



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización bioquímica de la pirofosfatasa citoplásmica
de la arquea halófila *Halobacterium salinarum*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:
CAROLINA RICARDEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HELIODORO CELIS SANDOVAL



CIUDAD UNIVERSTARIA, CDMX, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Ricardez
García
Carolina
5564480204
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, Biología
310312286

2. Datos del tutor

Dr.
Heliodoro
Celis
Sandoval
hcelis@correo.ifc.unam.mx

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Horacio
Reyes
Vivas
hreyesvivas@yahoo.com.mx

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Saúl
Gómez
Manzo
saulmanzo@ciencias.unam.mx

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Francisco Guillermo
Mendoza
Hoffmann
francisco.guillermo.mendoza.hoffmann@uabc.edu.mx

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Emilio
Espinoza
Simón
eespinoza@email.ifc.unam.mx

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización bioquímica de la pirofosfatasa citoplásmica
de la arquea halófila *Halobacterium salinarum*
65 p
2019

AGRADECIMIENTOS

“Individualmente, no somos más que una gota. Juntos, somos el océano” Ryunosuke Satoro

A la (mi) grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme estudiar en tan hermosa institución desde la preparatoria, formarme como universitaria y abrirme sus espacios para iniciar mi futuro en la investigación.

Al Dr. Heliodoro Celis Sandoval, por guiarme en el camino de la ciencia y mostrarme la pasión por ella. Además de ser mi tutor de Tesis, por ser una excelente persona dispuesta a contarnos maravillosas historias llenas de sabiduría y enseñanzas.

A mis sinodales: Dr. Horacio, Dr. Manzo (sus materias fueron de mis favoritas e influyó en mi pasión por la investigación en laboratorio), Dr. Francisco (Aunque sé que ya eres todo un Dr., me da un enorme gusto que seas parte de este paso tan importante en mi vida Memo) y M. en C. Emilio, por todas sus recomendaciones en la elaboración de este trabajo y que aumentaron mi conocimiento y se refleja en este escrito.

A la Bióloga Claudia Peña Segura por todo su apoyo técnico para la elaboración de esta tesis. También por brindarme todo su amor desde que llegue al laboratorio, por apoyarme y ser como mi segunda madre.

A mis amigos de la Universidad: Marlene, Violeta, Yair y Julio. Sé que sin ustedes esos años de mi vida habrían sido aburridos y me habría volcado en la tristeza. Gracias por tantas historias, aprendizajes, risas, maldades, fiestas y momentos de estrés. Gracias por enseñarme que la vida es mejor si tienes amigos inseparables que te acompañen en tu formación, que te apoyen, que te vean crecer y que te vean convertirte en una mejor persona. Porque quiero que nunca dejemos de ser esos locos de los pastos.

A mis amigas Paula y Diana. Sé que ustedes me acompañarán el resto de mi vida.

Gracias a mi familia. Mamá, gracias por ser una mujer super increíble, fuerte, valiente y llena de amor, por dar todo lo que tienes para que nunca me haga falta algo. Gracias por enseñarme a salir adelante y decirme que nunca me dé por vencida. Papá, gracias por ser ese hombre trabajador que da todo por su familia, inclusive si te hace alejarte de casa, sé que eso es de las cosas que más te duelen. Iván, te admiro hermano, realmente no sabes cuánto, te has convertido en todo un hombre ejemplar (medio loco a veces) que todos los días me enseña algo nuevo. Gracias por ser ese hermano ideal el cual quise desde pequeña.

A mi amor, Raúl. Por mostrarme lo que significa amar, por siempre confiar en mí, mostrarme que soy más fuerte de lo que creo ser y enseñarme a ser una mejor persona cada día.

DEDICATORIA

A mi madre Gloria, a mi padre Santiago, mi hermano Iván y a mi pequeña Dona, por ser una maravillosa familia, llena de locas ideas, risas y bellos momentos. Sobre todo, por ser el pilar de mi vida entera, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por guiarme desde pequeña, por enseñarme que la vida no es fácil, pero si uno lucha por lo que quiere lo consigue; porque gracias a ustedes he llegado a la meta de mi vida.

INDICE DE CONTENIDO

i Abreviaturas.....	1
ii Resumen.....	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Archaeas	3
1.1.1 Clasificación de las archaeas.....	3
1.2 Clasificación de las archaeas halófilas.....	5
1.2.1 Características generales de <i>Halobacterium salinarum</i>	6
1.3 Formas de crecimiento.....	7
1.3.1 Fotosíntesis.....	8
1.4 El Pirofosfato.....	9
1.4.1 El papel del Pirofosfato en el metabolismo celular.....	9
1.5 Las Pirofosfatasas.....	11
1.5.1 Pirofosfatasas de membrana.....	12
1.5.2 Pirofosfatasas citoplásmicas.....	12
1.5.2.1 Pirofosfatasas de la Familia I.....	13
1.5.2.2 Pirofosfatasas de la Familia II.....	14
1.5.3 Pirofosfatasas en archaeas halófilas.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1 Cultivos de las archaeas.....	18
3.1.2 Condiciones de crecimiento	19
3.1.3 Curva de crecimiento.....	19
3.2 Cosecha de las archaeas.....	20
3.3 Caracterización bioquímica.....	20
3.3.1 Obtención de la Pirofosfatasa citoplásmica.....	20
3.4 Determinación de proteína	22
3.5 Determinación de la actividad hidrolítica.....	23
3.6 Determinación de la masa molecular de la proteína	24
3.6.1 Curva estándar de la columna de exclusión molecular.....	24
3.6.2 Separación de la muestra por cromatografía.....	24
3.7 Estimación de la masa molecular de la PPIasa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	25
4. RESULTADOS	
4.1 Curva de crecimiento.....	27
4.2 Purificación parcial de la Pirofosfatasa de <i>Halobacterium</i>	

<i>salinarum</i>	28
4.3 Requerimiento de cationes divalentes como co-sustrato (catión-PPi)	29
4.4 Especificidad del sustrato.....	30
4.5 Efecto del pH en la actividad hidrolítica de la enzima.....	31
4.6 Modificadores de la actividad hidrolítica.....	32
4.7 Activación por diferentes cationes monovalentes.....	33
4.8 Masa molecular del oligómero.....	35
4.8.1 Masa molecular del monómero.....	37
4.9 Constante de Michaelis-Menten (K_m) y Velocidad máxima (V_{max})...	38
4.9.1 Inhibición por sustrato.....	39
5.DISCUSIÓN.....	41
6.CONCLUSIONES.....	46
7.PERSPECTIVAS.....	48
8.BIBLIOGRAFÍA.....	49

Abreviaturas

3-PGA: Ácido 3-fosfoglicérico

A.E.: Actividad específica, nmoles Pi
min⁻¹ mg de proteína⁻¹

atm: atmósferas

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

BR: Bacteriorrodopsina

DNAsa: Desoxirribunucleasa II, Tipo
IV: de bazo porcino

DSMZ: Colección Alemana de
Microorganismos y Cultivos Celulares
(Alemania; Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen,
siglas en alemán).

Elón: *p*-metilaminofenol sulfato 29
mM + bisulfito de sodio 290 mM

FI: Familia I de PPiase citoplásmica

FII: Familia II de PPiase citoplásmica

H⁺PPiases: Protón-Pirofosfatasa,
Pirofosfatasa de membrana.

IDP: Imidodifosfato

kDa: Kilo Daltones

Na⁺PPiases: Sodio-Pirofosfatasa,
Pirofosfatasa de membrana

NCBI: Centro Nacional de
Información Biotecnológica (EUA,
siglas en inglés)

Me: Metal

min: Minuto (s)

PNP: *p*-nitrofenilfosfato

PM: Masa molecular

PPi: Pirofosfato

PPiase: Pirofosfatasa citoplásmica

R_f: Movilidad electroforética relativa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de
poliacrilamida en presencia de
dodecil sulfato de sodio

TEMED: N,N,N', N'-
Tetrametiletilendiamina

Tris: Tris (hidroximetil) amino metano

x g: Campo relativo de la centrifuga
por gravedad

RESUMEN

En este trabajo se caracterizó la enzima encargada de hidrolizar al pirofosfato en el citoplasma (conocida como Pirofosfatasa citoplásmica (PPiase)) de la arquea halófila *Halobacterium salinarum*.

La enzima se purificó parcialmente por el método de Familia I utilizado anteriormente en bacterias fotosintéticas. La PPiase expresó el máximo de su actividad con el catión divalente Mg^{2+} como cofactor; la enzima alcanzó el punto más alto cuando el Mg^{2+} se encontraba libre en el medio de reacción. El sustrato verdadero es $Mg\text{-PPi}^{2-}$ pues no hidroliza otros compuestos fosfatados como trifosfato de adenosina, difosfato de adenosina o *p*-nitrofenilfosfato. El funcionamiento óptimo es a un pH 10.5. La masa molecular observada del oligómero fue de 43.23 kDa dando como estructura cuaternaria un dímero; mientras que la del monómero es de alrededor de 19.73 kDa. Esta enzima mostró activación cuando se adicionó KCl y no otros cationes monovalentes. La actividad se inhibe parcialmente con el imidodifosfato y totalmente por el fluoruro de sodio (NaF) y molibdato de sodio (Na_2MoO_4). La K_m fue de 2.26 mM y una V_{max} de 48.78 $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. También se observó una inhibición por sustrato indicando una enzima reguladora a nivel del PPI intracelular.

INTRODUCCIÓN

1.1 Archaeas.

En 1970 todos los organismos, excepto los virus, podrían asignarse a uno de los dos dominios conocidos: Procariontes y Eucariontes. Sin embargo, Carl Woese y otros investigadores a finales de la década de los 70's descubrieron un tercer dominio al cual denominaron Archaea. Woese y colaboradores lograron determinar al dominio Archaea al utilizar secuenciación del ARN perteneciente a la pequeña subunidad del ribosoma (16S) donde al comparar las secuencias obtenidas del RNA ribosomal, establecieron un árbol filogenético que puede ser usado para relacionar todos los organismos a partir de un ancestro en común, así como para reconstruir la historia de la vida en la Tierra. De esta manera se reconocieron las tres líneas primarias de evolución, denominadas dominios: Eucarya (eucariotas), Bacteria (inicialmente eubacterias) y Archeae (inicialmente arqueobacterias) (Woese *et al.*, 1977). Actualmente la diversidad biótica sigue vigente con los tres dominios y desde entonces, las Archaeas han sido exhaustivamente investigados sobre todo en estudios evolutivos que exploran los orígenes de la vida y la evolución en la Tierra (Garrett y Klenk, 2007).

Aunque metabólicamente son diversos, la característica en común de la mayoría de los organismos pertenecientes a este dominio identificados hasta la fecha es la capacidad de existir en hábitats extremos, incluidos ambientes con alto contenido de sal, altas y bajas temperaturas, bajo pH y anoxia aguda, es por ello por lo que casi siempre sean identificados como organismos "extremófilos". Aunque no todos los extremófilos son miembros de Archaea y no todas las arqueas son extremófilas (Rothschild y Mancinelli, 2001) pues existen arqueas no extremófilas distribuidas a nivel mundial y abundantes en ambientes terrestres como sedimentos de agua dulce, suelos templados y otras condiciones menos extremas, lo que confirma que son omnipresentes (Robinson *et al.*, 2005; McLain, 2004).

