso en pares de bases.

# REFERENCIAS

1. Abdul Ghani Kumar Abdul Aziz, Abdul Wahab Mohammad, Norhazwani Mohd. Suhimi and Jamaliah Md. Jahim, 2014. Influence of Substrate and Enzyme Concentration Towards Degree of Hydrolysis for Gelatine. *Journal of Applied Sciences*, 14: 1347-1350.
2. Ahn, S., Milner, A. J., Fütterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young, T. W., & White, S. A. (2001). The “open” and “closed” structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 797–811.
3. Bai, H., Zhang, Z., and J. Gong. 2006. Biological Synthesis of Semiconductor Zinc Sulfide Nanoparticles by Immobilized *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology Letters* 28:1135-1139.
4. Baltcheffsky, M. (1966). Energy conversión leading to the orign and early evolution of life: Did inorganic pyrophophate precede Adenosin Triphosphate'. En H. Baltcheffsky (Ed), *Origin and evolution of biological energy conversión* (pp 1-9). EE. UU. Wiley-VCH.
5. Baltcheffsky, M. (1967). Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature* 216; 241-243.
6. Baltcheffsky, M., Schultz, A., Baltcheffsky, H. (1999). H-protonpumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*. 452; 121-127.
7. Baltscheffsky, H. y von stedingk, L. V. (1966). Bacterial photophosphorylation in the absence of added nucleotide. A second intermediate stage of energy transfer in light- induced formation of ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 722-728.
8. Baltscheffsky, M., Schultz, A., & Baltscheffsky, H. (1999). H+-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*, 452(3), 121–7.
9. Blankenship, R. E. Madigan, M. T. and Bauer. 1995. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers 871-883.
10. Blasco, R., & Castillo, F. (1992). Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 690–5.
11. Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.

12. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from
13. Celis, H., Escobedo, S., y Romero, I. (2003). Los dos tipos de pirofosfatasas fotosintéticas. Diferencias en su requerimiento de cationes. *Memorias. XII Congreso de Bioenergetica y Biomembranas*. (Pag 49). Patzcuaro, Michoacan: Editorial Universitaria UMSNH.
14. Cooperman BS. (1982). The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods Enzymol*;87:526-48.
15. De Meis ', L., Behrens ', M. I., Celis ', H., Romero ', I., Tuena, M., Puyou ', G., & Gomez Puyou ', A. (1986). Orthophosphate -pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases Role of H<sup>+</sup> gradient. *Eur. J. Biochem*, 158, 149–157.
16. Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase un C4 Photosynthesis: Properties and mechanism of light dark regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 36; 255-286.
17. Fahy, A., McGenity, T. J., Timmis, K. N., & Ball, A. S. (2006). Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(2), 260–270.
18. Franchi, E., Tosi, C., Scolla, G., Penna, G. Della, Rodriguez, F., & Pedroni, P. M. (2004). Metabolically Engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for Improved Biohydrogen Photoproduction Combined with Disposal of Food Wastes. *Marine Biotechnology*, 6(6), 552–565.
19. Futai, M., Sternweis, P. C., & Heppel, L. A. (1974). Purification and Properties of Reconstitutively Active and Inactive Adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli* (coupling factor/ATP-driven transhydrogenase), 71(7), 2725–2929.
20. García-Contreras, R., Celis, H., & Romero, I. (2004). Importance of *Rhodospirillum rubrum* H(+)-pyrophosphatase under low-energy conditions. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6651–5.
21. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana, 2007 - 959 pags.
22. Giotta, L., Agostiano, A., Italiano, F., Milano, F., & Trotta, M. (2006). Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere*, 62(9), 1490–1499.
23. Glaeser, J., & Overmann, J. (1999). Selective enrichment and characterization of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Archives of Microbiology*, 171(6), 405–16.



