

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA DE LA BACTERIA  
FOTOSINTÉTICA *Rhodovibrio sodomensis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**Biólogo**

P R E S E N T A

VERÓNICA JAZMÍN SÁNCHEZ ORTIZ



México, D.F.

2010



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA DE LA BACTERIA  
FOTOSINTÉTICA *Rhodovibrio sodomensis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**Biólogo**

P R E S E N T A

**VERÓNICA JAZMÍN SÁNCHEZ ORTIZ**

DIRECTOR: Dr. Heliodoro Celis Sandoval

CODIRECTOR: Dra. Ma. Del Carmen García Rodríguez



México, D.F.

2010

El presente trabajo se realizo en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Heliodoro Celis Sandoval y como codirector a la Dra. María del Carmen García Rodríguez de la Unidad de Investigación en Genética y toxicología Ambiental, FES Zaragoza, UNAM.

Agradezco el apoyo otorgado por COMECyT- CONACyT para la realización de esta tesis.

El jurado asignado:

DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

DR. HELIODORO CELIS SANDOVAL

DRA. MA. DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

*A mi familia que amo tanto, especialmente a mi madre, muchas gracias por existir.*

*Gracias también Andy Amor por ser mi colega, por todo tu apoyo, tolerancia y cariño.*

*Agradezco al Dr. Celis por su ayuda y amistad, también a la Dra. María del Carmen García Rodríguez por sus consejos, a los miembros del jurado que a través de sus comentarios y sugerencias permitieron el enriquecimiento de este trabajo y por su puesto, a la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Silviuxt, donde quiera que estés, gracias.*

## Índice

	Pág.
<i>i.</i> Abreviaturas	1
<i>ii.</i> Resumen	3
<b>I.</b> Introducción	4
<b>II.</b> Marco teórico	6
2.1. Bacterias fotosintéticas	6
2.1.1. Bacterias púrpura	6
2.1.2. Bacterias púrpura no sulfurosas	7
2.1.3. <i>Rhodovibrio sodomensis</i>	8
2.2. El fósforo en los sistemas biológicos	9
2.3. Pirofosfato inorgánico	9
2.3.1. El papel del PPI en el metabolismo celular	10
2.3.2. Utilización del PPI	11
2.4. Pirofosfatasa inorgánica	12
2.4.1. PPasa citoplásmica	12
2.4.2. PPasa membranal	14
2.4.3. Complejo PPI-Mg <sup>2+</sup> e iones divalentes	16
2.4.4. PPasa en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas	19
<b>III.</b> Planteamiento del problema	20
<b>IV.</b> Hipótesis	21
<b>V.</b> Objetivos	22
<b>VI.</b> Material y Método	23
6.1. Cultivo de Bacterias	23
6.1.1. Medio de cultivo para <i>Rhodovibrio sodomensis</i>	23
6.1.2. Siembra	25
6.1.3. Curva de crecimiento	25
6.1.4. Cosecha de bacterias	26
6.2. Pirofosfatasa membranal	26
6.2.1. Obtención de cromatóforos	26
6.2.3. Medición de actividad hidrolítica específica de la H <sup>+</sup> PPasa	27
6.3. Pirofosfatasa citoplásmica	28

6.3.1. Purificación parcial de PPasa citoplásmica	28
6.3.2. Columna cromatográfica de exclusión molecular	30
6.3.3. Determinación de la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica	31
6.3.4. Determinación de proteína	31
6.3.5. Geles de poliacrilamida	33
6.3.5.1. Determinación de actividad hidrolítica en gel	33
6.3.5.2. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	35
<b>VII. Resultados</b>	<b>36</b>
7.1. Curva de crecimiento	36
7.2. Espectro y tinción de Gram	37
7.3. Pirofosfatasa membranal	38
7.4. Caracterización de la PPasa citoplásmica	38
7.4.1. Familia de la PPasa citoplásmica de <i>Rhodovibrio sodomensis</i>	38
7.4.2. Perfil de pH	41
7.4.3. Termoestabilidad y temperatura de activación	42
7.4.4. Especificidad del sustrato	43
7.4.5. Relación Magnesio-Pirofosfato	44
7.4.6. Efecto de la concentración de Magnesio y otros cationes divalente sobre la actividad hidrolítica de la PPasa	45
7.4.7. Efecto del Fluoruro sobre la actividad hidrolítica de la PPasa	47
7.4.8. Constante de Michaelis y velocidad máxima	47
7.4.9. Peso molecular	48
7.5. Resumen comparativo de algunas propiedades de la PPasa citoplásmica de <i>Rhodovibrio sodomensis</i> y de otras bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas	49
<b>VIII. Discusión</b>	<b>51</b>
<b>IX. Conclusiones</b>	<b>56</b>
<b>X. Referencias</b>	<b>57</b>



## i. Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
ASB	Albúmina de suero bovino
Atm	Atmósferas
ATP	Trifosfato de adenosina
Bisacrilamida	N, N' -bis-metilen-acrilamida
CAPS	Ácido N- ciclohexil- 3- aminopropano sulfónico.
CNC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
DNAsa	Desoxirribunucleasa II, Tipo IV: de bazo porcino.
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulten GmmH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (amino-etil eter) N N tetra acético
Elon	<i>p</i> -metilaminofenol sulfato 29 mM + bisulfito de sodio 290 mM
H <sup>+</sup>	Protón
FI	Familia I de sPPasa
FII	Familia II de sPPasa
H <sup>+</sup> PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones (membranal)
KDa	KiloDaltones
Km	Constante de Michaelis
l	Litro (s)
Me	Metal
min	Minuto (s)

MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
NEM	N- etilmaleimida
Nbf-Cl	7-cloro-4-nitobenzofrazan ( C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> ClNO <sub>3</sub> )
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PM	Peso molecular
p/v	Relación peso - volumen
Pi	Fosfato inorgánico
PoliP	Polifosfato(s)
PPasa	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
Rf	Movilidad electroforética relativa
RCF xg	Campo relativo de la centrifuga por gravedad
RFC	Reactivo Folin-Ciocalteu Fenol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
spp.	Especies
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
TCA	Ácido tricloro acético
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
v/v	Relación volumen - volumen

## ii. Resumen

Las Pirofosfatasas (PPasas) están entre las enzimas cuya continua síntesis es esencial para el crecimiento celular. Existen dos tipos de PPasas que se dividen con base a su estructura, ubicación y actividad catalítica, éstas son, las citoplásmicas y las membranales. Las pirofosfatasas citoplásmicas son exclusivamente hidrolíticas y se encuentran distribuidas en prácticamente todos los organismos, se han identificado hasta la fecha dos familias no homólogas de PPasa citoplásmicas que utilizan mecanismos similares pero estructural, molecular y bioquímicamente tienen diferencias muy importantes ya que sus estructuras primarias y plegamiento son completamente diferentes. El papel de la pirofosfatasa membranal ( $H^+PPasa$ ) en el metabolismo es colaborar en el crecimiento en condiciones de baja energía. Las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas presentan PPasa citoplásmica, sin embargo, dependiendo de la especie pueden presentar la enzima de Familia I o II. En algunas bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum* existe, además de la PPasa citoplásmica de Familia I, una  $H^+PPasa$ .

El fósforo (P) es el único entre los bioelementos primordiales y juega un papel clave en la bioenergética al ser componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que genera y consume el metabolismo celular y es transportado al interior de la célula en forma de anión ortofosfato diprotonado. Un gran número de reacciones biosintéticas hidrolizan ATP generando AMP + PPi y su hidrólisis posterior es llevada a cabo por la PPasa localizada en el citoplasma de las células, permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en la dirección correcta además se han identificado reacciones enzimáticas en las que el PPi sustituye al ATP o que son dependientes de PPi.

El proyecto tuvo como objetivo caracterizar la sPPasa de una bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa halófila, *Rhodovibrio sodomensis*, que es uno de los 2 organismos fotoheterótrofos del Mar Muerto. Esta enzima fue aislada y caracterizada a través de la cuantificación de su actividad hidrolítica, su perfil de pH, su termoestabilidad, temperatura de activación, la especificidad del sustrato y la determinación de su peso molecular, además de algunas constantes cinéticas como  $K_m$  y  $V_{max}$ , encontrando que puede ser purificada como FI y como FII por lo tanto puede utilizar al  $Co^{2+}$  o al  $Zn^{2+}$  como protectores. En el zimograma hecho en un PAGE se encontró que ambos extractos tienen un mismo  $R_f$  y se ubican entre la PPasa de *Rsp. rubrum* y de *Rba. sphaeroides* (prototipo de FI y FII, respectivamente). La PPasa de *Rhv. sodomensis* es estrictamente dependiente de  $Mg^{2+}$  y carece de actividad hidrolítica de la  $H^+PPasa$ . Su sustrato verdadero es  $Mg-PPi^2-$ . Es un dímero cuya peso molecular de 151 kDa determinado con una columna de Sephacryl S200 HR y a través de un SDS-PAGE de segunda dimensión se encontró que esta formado por subunidades de 75 kDa. La temperatura y el pH óptimo fueron de  $55^\circ C$  y 9, respectivamente. El NaF la inhibe en un 98%. Su  $K_m$  fue 0.135 mM y su  $V_{max}$  es  $3.498 \mu mol Pi (min mg proteína)^{-1}$ .

## I. Introducción

La energía es una cuestión central en la vida y para realizar sus funciones, los organismos vivos han encontrado diversas maneras para convertir continuamente las distintas formas de energía disponibles en el ambiente. Los compuestos de fosfato son la materia biológica común de intercambio de energía intracelular (de Meiss, 1993). El pirofosfato (PPi) es el polímero de fosfato más pequeño y es una molécula rica en energía, producto de muchas reacciones biosintéticas. Aunque el PPi es usado como un recursos de energía y fosforo en varias reacciones de fosforilación (Reeves 1976; Wood, 1977 y Wood *et al.*, 1977) estas reacciones consumen solamente una pequeña porción del PPi intracelular. Si la pirofosfatasa (PPasa) no estuviera continuamente presente en las células y por ello no hubiera actividad de hidrólisis del PPi, la concentración de éste aumentaría tan rápidamente que podría inhibir el crecimiento celular (Lahti, 1983). Las PPasas están entre las enzimas cuya continua síntesis es esencial para el crecimiento (enzimas constitutivas) (Stadtman, 1970).

La gran versatilidad metabólica de las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas, aunada a otras características como la facilidad de cultivarlas, la obtención de membranas y la disponibilidad de mutantes, han permitido que estas bacterias hayan sido usadas como un excelente modelo para estudios en bioenergética (Trüper y Pfenning, 1978).

El Mar Muerto es un ambiente hipersalino único, porque con excepción de la presencia del alga verde *Dunaliella parva*, en él se encuentran exclusivamente organismos del reino procariota. Casi todos los procariotas aislados del agua y sedimento del Mar Muerto son quimiorganotróficos, incluyendo arqueas y eubacterias. Hasta ahora sólo se ha encontrado dos organismos fototróficos

anóxicos, la bacteria sulfurosa *Ectothiorhodospira marismortui* y la bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rhodovibrio sodomensis* (Oren *et al.*, 1989; Oren, 1992; Bonora *et al.*, 1998; Extreme Science, 2008; Imhoff, 2001).

## II. Marco teórico

### 2.1. Bacterias fotosintéticas

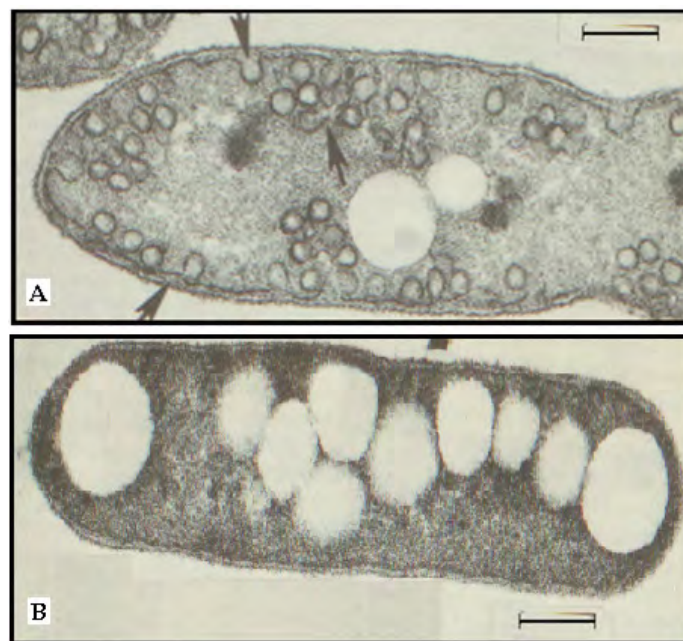
Las bacterias fototróficas verdes y púrpuras llevan a cabo una fotosíntesis anóxica, usando solamente un fotosistema, requieren un donador de electrón de más bajo potencial redox que el agua, como los compuestos reducidos de sulfuro, hidrógeno molecular o compuestos orgánicos simples. Los pigmentos fotosintéticos son bacterioclorofilas *a*, *b*, *c*, *d* y *e* además de una gran variedad de carotenoides. Estos pigmentos se localizan en unidades intracitoplasmáticas de sistemas de membrana, la cantidad de pigmentos es regulada como una función de la intensidad de la luz. Bajo condiciones anaeróbicas y en la oscuridad, todas las bacterias fototróficas obtienen la energía para mantenerse por fermentación de sus polisacáridos almacenados. Sin embargo, en condiciones aerobias y en la oscuridad presentan un metabolismo respiratorio (Pfenning, 1978).

#### 2.1.1. Bacterias púrpura

La diferenciación de dos grupos fisiológicos formados por *Rhodospirillaceae* y *Chromatiaceae* entre las bacterias púrpura fue introducida en 1907 por Molisch basándose en un punto de vista ecológico. Actualmente la clasificación está basada en la habilidad o inhabilidad de las células para usar el sulfuro elemental como un donador de electrón para oxidarlo a sulfato y para la asimilación fototrófica de CO<sub>2</sub> (Pfenning y Trüper, 1974). Todos los géneros de las bacterias púrpura sulfurosas, *Chromatiaceae*, son capaces de oxidar sulfuro elemental a sulfato lo que los diferencia de las bacterias púrpuras no sulfurosas (Pfenning, 1978).