1.1.1 Clasificación de las Archaeas.

Existen tradicionalmente tres categorías ecológicas que representan los patrones generales de las adaptaciones de las archaeas a ambientes extremos: metanógenas, termoacidófilas y halófilas (Cavicchioli, 2011).

Las archaeas metanógenas habitan en diversos tipos de ambientes todos ellos estrictamente anoxigénicos pues son incapaces de tolerar el oxígeno o las especies reactivas de oxígeno; se encuentran en el lodo de pantanos, capas de

cuerpos de agua dulce y marina, lodo proveniente de plantas de aguas residuales y arrozales, así como en el tracto gastrointestinal de los animales (Wolfe *et al.*, 1979; Dalton, 2005). La producción de metano ocurre con la conversión de materia orgánica mediante la utilización de los productos metabólicos de las bacterias (por ejemplo, CO₂, H₂, acetato y formiato) y otro metilo simple que estén disponibles en el medio (por ejemplo, metilaminas y metanol) para su posterior transformación en metano (CH₄) (Belay *et al.*, 1984).

Las archaeas termoacidófilas son organismos que son capaces de crecer a temperaturas superiores al punto de ebullición normal del agua, y todos tienen una temperatura óptima de $\geq 60^{\circ}\text{C}$ (Brock *et al.*, 1972). La mayoría de estos organismos se han aislado a partir de suelos o aguas geotérmicamente calientes que contienen azufre y sulfuros elementales, debido a que metabolizan este elemento como aceptor de electrones para llevar a cabo la respiración ácida o un donador de electrones para el metabolismo quimiolitotrófico (Liu *et al.*, 2012). Los ambientes ricos en azufre se encuentran en todo el mundo, por lo que también se han encontrado en hábitats termales artificiales, como el flujo de ebullición de las plantas de energía geotérmica, hábitats volcánicos submarinos, donde la presión de incluso pocos metros de agua de mar puede elevar el punto de ebullición del agua lo suficiente como para seleccionar organismos capaces de crecer por encima de los 100°C (Blöchl, 1997). Los ambientes geotérmicos pueden ser ligeramente alcalinos a medianamente ácidos (pH 5-8) o extremadamente ácidos (<5), indicando que resisten este cambio de pH, aunque su pH óptimo es ≤ 4.0 . (Schleper *et al.*, 1995 y Auernik *et al.*, 2013).

Las archaeas halófilas o haloarqueas son organismos que viven en una amplia gama de hábitats, incluyendo salinas solares, salmueras de aguas profundas, minas de sal, lagos hipersalinos y alcalinos. También se han aislado de depósitos secos donde la sal se extrae comercialmente, en pescados salados, pieles saladas, tocino y salchichas, y estos microorganismos a menudo se pueden relacionar a la descomposición de estos alimentos. (Oren, 2006; McLain, 2004). Estos organismos requieren una concentración mínima de 1.5 M de NaCl para su crecimiento, sin embargo, la mayoría de las especies requieren una concentración de 2-4 M de NaCl para un crecimiento óptimo. Prácticamente, todos los halófilos extremos pueden crecer en el límite de saturación de NaCl (5.5 M), aunque algunas especies crecen muy lentamente a esta salinidad (Das Sarma 2001). En todos los reportes que hasta ahora se tienen registrados, estos organismos, extruyen los iones de Na⁺ del citoplasma con el fin de lograr una alta presión osmótica en el citoplasma manteniendo la concentración de Na⁺ baja (Oren, 1999). Se sabe que existe una acumulación de iones K⁺ y Cl⁻ para mantener el equilibrio osmótico; donde la acumulación de KCl llega incluso a concentraciones

al menos tan altas como las concentraciones de NaCl en el medio, aunque la concentración de estos iones será variada dependiendo de la especie investigada (Christian, 1962; Rengpipat, 1988; Bayley, 1978; Oren, 2002)

Aunque ésta es la clasificación tradicional derivada de los hábitos ecológicos, filogenéticamente se reconocen tres principales ramas a nivel de Phylum dentro el dominio Archaea: Euryarchaeota, Crenarchaeota (Woese *et al.*, 1990) y Thaumarchaeota (Brochier-Armane *et al.*, 2008). Varios otros candidatos a phyla han sido propuestos, incluido Aigarchaeota (Nunoura *et al.*, 2011), Geoarchaeota (Kozubal *et al.*, 2013), Korarchaeota (Barnset *et al.*, 1996) y Nanoarchaeota (Huber *et al.*, 2002), pero su estado de Phylum espera confirmación, esto significa que existe un arduo debate en la comunidad científica por esclarecer la filogenia de estos organismos.

1.2 Clasificación de las archaeas halófilas.

El primer estrés químico encontrado durante la evolución de la vida en la tierra puede haber sido el estrés salino. Por lo tanto, desde el principio, los organismos deben haber desarrollado estrategias y mecanismos efectivos para la estabilización de estructuras protoplásmicas y la regulación de iones (Larcher, 2001).

Dentro del Phylum Euryarchaeota, se encuentra la Clase Halobacteria, esta representa uno de los grupos más grandes dentro del dominio Archaea pues está formada por tres Ordenes: Halobacteriales, Haloferacales y Natrialbales (Grant *et al.*, 2001). Dentro del Orden hay tres familias: Halobacteriaceae, Halococcaceae y Haloarculaceae, dentro de la familia Halobacteriaceae, propuesta primero por Gibbons en 1974, está comprendida de 36 géneros con 129 especies (Oren, 2012).

Los miembros de las Halobacterias se encuentran en un amplio rango de ambientes donde su requerimiento absoluto de sal es satisfecho (~25% de sal) (Oren, 2002). Para que estos organismos habiten en condiciones extremas de sal, muestran diversos mecanismos como la modificación de la composición de la membrana, variaciones en la fluidez de la membrana, actividad antiportadora Na^+/H^+ , proteínas de tolerancia a la salinidad general, etc. (DasSarma *et al.*, 2010). Sobre la base de esta concentración variable de NaCl, los halófilos se clasifican como halófilos moderados que crecen en concentraciones de NaCl que varían de 2% a aproximadamente 20% (0.3 a 3.4 M) y los halófilos extremos que requieren al menos un 15% (2.6 M) y pueden llegar incluso al punto cercano de

saturación de sodio (30% o 5M) para crecer (Kushner, 1968 y Larsen, 1967). Aunque existen algunas excepciones a estas definiciones (Matheson *et al.*, 1976; Mullakhanbhai *et al.*, 1975 y Novitsky *et al.*, 1975).

Exclusivamente dentro de la familia Halobacteriaceae, la membrana plasmática de estos organismos no excluye las sales, pero puede seleccionar ciertos iones para que se puedan controlar las concentraciones internas de iones y se pueda mantener el funcionamiento celular. Lo que estos organismos hacen es bombear grandes cantidades de potasio desde el ambiente al interior de la célula, de manera que la concentración de K⁺ intracelular es mayor y trata de igualar las concentraciones de Na⁺ en el exterior (Pastor *et al.*, 2013).

Todas las especies pertenecientes a esta familia tienen un metabolismo quimioheterotrófico aeróbico. Algunas especies son de color rojo-rosado debido a pigmentos presentes en la membrana, inclusive algunas especies tienen la capacidad de crecer anaeróbicamente mediante la fermentación o por el uso de Bacteriorrodopsina (BR) para absorber la luz como fuente de energía (Rosenberg *et al.*, 2014).

1.2.3 Características generales de *Halobacterium salinarum*.

El género *Halobacterium* es uno de los pertenecientes a la familia Halobacteriaceae. Aunque dentro del género están agrupadas 3 especies, el organismo modelo es *Halobacterium salinarum* (Falb *et al.*, 2008). Esta especie había sido descrita anteriormente como: *Halobacterium halobium*, *Halobacterium cutirubrum* y *Halobacterium salinarium*, pero en 1996 fueron renombradas y agrupadas bajo el mismo nombre y se aceptó la existencia de 9 cepas (Ventosa y Oren, 1996). Son unicelulares con forma de bacilo, con un tamaño de (μm) 0.5-1.0 x 1.0-6.0, crecen como colonias color rosa, las condiciones de cultivo son en una concentración de NaCl de 18-30% siendo óptima del 20-25%, el rango de pH varía de 5.5 a 8 y el rango de temperatura es de 20 a 55 °C siendo una temperatura óptima de 50 °C (Oren, 2013). El genoma de estos organismos tienen un porcentaje de G + C de 46.9 hasta 71.2 (Grant, 2001), esto debido a que dependiendo la cepa, estas pueden presentar una cantidad variable de plásmidos (NCBI, 2018) ejemplo de ello es *Halobacterium salinarum* cepa R1 que posee 4 megaplásmidos (pHS1 a pHS4) y dos megaplásmidos la cepa NRC-1 (pNRC100 y pNRC200) que han sido estudiados hasta la fecha (Pfeifer *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2000). La proteína más estudiada de estos organismos es la Bacteriorrodopsina debido a que se puede usar como material biológico para el procesamiento de la información, conversión de luz solar a electricidad, generación de ATP, desalación

de agua de mar, uso en quimio y biosensores, detección ultrarrápida de la luz, cambios de efecto fotocromicos, almacenamiento de información, incluido el almacenamiento holográfico, y poder permitir el desarrollo de poderosas memorias de computadora y procesadores, construcción de células fotoelectroquímicas para iluminación, así como la producción de hidrógeno (Chu *et al.* 2010; Lata *et al.*, 2007; Zabut *et al.* 2006; Hampp, 2002a, b; Wise *et al.*, 2002; Birge *et al.*, 1999; Hong 1986). En la tabla 1 se resume la taxonomía de *H. salinarum*.

Tabla 1. Taxonomía de la archaea halófila *Halobacterium salinarum*.

Taxonomía de <i>Halobacterium salinarum</i>	
Dominio:	Archaea
Reino:	Euryarchaeota
Phylum:	Euryarchaeota
Clase:	Halobacteria
Orden:	Halobacteriales
Familia:	Halobacteriaceae
Género:	<i>Halobacterium</i>
Especie:	<i>Halobacterium salinarum</i>

1.3 Formas de crecimiento.

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en los ambientes salinos, este elemento puede convertirse fácilmente en un factor limitante para el desarrollo de la archaea halofílica. Una posible estrategia para evitar la limitación de oxígeno es el uso de vesículas de gas para impulsar las células hacia la superficie de la salmuera. La efectividad de las vacuolas de gas para permitir que las células alcancen la capa más rica en oxígeno hasta ahora es incierta (Oren *et al.*, 2006).