24. Hansen TA and van Gernerden H (1972) Sulfi de utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch Mikrobiol* 86: 49–56
25. Heikinheimo P, Tuominen V, Ahonen AK, Teplyakov A, Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R, Goldman A. (2001) Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 p.3121-3126
26. Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B. S., & Goldman, A. (1996). The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure* (London, England : 1993), 4(12), 1491–508.
27. Heinonen, J. K. (2003). *Biological role of inorganic pyrophosphate* (Segunda edición ed.). EE. UU. Kluwer Academic Publishers.
28. Hilario. E., Romero, I., & Celis, H. (1990). Determination of the physicochemical constants and spectrophotometric characteristics of the metallochromic Zincon and its potential use in biological systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 21(3), 197–207.
29. Iketa, M., Nakanishi, Y., Matsuda, N., Aizawa, K., Kashiya, T., Yamamoto, K., Mmura, Y., Maeshima, M. (1999) Molecular cloning and sequencing of the cDNA for vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase from *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* 50; 139-140.
30. Imhoff, J. F., Trüper, H. G. & Pfennig, N. (1984). Rearrangement of the species and the genera of the phototrophic 'purple nonsulfur bacteria'. *Int J Syst Bacteriol* 34, 340-343.
31. Imhoff., J., Trüper, H. G., (1989). Purple nonsulfur bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologu*. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1635-1702.
32. Jeon, S. J., & Ishikawa, K. (2005). Characterization of the Family I inorganic pyrophosphatase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 1(6), 385–389.
33. Kantachote, D., Torpee, S., & Umsakul, K. (2005). The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3), 314–323.
34. Keister, D. L., Minton, N.J. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42; 932-939.
35. Keister, D. L., Yike, N. J. (1967). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succionate-linked ATP-driven NAD<sup>+</sup> reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 121 ; 415-422.
36. Kim, E. J., Zhen, R.-G., & Rea, P. A. (1994). Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport (bopsw iwa/proton pump/*Sacckrmysc cenrea/manbraeW pobte*). *Plant Biology*, 91, 6128–6132.

37. Kim, E. J., Zhen, R. G., Rea, P. A. (1991). Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 91 (13): 6128-6132.
38. Klemme, J.-H., & Gest, H. (1971). Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *European Journal of Biochemistry*, 22(4), 529–537.
39. Kornberg, A. (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. *Advances in Enzymology*. Interscience 18: 191-240.
40. Kornberg, A. (1962). On the metabolic significance of phospholytic reactions. *En Horizons in Biochemistry*.
41. Lahti, R., Pitkäranta, T., Valve, E., Iita, I., Kukko-Kalske, E., y Heinonen, J. (1988). Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170; 5901-5907.
42. Lawson, J. W. R. y Veech, R. L. (1979). Effects of pH and free Mg<sup>2+</sup> on the K<sub>eq</sub> on the creatinine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 254; 6528-6537.
43. Lipman, F. (1965). Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis. In *The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices*. (Fox, S. W., ed.), pp. 212-216, Academic Press, New York.
44. López-Marqués, R. L., Pérez-Castiñeira, J. R., Losada, M., & 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(16), 5418–26.
45. Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). *An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats* (pp. 1–15). Springer, Dordrecht.
46. Madigan, M.T., (1998). Microbiology, physiology and ecology of phototrophic bacteria. In A.J.B. Zehner (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, N. Y. pp. 39-111.
47. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (2002). *Brock Biology of Microorganism*. 10a ed. Pearson Education, Inc. NJ, 355-356: 547-612.
48. McGrath, J. E., & Harfoot, C. G. (1997). Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3333–5.
49. McLaughlin, J., Aly, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Protozoology*. 32; 221-240.
50. Mehrabi, S., Ekanemesang, U. M., Aikhionbare, F. O., Kimbro, K. S., & Bender, J. (2001). Identification and characterization of *Rhodopseudomonas*