### 2.1.2. Bacterias púrpura no sulfurosas

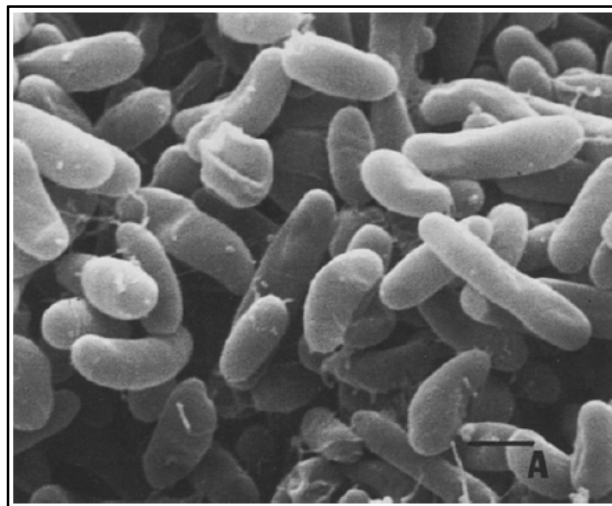
Las bacterias púrpura no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente en pantanos y aguas estáticas, donde existe una rápida producción y descomposición de materia. Estas bacterias son únicas por la gran plasticidad metabólica, ya que pueden desarrollarse en condiciones anaeróbicas en la luz fotoheterotróficamente y en la oscuridad por fermentación, así como en condiciones aeróbicas por oxidación de sustratos (respiración). En el crecimiento respiratorio la membrana es plana, pero al inducir el crecimiento fotosintético, en anaerobiosis, se desarrollan invaginaciones de la membrana, denominadas cromatóforos, donde está el aparato fotofósforilante (**Fig. 1.**) (Trüper y Pfenning, 1978).



**Fig.1.** Esquema general de la membrana de bacterias: en **A** *Rba. sphaeroides* creciendo anaeróticamente con luz, y en **B** *Rba. sphaeroides* con crecimiento semi-aeróbico en la oscuridad. La barra corresponde a 0.2 $\mu$ m, se muestran también gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), las flechas señalan a los cromatóforos (Tomada de Remsen, 1978).

### 2.1.3. *Rhodovibrio sodomensis*

La bacteria fotosintética *Rhodovibrio sodomensis* (*so. do. mensis* N.L. adj. Pertenece al Mar de Sodom, nombre Talmudico del Mar Muerto) fue descrita en 1993 por Mack y colaboradores, sus células son en forma de vibrio a forma de espiral (**Fig. 2.**), miden  $0.6-0.7 \times 1.6-2.5 \mu\text{m}$ , se mueven por medio de flagelos polares y se multiplica por fisión binaria. Son Gram negativas pertenecientes a las *Alfaproteobacteria*. La membrana fotosintética interna está en forma de vesículas. Sus pigmentos fotosintéticos son la bacterioclorofila *a* y carotenoides de la serie de la spiroxantina. Es una bacteria halófila que requiere de NaCl o de agua de mar para su crecimiento. El color del cultivo fotosintético es rosa y el espectro de absorción de las células vivas es de 377, 427, 488, 516, 551, 591, 803 y 875-880 nm. Tiene un óptimo crecimiento a temperatura de 35-40 °C (pero puede crecer en un intervalo de 25-47 °C), pH 7 y 12% NaCl (crece en un intervalo de 6-20% NaCl). Soporta concentraciones de 1M  $\text{MgCl}_2$  en el medio y es extremadamente tolerable al bromuro, crece normalmente con 50-75% de NaCl reemplazado por NaBr. Habita en las partes anóxicas expuestas a la luz del sedimento y agua del Mar Muerto (Imhoff, 2005).



**Fig. 2.** Imagen del *Rhodovibrio sodomensis* en microscopio de barrido. La barra A indica  $1\mu\text{m}$ . (Tomada de Marck *et al.*, 1993).



## 2.2. El fósforo en los sistemas biológicos

De los seis bioelementos primordiales que son asimilados por los organismos vivos (H, C, O, N, P y S) el fósforo (P) es el quinto en importancia cuantitativa como componente celular. Sin embargo, este bioelemento es parte fundamental del armazón de numerosas biomoléculas (ácidos nucleicos, coenzimas y metabolitos), es un componente esencial de las membranas lipídicas y forma complejos con proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos. El P es, además único entre los bioelementos primordiales y juega un papel clave en la bioenergética al ser componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que genera y consume el metabolismo celular y es transportado al interior de la célula en forma de anión ortofosfato diprotonado ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , Pi) (Losada *et al.*, 1999).

El fósforo inorgánico (Pi) está presente en la naturaleza en tres formas, como ortofosfato, como polifosfatos o metafosfatos [Poli (P)] y como pirofosfato (PPi), la primera, es la forma más abundante y se presenta formando parte de diversas rocas y minerales. Las otras dos formas químicas, no parecen ser transportadas al interior celular, actualmente se desconoce si son reacciones químicas o biológicas las que producen la hidrólisis de estos compuestos que tiene lugar en el suelo (Malacinski y Konetzka, 1967; Metcalf y Wolfe, 1998).

## 2.3. Pirofosfato inorgánico

El pirofosfato (PPi) es una molécula sencilla constituida por dos grupos ortofosfato unidos por un enlace fosfoanhidro (**Fig. 3.**) y es el polímero de fosfato más pequeño, se obtiene industrialmente por la deshidratación del ortofosfato por calor, de ahí su nombre. (Lahti *et al.*, 1988).

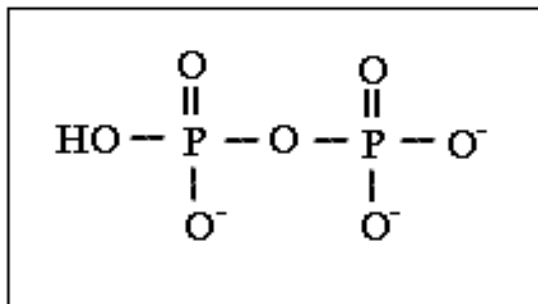


Fig. 3. Estructura del PPI a pH 7 (Tomada de Romero y Celis 1990).

La estructura **P-O-P** que la caracteriza, conocida como puente pirofosfato, constituye el grupo químico en el que se almacena la energía de enlace fundamental para la energética celular. El pirofosfato es una molécula rica en energía ( $\Delta G^{\circ} = -22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ó  $-0,22 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$  ó  $-7.0$  a  $-9.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$  en agua), su potencial químico es muy similar al del ATP ( $\Delta G^{\circ} = -31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ó  $-0,31 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$  ó  $-3.0$  a  $-6.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$  en agua). Teniendo en cuenta sus propiedades termodinámicas, no hay razón para excluir al PPI como una posible fuente de energía para las células (Lahti, 1983).

### 2.3.1. El papel del PPI en el metabolismo celular

Un gran número de reacciones biosintéticas hidrolizan ATP generando AMP + PPI. En consecuencia se había considerado durante mucho tiempo como un producto de desecho del anabolismo celular cuya hidrólisis posterior llevada a cabo por la PPasa localizada en el citoplasma de las células, permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en la dirección correcta (Kornberg, 1957). Aseveraciones que hicieron este dogma de la bioquímica insostenible se fundamentan en que se han identificado reacciones enzimáticas en las que el PPI sustituye al ATP o que son dependientes de PPI. Algunas de estas reacciones son responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Ciertos organismos como *Entamoeba histolytica* o

*Propionibacterium shermanii* contienen enzimas (p. e., quinasas implicadas en la glicolisis) que pueden usar PPi como fuente de energía y fosfato en lugar de ATP (Reeves y Guthrie, 1975). Asimismo, se encontró que la glucosa-6 fosfatasa del hígado es capaz de llevar a cabo la síntesis de glucosa 6-fosfato en una reacción dependiente de PPi (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPi están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards *et al.*, 1984). En resumen, estos hallazgos muestran que el PPi puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y que en algunas otras puede ser utilizado, incluso en lugar del ATP (Lahti *et al.*, 1988).

### **2.3.2. Utilización del PPi**

Tomando en consideración lo anterior, podemos decir que el PPi producido por la célula puede seguir los siguientes caminos:

- a) Ser hidrolizado por la PPasa citoplásmica y perder como calor la energía liberada de la hidrólisis del enlace anhidro (Kornberg, 1957).
- b) Ser hidrolizado por la PPasa de membrana translocadora de H<sup>+</sup> como la de *Rsp. rubrum*. La energía del gradiente electroquímico producido al hidrolizarse el PPi por esta enzima puede ser utilizado para mantener varias reacciones dependientes de energía como son: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky, 1967), la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967a), la reducción de NAD<sup>+</sup> (Keister y Yike, 1967b) y la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971).
- c) Ser utilizado directamente como fuente de energía en reacciones metabólicas, o sustituir al ATP como donador de energía (Nyrén y Strid, 1991).
- d) El PPi además de ser hidrolizado también puede ser sintetizado por la pirofosfatasa inorgánica de membrana (H<sup>+</sup>PPasa) (Romero y Celis, 1990).

## 2.4. Pirofosfatasa inorgánica (PPasa)

Las enzimas encargadas de hidrolizar el pirofosfato celular, regenerando así Pi, se denominan pirofosfatasas inorgánicas (**EC 3.6.1.1, Pirofosfato fosfohidrolasa o difosfatasa inorgánica** [CNC-IUBMB, 2009]), desempeñan, por lo menos, dos importantes funciones en el desarrollo de las células. A través de la hidrólisis del pirofosfato (PPi), la pirofosfatasa es considerada como el impulsor de la biosíntesis de biopolímeros vitales (Avaeva, 2000). Otra función que tiene particular importancia en ciertas bacterias fotosintéticas es la potencialidad de conservación de la energía de enlace del PPi.

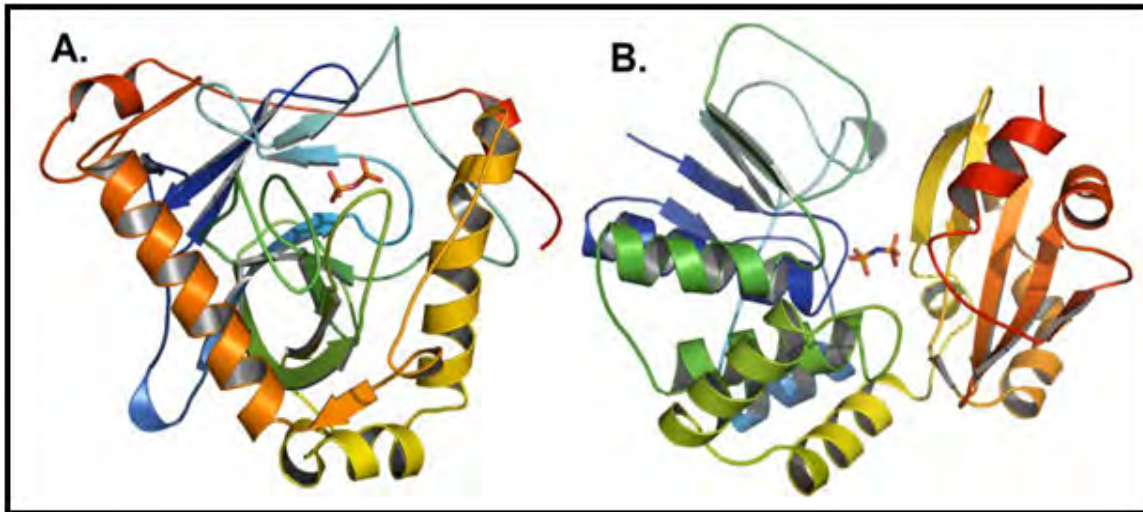
Existen dos tipos de PPasa que se dividen en base a su estructura, ubicación y actividad catalítica, estas son las citoplásmicas o solubles y las de membrana translocadoras de protones (Klemme y Gest, 1971).

### 2.4.1. PPasa citoplásmica

Las PPasas solubles o citoplásmicas (sPPasas, PPi hidrolasas) son exclusivamente hidrolíticas y se encuentran distribuidas en prácticamente todos los organismos [menos *Entamoeba histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985)] son esenciales para el crecimiento celular ya que hidrolizan el PPi proveniente de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable y reciclan la reserva de Pi intracelular (Kornberg, 1957; Chen *et al.*, 1990). Generalmente más del 90% de la actividad total de la PPasa es observada en las proteínas solubles del citoplasma (Howard y Lungren, 1970).

Dos familias no homólogas de PPasa soluble han sido identificadas hasta la fecha, utilizan mecanismos similares y representan un marcado ejemplo de evolución convergente durante el proceso de sustitución funcional de PPasa arquetípicas ancestrales ocurrido en la evolución de algunos procariontes (Zyryanov *et al.*, 2002; Gómez-García *et al.*, 2002). Las dos familias, estructural, molecular y

bioquímicamente tienen diferencias muy importantes, ya que sus estructuras primarias y plegamiento son completamente diferentes (Baykov *et al.*, 1999; Fabrichniy *et al.*, 2007; Heikinheimo *et al.*, 2001; Young *et al.*, 1998 y Sivula *et al.*, 1999). (Fig. 4).



**Fig. 4.** Comparación de la estructura de la PPasa de Familia I y la de Familia II. **A** modelo esquemático de la PPasa de Familia I de la levadura (Heikinheimo *et al.*, 2001) y en **B** se muestra el modelo esquemático de la PPasa de Familia II de *Baccillus subtilis* (Fabrichniy *et al.*, 2007). Las estructuras de las enzimas se muestran en una gama de colores donde en azul se encuentra el N terminal y en rojo el C terminal. Los sustratos se muestran como palillos: PPI para la Familia I y PNP para la Familia II.