Muchas otras especies tienen estrategias basadas en la respiración anaeróbica con diferentes receptores de electrones. La capacidad de reducir el nitrato está muy extendida entre los miembros de Halobacteriaceae. Algunas especies (por ejemplo, *Haloferax denitrificans*, *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Halogeometricum borinquense*) pueden crecer anaeróbicamente usando nitrato como aceptor de electrones. El nitrato generalmente se reduce a nitrógeno molecular (N_2), pero también se ha observado formación de óxido nitroso (N_2O) en varios casos (Hochstein y Tomlinson 1985; Mancinelli y Hochstein 1986; Tomlinson et al. 1986). Sin embargo, su relevancia ecológica del crecimiento anaeróbico con nitrato no se determina aún. Otros aceptores de electrones alternativos para la respiración son el dimetilsulfóxido (DMSO), el N-óxido de trimetilamina (TMAO), el fumarato y tiosulfato, aunque se desconoce la relevancia ecológica del crecimiento anaeróbico con estas moléculas (Sorokin et al., 2005). Aunque el TMAO puede estar disponible como aceptor de electrones en peces salados, un hábitat muy conocido para especies de *Halobacterium* y *Halococcus* no se ha relacionado este compuesto orgánico con el crecimiento directo de las archaeas (Sorokin et al. 2005).

Otra estrategia para la generación de energía anaeróbica es la fermentación de L-arginina a citrulina, amoníaco y CO_2 (Hartmann et al., 1980; Ruepp y Soppa, 1996). Sin embargo, el crecimiento anaeróbico utilizando L-arginina no está muy extendido entre las haloarqueas (Oren 1994; Oren y Litchfield 1999).

La estrategia para la generación de energía más estudiada dentro de estos organismos es la producción de ATP aprovechando la luz.

1.3.1 Fotosíntesis.

Históricamente, el término fotosíntesis se ha aplicado a organismos que dependen de la clorofila o bacterioclorofila para la conversión de energía lumínica en energía química. Debido a que en las haloarqueas no existe una reacción de óxido-reducción (no poseen pigmentos de clorofila) y no utilizan el CO_2 como fuente de carbono, en su lugar son cambios conformacionales en la BR, es por ello por lo que el término fotosíntesis como tal ha sido discutido en este organismo (Hartman y Oesterhelt, 1977; Gest, 1993; Talue et al., 2016 y González et al., 2009).

La luz se puede utilizar como una fuente de energía para impulsar el crecimiento anaeróbico, aunque no todos los miembros de la familia tienen bacteriorrodopsina; entre los que la contienen son *Halorubrum sodomens*, *Haloquadratum walsbyi* y *Halobacterium salinarum* (Betlach et al., 1986; Shand y Betlach, 1991).

La fotosíntesis en *H. salinarum*, se lleva a cabo por medio de la Bacteriorrodopsina (BR). La BR es una proteína de 27 kDa transmembranal que presenta una estructura típica de las proteínas retinianas (Hartmann *et al.*, 1980; Oesterhelt, 1982; Oesterhelt y Krippahl, 1983) formando parches especializados en la membrana celular (conocida como Membrana Púrpura) (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971). Ésta tras la excitación por la luz (absorción máxima de 570 nm) realiza un cambio conformacional que le permite bombear portones (H^+) desde el citoplasma hacia el exterior de la célula; donde el gradiente de H^+ generado se utiliza para impulsar la fosforilación de ADP a ATP (Danon y Stoeckenius, 1974). Se han identificado otras proteínas que contienen la estructura retiniana en *H. salinarum*, pero con funciones diferentes a la de la BR: halorhodopsina (una bomba de cloruro dirigida por la luz hacia el interior) y dos rodopsinas sensoriales, involucradas en la detección de luz para la fototaxis (Schobert y Lanyi, 1982).

1.4 El pirofosfato.

El Pirofosfato (PPi) es un compuesto químico que estructuralmente está formado por un enlace fosfoanhidro (dos grupos metafosfatos unidos a un oxígeno), otra molécula que presenta este mismo enlace es el ATP, conocida como la moneda energética de todas las células (Davies *et al.*, 1993 y de Meis, 1984) se ha observado que el ATP en algunos casos puede ser sustituido por el PPi (Wood, 1997). En estos años se ha ido incrementando la evidencia que indica que el PPi juega un rol bioenergético sumamente importante, incluso se ha sugerido que el PPi podría ser una molécula antecesora del ATP como “moneda energética” durante las primeras etapas de la evolución bioquímica (Baltscheffsky *et al.*, 1986; Chi *et al.*, 2000; Pérez-Castañeira *et al.*, 2001 y Holm *et al.*, 2011)

1.4.1 El papel del Pirofosfato en el metabolismo celular.

El PPi es producido en una larga cantidad de reacciones biosintéticas como la síntesis de biopolímeros: polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc. Como se describe en la tabla 2, podemos observar algunas de las reacciones bioquímicas donde el PPi puede ser sustrato, producto secundario o de desecho de las reacciones celulares; al ser tantas las reacciones en las que se encuentra presente, es necesario que sea hidrolizado por una proteína para evitar el acumulo, así como también para darle direccionalidad a las reacciones, que en algunos pasos son reversibles; en este caso se trata de la Pirofosfatasa citoplasmática (Kornberg, 1957; Pérez-Castañeira *et al.*, 2001).

Además de estas reacciones metabólicas en las células, el PPI está involucrado en: generación de calor (Romero y Celis, 1990), translocación de H⁺ para generar un gradiente electroquímico (Baltcheffsky, 1967), la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967), la reducción de NAD⁺ (Keister y Yike, 1967), la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971) y como reserva de energía en *Rhodospirillum rubrum* mediante la formación de gránulos de PPI (Nyren y Strid, 1991).

Tabla 2. Reacciones generales en sistemas biológicos que producen PPI (Modificada de Heinonen 2001).

Reacción	Ejemplos:
1. NTP + X + Y = X-Y + AMP + PPI	Síntesis de aminoacil tRNA, pared celular en algunas bacterias, activación de ácidos carboxílicos, ligación de RNA y DNA y la síntesis de fosfoenolpiruvato en fotosíntesis C4.
2. ATP+X = Y+AMP + PPI	Reducciones de grupos carboxilo, producción de luz por luciferasa.
3. NTP+X = NMP-X + PPI	Activación de azúcares y otros compuestos de la biosíntesis de fosfolípidos y antibióticos, síntesis de vitamina B12, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de oligonucleótidos.
4. NTP+X = N-X + PPI + Pi	Síntesis de adenosilmetionina y adenosilcobalamina
5. NTP = NMP + PPI	Síntesis de nucleótidos cíclicos, hidrólisis de NTP, síntesis de histidina, síntesis de ácido fólico.
6. Pirofosforibosilpirofosfato+X = x-ribosa-5'fosfato + PPI	Síntesis <i>de novo</i> de nucleótidos, biosíntesis de aminoácidos y coenzimas.
7. X-Pirofosfato+Y = X-Y + PPI	Síntesis de terpenos, esteroides, coenzimas y pigmentos, modificación del tRNA, síntesis de citosinas y pared celular de arqueas.
8. X-Pirofosfato +H₂O = X + PPI	Hidrólisis de terpenilpirofosfato y guanosin-3,5-bis-difosfato.
9. X-pirofosfato = Y + PPI	Ciclación en síntesis de terpenos
10. Síntesis de pirofosfato de novo	Síntesis de PPI dependiente de la fuerza protón-motriz
11. Reacciones variables	Hidrólisis de polifosfatos, síntesis de riboflavina, hidrólisis de adenosin-5'-pentafofosfato.

*NTP: Nucleósido trifosfatato; X y Y: Variables; NMP: Nucleósido monofosfato; AMP: Adenosín monofosfato; ATP: Adenosín Trifosfato.

1.5 Las Pirofosfatasa.

Todas las formas de crecimiento anterior mencionadas son para obtener la energía necesaria para la supervivencia de las células. La energía celular de cualquier organismo, en su mayoría, está dado por la ATPsintasa; cuando se hace una mutante para hacerla no funcional, las células pueden seguir viviendo con una mínima reserva de energía (Efimova *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando se hace una mutante para la proteína llamada Pirofosfatasa (PPiasa) las células mueren en poco tiempo (Lundin, *et al.*, 1991).

Las PPiasas (E.C.3.6.1.1) son una familia de enzimas ubicuas que se encargan de realizar la hidrólisis de pirofosfato (Kajander *et al.*, 2013); como se esquematiza en la figura 1, el primer paso es la formación del complejo enzima con dos metales divalentes (complejo PPiasaM₂) la cual es la conformación activa, así como la formación de un segundo complejo entre el PPI y 1 catión divalente (M²PPi²⁻) el cual es el sustrato, una vez formados, el complejo sustrato y el complejo PPiasaM₂ se unen pero aún no ocurre ninguna reacción catalítica, posteriormente dos moléculas de H₂O, se coordinan hacia los dos iones metálicos del complejo PPiasaM₂, lo que genera una fuerza suficiente para que el nucleófilo (una molécula de H₂O) done un hidrógeno y se forme la unión al residuo de aminoácido correspondiente en el sitio activo; el PPI con un metal divalente (M²PPi²⁻) se ajusta por coordinación hacia los átomos cargados positivamente en la enzima, formando un complejo (PPiasaM_j(H₂O)₂-MPPi), posteriormente los puentes de hidrógeno son los que logran que los Pi se separen y salgan de uno en uno unidos a un catión divalente. (Sosa *et al.*, 1992; Heikinheimo *et al.*, 1996 y Cooperman *et al.*, 1992). Aunque recientemente, un estudio demostró que la PPiasa de familia II de *Rhodobacter sphaeroides* puede tener actividad enzimática sin catión (Sarmina *et al.*, 2017). Las PPiasas son importantes en el metabolismo, pues se encargan de mantener un equilibrio en las reacciones y mantienen la dirección de avance de éstas.

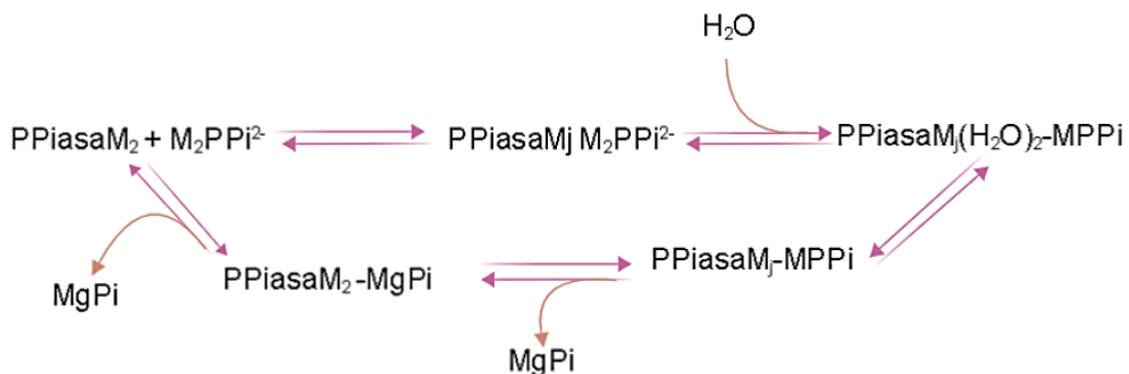


Figura 1. Esquema mínimo del mecanismo de la hidrólisis del PPi realizado por la PPiase. $j = 1$ o 2 , dependiendo del pH y la concentración de iones metálicos divalentes en la reacción.