- spp., a purple, non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomolecular Engineering*, 18(2), 49–56. Retrieved from
51. Melnicki, M. R. 2009. Modes of hydrogen production in the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*". University of California, Berkeley.
  52. Miller, S.L. y Parris, M. (1964) Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions. *Nature* 204 : 1248-1250.
  53. Moe, O., Pham JR, Tuan D, y Styer, L. (1979). Kinetic Analysis of the Effect of Zinc Ion on the Inorganic Pyrophosphatase Reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 196, No. 1, pp. 73-78.
  54. Moe, o., y Butler, L. (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. III. Kinetics of Ca<sup>2+</sup> inhibition. *The Journal of biological chemistry*, 247 (22), 7315-7319.
  55. Müller, R. H., Kleinstaub, S., & Babel, W. (2001). Physiological and genetic characteristics of two bacterial strains utilizing phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. *Microbiological Research*, 156(2), 121–131.
  56. Munk, C., Copeland, A., Lucas, C., Lapidus, A., et al. (2011) "Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1T)". *Standards in Genomic Sciences*. Volume 4. pp. 293-302.
  57. Nyrén, P., Strid, A. (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS. Microbial. Lett.* 77; 265-270.
  58. Oda, Y., Wanders, W., Huisman, L. A., Meijer, W. G., Gottschal, J. C., & Forney, L. J. (2002). Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3467–77.
  59. Perez-Castineira, J. R., Lopez-Marques, R. L., Villalba, J. M., Losada, M., & Serrano, A. (2002). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15914–9.
  60. Peschek, G. A., Löffelhardt, W., Schmetterer, G., & International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes (9th: 1997: Vienna, A. (1999). *The phototrophic prokaryotes*. Springer.
  61. Pfening, N. (1989). Ecology of phototrophic purple and Green sulfur bacteria. In H.G. Schlegel and B. Bowien (ed.), *Autotrophic bacteria*. Springer-Verlag, New York, N.Y. pp. 81-96.
  62. Pfening, 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.
  63. Popp, N., Schlomann, M., & Mau, M. (2006). Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology*, 152(11), 3291–3304.

64. Romero, I., Celis, H. (1990) El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bionergetica. *Ciencia* 41; 297-305.
65. Romero, I., García-Contreras, R., & Celis, H. (2003). *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and sequencing. *Archives of Microbiology*, 179(5), 377–380.
66. Sakakibara, Y., Kobayashi, H., Kasamo, K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *J. Mol. Biol.* 366; 1305-1317.
67. Samygina VR, Moiseev VM, Rodina EV, Vorobyeva NN, Popov AN, Kurilova SA, Nazarova TI, Avaeva SM, Bartunik HD. (2007) Reversible inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fluoride: trapped catalytic intermediates in cryo-crystallographic studies. *J. Mol. Biol.* 366 p.1305-1317
68. Sarmina, A., Peña-Segura, C., & Celis, H. (2017). Family II pyrophosphatases from photosynthetic bacteria can hydrolyze free pyrophosphate. *Research and Reports in Chemistry*, Volume 1, 1–5.
69. Schöcke, L. y Schink, B. (1998). Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *Eur. J. Biochem.* 256; 589-594.
70. Scott, D. A., De Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L. Hong-Gang, L., Moreno, S., Docampo, S. (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273; 22151-22158.
71. Serrano-Bueno, G., Hernández, A., López-Lluch, G., Pérez-Castiñeira, J. R., Navas, P., & Serrano, A. (2013). Inorganic pyrophosphatase defects lead to cell cycle arrest and autophagic cell death through NAD<sup>+</sup> depletion in fermenting yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 13082–92.
72. Smith, R.M. y Martell, A. E. (1981). *Critical stability constants*. Vol. 4. Plenum Press, New York. pp 56-62.
73. Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I., Celis, H. (1992). Mg<sup>2+</sup> is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry Journal*. 283; 561-566.
74. Sumner, J. B. (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*, 100(2601), 413–414.
75. Van Niel C.B. (1932) On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. *Arch Mikrobiol* 3: 1–112
76. Van Niel C.B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev* 8: 1–118
77. Wang, X., Falcone, D.L., y Tabita, F.R. (1993). Reductive pentose phosphate-independent CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that

- ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance on the cell. *Journal of Bacteriology*, 175: 3372-3379.
78. Wood, HG. (1997). Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed Proc.* 36: 2197-2205.
79. Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., & García-Trejo, J. J. (2018). Unidirectional regulation of the F1FO-ATP synthase nanomotor by the  $\zeta$  pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*.
80. Vega-Villasante, Fernando, Martínez-Ochoa, Edgar F, García-Guerrero, Marcelo U, & Arrona-Ortiz, Jessica D. (2015). Efecto de diferentes intensidades de luz sobre la expresión de cromatóforos, crecimiento y supervivencia en juveniles de *Macrobrachium tenellum*. *Latin american journal of aquatic research*, 43(1), 255-261
81. Kelly P. Williams, Bruno W. Sobral, Allan W. Dickerman. (2007) A Robust Species Tree for the *Alphaproteobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 189 (13) 4578-4586