La **Familia I** incluye PPasa de procariontes y eucariontes (Gómez-García *et al.*, 2007) (**clase A** y **clase B** de acuerdo a Young *et al.*, 1998), se inhiben con 1 mM de fluoruro, presentan un pH óptimo alcalino, entre 8 y 9, son dependientes de  $Mg^{2+}$  como cofactor y activador, presenta una especificidad absoluta por PPI. Las de **clase A** se caracterizan por presentarse únicamente en procariontes, el tamaño de sus subunidades va de 164-184 aminoácidos y tienen un peso molecular de 20 kDa. Son típicamente tetrámeros o hexámeros y tienen una actividad específica de alrededor de  $1\ 000\ \mu\text{mol}\ \text{min}^{-1}\ (\text{mg}\ \text{proteína})^{-1}$ . Las de **clase B** están en eucariotas y son mucho más largas, con subunidades de cerca de 285 aminoácidos y un peso molecular de 32 kDa aproximadamente. Son generalmente dímeros o heterodímeros, la actividad específica de algunas de ellos es de  $1\ 000\ \mu\text{mol}\ \text{min}^{-1}\ \text{mg}$

proteína<sup>-1</sup>, otras actividades son marcadamente menores que la clase A, utilizan al catión zinc como protector.

En 1998, dos grupos de investigadores trabajando independientemente (Shintani *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998) descubrieron que la PPasa citoplásmica de *Bacillus subtilis* forma parte de una nueva familia de PPasa citoplásmica soluble: Familia II (o clase C, Young *et al.*, 1998), sólo se ha encontrado en procariotas, su tamaño es de 310 aminoácidos, su peso molecular es de 33-35 kDa. El Mn<sup>2+</sup> puede al igual que el Mg<sup>2+</sup>, ser utilizado como activador y sustrato en complejo con PPI, en contraste con la Familia I, cuyo principal activador y parte del sustrato es el Mg<sup>2+</sup> (Kuhn y Ward 1998; Kuhn *et al.*, 2000; Parfenyer *et al.*, 2001). Resiste mayores concentraciones de fluoruro que la Familia I (lo cual pudiera estar mediado por la protección de iones Co<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>), tiene una actividad específica de 6 000 a 8 000 µmol de Pi (min mg de proteína<sup>-1</sup>).

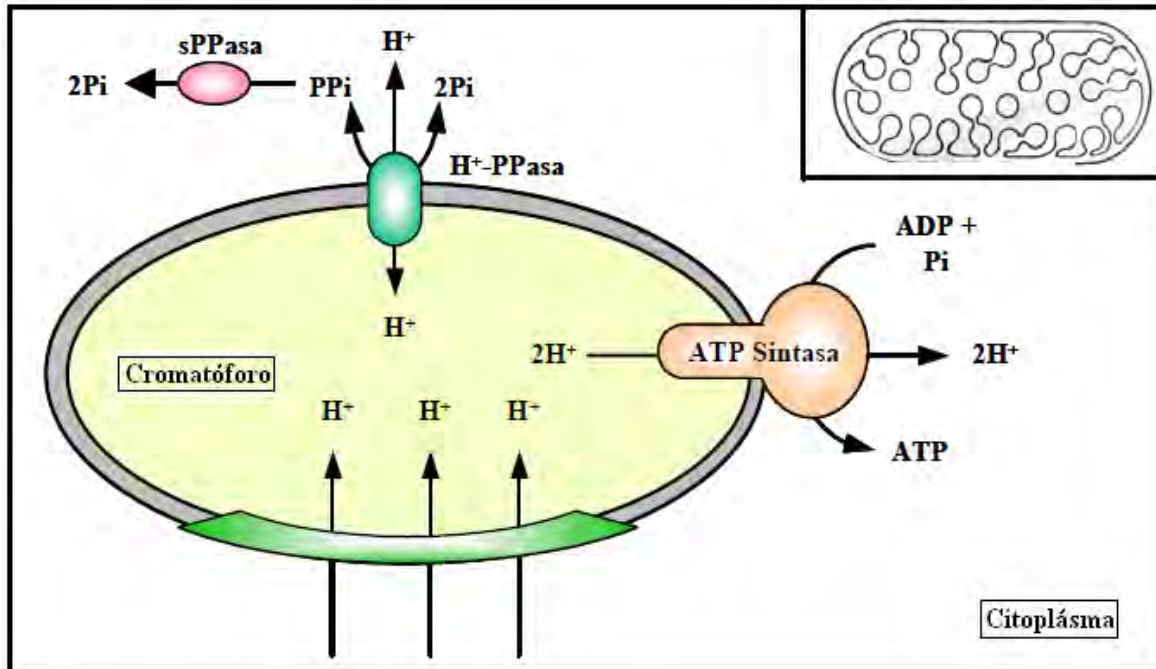
#### **2.4.2. PPasa membranal**

Diversas investigaciones han demostrado que en plantas, bacterias y protistas muy diversos, el PPI puede usarse en muchas reacciones en lugar del ATP. En estos organismos se ha encontrado una PPasa translocadora de protones (H<sup>+</sup>PPasas, o V-PPasas cuando se localizan en el tonoplasto), una proteína integral de membrana no relacionada directamente con la sPPasa, capaz de aprovechar la energía del enlace PPI para la bioenergética celular acoplando la hidrólisis de este metabolito a la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana en la que se encuentran (Baltscheffsky, 1967; Romero y Celis, 1990 y Maeschima, 2000). Esta H<sup>+</sup>PPasa puede además de hidrolizar, sintetizar PPI, su papel en el metabolismo es colaborar en el crecimiento en condiciones de baja energía, como en el crecimiento aeróbico a bajas concentraciones de oxígeno, la transición del metabolismo respiratorio a fotosintético y en el crecimiento fotosintético a intensidades luminosas bajas, o de bajo potencial electroquímico de H<sup>+</sup> y en el caso

de las mutantes respiratorias con bajas tensiones de O<sub>2</sub> (García-Contreras *et al.*, 2004). Estas proteínas se describieron por primera vez en los cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky, 1967) y posteriormente, fueron identificadas actividades de hidrólisis de PPi en el tonoplasto de diversas células vegetales. Hasta el momento, se han descrito H<sup>+</sup>PPasas en diferentes grupos de eubacterias y arqueas, plantas y diversos protistas fotosintéticos y no fotosintéticos, pero no se han encontrado en membranas de células animales o de hongos, aunque sí en sus protistas parásitos (Rea y Poole, 1993; Baltscheffsky *et al* 1999 y Maeshima, 2000). Todas la H<sup>+</sup>PPasas conocidas presentan actividad de hidrólisis de PPi *in vitro*, su perfil hidrofóbico demuestra que poseen entre 14 y 16 segmentos transmembranales y su sustrato es un complejo MgPPi.

Se han propuesto diferentes funciones fisiológicas para la H<sup>+</sup>-PPasa en *Rhodospirillum rubrum*. Por una parte, Baltscheffsky y Baltscheffsky (1992) han propuesto que esta enzima actuaría *in vivo* como una PPI-sintasa, de manera análoga a la ATP-sintasa, ya que se ha demostrado que, cuando el flujo no cíclico de electrones de la cadena fotosintética se inhibe con antimicina, el flujo cíclico de electrones es suficiente para mantener una cierta síntesis de PPi (Nyrén *et al* 1986b). Por otra parte, también se ha sugerido que esta H<sup>+</sup>PPasa podría hidrolizar o sintetizar PPi *in vivo* según los requerimientos celulares en cada instante (Nyrén y Strid, 1991) (Fig. 5.). De este modo, en oscuridad o en condiciones de baja intensidad de luz en que el flujo de electrones no es abundante, la H<sup>+</sup>PPasa estaría bombeando protones al interior del cromatóforo, contribuyendo así a la síntesis de ATP, mientras que en condiciones de alta intensidad de luz, en que existe un bombeo abundante de protones acoplado a la cadena de transporte de electrones de la maquinaria fotosintética, la proteína estaría sintetizando PPi, que se acumularía en “gránulos de reserva” para ser utilizado en condiciones de deficiencia energética.





**Fig. 5.** Cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. Esquina superior derecha: esquema de una célula de *Rsp. rubrum*, mostrando las invaginaciones de la membrana interna que forman los cromatóforos. En estas vesículas cerradas esta presente toda la maquinaria fotosintética, incluida la ATP-sintasa. Asociada a la membrana se encuentra también la H<sup>+</sup>PPasa. Tomada de López-Marqués *et al* 2004.

### 2.4.3. Complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> e iones divalentes

Los iones metálicos son la clave para la catálisis por PPasa. Las PPasas citoplásmicas y membranales requieren Mg<sup>2+</sup> para que se formen sus sustratos Mg-PPi<sup>2-</sup> para la hidrólisis o Mg-Pi para la síntesis; el PPi<sup>4-</sup> es un inhibidor para esta reacción (Lahti, 1983). Sin embargo, el Mg<sup>2+</sup> libre ejerce también un papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la enzima (**Fig. 6.**). Randahl (1979) reportó que el Mg<sup>2+</sup> libre puede actuar como activador en la hidrólisis de PPi y que este catión puede unirse a la PPasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como NEM y Nbf-Cl.

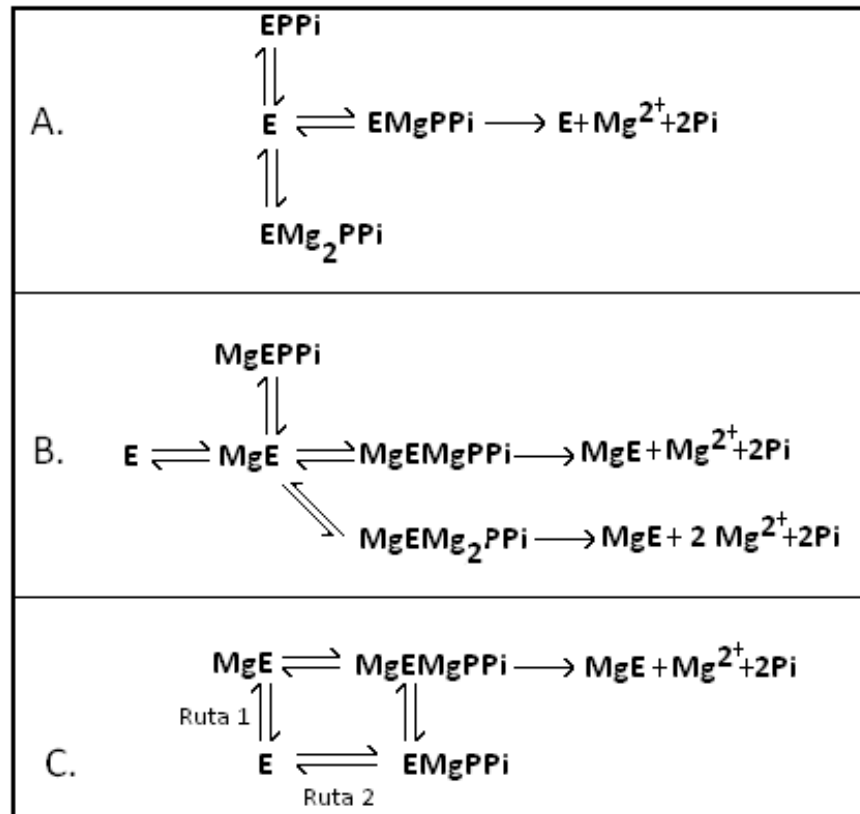
Estudios realizados sobre los efectos de los cationes divalentes en la reacción hidrolítica y el intercambio Pi/PPi muestran que el Mg<sup>2+</sup> y el Co<sup>2+</sup> soportan parcialmente (50%) el cambio de la reacción Pi/PPi. Otros cationes divalentes



como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  no son tan eficientes; en la reacción hidrolítica el  $\text{Zn}^{2+}$ , a bajas concentraciones, puede reemplazar al  $\text{Mg}^{2+}$  en la formación del sustrato. En presencia de altas concentraciones de sustrato para la hidrólisis ( $\text{Mg-PPi}^{2-}$ ) los cationes divalentes libres son inhibidores (Celis y Romero, 1987; Zyryanov *et al.*, 2002).

Ordaz *et al.*, (1992) trabajando con la PPasa de membrana de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*, encontraron que la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , no sólo protege a la enzima de su desnaturalización a 70 °C, además la activan. Al ser solubilizada la enzima se sigue observando este fenómeno protector hasta temperaturas de 65 °C. Estos datos sugieren la existencia de un sitio regulador en la enzima para estos cationes divalentes.

En base a los modelos generales de la hidrólisis enzimática del  $\text{PPi}$  propuestos por Josse (1966), Rapoport *et al.*, en 1972, Moe y Butler (1972) se hicieron submodelos donde se representa de manera simple la cinética de la PPasa (Lahti, 1983).



**Fig. 6.** Modelos de cinética simple de la PPasa de *E. coli* (A) y *S. cerevisiae* (B, C) de acuerdo a Josse (1966), Moe and Butler (1972) y Rapoport *et al.*, (1972), respectivamente. El medio estaba a pH 7.2.

Mediante estudios cinéticos se ha encontrado que el  $\text{Mg}^{2+}$  libre es un activador esencial y ordenado de la actividad hidrolítica de la PPasa de membrana (Sosa *et al.*, 1992), donde primero debe entrar el  $\text{Mg}^{2+}$  a la enzima para después incorporarse el sustrato  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  y así poder hidrolizarse. A través de estudios de modificaciones químicas se ha determinado que el sitio para  $\text{Mg}^{2+}$  libre está dentro o muy cercano al sitio activo (Romero y Celis, 1992).