Las PPiases se clasifican en dos grupos dependiendo de su localización celular: membranales y citoplásmicas.

1.5.1 Pirofosfatasas de membrana.

Son proteínas hidrofóbicas integrales de membrana que además de catalizar la hidrólisis del PPi, son capaces de sintetizarlo, gracias a que generan un gradiente iónico transmembranal utilizando protones (H^+) o de sodio (Na^+). Con la obtención de estructuras cristalográficas, se observó que poseen de 1 a 16 dominios α -hélices transmembranales conservados, y posee un segmento con gran similitud a la región sensible –DCCD- (un inhibidor del canal de protones) de la ATPasa tipo F_1 . Esto ha sugerido que son las bombas de protones primarias evolutivamente más antiguas, pues la utilización de PPi para proporcionar energía química bien puede haber ocurrido al principio de la evolución antes de la adopción de ATP como fuente de energía (Lipmann, 1965). Por lo tanto, las PPiases membranales podrían haber sido las primeras enzimas en unir la hidrólisis y la síntesis del enlace fosfoanhídrido con los cambios en el potencial eléctrico a través de las membranas (Kim, *et al.* 1991, Kajander *et al.*, 2013 y Luoto *et al.*, 2011).

Este tipo de PPiases se encuentra en bacterias tanto fotosintéticas como aeróbicas, (Schöcke y Schink, 1998), archaeas (Baltcheffsky, *et al.*, 1999), parásitos (Scott, *et al.*, 1998), vacuolas de algas (Iketa *et al.*, 1999), plantas superiores (Sakakibara *et al.*, 1996) y en las membranas del acidocalcisoma (compartimientos de almacenamiento de calcio y fósforo en forma de pirofosfato y polifosfatos) de protistas (McIntos *et al.*, 2002).

1.5.2 Pirofosfatasas citoplásmicas.

La pirofosfatasa citoplásmica es una enzima esencial y ubicua. Anteriormente, ya se ha mencionado que la función que lleva a cabo al hidrolizar el PPi permite el flujo termodinámico, y direcciona las reacciones hacia los productos volviéndolas irreversibles (Kornberg, 1962).

Las Pirofosfatasas citoplasmáticas han sido divididas en dos familias no homólogas que poseen características totalmente diferentes. En su secuencia, tienen solamente el 1% de similitud pues sólo conservan los residuos del sitio activo, considerándose un notable ejemplo de convergencia evolutiva enzimática (Ahn *et al.*, 2001 y Kajander *et al.*, 2013)

1.5.2.1 Pirofosfatasas de Familia I.

Las PPiasas de la Familia I se encuentran representadas en todos los dominios (Bacteria, Archaeay Eukarya) (Tuominen, 2011; Vidilaseris *et al.*, 2018, Lynch *et al.*, 2018), siendo también las más estudiadas y descritas. Son enzimas con una estructura cuaternaria de homodímeros (eucariotas) o hexámeros (bacterias) con monómeros de ~20-30 kDa. A pesar de diferir en el estado oligomérico, las PPiasas de la familia I se pliegan en una estructura compacta de un solo dominio, cuyo núcleo es un barril β de cinco hebras conservadas (Heikinheimo *et al.*, 1996) sobre el cual se encuentra el sitio activo. La conservación de la secuencia en las PPiasas de la Familia I en el sitio activo está conformada por 20 residuos de aminoácidos cargados e hidrófilos, estos se pueden identificar por el motivo: Asp-(Ser / Gly / Asn)-Asp-Pro-*ali*-Asp-*ali-ali* conservado (*ali* = Cys / Ile / Leu / Met / Val) (Kankare *et al.*, 1994). Este motivo contiene un Asp120, que se une a los dos iones metálicos activadores M1 y M2 presentes antes de que se una el sustrato, así como Asp117, que ayuda a activar la molécula de agua (Kajander *et al.*, 2013 y Tuominen, 2011). Utilizan el Zn^{2+} para estabilizar su estructura, dándole protección contra la desnaturalización por calor (Celis, *et al.*, 2003). El catión que usan preferiblemente para mostrar su máxima actividad es el Mg^{2+} inclusive, es necesario del catión libre para activarla (Moe y Butler, 1972).

De los principales inhibidores de la Familia I se encuentra el fluoruro de sodio (NaF) que actúa a concentraciones micromolares; recientemente Baykov y otros autores han determinado que el efecto de inhibición sobre la enzima es bifásico, esto explicaría le porqué después de agregar el catión a la PPiasa funcionalmente activa se observa una disminución inmediata en la actividad específica seguida de una disminución lenta de actividad remanente, también se ha demostrado que el NaF actúa como un inhibidor no competitivo, es decir que se une tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato (Baykov *et al.*, 2000). Sustratos análogos al PPi, como el imidodifosfato (IDP) y metilendifosfato (MDP) en concentraciones milimolares muestran una curva de inhibición competitiva, es decir entran al sitio activo interfiriendo con la hidrólisis del PPi (Klemme y Gest, 1971). Compuestos quelantes como el EDTA y EGTA, modifican negativamente la

actividad, esto debido a que arrestan los cationes divalentes del medio de reacción, necesarios para la activación de la enzima y formación del sustrato, sin embargo, esta inhibición es reversible (Celis, *et al.*, 2003), por lo que la Familia I es más susceptible que la Familia II.

1.5.2.2 Pirofosfatasas de la Familia II.

Las PPiasas de la Familia II se han encontrado hasta la fecha solamente en algunos organismos del dominio Arquea y Bacteria (Rantanen *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2012 y Kajander *et al.*, 2013). Son homodímeros de ~28-35 kDa y no tienen ninguna relación estructural con las PPasas de la Familia I. Estas proteínas homodiméricas tienen dos dominios “DHH”, esta firma pertenece a la superfamilia de fosfoesterasa (Aravind *et al.*, 1998), donde DHH se refiere a un motivo Asp-His-His conservado en el dominio N-terminal de la enzima, que es crítico para la especificidad de unión a los iones metálicos. El sitio activo de está ubicado entre los dominios DHH N-terminal y DHHA2 C-terminal (Ahn *et al.*, 2001 y Merckel *et al.*, 2001) Alrededor de una cuarta parte de ellos también contienen dominios reguladores adicionales, como los dominios CBS y DRTGG insertados en el primer dominio DHH (Tuominen, 2011). Su máximo de actividad hidrolítica es en presencia de Mn^{2+} , seguida del Co^{2+} , el Mg^{2+} sólo puede llevar a la mitad de su actividad hidrolítica a la proteína con respecto al Mn^{2+} (Cooperman *et al.*, 1992). Se ha observado un fenómeno peculiar en las PPiasas de Familia II, cuando el catión divalente Mg^{2+} se encuentra en proporciones mayores que el sustrato, es decir, mientras más catión libre tenga la reacción y la concentración de PPi permanezca fija, la enzima muestra un esquema de saturación hiperbólica, al igual que en ausencia de Mg^{2+} libre, la saturación de la enzima mantiene el mismo comportamiento, como a diferencia de la PPiasa de familia I, que se vuelve sigmoideal, es por ello que Klemme y colaboradores concluyeron que a altas concentraciones del catión libre se inhibe la reacción catalítica de la PPiasa (Klemme, *et al.*, 1971). Además de esto, esta familia sólo presenta inhibición reversible con compuestos quelantes como el EDTA y el EGTA por la misma razón como lo es el caso en la Familia I.

Con respecto a la eficiencia de la reacción de hidrólisis, ambas familias tienen la misma especificidad por el sustrato; sin embargo, la actividad específica de las enzimas de Familia II son un orden de magnitud mayores con respecto a las de Familia I. En α -proteobacterias fotosintéticas, se ha encontrado una correlación entre la presencia simultánea de la H^+ PPiasa y la PPiasa citoplásmica de Familia I, mostrando también que las bacterias que no presentan la Pirofosfatasa de membrana tienen la PPiasa de Familia II (Celis, *et al.*, 2003)

1.5.3 Pirofosfatasa en archaeas halófilas.

Aunque el estudio de las PPiasas no es reciente, pues hace más de 50 años se tiene registro del primer cristal de una PPiasa (Kunitz, 1952), el mayor número de investigaciones se centran en levaduras, *Escherichia coli*, bacterias fotosintéticas y humanos, dejando de lado las PPiasas de las archaeas que como se explicó anteriormente, dentro de este dominio se encuentran los organismos halófilos extremos

Las PPiasas que han sido aisladas y caracterizadas cinéticamente de las archaeas termoacidófilas son: *Sulfolobus acidocaldarius* (Wakagiet *al.*, 1992), *Thermoplasma acidophilum* (Richter y Schafer 1992), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (van Alebeek *et al.*, 1994), *Thermus thermophilus* (Satoh *et al.*, 1998), *Methanococcus jannaschii* (Kuhn *et al.*, 2000), *Pyrococcus horikoshii* (Jeon y Ishikawa, 2005) y *Haloferax volcanii* (McMillan, 2016) y se han podido ubicar en las dos familias de PPiasas citoplásmicas. En la tabla 2 se muestra un resumen de las características generales que han sido descritas de las dos Familias de PPiasas de las archaeas termoacidófilas. Cada una de las PPiasas poseen características típicas de Familia I y II; únicamente difiriendo en la preferencia del metal co-sustrato así como los inhibidores, aunque el pH óptimo en la hidrólisis del PPi no es igual en las PPiasas citoplásmicas, podemos observar una tendencia hacia la alcalinidad. Sin embargo, estos trabajos no ayudan a esclarecer la incógnita de saber si al tener PPiasa citoplásmica de Familia I se posee de igual manera una PPiasa membranal o siguen el patrón de las BPNS.

Tabla 3. Características generales de las Pirofosfatasas de Familia I y Familia II en archaeas termoacidófilas.