#### 2.4.4. PPasas en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas

Las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas presentan por supuesto PPasa citoplásmica, sin embargo, dependiendo de la especie pueden presentar la enzima de Familia I o II. Se ha encontrado que las especies que tienen H<sup>+</sup>PPasa, poseen PPasa citoplásmica de Familia I, mientras que las que carecen de ésta, poseen PPasa citoplásmica de Familia II (Romero *et al*, 2003; Celis *et al*, 2003).

La presencia de H<sup>+</sup>PPasa dentro de la familia de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas pudiera ser un requerimiento indispensable para su crecimiento en intensidades luminosas bajas, ya que solo las especies que poseen naturalmente la enzima pueden crecer en intensidades luminosas muy bajas (2 W/m<sup>2</sup>) (García-Contreras *et al*, 2004). Sin embargo, es probable que en esta capacidad de crecimiento intervengan varios factores, como el tipo de pirofosfatasa citoplásmica que las bacterias posean. La presencia simultánea de la H<sup>+</sup>PPasa y la sPPasa de Familia I debe requerir una estricta regulación para que no se presente desperdicio de energía. Así mismo se ha reportado que el gen de la H<sup>+</sup>PPasa se induce en respuesta a condiciones de estrés indicando una fuerte regulación transcripcional (López-Marques *et al*, 2004). En estas situaciones la H<sup>+</sup>PPasa debe estar generando gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> para ser utilizado entre otras cosas, para la síntesis de ATP, esto indicaría que las bacterias fotosintéticas usan al PPi como una fuente de energía a “bajo costo”, permitiéndoles una importante ventaja adaptativa.

### III. Planteamiento del problema

El interés científico en microorganismos extremófilos, especialmente en hipertermófilos, termoacidófilos e hiperhalófilos, ha incrementado recientemente. Una razón de este interés es la necesidad de entender los mecanismos bioquímicos envueltos en estas condiciones extremas para hacer un posible uso biotecnológico de las enzimas y moléculas de estos organismos. Entre las bacterias extremófilas, las termófilas son las que han sido estudiadas más intensivamente. En contraste, los menos estudiados son los microorganismos halófilos. Hasta ahora la investigación microbiológica en esta área ha sido enfocada a los microorganismos aerobios, relativamente pocos trabajos se han reportado sobre halófilos anaerobios (Ollivier *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 2006).

Las pirofosfatasas citoplásmicas son enzimas constitutivas y su comportamiento bioquímico ha sido estudiado principalmente en eucariotas (plantas superiores, levaduras y algas), en bacterias ha sido principalmente caracterizada en *E. coli* y en las bacterias fotosintéticas *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter sphaeroides*, con el estudio de la enzima en estas tres especies de bacterias es imposible determinar las características generales (como son: la actividad de hidrólisis, el requerimiento de cofactores, el perfil de pH, el peso molecular, etc.) de las PPasas citoplásmicas bacterianas. La determinación de características en un mayor número de especies ayudará a realizar una comparación menos sesgada, además de plantear diferencias y similitudes entre las PPasas de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas ya caracterizadas y la PPasa de *Rhodovibrio sodomensis*.

## IV. Hipótesis

Si la bacteria fotosintética halófila *Rhodovibrio sodomensis* se encuentra sometida a condiciones extremas en su ambiente natural (alta salinidad, mucha desecación y poca cantidad de luz), y se ha descrito que en algunas bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum*, además de tener PPasa citoplásmica de Familia I, tiene la H<sup>+</sup>PPasa que colabora en el crecimiento en condiciones de baja energía; entonces al realizar la caracterización enzimática se espera que el tipo de PPasa citoplásmica presente en *Rhodovibrio sodomensis* pertenezca a la Familia I y por ende que tenga H<sup>+</sup>PPasa.

## V. Objetivos

### Objetivo general

- ❖ Caracterizar bioquímicamente la pirofosfatasa citoplásmica de la bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa, mediante la evaluación de su actividad hidrolítica específica, el requerimiento de cofactores, el perfil de pH y la obtención de su peso molecular.

### Objetivos particulares

- ❖ Proliferar la bacteria *Rhv. sodomensis* a través de la selección de las condiciones óptimas del medio (concentración de NaCl), el cultivo y cosecha de bacterias.
- ❖ Establecer el tiempo en el que los cultivos de *Rhv. sodomensis* alcanzan la fase logarítmica tardía.
- ❖ Determinar la existencia de H<sup>+</sup>PPasa a través de la extracción de cromatóforos y la medición de su actividad hidrolítica.
- ❖ Extraer y purificar la enzima pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodovibrio sodomensis* utilizando técnicas convencionales como la ruptura celular, precipitación con sulfato de amonio y diálisis.
- ❖ Determinar la actividad específica de la PPasa citoplásmica de *Rhodovibrio sodomensis*, midiendo el fósforo inorgánico producto de la hidrólisis del pirofosfato.
- ❖ Determinar el tipo de PPasa citoplásmica presente en la bacteria fotosintética *Rhodovibrio sodomensis*, mediante la evaluación de su actividad específica, su comportamiento con cationes divalentes y su peso molecular.

## VI. Material y método

### 6.1. Cultivo de Bacterias

En todos los experimentos se utilizó la cepa tipo DSM No. 9895 de la bacteria fotosintética *Rhodovibrio sodomensis* obtenida de DSMZ en 2006.

#### 6.1.1. Medio de cultivo para *Rhodovibrio sodomensis*

##### a) Medio líquido:

El medio de cultivo utilizado fue el 747: DSIC modificado de acuerdo a DSMZ 2008, para el cual se prepararon las siguientes soluciones:

##### Solución A:

	Cantidad para 50 litros		Concentración mM
NaCl	3 125.0	g	1 069. 00
NH <sub>4</sub> Cl	25.0	g	9.34
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.0	g	4.43
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	125.0	g	14.32
Acetato de sodio	100.0	g	24.35
NA <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	5.0	g	0.40
Extracto de levadura	37.5	g	-----
Vitamina B <sub>12</sub> (10 mg/ 100 ml H <sub>2</sub> O)	50.0	ml	-----
Solución de elementos traza SL-10*	50.0	ml	-----
MOPS buffer	105.0	g	9.00

Se ajustó el pH a 7, con HCl o NaOH, y aforó con agua desionizada. Se esterilizó a 120 °C por 20 min.

### Solución B:

	Cantidad para 5 litros	Concentración mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	500 g	491.85
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10 g	17.00

Se ajustó el pH a 7, con HCl o NaOH, y aforó con agua desionizada. Se esterilizó a 120 °C por 20 min.

### Solución C:

	Cantidad para 1 litro	Concentración mM
NaHCO <sub>3</sub>	83.3 g	0.11

Se aforó con agua desionizada y filtró en condiciones estériles en una membrana milipore de 0.2 µm.

### \*Solución de elementos traza SL-10:

	Cantidad para 1 litro	Concentración mM
HCl (7.7 M; 25%)	10.0 ml	77.00
FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1.5 g	7.70
ZnCl <sub>2</sub>	70.0 g	513.00
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	100.0 g	505.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.0 g	97.00
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	190.0 g	1220.00
CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2.0 g	11.70
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	24.0 g	100.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	36.0 g	148.00

Primero se disolvió el FeCl<sub>2</sub> en el HCl, después se diluyó en agua, se adicionaron y disolvieron las otras sales y se aforó a 1 l.



Por cada litro de a solución A, se agregó 76.92 ml de solución B y 15.38 ml de solución C y se nitrogenó por 10 min. para desplazar todo el oxígeno posible del medio antes de sembrar las bacterias.

## **b) Medio sólido**

Para preparar el medio sólido, se agregó Agar (2% p/v) al medio líquido 747 previamente preparado y se esterilizó en autoclave a 120 atm por 20 min. Posteriormente, cuando estuvo a una temperatura aprox. de 60° C (gelidifica a los 50 °C), se vertió en cajas de Petri y en viales, ya sólido, se incubaron por 24 horas en la estufa a 36 °C para asegurar que no estuvieran contaminados por levaduras o bacterias.

### **6.1.2. Siembra**

A partir de viales con medio sólido que contenían un cultivo de *Rhodovibrio sodomensis* DSMZ se comenzó la proliferación de esta bacteria agregando medio líquido hasta el tope del vial y colocándolo en la oscuridad por un periodo de 12 horas para favorecer el crecimiento anaeróbico y eliminar así el oxígeno contenido. Posteriormente, se sometió a la luz de dos focos con filamentos de Tungsteno de 40 watts, a 30 cm de distancia.

### **6.1.3. Curva de crecimiento**

Para determinar la curva de crecimiento de *Rhv. sodomensis*, el tiempo en el que las bacterias alcanzan un crecimiento logarítmico tardío y el valor de salinidad adecuado del medio 747 se tomaron 12 tubos (dos tubos por cada variación en la concentración de NaCl) conteniendo medio líquido con seis diferentes concentraciones de NaCl (6, 10, 12, 15 y 20 %) y 1.3 ml de cultivo líquido en una

proporción 1:10 (v/v), se tomaron regularmente las Unidades Klett (UK) con ayuda de un fotocolorímetro Klett - Summerson que mide la absorbancia del cultivo. Con el fin de obtener el suficiente material biológico para la extracción de la enzima, se preparó el medio de cultivo líquido y se siguió inoculando 1: 10 (v/v), primero, en matraz Erlenmeyer 125 ml, después en botellas de 1 l y posteriormente, en botellas de 9 l; cerrándolos con tapones de hule herméticos dejando la mínima cantidad posible de aire dentro, también se dejaron en la oscuridad por 12 horas.

#### **6.1.4. Cosecha de bacterias**

Cuando se alcanzó la fase de crecimiento logarítmico tardío se cosecharon las bacterias centrifugando a 14 340 RCF xg durante 15 min. a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5B. La pastilla resultante se resuspendió para lavar los residuos del medio con 50 mM MOPS, 50 mM KCl pH 7, homogeneizando y centrifugando a 14 340 RCF xg durante 15 min. Se tomó el peso de la botella vacía y el peso de la botella más la pastilla para obtener el peso húmedo, se etiquetó y guardó a -70 °C en el ultracongelador REVCO.

## **6.2. Pirofosfatasa membranal**

### **6.2.1. Obtención de cromatóforos**

Baccarinni- Melandri *et al.*, en 1970 describieron el método para la obtención de cromatóforos que se siguió, bajo algunas modificaciones:

Las bacterias se resuspendieron 1:10 en amortiguador glicilglicina 200 mM pH 7.4 más 1 mg de DNAsa y 1 mg de MgCl<sub>2</sub> por cada 10 g de peso húmedo de las bacterias después fueron homogeneizadas.

Las células bacterianas se rompieron por sonicación con un sonicador Branson (Sonifer 250) puesto al máximo por 3 ciclos de 2.5 min. de sonication y uno de descanso, en porciones de 30 ml. dentro de un baño con hielo.

La muestra sonicada se centrifugó a 35 850 RCF  $\times$ g durante 20 min. para eliminar la pared celular, células sin romper, cápsulas y mantener en el sobrenadante los cromatóforos y las proteínas citoplásmicas.

El sobrenadante se centrifugó a 242 000 RCF  $\times$ g durante 80 min. a 4 °C para sedimentar los cromatóforos. La pastilla de cromatóforos se resuspendió en 200 mM glicilglicina, 5 mM EDTA y 5 mM EGTA a pH 7.4 y se centrifugó una vez más a 242 000 RCF  $\times$ g por 80 min. Así se eliminaron los cationes divalentes de la preparación. Se resuspendió la pastilla obtenida de la centrifugación anterior con 200 mM glicilglicina pH 7.4 y se centrifugó nuevamente a 242 000 RCF  $\times$ g por 80 min. Se decantó y la pastilla resultante se resuspendió en 50 mM glicilglicina pH 7.4 en una proporción de 1 g de cromatóforos en 2 ml de buffer. La suspensión se guardó a 4 °C y se usó antes de 2 días, después de los cuales pierde su actividad hidrolítica (Sosa y Celis, 1995).

### **6.2.2. Medición de la actividad hidrolítica específica de la H<sup>+</sup>PPasa**

La actividad hidrolítica, se cuantifico como la liberación de Pi a partir de PPI a 30 °C, en la oscuridad (en un cuarto iluminado con luz verde de seguridad, según Schiff 1972). El medio de reacción general contenía 50 mM Tris-Maleico pH 6.5, 2 mM NaPPI pH 6.5 y diferentes cationes divalentes en una concentración de 3 mM.

La reacción se inició al agregar 0.5 mg de proteína aproximadamente, se incubo por 10 min. y se detuvo al agregar TCA al 6%. El fosfato libre se cuantificó de acuerdo al método de Summer (1944) basado en la formación de un complejo fosfomolibdico reducido por Elon (*p*-metilaminofenol sulfato + bisulfito de sodio),

midiendo la absorbancia a 660 nm. La actividad específica es reportada en  $\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ . La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

### **6.3. Pirofosfatasa citoplásmica**

#### **6.3.1. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica**

La purificación parcial de la enzima pirofosfatasa como Familia I y como Familia II se llevo a cabo, bajo algunas modificaciones, de acuerdo al método reportado por Celis y colaboradores en 2003.

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

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron en una proporción 1:3 (p/v) en buffer 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM  $\text{ZnSO}_4$  con un homogeneizador Potter. Se agregó 1 mg de DNAsa por cada 10 g de peso húmedo de bacterias. El homogeneizado se dividió en lotes de 30 ml. y se sonicó dentro de un baño con hielo, en 3 ciclos de 2.5 min. por uno de descanso en un sonicador Branson (sonifier 250), constante en el número cuatro de la perilla del sonicador. El sonicado se centrifugó a 242 000 RCF xg por 80 min. a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman XL-90. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 8.6 y se tomó una muestra de 1 ml (extracto crudo) que se mantuvo en refrigeración. El resto se dividió en alícuotas de 15 ml y se calentó a 60 °C por 5 min. El extracto calentado fue centrifugado a 35 850 RCF xg durante 20 min. Se tomó una muestra de 1 ml. y de acuerdo al volumen del sobrenadante se calculó la cantidad de sulfato de amonio para hacer la primera precipitación de 0-40%, de 40-50% y de 50-65% (las cantidades se tomaron de la matriz para la precipitación de proteínas con sulfato

de amonio reportada por Harris en 1989). Entre cada saturación se centrifugó a 35 850 RCF xg durante 20 min. en una centrifuga Sorvall RC-5B. Se decantó y la pastilla se resuspendió con buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>. Se dializó en una membrana YM30 contra 4 l del mismo buffer con agitación lenta durante toda la noche.

#### **b) Como familia II**

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron en una proporción 1:3 (p/v) en buffer 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.4 mM CoSO<sub>4</sub> con un homogeneizador Potter. Se agregó 1 mg de DNasa y 1 mg de MgCl<sub>2</sub> por cada 10 g de peso húmedo de bacteria. Al homogeneizado se le dio el mismo tratamiento que en la purificación como FI para sonificarlo y ajustar el pH. En esta ocasión las saturaciones fueron de 0-60% y de 60-80%, centrifugando después de cada una a 35 850 RCF xg durante 20 min., en una centrífuga Sorvall RC-5B. Se decantó y la pastilla se resuspendió con buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM CoSO<sub>4</sub> y 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, se dializó en una membrana YM30 contra 4 l del mismo buffer con agitación.

### 6.3.2. Columna cromatográfica de exclusión molecular

Se utilizó una columna de Sephacryl S200 HR de 50 cm. de largo por un diámetro de 1.6 cm (100 cm<sup>3</sup>). Se equilibró con 300 ml de buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM CoSO<sub>4</sub>.

#### a) Calibración de la columna

Para obtener la curva de calibración de la columna se utilizaron 3 proteínas con peso molecular conocido [Citocromo *c* (12 kDa), ASB (66 kDa) y β-amilasa (200 kDa)], cuya concentración era de 2 mg/ml. La determinación de proteína se hizo por el método cualitativo leyendo la absorbancia del Citocromo *c* y la β-amilasa a 400 nm, del ASB a 280 nm con ello se determinó la fracción que presentaba la máxima densidad óptica y se graficó contra el logaritmo del peso molecular para obtener la ecuación de la recta.

#### b) Carga de la columna

La muestra dializada (del apartado 6.3.1. inciso b)) se cargó en la columna que se equilibró con buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM CoSO<sub>4</sub>, para coleccionar 80 fracciones de 50 gotas (3 ml) cada una mediante un colector de fracciones Gilson. Se determinó la proteína de manera cualitativa midiendo la absorbancia a 280 nm. Con el volumen de elución se determinó su peso molecular. Las fracciones que presentaron proteína se les determinó la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica, se graficó y se decidió juntar las fracciones de mayor actividad, posteriormente, se concentró con una membrana CENTRICON YM30 y se determinó su concentración por el método de Bradford (1976).

### 6.3.3. Determinación de la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica

Para la cuantificación de la actividad hidrolítica se utilizó la enzima dializada. La actividad hidrolítica o actividad de la pirofosfatasa citoplásmica, se cuantificó como la liberación de Pi a partir de PPi a 37 °C, en presencia de cationes divalentes (MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>). El medio de reacción en general contenía: 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 2 mM NaPPi, 3 mM de catión y agua desionizada. La determinación se hizo bajo las mismas condiciones para los extractos de la Familia I y de la Familia II.

La reacción se inició al añadir aproximadamente 35 µg de la PPasa citoplásmica purificada parcialmente, el medio se incubó a 37 °C durante 10 min. y la reacción se detuvo al añadir TCA a una concentración final de 6%. El Pi presente se cuantificó con el método de Summer (1944). La actividad específica se refiere como µmoles Pi min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>. Las modificaciones a este método se especifican en los pies de figura de la sección de resultados.

### 6.3.4. Determinación de proteína

Se utilizaron 3 métodos diferentes para determinar la concentración de proteína, el empleo de cada uno de éstos, se especifica en el pie de página de cada figura o en el apartado correspondiente y depende de la concentración aproximada de proteína esperada.

#### a) Método de Lowry

La concentración de proteína purificada se cuantificó por el método propuesto por Lowry y colaboradores en 1951, para ello, 20 y 40 µl de muestra (diluida 1:10) se completaron con agua desionizada hasta 0.4 ml y luego se agregó 2.5 ml. de solución alcalina (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1 N; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O al 1% y tartato de

sodio-potasio al 2%; [100:1:1]), se dejó reposando por 10 min. Después de ese tiempo se agregó 250 µl del RFC (diluido 1:1 en agua desionizada). Luego de 30 minutos de reposo se leyó la absorbancia a 656 nm en un espectrofotómetro LUCY 1 de Anthos Lactec Instrumens, el resultado se multiplicó por 10. Como proteína estándar se utilizó ASB 1mg/ml y como blanco se utilizó agua más los reactivos.

### **b) Método de Bradford**

El método de Bradford tiene una sensibilidad para detectar de 1- 10 mg de proteína y se basa en el empleo del colorante azul de Commassie cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente (Bradford, 1976).

Para este método se preparó una curva patrón con ASB 1 mg/ml, el volumen final de los tubos se llevó a los 100 µl con agua desionizada. Los extractos problema se colocaron en tubos con 20 y 40 µl de muestra y se completaron con agua desionizada hasta 100 µl y luego se agregaron 3 ml del reactivo de Bradford (Azul brillante G, ácido fosfórico y metanol), se agitó y se leyó en el espectrofotómetro LUCY 1 de Anthos Lactec Instrumens la absorbancia a 600 nm. El blanco tenía de agua desionizada mas el reactivo.

### **c) Método cualitativo**

Para este método se colocó un mililitro de la muestra en una celda de cuarzo de 1 cm<sup>3</sup> y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Las longitudes de onda a que absorben las diferentes proteínas y por ende a las que se leen, se especifican en cada una de las secciones donde se utiliza este método (Harris, 1989).



### 6.3.5. Geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida (PAGE) con un porcentaje de 10 para el gel separador y 4 para el gel concentrador de acuerdo al **Cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Geles de poliacrilamida

Reactivo	Gel separador (10%)		Gel concentrador (4%)	
	ml	Concentración final %	ml	Concentración final %
Agua	4.816		2.825	
Acrilamida 30% -Bisacrilamida 0.8%	3.330	33.30	0.666	13.32
Buffer resolovedor (0.375 M Tris-Cl pH 8.8)	1.250	12.50	-----	-----
Buffer concentrador (0.5 M Tris-Cl pH 6.8)	-----	-----	1.250	25.00
Persulfato de amonio 1.5%	0.500	5.00	0.250	5.00
TEMED	0.010	0.10	0.007	0.14
SDS*	0.100	1.00	0.050	1.00

\*Solo se agrega a geles en condiciones desnaturalizantes

El porcentaje de agua se agregó en función de si el gel es nativo o en condiciones desnaturalizantes y es ajustado al 100%.

#### 6.3.5.1. Determinación de actividad hidrolítica en gel

Para indicar la existencia de actividad hidrolítica en gel (Zimograma) se realizó PAGE de la muestra de PPasa. Al gel, en condiciones nativas, se agregó aproximadamente 0.05 a 0.12 mg de proteína más 15 µl de mezcla de digestión (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul bromofenol). Se corrió a 20 mA el gel concentrador y a 40 mA el gel separador a 4 °C con buffer de electroforesis (0.025 M Tris, 0.192 M de glicina, pH 8.3). Para medir la actividad hidrolítica en el gel se prepararon las disoluciones indicadas en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Disoluciones para realizar actividad en gel.

Solución I	Solución II	Solución II
20 mM Tris-HCl pH 8.6	50 mM Tris-HCl pH 8.6	10% Molibdato-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [5% de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4H <sub>2</sub> O; 40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N]
	5 mM MgCl <sub>2</sub>	90% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M
	3 mM NaPPi	1.5 % Ac. Ascórbico

El gel se lavó en la solución I y se mantuvo con agitación durante 15 min., con el fin de cambiar el pH. Una vez que transcurrió el tiempo, el gel se pasó a la solución II (medio de reacción) y se mantuvo en baño de agua a 37 °C durante 15 min. e inmediatamente después del tiempo de reacción se lavó con solución I. Por último, se reveló el gel con solución III en baño de agua a 45 °C hasta que se observaron las bandas de actividad. Fue medido el frente del gel (se tomó la distancia recorrida por el azul de bromofenol) y la distancia recorrida por la enzima, con lo cual se determinó el **Rf**, que es específico para la enzima. Los cálculos se hicieron bajo la siguiente relación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra el frente del gel}}{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}$$

Después el gel se tiñó con colorante Azul de Commassie (Sung-Jong e Ishikawa 2005), para verificar de manera cualitativa el grado de purificación y ubicar la proteína en el gel.

### 6.3.5.2. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Para conocer el peso molecular y de cuántas unidades está formada la enzima, se realizó un gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de segunda dimensión (al buffer de corrida de geles en condiciones desnaturalizantes también se le agregó 1% SDS pH 8.3), utilizando marcadores de peso molecular como estándar y la sPPasa purificada de la columna de exclusión molecular. Posteriormente, se tiñó con colorante Azul de Commassie.

La movilidad electroforética relativa (**Rf**) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con los estándares de PM conocido (**Cuadro 3.**), se obtuvo una ecuación de referencia en la cual se pudo interpolar la muestra de PM desconocido (García, 2000).

**Cuadro 3.** Marcadores de peso molecular (SIGMA)

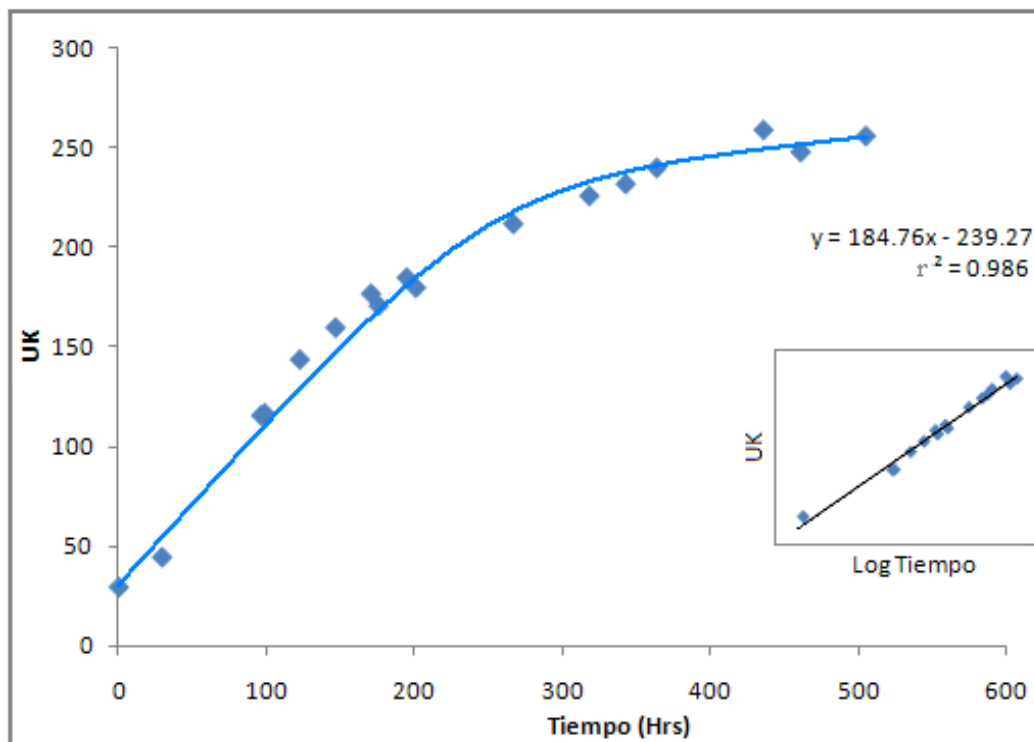
Marcador	Peso molecular	
	kDa	
$\alpha$ -lactalbumina	14.2	
Anhidrasa carbónica (eritrocito bovino)	29.0	
Albumina de huevo	45.0	
Albumina suero de bovino	Monómero	66.0
	Dímero	132.0

Todos los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces y los resultados se obtuvieron como la media de los datos (Richter y Schafer, 1992; Escobedo, 1998). Los reactivos fueron de grado químico y se obtuvieron de proveedores comerciales.