Organismo	Familia I						Familia II
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	<i>Haloferax volcanii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
Masa molecular del monómero (kDa)	21	22	25	19	24.5	20.4	34.12
Masa molecular del oligómero (kDa)	80	110	100	ND	ND	ND	68.24
Metal co-sustrato	Mg ²⁺ >Co ²⁺ >Zn ²⁺ >Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺ >Co ²⁺	Mg ²⁺ >Zn ²⁺ >Mn ²⁺ >Co ²⁺	Mg ²⁺ >Mn ²⁺	Mg ²⁺ >Mn ²⁺	Mn ²⁺ >Co ²⁺ >Mg ²⁺ >Mn ²⁺ >Zn ²⁺
Efecto del Mg ²⁺ libre	Activa	ND	Activa	Activa	ND	ND	Activa
Inhibidores	NaF, Ca ²⁺ , Fenilgloixal	NaF, Ca ²⁺	Naf	ND	NaF	NaF	ND
pH óptimo	6.5-7	ND	7.7	9.5	7.5	8.5	9
K _m Mg ²⁺ (mM)	0.9	1.7	4.9	ND	0.3	13.4	ND
K _m PPI (μM)	5	7	0.16	ND	14-11	260	ND
V _{max} (U*mg ⁻¹) ^a	860	1100	570	ND	930	465	ND

ND: Dato no disponible; a: Actividad específica μmol PPI*min⁻¹*mg proteina⁻¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos se ha observado una correlación en bacterias fotosintéticas purpuras no sulfurosas (BPNS), donde las especies que poseen PPiase de membrana (PPiase H⁺), su PPiase citoplásmica es de Familia I. Por otro lado, las especies que tienen PPiase citoplásmica de Familia II no poseen PPiase membranal. Sin embargo, las especies halófilas pertenecientes a las BPNS no se encuentra una congruencia clara en las PPiases citoplásmicas en la clasificación de PPiase de Familia I o Familia II y si presentan PPiase membranal

HIPOTESIS

Dadas las diferencias cinéticas entre las PPiases de BPNS halófilas y no contar con suficientes datos en PPiases citoplásmicas de archaeas termoacidófilas; *Halobacterium salinarum* presentará una PPiase citoplásmica y/o de membrana dado sea el caso, con características específicas de una familia.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo caracterizar la PPiase citoplásmica de *Halobacterium salinarum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cultivar la arquea halófila *Halobacterium salinarum*
2. Purificar parcialmente la enzima con los métodos descritos para la familia I de bacterias halófilas, utilizando técnicas convencionales de purificación de enzimas.
3. Posteriormente se evaluarán sus características cinéticas y electroforéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cultivos de las archaea.

En todos los experimentos se utilizó la cepa silvestre de la archaea halófila *Halobacterium salinarum* (ATCC 33170) obtenida de la colección DSMZ-Alemania (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

*Medio de cultivo

Para el crecimiento de este organismo se utilizaron y prepararon dos medios de cultivo:

A) Líquido y B) Sólido

A) Medio líquido

Se utilizó el medio 97 modificado de acuerdo con DSMZ 2007, pues es el medio adecuado para el crecimiento de esta archaea halófila. A continuación, se indica la composición del medio en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de Medio 97

Casaminoácidos	7.5 g
Extracto de levadura	10 g
Citrato de sodio Na ₃ -citrato	3 g
Cloruro de potasio KCl	2 g
Sulfato de magnesio MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20 g
Sulfato de hierro (II) FeSO ₄	50 mg
Sulfato de manganeso (II) MnSO ₄ x H ₂ O	0.20 mg
Cloruro de sodio NaCl	250g (4.2 M)

Al final de la preparación, se ajustó el pH a 7.4 y llevado a un volumen final de 1 L. Fue esterilizado en frascos de volumen que se requieren por un tiempo de 30 min a 120°C y 15 atm de presión.

B) Medio sólido:

Agar bacteriológico de SIGMA 1.5% agregado al medio descrito anteriormente. El medio se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 atm de presión, se vació en cajas de Petri de 15 a 20 mL de capacidad, que contienen aproximadamente 10 mL de medio, para la conservación de las células.

3.1.2 Condiciones de crecimiento.

El cultivo de la archaea fue a partir de gliceroles al 10%, puros y guardados a -70 °C. Se siguió un proceso común para escalar el volumen del cultivo 1:10, que consistió en poner un inóculo de 100 µL en 1 mL del medio respectivo, posteriormente 1 mL de cultivo en 10 mL de medio, después 10 mL de cultivo en 100 mL de medio, para finalmente escalar 100 mL de cultivo en volumen final de 1 L de medio.

Los cultivos líquidos fueron incubados a 37°C en agitación constante (250 rpm) durante 1 semana; aunque se sabe que su temperatura de crecimiento es de ~50 °C en la naturaleza, Robinson y colaboradores (2005) reportan que *H. salinarum* puede crecer sin problemas en un rango mayor de temperatura que va de los 30-60 °C, esto sin afectar su cinética de crecimiento, por lo que los cultivos sólidos se mantuvieron igual a 37 °C en una incubadora estándar.

3.1.3 Curva de crecimiento.

Para determinar el patrón de crecimiento celular de *H. salinarum*, se cultivaron 3 matraces con capacidad de 10 mL, con 5 mL de medio 97 y una alícuota de 500 µL de la archaea, a una temperatura de 37 °C y en agitación constante de 250 rpm durante 1 semana. Se tomó 1 mL de cada matraz y se inoculó por separado en 15 mL de medio 97 en tubos de ensayo con capacidad para 20 mL. Los medios inoculados se incubaron a 37 °C durante una semana a 250 rpm. Cada 24 horas se midieron las unidades Klett con un fotocolorímetro Klett-Summerson durante 20 días.

3.2 Cosecha de las archaeas.

Las arqueas cultivadas, al haber alcanzado la fase de crecimiento estacionaria, se cosecharon centrifugándose a 4304 x *g* por 15 minutos. Las pastillas se pesaron y esto se consideró el peso húmedo.

3.3 Caracterización bioquímica.

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de la PPiase citoplásmicas de *H. salinarum*, se utilizó la explicada en los siguientes puntos.

Al finalizar con la purificación de la enzima se realizó una tabla que muestra la actividad total, actividad específica, miligramos de proteína obtenidos en cada paso de purificación, esto con el fin de conocer las veces de purificación obtenidos con los diferentes métodos, además de corroborar si el método purifica de manera eficiente la enzima. Para conocer las veces de purificación se cada uno de los pasos, se divide la actividad específica del paso a calcular entre la actividad específica del extracto crudo (Burgess y Deutscher, 2009)

3.3.1 Obtención de la Pirofosfatasa citoplásmica.

Al no haber un protocolo de purificación estándar entre las PPiases descritas en las arqueas termoacidófilas, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de las PPiases de archaeas termoacidófilas utilizando el programa Clustal Omega de EMBL-EBI (Instituto Europeo de Bioinformática, Reino Unido) y se observó que la secuencia de la proteínas de *H. salinarum* presenta un 84% de identidad con la PPiase citoplásmica de *Haloferax volcanii* (*H. volcanii*) reportada como una PPiase de Familia I (Figura 1) por lo que se siguió el método descrito para bacterias fotosintéticas de Familia I (Celis et al 2003) y que de igual manera ha sido utilizado para la purificación de las PPiases de las bacterias púrpuras no sulfurosa halófila *Rhodovibrio salinarum* (Díaz, 2011) y *Afifella marina* (Sarmina, 2012).

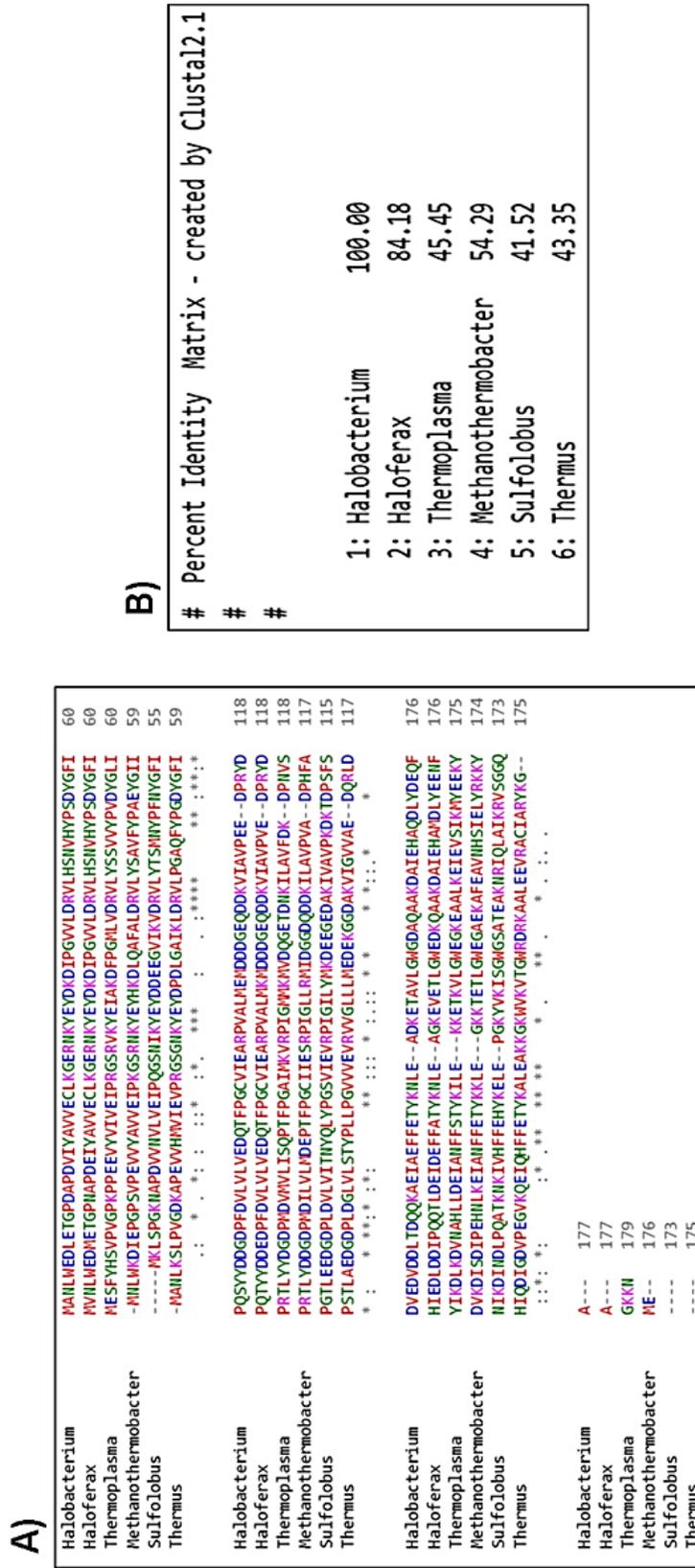


Figura 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las PPIasas de arqueas termoacidófilas de Familia I. A) Secuencias de aminoácidos de las PPIasas de Familia I en arqueas. Los aminoácidos presentan un código de color: AVFPMILW (aminoácidos pequeños + hidrofóbicos, incluyendo a Y) marcados de color rojo; DE (aminoácidos básicos) magenta; STYHCNGGQ (aminoácidos con hidroxil + sulfidril + amina + G) verdes. B) Porcentaje de identidad entre la PPIasa de *H. salinarum* y las arqueas termoacidófilas, los símbolos denotan el grado de conservación de residuos: * (asterisco) indica posiciones que tienen un residuo totalmente conservado; : (dos puntos) indica conservación entre aminoácidos con propiedades similares y el. (punto) indica una conservación débil entre los aminoácidos. Los números de acceso en NCBI corresponden a: *H. salinarum* (CAP13108.1), *S. acidocaldarius* (CAA57434.1), *T. acidophilum* (CAC11542.1), *M. thermoautotrophicum* (AAB84769.1), *T. thermophilus* (AEG34354.1), *P. horikoshii* (O59570.1), *H. volcanii* (ELY26408.1) y *M. jannaschii* (2EB0_B).

Pasos de extracción:

- A) Las células se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ZnCl 0.4mM, KCl 1M, pH 7.4 en una proporción 1/10 (g de células/ml de amortiguador), que contenía 1mg de ADNasa por 100 g de peso húmedo.
- B) Para romper las células, se utilizó un convertidor piezoeléctrico Branson (Branson 250) en lotes de 15 mL por 2 minutos y un minuto de descanso a máxima potencia y enfriado con baño de agua a 4 °C durante 1 minuto (Scholes *et al.*, 1969).
- C) Se centrifugó a 100,000 x g durante 80 minutos a 4 °C para quitar membranas y células que no se hayan lisado. Al finalizar la centrifugación sólo se conservó el sobrenadante y se guardó una alícuota de 100 µL a -70 °C (a esto pasó se le llamó extracto crudo).
- D) Al sobrenadante se le ajustó el pH a 8.6 y fue calentado a 60 °C por 5 minutos y después puesto inmediatamente a 10 °C. Las proteínas desnaturalizadas fueron removidas por centrifugación a 27,000 x g por 20 min a 4 °C y se guardó una segunda alícuota (a este pasó se llamó extracto calentado).
- E) El sobrenadante fue fraccionando con precipitaciones de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ en 4 pasos: 0–40%, 40–50%, 50–65% y 65-80% (m/v). Se fue agregando poco a poco la sal hasta que se disolviera por completo a una temperatura de 4°C. Al final de disolver la sal, cada paso de precipitación fue centrifugado a 27,000 x g por 20 min a 4 °C.
- F) El sobrenadante del último paso de saturación fue dializado toda la noche en 4 L del amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl 10 mM, ZnCl 0.04 mM y NaCl 3 M, esta concentración de sal fue utilizada debido a que en reportes previos se ha observado que se evita la desnaturalización de la enzimas presentes en arqueas halófilas (Bonet, 1991 y Holmes *et al.*, 1963) además así se eliminó el (NH₄)₂SO₄ que hay en la muestra (a este paso se le llamó dializado).

3.4 Determinación de proteína

Las muestras obtenidas de la purificación proteica fueron cuantificadas utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). En cada una de las cuantificaciones se realizó una curva estándar para calcular la concentración de proteína en las muestras obtenida en los diversos pasos de purificación, utilizando diferentes concentraciones de BSA: 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg y 50 mg en repeticiones de 3 cada una.

3.5 Determinación de la actividad hidrolítica.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en el medio descrito por Klemme y Gest en 1971, el medio de reacción es Tris- HCl 50 mM pH 8.6, KCl 200 mM, MgCl₂ 6 mM, PPINa 4 mM. La reacción de Hidrólisis de PPI, realizó en tubos de vidrio sumergidos en un baño de temperatura constante, fijada a 37 °C. Para iniciar la reacción, se agregó la enzima y se contaron 15 min para detener la reacción agregando ácido tricloroacético (concentración final 6%) y se incubó en hielo por 10 min. Como control positivo (referenciado como numero factor) se tomó (en tubos de ensayo aparte) 100 µL de H₃PO₄ a una concentración de 2.5 mM disueltos en 500 µL de H₂O destilada y como control negativo se ponía en un tubo aparte el medio de reacción a utilizar + TCA y al final se colocaba la muestra de la enzima; estos tubos se mantenían a la misma temperatura y el tiempo de reacción que las muestras a cuantificar la actividad.

Para cuantificar el fosfato hidrolizado procedente de la actividad de la PPIasa, se utilizó el método colorimétrico descrito por Sumner y colaboradores (1944), el cual se fundamenta en la formación de un complejo fosfomolibdico de color amarillo que al adicionar una sustancia reductora –en este caso se utilizó ELON (*p*-metilaminofenol sulfato + bisulfito de sodio)- se forma el complejo fosfomolibdato de amonio y la muestra presenta diferentes intensidades de azul dependiendo la cantidad del complejo. Las muestras se midieron con un lector ELISA Anthos Lucy 1 a 656 nm.

Una vez medidas las muestras, se realizaron los cálculos para determinar la actividad de la enzima, para ello primero se debe restar la densidad óptica del control negativo a las densidades ópticas de cada muestra, posteriormente para calcular la actividad total de las muestras se multiplica la densidad óptica menos el blanco negativo por el factor (el cual se obtiene dividiendo 250/la densidad óptica obtenida) y lo que resulte de esa multiplicación dividirlo por el tiempo que se dejó el experimento. La actividad específica se calcula a partir de la actividad total y lo que se realiza es dividir la actividad total entre el producto de la multiplicación de los mg/ml obtenidos en la cuantificación de proteína por los microlitros utilizados en cada experimento.

La actividad específica se especifica como µmoles Pi min⁻¹ mg de proteína⁻¹ y la actividad total como nmol Pi*min⁻¹. Cualquier otra modificación se especifica en los pies de figura de la sección de resultados. Todos los experimentos se hicieron por triplicado, de manera que los resultados expresados en las gráficas son un

promedio de las repeticiones hechas en cada experimento además en cada una de ellas se grafica con barras negras la desviación estándar obtenida.

3.6 Determinación de la masa molecular de la proteína.

Para determinar la masa molecular del oligómero de la PPIasa, la muestra dializada en el paso anterior mencionado se pasó por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 HR (Sigma-Aldrich). Previamente la resina se empacó en una columna de vidrio con un volumen de 63 cm³, se pasaron 2 L de agua bidestilada por la columna para remover el etanol con el que viene empaquetada de fábrica la resina. Posteriormente se dejaron correr 2 L de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.6, MgCl₂ 10 mM y 200 mM NaCl, esto con el fin de equilibrar tanto el pH como concentración de sales en la columna. Para determinar el volumen vacío o V₀ (espacio vacío entre esferas de Sephacryl) se eluyó azul de dextran con una masa molecular de 2000 kDa a una concentración de 2 mg/mL.

3.6.1 Curva estándar de la columna de exclusión molecular.

Para obtener una curva estándar, se eluyeron 3 proteínas de masa molecular conocida: Citocromo c (12 kDa), BSA (66 kDa) y β-amilasa (200 kDa), cuya concentración fue de 2 mg/mL, 5 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente. La determinación de la elución de las proteínas se hizo por un método cuantitativo leyendo la absorbancia del Citocromo c a 400 nm, del BSA y β-amilasa a 280 nm. Para este método, se colocó 1 mL de las muestras recolectadas de la columna, en una celda de cuarzo de 1cm³ por separado, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman, DU 650 a 400 nm las muestras de Citocromo c y a 280 nm BSA y β-amilasa (Harris, 1989).

Una vez obtenidos los volúmenes de elución (V_e) de cada una de las proteínas estándar, se dividió el V_e/V₀ y se graficó contra el logaritmo de la masa molecular y así calcular la ecuación de la recta (mx+b) donde mx será el resultado de la división de V_e/V₀ y b el resultado que obtengamos de la curva.

3.6.2 Separación de la muestra por cromatografía.

La muestra purificada parcialmente de la PPIasa que fue dializada en el punto 3.3.1, se concentró en filtros para centrifuga Amicon Ultra 15 (Millipore, USA)

hasta un volumen final de 2 mL. Posteriormente, la muestra se cargó en la columna y se eluyó para coleccionar 60 fracciones de 2 mL con un colector BIO-RAD (2110 Fraction Collector). Se determinó la proteína de manera cuantitativa midiendo la absorbancia a 280 nm y las fracciones que presentaron mayor absorbancia a 280 nm se les determinó la actividad hidrolítica de PPIasa citoplásmica, se graficaron estos resultados y se juntaron las fracciones que presentaron la mayor actividad.

Para calcular la masa molecular, primero se obtuvo el antilogaritmo del peso molecular, para lo cual se dividió el V_e/V_0 de la muestra de PPIasa donde obtuvo mayor actividad total, este resultado es sustituido en la x de la ecuación de la recta. Una vez resuelta la ecuación se calcula el antilogaritmo en base 10 para obtener la masa molecular de la PPIasa y se grafica lo obtenido en la recta.

Al final se concentró la muestra de las fracciones coleccionadas con mayor actividad con filtros para centrifuga Amicon Ultra 15, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford anteriormente mencionado, se alicuotó en tubos eppendorf con 500 μ L de la muestra y se almacenaron a -70 °C.

3.7 Estimación de la masa molecular de la PPIasa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Con el fin de verificar la masa molecular del monómero y comprobar la pureza de la muestra, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) con el sistema Laemmle (Gallagher, 2006). Los patrones de separación y migración de las proteínas en este sistema están determinados por la composición química y el pH del búffer utilizado. Se utiliza un sistema de buffer discontinuo formado por dos capas de gel de diferentes tamaños de poros y diferentes composiciones de búffer (geles de apilamiento y separación). Esta electroforesis da como resultado la concentración de la muestra, una resolución más alta donde se crea un efecto de apilamiento produciendo bandas de proteínas nítidas separadas según el tamaño que posean. El búffer utilizado en este sistema es Tris / Glicina / SDS para desnaturalizar las proteínas.

La primera fase “Gel de apilamiento” (5% de acrilamida), concentra las proteínas para una migración homogénea mientras que el “Gel separador” (10% de acrilamida) permite separar las proteínas por su peso. Las cantidades utilizadas en esta electroforesis están detalladas en la tabla 5.

Tabla 5. Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Reactivo	Gel separador 10%	Gel de apilamiento 5%
Agua	2.5 mL	3.4 mL
Acrilamida- Bisacrilamida (30% / 0.8% peso / volumen)	3.3 mL	0.83 mL
Buffer separador	2 mL	----
Buffer de apilamiento	-----	0.63 mL
Persulfato de amonio 10% (peso / volumen)	75 μ L	75 μ L
TEMED	50 μ L	50 μ L
SDS 10% (peso/ volumen)	100 μ L	100 μ L

El volumen agregado a cada pozo del gel fue determinado basándose en la anterior cuantificación proteica, ajustando los volúmenes para tener la misma concentración de proteína en cada uno de ellos, obteniendo al final una concentración de 1.68 μ g de proteína; a cada muestra se le agrego 5 μ L de amortiguador de corrida que consiste en Tris-HCl 0.5 M pH 6.8; glicerol 64% y azul de bromofenol 0.05%; como marcador de referencia se utilizaron 3 μ L del marcador de peso Protein All Blue de BIO-RAD. Los geles fueron corridos en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD) a 100 V a temperatura ambiente; el amortiguador con el que se llenó la cámara es una solución de Tris-HCl 25 mM pH 8.3 y Glicina 0.192 mM.

Después de sacar el gel de la cámara de electroforesis, se realizó una tinción de plata rápida por el método de Bloom *et al.* (1987) y se utilizó una relación entre la distancia recorrida y la masa de los marcadores para determinar la masa molecular del monómero de la PPiase citoplásmica de *Halobacterium salinarum* extraída como familia I.