## VII. Resultados

### 7.1. Curva de crecimiento

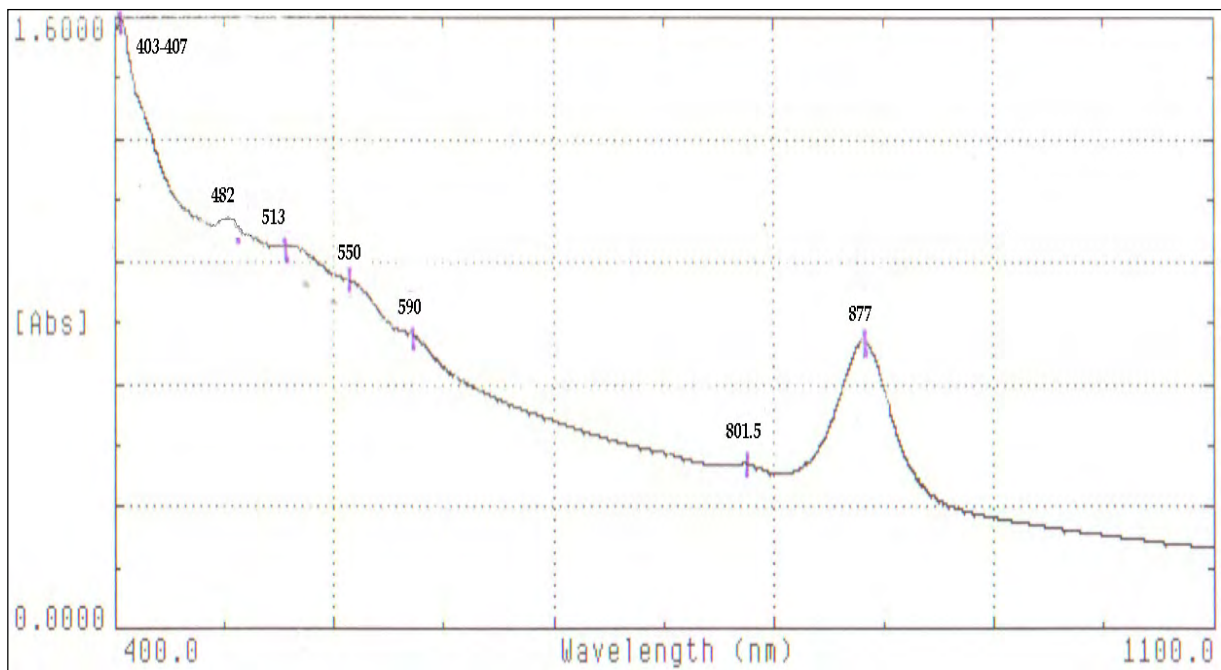
De acuerdo a la curva de crecimiento obtenida de *Rhv. sodomensis* (Gráfica 1.) se fijó un tiempo de 12 días (288 hrs.) para cosechar las bacterias, ya que en este tiempo se alcanza la fase logarítmica tardía. La cantidad óptima de NaCl para el medio se estableció en 6%; con los otros porcentajes de NaCl en el medio se registró nulo crecimiento bacterial. El 6% de NaCl en el medio de *Rhv. sodomensis* representa una mínima cantidad de NaCl con respecto al 12% requerido en el medio 747 y en función del 29% de sales disueltas (cloruro sódico, cloruro potásico y bromuro magnésico) en el Mar Muerto (Extreme Science 2008).



Gráfica 1. Curva de crecimiento de *Rhodovibrio sodomensis*, con una concentración de NaCl de 6% en el medio.

## 7.2. Espectro y tinción de Gram

El espectro obtenido del cultivo de bacterias diluido 1:10 con agua desionizada muestra concordancia en muchos de los picos del espectro que han sido reportados en la bibliografía (Imhoff 2005; Mack *et al.*, 1996) (**Fig. 7.**), el pico de 377 que no aparece es porque el espectro estaba sólo con luz visible, el otro pico de 421 corresponde a la bacterioclorofila *a* y su ausencia obedece seguramente a la diferencia de medios utilizados entre los autores (cromatóforos) y el utilizado en estos ensayos (bacterias vivas). Estos picos leídos son suficientes para hacer la comparación. Con este espectro se puede deducir que la cepa de *Rhv. sodomensis* no estaba contaminada con otras especies de bacterias fotosintéticas. Con la tinción de Gram descartamos la contaminación de hongos y otras especies de bacterias. En ambos casos se observó que el cultivo estaba libre de contaminantes.



<b>Reportados</b>	337	427	488	516	551	591	803	875-880
<b>Observados</b>	403-406.5		482	513	550	590	801.5	877

**Fig. 7.** Comparación de los puntos en el espectro de absorción reportados (Imhoff 2005 y Mack 1993) y observados experimentalmente en la cepa trabajada, en nm.

### 7.3. PPasa membranal

No se registró actividad hidrolítica alguna de la H<sup>+</sup>PPasa en el extracto de cromatóforos hecho de *Rhv. sodomensis* bajo ninguna de las condiciones ensayadas reportadas en el método. En el **Cuadro 4**, se presentan los resultados obtenidos de actividad hidrolítica de la H<sup>+</sup>PPasa de tres bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas, incluyendo *Rhv. sodomensis*, bajo las mismas condiciones de purificación y medio de reacción.

**Cuadro 4.** Actividad Especifica de la H<sup>+</sup>PPasa

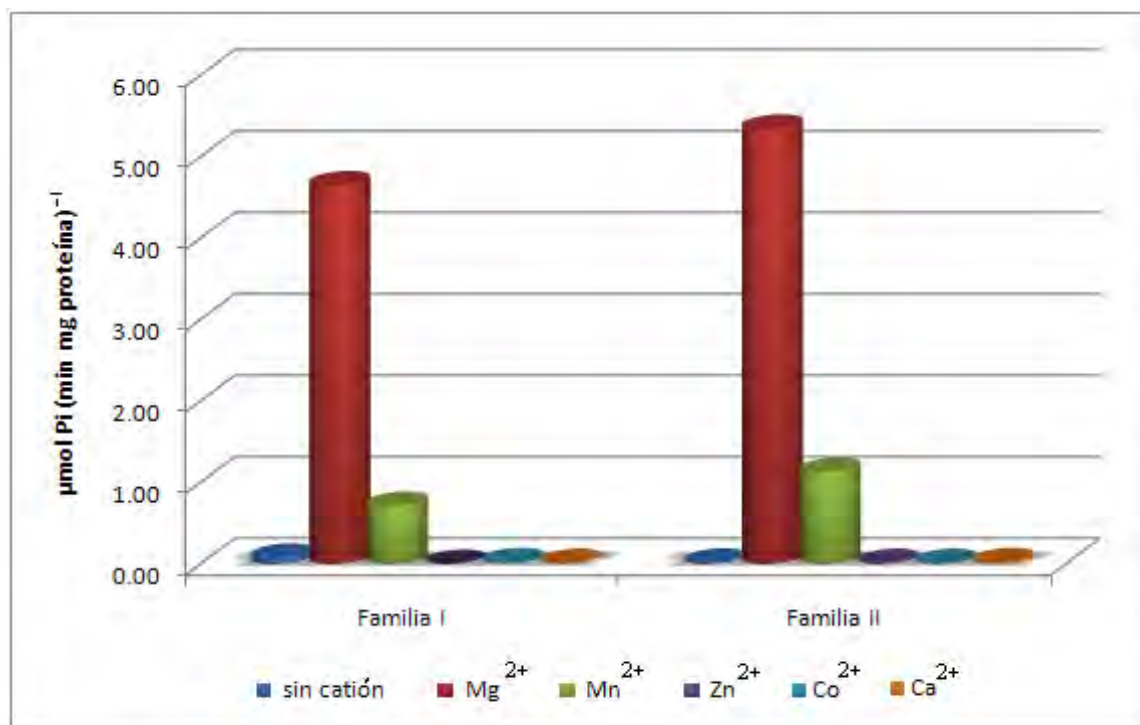
	<i>Rsp. rubrum</i>	<i>Rba. sphaeroides</i>	<i>Rhv. sodomensis</i>
AE*	0.10	0.00	0.00

\*  $\mu\text{mol Pi (min mg de proteína)}^{-1}$

### 7.4. Caracterización de la PPasa citoplásmica

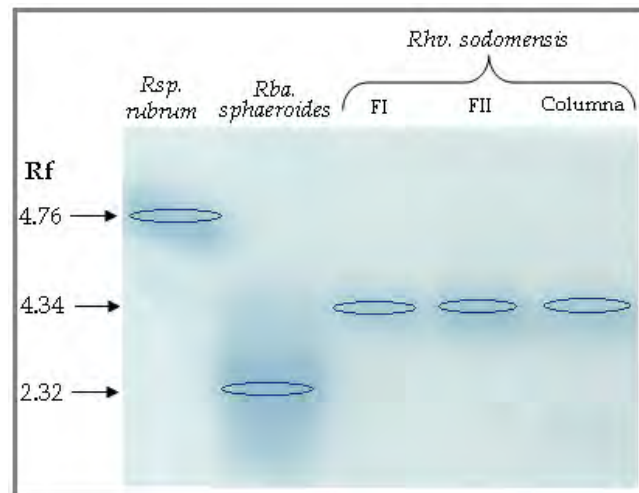
#### 7.4.1. Familia de la PPasa citoplásmica de *Rhodovibrio sodomensis*

Para los ensayos de caracterización bioquímica se utilizó la enzima PPasa citoplásmica purificada parcialmente (Gómez-García, 2007) como FII (obtenida después de la primera diálisis) debido a que mostró mayor actividad hidrolítica. La PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis* se purificó parcialmente de acuerdo al método propuesto para la purificación de la Familia I y también del propuesto para la Familia II, con ambos extractos se obtuvo una actividad hidrolítica muy cercana, para FI **4.140**  $\mu\text{mol Pi (min mg de proteína)}^{-1}$  y para FII se registró una actividad de **5.343**  $\mu\text{mol Pi (min mg de proteína)}^{-1}$  (**Gráfica 2.**), además ambos extractos mostraron un comportamiento similar frente a los diferentes cationes divalentes. La actividad específica de la sPPasa purificada en la columna de Sephacryl S200 HR fue de **11.145**  $\mu\text{mol Pi (min mg de proteína)}^{-1}$ .



**Gráfica 2.** Comparación de la actividad hidrolítica específica de la PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis* purificada parcialmente como FI y como FII. El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl pH 8.6; 2mM NaPPi, 3 mM de cationes divalente (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup>) y 35 μg de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C.

Para constatar si eran dos proteínas diferentes se realizó un Zimograma. Se encontró que las bandas de la actividad hidrolítica se marcaban a la misma distancia (tienen el mismo Rf), por lo cual se estableció que es la misma enzima y que cualquiera de los dos métodos sirven para su purificación. En este gel se incluyeron extractos dializados de la sPPasa de *Rhodospirillum rubrum* [prototipo FI (Romero *et al.*, 2003)] y de *Rhodobacter sphaeroides* [prototipo FII (Celis *et al.*, 2003)] como referencia de los dos tipos de PPasa citoplásmica reportados en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas. Los extractos de *sodomensis* corrieron con un Rf intermedio al de *Rba. sphaeroides* y *Rsp. rubrum* ( **Fig. 8.**).



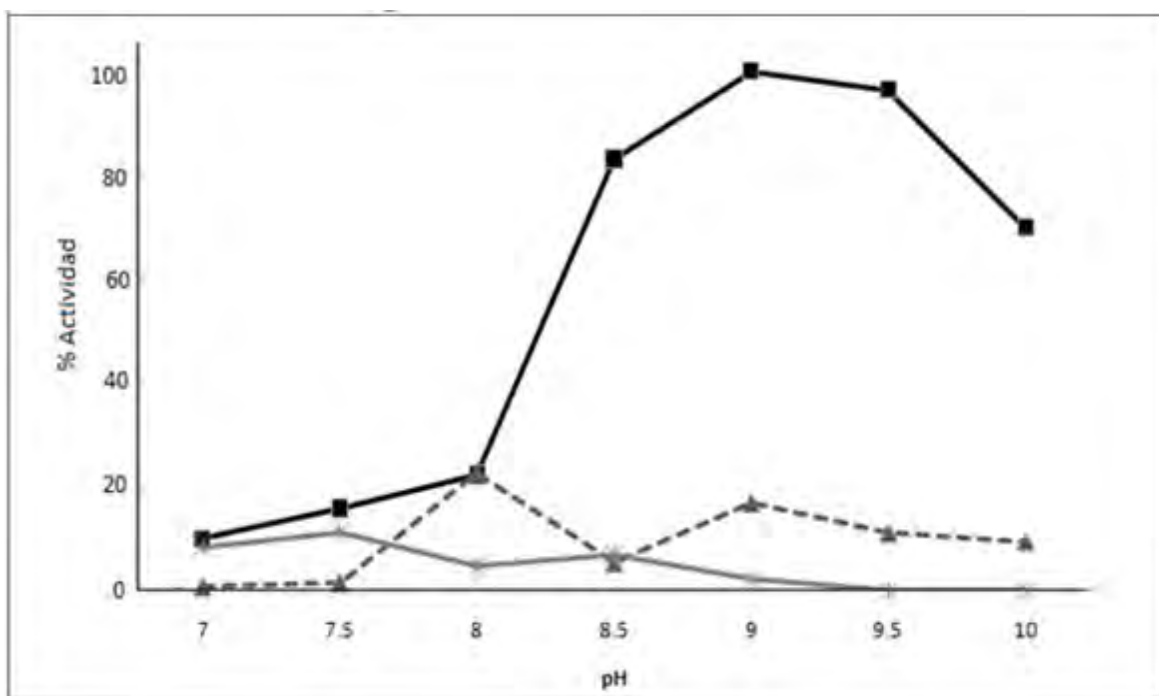
**Fig. 8.** Zimograma de los extractos dializados de la sPPasa de *Rhv. sodomensis* purificada como FI y como FII.

Se hicieron ensayos preliminares donde la sPPasa de *Rsp. rubrum* se purificó bajo las condiciones para la Familia II y *Rba. sphaeroides* como FI para tomar de referencia de que tan selectivos eran estos dos métodos para cada familia y si las sPPasas de estas especies se comportaban como la de *Rhv. sodomensis*, encontrándose que ninguna de las dos proteínas de estas spp. se podían purificar por ambas formas.



### 7.4.2. Perfil de pH

La PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis* cataliza la hidrólisis del complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> sobre un amplio intervalo de pH. Por medio de un análisis gráfico del logaritmo de la velocidad máxima aparente contra el valor de pH, modelo diprótico (Segel 1975), se encontró que el pH óptimo de la enzima tiene un valor de 9.25. Con otros complejos Me-PPi<sup>2-</sup>, como Mn-PPi<sup>2-</sup> y Co-PPi<sup>2-</sup> la actividad hidrolítica disminuye por abajo del 20% de la actividad registrada con el complejo Mg-PPi<sup>2-</sup>. En el caso del complejo Co-PPi<sup>2-</sup>, se observa que tiene una ligera predilección por pH ácido y que decrece al incrementarse la alcalinidad (Gráfica 3.).



**Gráfica 3.** Perfil de pH de la PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis*. El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl (pH 7-9), Gly- Gly (pH 9.5-10), respectivamente; 2mM NaPPi, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (■) o MnCl<sub>2</sub> (▲) o CoCl<sub>2</sub> (\*) y 35 μg de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C.