RESULTADOS

4.1 Curva de crecimiento.

Al obtener la cepa silvestre de la archaea halófila *Halobacterium salinarum* (ATCC 33170) obtenida de la colección DSMZ-Alemania. Se preparó medio de cultivo 97 modificado de acuerdo con la DSMZ (2007) y se tomaron mediciones cada 24 horas hasta llegar a 498 horas, esto con el fin de conocer su curva de crecimiento y precisar la fase estacionaria para comenzar con la extracción de la PPIasa. De acuerdo con la curva de crecimiento obtenida para *Halobacterium salinarum* (figura 4), se estimó un tiempo de 7 días (168 hrs) para la cosecha de las arqueas, ya que en es en este tiempo se alcanza la fase estacionaria. El tiempo de generación calculado a partir de los datos obtenidos se estimó en 9.08 horas. Dentro de la familia Halobacteriaceae, los tiempos de generación observados son largos (6-10 horas) debido a que se recomienda se cultiven a temperaturas entre 37 y 42 ° C (Rodríguez-Valera *et al.*, 1995) por la solubilidad y disponibilidad del oxígeno en altas concentraciones de sal y evitar que se vuelva anaeróbico el cultivo (Robinson *et al.*, 2005).

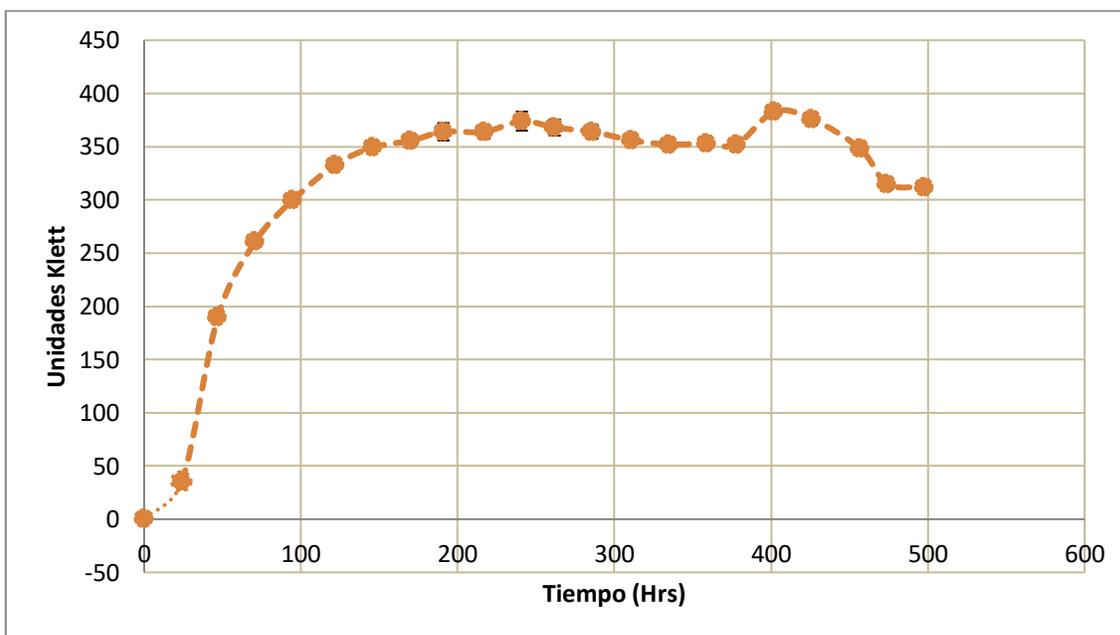


Figura 2. Curva de crecimiento de *Halobacterium salinarum*. Las células de la archaea *H. salinarum* fueron cultivadas en medio 97 durante 20 días a una temperatura de 37 °C a 250 rpm. Cada 24 horas se tomó 1 mL de muestra de cultivo y se midió la densidad óptica en unidades Klett. Cada punto de la curva representa una toma de muestra del cultivo de la archaea. Los datos mostrados son el promedio de 5 experimentos diferentes que se realizaron. Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

4.2 Purificación parcial de la Pirofosfatasa de *Halobacterium salinarum*.

Al no haber un protocolo de purificación para PPiases de familia I en las archaeas, se decidió seguir el protocolo de extracción antes reportado en BPNS halófilas (Sarmina, 2012 y Díaz, 2011) y que muestra una purificación adecuada de la enzima en esas bacterias. En la tabla 5 se muestra la actividad total y actividad específica, así como el total de proteína extraída y las veces de purificación de cada paso del proceso de purificación de la PPiase extraída como Familia I de *H. salinarum*. El paso de purificación donde el extracto crudo se calentó a 65 °C por 5 minutos decidió omitirse pues no se precipitaban proteínas. Como puede observarse en la tabla, al final en el paso de la columna de Sephacryl, la muestra de PPiase presenta 26 veces de purificación, indicando un bajo número de proteínas que pudieran estar interfiriendo en el estudio, observable en la figura 5, donde a partir del paso de diálisis van disminuyendo el número de bandas observables (figura 5 A Diál.) hasta llegar a tener exclusivamente 4 bandas (figura 5 B fracción 1, 2 y 3) en el paso de la columna de Sephacryl, esto muestra que el protocolo seguido a partir del ya establecido en BPNS halófilas y BPNS fotosintéticas ya reportado anteriormente como método de purificación para Pirofosfatasa sí puede establecerse como método general de extracción en organismos unicelulares que presenten PPiase de familia I.

Tabla 5. Actividad en los diferentes pasos de purificación de la PPiase de *H. salinarum*.

Paso de purificación	Proteína (mg/ml)	A. T. ^a	A.E. ^b	Veces de purificación
Extracto crudo	2.67	119.55	1.21	1
Dializado	1.37	122.34	2.35	1.93
Columna Sephacryl S-200HR	0.11	43.81	32.06	26.42

La cantidad de proteína utilizada en los ensayos de actividad fueron: 13.5 µg en el extracto crudo, 68.5 µg en el paso de dializado y 1.36 µg en el paso de la columna de Sephacryl S-200 HR. a: A.T (actividad total) nmolPi/min; b: A.E (actividad específica) µmol Pi min⁻¹ mg⁻¹prot.

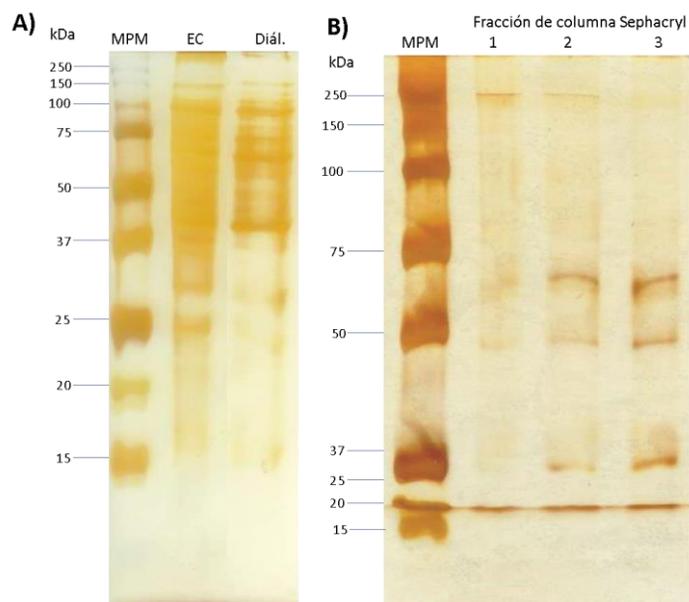


Figura 5. Pasos de purificación en muestras de *H. salinarum* mediante el método de extracción de Pirofosfatasas de Familia I para de BPNS. Se muestran dos geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) teñido con una tinción de plata rápida. A) se puede observar como con un solo paso de purificación la disminución de bandas es considerable de pasar del extracto crudo a una muestra dializada. B) La muestra que fue dializada y pasada por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 HR se pueden observar cómo es aún más notable la disminución del bandeo presente en la muestra, sólo es posible diferenciar 4 bandas presentes en la muestra. Ambos geles fueron realizados en experimentos independientes. MPM significa marcador de peso molecular; EC significa extracto crudo; Diál significa diálisis y por último 1-2-3 significan fracciones de la columna de Sephacryl recolectadas mediante la columna.

4.3 Requerimientos de cationes divalentes como co-sustrato (catión-PPi).

Se sabe que la PPiase citoplásmica de Familia I es dependiente de cationes divalentes como cofactores para realizar su actividad hidrolítica y responde sensiblemente a cambios en la concentración de los cationes en la mezcla de reacción (Tuominen, 2011), es por ello que se decidió comprobar si la PPiase extraída de *H. salinarum* presentaba el mismo comportamiento con diferentes cationes divalentes así como con diferentes concentraciones de los mismos, además de ello, determinar el catión que actúa como sustrato verdadero en esta enzima. Al cuantificar la actividad de la PPiase de *H. salinarum*, lo primero que se observa es que la enzima es más activa con Mg^{2+} , como se muestra en la figura 6, un ligero aumento en la concentración de Mg^{2+} (1.0 mM) promueve que la actividad aumente de 0 a $15 \mu\text{mol de PPi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. A partir de una concentración de 4 mM de Mg^{2+} , es decir, 1:1 con el PPi, la actividad aún sigue incrementando, lo que indica que la enzima está siendo activada por este catión libre.

La tasa de hidrólisis con otros cationes divalentes Mn^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} es muy baja y representa menos del 25% de su actividad en comparación con Mg^{2+} , lo cual de acuerdo con la literatura referida a PPiasas de Familia I es concordante este comportamiento. Sin catión presente en el medio de reacción no es posible observar actividad hidrolítica, como se había reportado anteriormente con la PPiasa de Familia II de *Rhodobacter sphaeroides* (Sarmina *et al.*, 2016).