## VIII. Discusión

La pirofosfatasa citoplásmica de la bacteria fotosintética halófila *Rhv. sodomensis* a diferencia de las sPPasas de otras bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas y no halófilas reportadas en la bibliografía se puede purificar por los dos métodos propuestos (FI Y FII), un comportamiento compartido con *Rhodovibrio salinarum* bacteria halófila ensayada en nuestro laboratorio (Celis, en preparación). Esto indica la utilización del  $Zn^{2+}$  y del  $Co^{2+}$  como protectores, además de incorporar al  $Mg^{2+}$  en esta función. Hasta ahora no se ha determinado si es una propiedad que sólo presentan las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas salinas, ni tampoco se ha establecido el papel biológico que representa esta diversidad catiónica utilizada como protectores. Hay que recordar que estas bacterias extremofilas están expuestas a ambientes adversos y que requieren de mecanismos que ayuden a continuar los procesos biológicos y que sean fisiológicamente versátiles (Unemoto *et al.*, 1973; Ollivier *et al.*, 1994; Madigan, 2003).

La separación que se lleva a cabo en el gel de electroforesis en condiciones nativas se explica porque la velocidad de migración electroforética depende de la carga de la molécula, su peso molecular y su estructura tridimensional bajo la influencia de un campo eléctrico (García, 2000), de ello se deduce que las PPasas pertenecientes a las tres diferentes spp de bacterias fotosintéticas utilizadas para el PAGE difieren en su peso molecular o su carga, sobre su estructura tridimensional no hay elementos para hacer alguna afirmación sobre la posibilidad de que la sPPasa de *Rhv. sodomensis* sea o no una isoforma de cualquiera de las dos sPPasas descritas en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas.

Respecto al perfil de pH, la actividad hidrolítica disminuye significativamente a valores de pH menores de 8.5 y mayores a pH 10, aún así esta actividad es suficientemente alta para sostener el papel vital de la PPasa

citoplásmica (Richter y Schafer 1992). De acuerdo a Segel (1975), el declive en la actividad enzimática puede ser resultado de la formación de una modalidad iónica inapropiada del sustrato, la enzima o ambos; de acuerdo a Klemme y Gest (1971) a altos valores de pH en presencia de  $Mg^{2+}$  la afinidad de la enzima por el sustrato es máxima, las propiedades cinéticas de la enzima presentan una dependencia a los valores de pH.

Parte de la tolerancia y estabilidad frente a altas temperaturas se observa en uno de los pasos de la purificación como Familia I, donde se somete al extracto crudo a 65 °C por 5 min., en ese caso es atribuible a la protección que ejerce el catión  $Zn^{2+}$  sobre la enzima (Klemme y Gest 1971). La temperatura de máxima actividad de la enzima es casi 10 °C mayor a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria en condiciones naturales. La diferencia entre la temperatura óptima de la PPasa y la temperatura óptima de crecimiento de *Rhv. sodomensis* da indicios de la utilidad de los cofactores para la termofilicidad en células (Richter and Schafer 1992).

En la **Gráfica 5.** se observa que la activación llevada a cabo por la temperatura, cuando ya está formado el complejo  $Mg-PPi^{2-}$ , es mucho más eficiente llegando a incrementar la actividad a más del doble de lo que se registra a 37 °C; en un experimento se determinó el grado de hidrólisis del PPi producto de la exposición al calor, sin la presencia de la enzima y del catión a 75 °C (estudios preliminares), este valor sólo tuvo un promedio del 10% de la cantidad de Pi cuantificado frente al 100% de la actividad registrada con proteína a 37 °C. Es decir, el calor hidroliza al PPi en aproximadamente un 10% de lo que lo hace la enzima-sustrato en un medio a 37 °C.

La enzima es muy específica para el sustrato  $MgP_2O_7^{2-}$  como la PPasa de la mayoría de los organismos, en contraste con la PPasa de mitocondrias de tejidos de mamíferos o extractos de células HeLa que poseen alta actividad hidrolítica con otros sustratos usualmente nucleótidos fosfatados (Wang y Strittmatter, 1975).

Josse (1966) y a Lahti (1983) plantearon que el  $\text{PPi}^{4-}$  actúa como un inhibidor competitivo, debido a que se une hasta 50 veces más estrechamente al sitio activo de lo que lo hace el sustrato verdadero,  $\text{MgPPi}^{2-}$ . El carácter sigmoideo de la curva no necesariamente indica un comportamiento alósterico de la enzima. En este caso la forma sigmoide denota como consecuencia de que el verdadero sustrato es  $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$  y el  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  es un inhibidor (Baykov *et al.*, 1996).

La mayor actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis* se obtiene cuando hay dos moléculas de  $\text{Mg}^{2+}$  por cada molécula de  $\text{PPi}^{4-}$ . En los resultados, se pueden identificar dos papeles que juega el  $\text{Mg}^{2+}$  en la actividad de la PPasa de *Rhv. sodomensis*, el primero como parte importante del sustrato verdadero,  $\text{MgPPi}^{2-}$  (**Cuadro 5.**) y el segundo como un activador (**Gráfica 6.**). Sin embargo este no es un comportamiento general de la familia *Rhodospirilleceae*, ya que Gómez-García (2007) ha descrito el comportamiento de las sPPasas de distintas bacterias fotosintéticas y con ello mostró una marcada variabilidad sobre la dependencia de cationes, como las enzimas de *Rsp. rubrum* y *Rhodopseudomona viridis* que son dependientes al  $\text{Mg}^{2+}$ ; la sPPasa de *Rba. capsulatus* que prefiere al  $\text{Mn}^{2+}$  para llevar a cabo la hidrólisis del  $\text{PPi}^{4-}$  o como en *Rhodopseudomona palustris*, cuyo sustrato óptimo es el que se forma con el catión  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{PPi}^{4-}$ . De acuerdo a este autor, esta gran variabilidad en la dependencia de cationes entre las PPasas de bacterias fotosintéticas obedece a sus adaptaciones a ambientes metabólicos específicos.

En el Mar Muerto la concentración de  $\text{MgCl}_2$  supera el 1 M, dos grupos de procariontes que lo habitan pueden ser definidos en base a sus requerimientos de  $\text{Mg}^{2+}$ . Los que tienen altos requerimientos (0.5 M) de  $\text{Mg}^{2+}$  para su crecimiento óptimo y son altamente tolerantes (arriba de 1.8 M) al  $\text{Mg}^{2+}$ ; en contraste hay otros organismos, como *Rhv. sodomensis*, cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre el 0.1-0.3 M de  $\text{Mg}^{2+}$  y crece muy pobremente arriba del 0.6 M de  $\text{Mg}^{2+}$  (Oren 1983),

en el medio 747: DSIC la concentración final de  $Mg^{2+}$  está en 37.83 mM, muy por debajo del óptimo reportado.

El papel primario de las sales en el metabolismo de las bacterias halófilas es descrito como una función regulatoria en las actividades enzimáticas, y particularmente sobre la PPasa ejercen un papel inhibitor. Un grupo de investigadores de Japón (Unemoto *et al.*, 1973), trabajando con la bacteria moderadamente halófila *Vibrio alginolyticus*, encontraron que en presencia de altas concentraciones de magnesio libre no se presentaba tal efecto de las sales sobre la actividad enzimática de la PPasa. El magnesio es particularmente importante para las bacterias salinas, lo que explica que actué como protector, activador y parte del sustrato en la PPasa citoplásmica de *Rhv. sodomensis*.

La inhibición del fluoruro sobre la PPasa membranal y PPasa citoplásmica de FI es explicada por la formación del complejo E-PPi-F (1:2:2) que es sumamente estable ( $T_{1/2} \approx 2$  días a 4°C pH 7.5), donde el PPi es unido covalentemente a la enzima. Baykov y sus colaboradores en 1977, para explicar la inusual estabilidad de esta asociación, proponen un mecanismo de unión simultánea del fluoruro y del PPi al sitio activo de la enzima, donde se asume que la unión ocurre de una manera en que hay un impedimento mutuo entre el fluoruro y el PPi para liberar al sitio activo de la pirofosfatasa. Por lo que, el fluoruro se considera un potente inhibidor a nivel del sitio activo de estas enzimas, ya que impide la unión de los cationes que son indispensables para la actividad catalítica de las PPasas.

La magnitud y el significado real de  $V_{max}$  y  $K_m$  pueden cambiar de una enzima a otra y estos valores describen un estado estacionario de la reacción sin aportar información sobre la naturaleza, velocidad y número de los pasos discretos de la reacción, aún así estos valores sirven para caracterizar y comparar las eficiencias catalíticas de las enzimas. Bajo las condiciones ensayadas (equimolecularidad de  $Mg^{2+}$  y de  $PPi^{2-}$ ), se obtuvieron 2/3 partes de la actividad

registrada cuando la relación  $Mg^{2+}/PPi^{2-} = 1.5$ . El valor de  $K_m$  obtenido muestra poca eficiencia de la PPasa hacia el sustrato.

La sPPasa de *Rhv. sodomensis* no muestra un comportamiento que pueda ser estandarizado y catalogado para ubicarla en una de las dos familias de PPasa citoplásmicas descritas hasta el momento, presentes en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas ni en la forma de purificación ni en su comportamiento en gel de electroforesis. La mayoría de sus características bioquímicas se encuentran relacionadas con las PPasas de Familia I (**Cuadro 6.**); como la ausencia de actividad hidrolítica sin catión y la alta sensibilidad a la inhibición por NaF. El catión  $Mg^{2+}$  es parte primordial de su sustrato verdadero y como funciona como activador, no así el  $Mn^{2+}$ , que para la FII funciona al igual que el  $Mg^{2+}$  como activador y parte del sustrato, su peso molecular de 151 kDa, claramente mayor al PM citado para las PPasas de FII. Aunque presente estas características, la mayoría de FI, no cumple con la correlación que se ha manejado entre la presencia de PPasa citoplásmica de Familia I y la existencia de actividad hidrolítica de la  $H^+PPasa$ , además de tener una actividad hidrolítica mayor a la reportada para Familia I. De acuerdo con lo anterior, y a espera de más evidencia experimental, se abre la posibilidad de la existencia de un nuevo tipo o Familia de PPasa citoplásmica, anexa a las dos ya existentes.

## IX. Conclusiones

- ❖ En cuanto al crecimiento de la cepa tipo DSM No. 9895 de la bacteria fotosintética *Rhodovibrio sodomensis*, la óptima concentración de NaCl en el medio es de 6% y el tiempo de generación es de 12 días.
- ❖ No se encontró actividad hidrolítica de H<sup>+</sup>PPasa.
- ❖ Al igual que la sPPasa de la bacteria fotosintética halófila púrpura no sulfurosa *Rhv. salinarum* la sPPasa de *Rhv. sodomensis* puede ser purificada como FI y como FII, presentando mayor actividad hidrolítica cuando es purificada como FII.
- ❖ Tiene un comportamiento electroforético diferente (R<sub>f</sub> intermedio) a la sPPasa de *Rps. rubrum* (FI) y a la sPPasa de *Rba. sphaeroides* (FII).
- ❖ La caracterización de la PPasa se presentan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 6** Características bioquímicas de la sPPasa de la bacteria *Rhodovibrio sodomensis*

<b>pH óptimo</b>	9.25
<b>Termoestabilidad (°C)</b>	35-65
<b>Temperatura activación (°C)</b>	55
<b>Sustrato</b>	MgP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>
<b>Catión activador</b>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Inhibidores</b>	NaF y PPi <sup>2-</sup>
<b>Actividad con diferentes cationes divalentes</b>	Mg <sup>2+</sup> > Mn <sup>2+</sup> > Zn <sup>2+</sup> > Co <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>
<b>K<sub>m</sub> (mM)</b>	0.138
<b>V<sub>max</sub>*</b>	3.49
<b>PM (kDa)</b>	151
<b>Subunidades moleculares</b>	Dos de 75 kDa

\* μmol Pi min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup> con concentraciones equimoleculares de sustrato

## X. Referencias

- ④ **Avaeva, S. M.** (2000). Active Site Interactions in Oligomeric Structures of Inorganic Pyrophosphatases. *Biochemistry*. 65: 361-372.
- ④ **Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B. A.** (1978). Coupling Factors, en: Clayton, R. K. Y Sstrom, W. R. (Eds.) *The Photosynthetic Bacteria.*, Plenung Press, New York and London. pp. 615-628.
- ④ **Baltscheffsky, M.** (1967). Inorganic pyrophosphatase as energy donor in cromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature*. 216: 241-243.
- ④ **Baltscheffsky, M. and Baltschesffsky, H.** (1992). Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatases. En L Ernster (Ed), *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Science Publishers BV, pp 331-348.
- ④ **Baltscheffsky, M. and Nyrén, P.** (1984). The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. *Bioenergetics*. Edit. L. Ernster. Ed. Elsevier, Amsterdam. pp 187-206.
- ④ **Baltscheffsky, M., Schultz, A. y Baltscheffsky, H.** (1999). H<sup>+</sup>-PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett*. 457: 527-533.
- ④ **Baykov, A., Artjukov, A. and Avaeva.** (1977). Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. III. Dependence on the nature of substrate and metal ion cofactor. *Biochirnica et Biophysica Acta*. 481: 195 – 201.
- ④ **Baykov, A., Cooperman, B., Goldman, A. and Lahti, R.** (1999). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog. Mol. Subcell. Biol*. 23: 127-150.
- ④ **Baykov, A., Hyytia, T., Volk, S., Kasho, V., Vener, A., Goldman, A., Lahti, R. and Coopermam, B.** (1996). Catalysis by *Escheriquia coli* Inorganic Pyrophosphatase: pH and Mg<sup>2+</sup> Dependence. *Biochemistry*. 35: 4655-4661.



- Ⓢ **Bonora, P. Principi, I. Hochkoepler, A. Borghese, R. and Zannoni, D.** (1998). The respiratory chain of the halophilic anoxygenic purple bacterium *Rhodospirillum sodomense*. *Arch Microbiol.* 170: 435-441.
- Ⓢ **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Ⓢ **Celis, H.** (En preparación). Pirofosfatasa citoplásmica en bacterias halófilas fotosintéticas purpura no sulfurosas.
- Ⓢ **Celis, H. and Romero, I.** (1987). The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and divalent cations. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 19: 255-272.
- Ⓢ **Celis, H., Franco, B., Escobedo, S. and Romero, I.** (2003). *Rhodobacter sphaeroides* has a family II pyrophosphatase: comparison with other species of photosynthetic bacteria. *Arch Microbiol.* 179: 368-376.
- Ⓢ **Chen, J. Brevet, A. Fromat, M. Leveque, F. Schmitter, JM. Blanquet, S and Plateau, P.** (1990). Pyrophosphatase is essential for growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 5686-5689.
- Ⓢ **CNC-IUUBMB** [en línea] 2009 [2 julio 2009] URL disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/6/1/>
- Ⓢ **DSMZ**, medium 000747 [en línea] 2005 [27 noviembre 2006] URL disponible en: <http://www.dsmz.de/micoorganisms/html/media/medium000747.html>.
- Ⓢ **Edwards, J. ap Rees, T., Wilson, P. and Morell, S.** (1984). Measurement of the inorganic pyrophosphate content in tissues of *Pisum sativum L.* *Planta.* 162: 188-191.

- ④ **Escobedo, S.** (1998). Inhibición de la pirofosfatasa membranal de *Rhodospirillum rubrum* por trifenilestaño. Tesis para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias, UNAM. Director Dra. Irma Romero Álvarez. Pg. 46.
- ④ **Escobedo, S., Jimenez-Xolalpa, D., Reyes, B., Romero, I. y Celis, H.** (2005). Correlación entre el tipo de pirofosfatasa citoplásmica y la presencia de pirofosfatasa membranal en bacterias fotosintéticas purpura no sulfurosas. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas.
- ④ **Extreme Science 2008.** [en línea] Lowest Elevation... Dead Sea [julio 2009] URL disponible en: <http://www.extremescience.com/DeadSea.htm>
- ④ **Fabrichniy, I., Lehtio, L., Tammenkoski, M., Zyryanov, A., Oksanen, E., Baykov, A., Lahti, R. and Goldman, A.** (2007). A Trimetal Site and Substrate Distortion in a Family II Inorganic Pyrophosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 1422-1431.
- ④ **García, H.** (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 1(2):31-41.
- ④ **García-Contreras, R., Celis, H. and Romero, I.** (2004). Importance of *Rhodospirillum rubrum* H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase under Low-Energy Conditions. *Journal of Bacteriology*. 186: 6651-6655.
- ④ **Gómez-García, M., Losada, M. and Serrano, A.** (2002). Expression studies of two paralogous *ppa* genes encoding distinct Family I pyrophosphatases in marine unicellular cyanobacteria reveal inactivation of the typical cyanobacteria gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 302: 284-292.
- ④ **Gómez-García, M., Losada, M. and Serrano, A.** (2007). Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic

pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. FEBS Journal. 274: 3948-3959.

- ④ **Harris, E. L. V.** (1989). Chapter 3 “Concentration of the extract” in Protein Purification methods. Edit. Harris E. L. V. and Angal S. Ed. IRL PRESS. Oxford. pp. 155.
- ④ **Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A. K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A.** (2001). Towards a Quantum-mechanical description of Metal Assisted Phosphoryl Transfer in Pyrophosphatase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 3121-3126.
- ④ **Howard, A. and Lungren D. J.** (1970). Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. 48: 1302-1307.
- ④ **Imhoff, J.** (2001). True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. Arch Microbiol. 176:243-254.
- ④ **Imhoff, J.** (2005). Genus VIII. **Rhodovibrio**. In Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology 2ed. Vol. II parte C. Edit. Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J. Ed. Springer. EUA, pp. 36-37.
- ④ **Josse, J.** (1966). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. J. Biol. Chem. 241: 1938-1947.
- ④ **Keister, D. L. and Minton, N. L.** (1971). ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42: 932-939.
- ④ **Keister, D. L. and Yike, N. J.** (1967a). Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD<sup>+</sup> reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Arch. Biochem. Biophys. 121: 415-422.

- ④ **Keister, D. L. and Yike, N. J.** (1967b). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 6: 3847-3857.
- ④ **Klemme, J. and Gest, H.** (1971). Regulatory Properties of inorganic pyrophosphatase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad.*, 68: 721-725.
- ④ **Kornberg, A.** (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions, en *Avances in Enzimology*. Interscience 18: 191-240.
- ④ **Kuhn, N. J. and Ward, S.** (1998). Purification, properties, and multiple forms of a manganese-activated inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 354: 47-56.
- ④ **Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S. and Young, T. W.** (2000). *Methanococcus jannaschii* OR Fmj0608 codes for a class C inorganic pyrophosphatase protected by  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  ions against fluoride inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 292-298.
- ④ **Lahti, R.** (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 47: 169-179.
- ④ **Lahti, R., Pitkäranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-kalske, E., and Heinonen, J.** (1988). Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 5901- 5907.
- ④ **Lawson, J. W. R. and Veech, R. L.** (1979). Effects of pH and free  $\text{Mg}^{2+}$  on the  $K_{eq}$  on the creatinine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 254: 6528- 6537.
- ④ **López-Marqués, R., Pérez-Castiñeira, J., Losada, M. and Serrano, A.** (2004). Differential Regulation of Soluble and Membrane-Bound Inorganic

Pyrophosphatases in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* Provides Insights into Pyrophosphate-Based Stress Bioenergetics. *Journal of Bacteriology*. 186: 5418-5426.

- ② **Losada, M., Varga, M., de la Rosa, M. and Florencio, F.** (1999). *Los Elementos y Moléculas de la vida*. Vols. I y II. Editorial Rueda, Madrid.
- ② **Lowry, O., Rosebrough, N.J; Farr, A.L. and Randal, R. J.** (1951). Protein measurement with the Follin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 254: 6528-6537.
- ② **Lyndal, J.** (1997). Enzymes: classification, kinetics, and control. In *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Edit. Devlin, T. Ed. Wiley-Liss, pp 127-178.
- ② **Mack, E.E., Mandelco L., Woese C. R. and Madigan M.T.** (1993). In validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 59. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1189-1190.
- ② **Madigan, M.** (2003). Anoxygenic phototropic bacteria from extreme environment. *Photosynthesis Research*. 76: 157-171.
- ② **Maeschima, M.** (2000). Vacuolar H<sup>+</sup>- Pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*. 1465: 37-51.
- ② **Malacinski, G. and Konetzka W.** (1967). Orthophosphite-nicotinamide adenine dinucleotide oxireductase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 93: 1906-1910.
- ② **McLaughlin, J. and Aley, S.** (1985). The Biochemistry and Functional Morphology of the *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Protozoology*. 32: 221- 240.

- ④ **Meis de, L.** (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 287-296.
- ④ **Metcalf, W. and Walfe R.** (1998). Molecular genetic analysis of phosphate and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J. Bacteriol.* 180: 5547-5558.
- ④ **Moe, O. A., and Butler, L. G.** (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. II. Kinetics of Mg<sup>2+</sup> activation. *J. Biol. Chem.* 247: 7308-7314.
- ④ **Molisch, H.** (1907). *Die Purpubakterien nach neuen Untersuchungen*, Fischer Verlag. Jena, 95 Pgs.
- ④ **Nyrén, P., Nore, B. Y Baltscheffsky, M.** (1986b). Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. *Biochemistry.* 30: 2883-2887.
- ④ **Nyrén, P and Strid, A.** (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototropic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77:265-270.
- ④ **Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. and Celis, H.** (2000). Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 174: 104-110.
- ④ **Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J-L., and Mah, R.** (1994). Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *Microbiological Reviews.* 58: 27-38.
- ④ **Ordaz, H., Sosa, A., Romero, I. and Celis, H.** (1992) Thermostability and activation by divalent cations of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Int. J. Biochem.* 24: 1633-1638.

- ④ **Oren, A.** (1983). *Clostridium lortetii* sp. Nov. a halophilic photosynthetic bacterium producing endospores whit attached gas vacuoles. Arch. Microbiol. 136: 42-48.
  
- ④ **Oren, A.** (1992). Bacterial activities in the Dead Sea, 1980-1991. En Survival at the upper limit of salinity. International Journal of Salt Lake research. Vol 1. No. 1., pp 7-20.
  
- ④ **Oren, A., Kessel M. and Stackebrandt, E.** (1989). *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligately anaerobic,moderately halophilic purple sulfur bacterium from a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. Arch Microbiol 151: 524- 529.
  
- ④ **Parfenyev, A. N., Salminen, A., Halonen, P., Hachimori, A., Baykov, A. A., and Lahti, R.** (2001). Quaternary structure and metal ion requeriment of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mutans*. J. Biol. Chem. 276: 24511-24518.
  
- ④ **Pfenning, 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.
  
- ④ **Pfenning, N. and Trüper, H.** (1974). The phototrophic bacteria, in: Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., edit. R. E. Buchanam and N.E, Gibbons. The Williams & Wilking Co., Baltimore, pp 24-64.
  
- ④ **Randahl, H.** (1979). Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. Eur. J. Biochem. 102: 251-256.
  
- ④ **Rapoport, T. A., Hohne, W. E., Reich, G., Heitmann, P., and Rapoport, S. M.** (1972). A kinetic model for the action of the organic pyrophosphatase from baker’s yeast. The activating influence of magnesium ions. Eur. J. Bichem. 26: 237-246.

- ② **Rea, P. y Poole, R.** (1993). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44: 157-180.
- ② **Reeves, R.** (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphatase? *TIBS.* 1: 53-55.
- ② **Reeves, R. and Guthrie, J.** (1975). Acetate kinase (pyrophosphate), a four pyrophosphate dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun.* 66: 1389-1395.
- ② **Remsen, C.** (1978). "Chapter 3 Comparative Subcellular Architecture of Photosynthetic Bacteria". *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. New York and London. Plenum Press, pp 31-40.
- ② **Richter, H. and Schafer, G.** (1992). Purification and enzymic characterization of the cytoplasmic pyrophosphatase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur. J. Biochem.* 209:343-349.
- ② **Romero, I. and Celis H.** (1990). El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bioenergética. *Ciencia.* 41: 297-305.
- ② **Romero, I. and Celis, H.** (1992). Evidence of an essential carboxyl residue in membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 617-624.
- ② **Romero, I., García-Contreras, R. and Celis, H.,** (2003). *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and secuencing. *Arch. Microbiol.* 173: 377-380.
- ② **Segel, I.** (1972). *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Ed. John Wiley & Sons. 955 Pgs.
- ② **Shiff, J. A.** (1972). A green safelight for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena, in: *Methods in*



Enzimology. Ed. San Pietro, A. vol. 24, parte B, Academic Press. New York, London, pp. 321-322.

- ② **Shintani, T., Uchiumi, T., Yonezawa, T., Salminen, A., Baykov, A., Lahti, R. and Hachimori, A.** (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Lett.* 439: 263-266.
- ② **Sivula, T., Salminen, A., Parfenyev, A., Pohjanjoki, P., Goldman, A., Cooperman, B., Baykov, A. and Lahti, R.** (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters.* 454: 75-80.
- ② **Sosa, A. and Celis, H.** (1995). H<sup>+</sup>/PPi Stoichiometry of Membrane-Bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 316: 421-427.
- ② **Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I. and Celis, H.** (1992). Mg<sup>2+</sup> is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 283: 561-566.
- ② **Stadtman, E. R.** (1970). Mechanism of enzyme regulation in metabolism, in P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, 3<sup>rd</sup> ed., vol. 1. Academic Press, Inc., New York. pp. 397-459
- ② **Summer, J. B.** (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100: 413-415.
- ② **Sung-Jong, J. and Ishikawa, K.** (2005). Characterization of the Family I inorganic pyrophosphatase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Archaea.* 1: 385-389.
- ② **Toledo, G., Green, W., Gonzalez, R., Christoffersen, L., Podar, M., Chang, H., Hemscheid, T., Trapido-Rosenthal, H., Short, J., Bidigare, R. and**

- Mathur, E.** (2006). High Throughput Cultivation for Isolation of Novel Marine Microorganisms. *Oceanography*. 19: 120-125.
- ② **Trüper, H. and Pfenning, N.** (1978). "Chapter 2: Taxonomy of the Rhodospirillales" The Photosynthetic Bacteria. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. New York and London. Plenum Press, pp. 19-26.
- ② **Unemoto, T., Tanaka, M. and Hayashi, M.** (1973). Effect of free magnesium and salts on the inorganic pyrophosphatase purified from a slightly halophilic *Vibrio alginolyticus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 327: 490-450.
- ② **Wang, P. and Strittmatter, C.** (1975). Characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase from chicken Liver. *Int. j. Biochem.* 6: 9-15.
- ② **Weil-Malherbe, H. and Green, H.** (1951). The Catalytic Effect of Molybdate on the Hydrolysis of Organic Phosphate Bonds. *Biochem.* 49: 286-292.
- ② **Wood, H. G.** (1977). Some reactions in which inorganic pyrophosphatase replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proc.* 36: 2197-2205.
- ② **Wood, H. G., W. E. O'Brien, and G. Michaels.** (1977). Properties of carboxytransphosphorylase; pyruvate, phosphate dikinase; pyrophosphate-phosphofructokinase and pyrophosphate-acetate kinase and their roles in the metabolism of inorganic pyrophosphate. *Adv. Enzymol.* 45: 85-155.
- ② **Young, T.W., Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S. Burges. D. and Cooke, G.D.** (1998). *Bacillus subtilis* ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?. *Microbiology*. 144: 2563- 2571.
- ② **Zyryanov, A., Shestakov, A., Lahti, R. and Baykov, A.** (2002). Mechanism by which metal cofactors control substrate specificity in pyrophosphatase. *J. Biochem.* 367: 901-906.