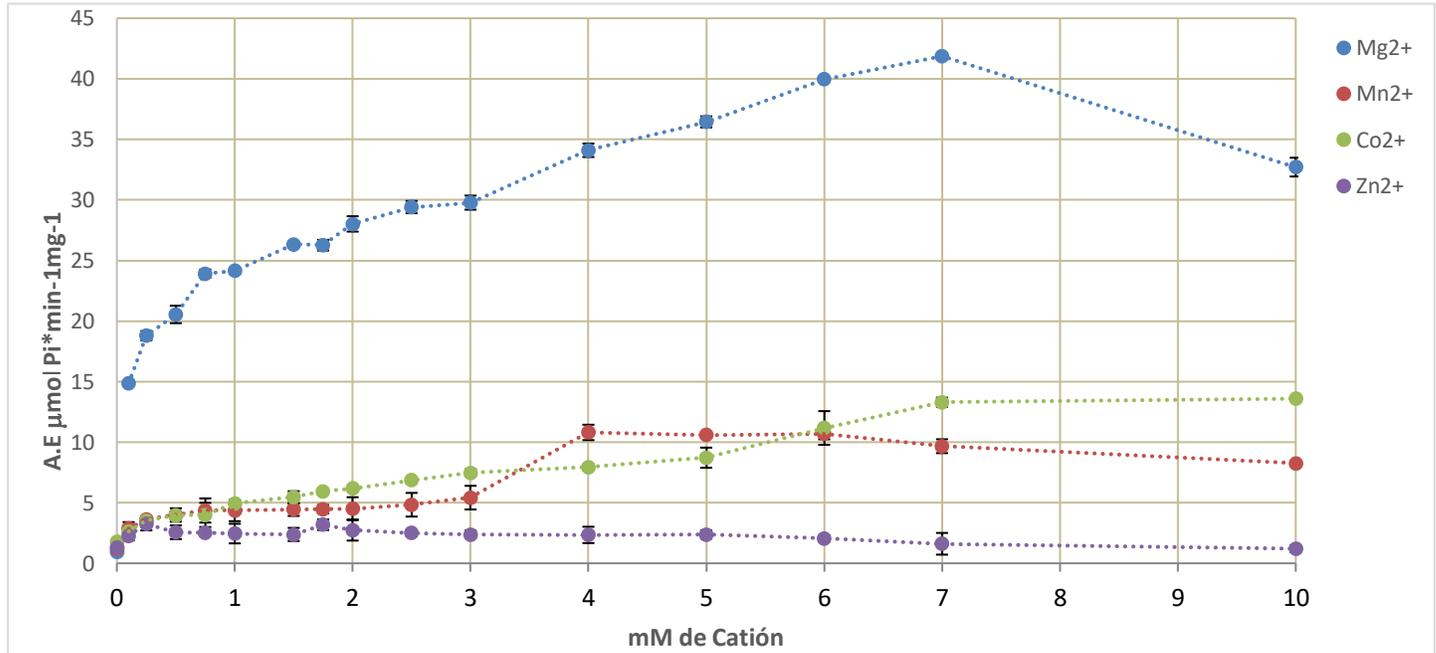


Figura 6. Efecto de cationes divalentes en la hidrólisis del pirofosfato (PPi). En la figura se puede observar el comportamiento diferente que presenta la enzima en su actividad específica con diferentes concentraciones y cationes en el medio de reacción. En círculos azules se representa el catión Mg^{2+} el cual al ir aumentando la concentración en el medio se ve incrementada a la par su actividad mientras que los otros 3 cationes probados Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} (círculos verdes, rojos y morados respectivamente) se observa una mínima actividad específica en la enzima. Las muestras son del paso de purificación de la columna Sephacryl S-200 HR. El medio de reacción es: Carbonato de Sodio 50 mM pH 10.5, 4 mM NaPPi y 200 mM KCl y 0-10 mM catión variable. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en cada curva.

4.4 Especificidad del sustrato.

Las dos familias de PPiasas citoplásmicas, tienen una alta especificidad por su sustrato M^2PPi^{2-} (Cooperman, 1992). Se realizaron experimentos en los que se agregó al medio de reacción de la PPiasa de *H. salinarum* compuestos fosfatados: PNP (*p*-nitrofenil fosfato), ATP (adenosín trifosfato) y ADP (adenosín difosfato), los tres a una concentración de 4 mM simulando la concentración del NaPPi y determinar si la enzima puede llevar a cabo la hidrólisis de otros compuestos

fosfatados además del pirofosfato además de determinar si era o no una fosfatasa inespecífica que se había purificado. Como se observa en la figura 7 en ninguno de los experimentos realizados se obtuvo actividad en los tres sustratos puestos a prueba, es por ello por lo que se concluye que la PPiase de *H. salinarum* es específica para PPi.

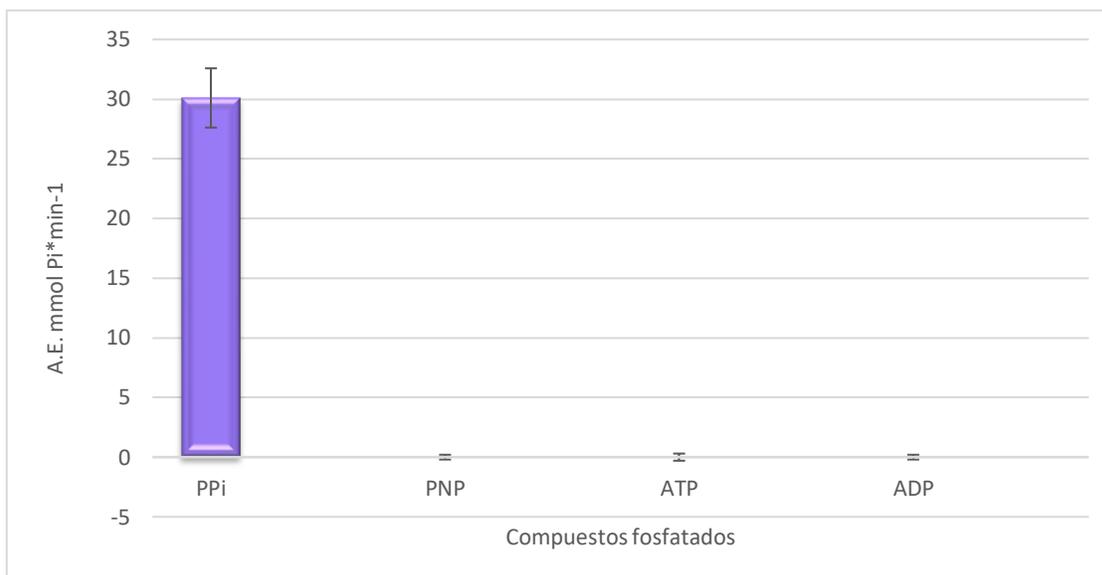


Figura 7. Especificidad por el sustrato (PPi) en la PPiase de *H. salinarum*. Para determinar si la enzima extraída en el proceso de purificación tenía por sustrato único el PPi y no otro compuesto con fosfato, se utilizaron *p*-nitrofenil fosfato, adenosín trifosfato y adenosín difosfato para comprobar la especificidad y corroborar que se tenía una PPiase. El medio de reacción es: Carbonato de Sodio 50 mM pH 10.5, 200 mM KCl, 6 mM catión variable y 4 mM del compuesto fosfatado. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en cada molécula.

4.5 Efecto del pH en la actividad en la enzima.

Cada enzima presenta un pH óptimo en el cuál realiza la máxima actividad de hidrólisis de sustrato y son variables estos rangos pues es específico para cada enzima. Para determinar cuál es ese pH óptimo al cual la PPiase citoplásmica de *H. salinarum* cataliza de manera más eficiente la hidrólisis del complejo Mg-PPi²⁻ se realizó una titulación con un buffer a diferentes puntos de pH. En la figura 8 se muestra una curva de pH que va desde 6 a 13.5 de pH, en este caso la PPiase muestra actividad en un intervalo de pH estrecho, de 8-12.5. Por medio de un análisis gráfico, se determinó que el pH óptimo de la enzima es de 10.5, aunque se observa que la actividad presente en el pH de 11-12 esta se mantiene constante, un efecto que a pesar de haberse repetido varias veces el ensayo, este se conserva y no se tiene reportes bibliográficos de este comportamiento. A pesar

de diferir con el resto de las PPiases en el pH óptimo, representa un descubrimiento nuevo, pues no se tenía registrada un PPiasea con un valor de pH tan alcalino hasta el momento en archaeas.

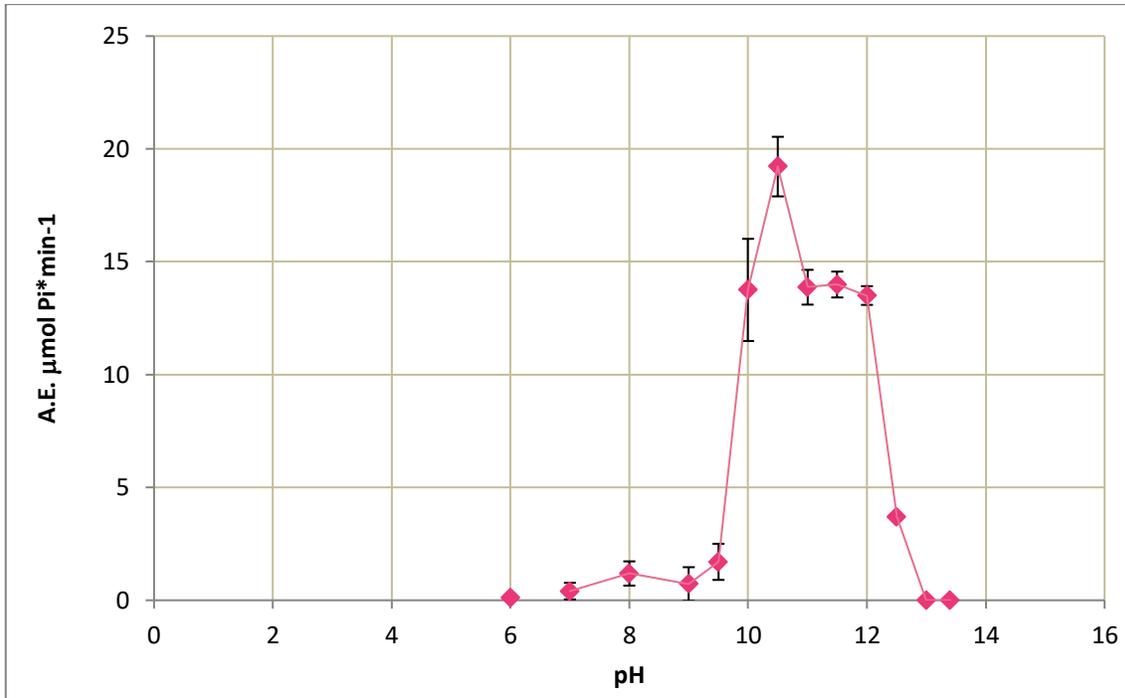


Figura 8. pH óptimo de la PPiasea de *H. salinarum* a diferentes. AL realizar una curva de titulación en la PPiasea de la archaea se observó un punto de mayor actividad específica encontrado en un pH de 10.5, sin embargo, la actividad a un pH de 11-12 es constante y no mostrando una campana típica de titulación de pH en enzimas. Muestras de columna Sephacryl S-200 HR. Medio de reacción: Carbonato de Sodio 50 mM pH 6-13.4, 4 mM NaPPi, 200 mM KCl y 6 mM MgCl₂. La curva es el promedio de tres ensayos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

4.6 Modificadores de la actividad hidrolítica.

El fluoruro es el inhibidor clásico de las Pirofosfatasa citoplásmicas de Familia I así como a las Pirofosfatasa membranales y no inhibe a las PPiasea de Familia II (Kellosalo, 2013). Para comprobar si la PPiasea extraída y anteriormente analizada como una PPiasea de Familia I en realidad seguía siendo una PPiasea de Familia I, se decidió utilizar diferentes tipos de modificadores de la actividad en el medio de reacción de la enzima; NaF y 3-PGA inhibidores de PPiasea de Familia I, IDP (imidodifosfato) análogo del sustrato y Na₂MoO₄ (molibdato de sodio) un inhibidor de fosfatasa. Como se observa en la figura 9, la inhibición del NaF y del 3-PGA (ácido 3-fosfoglicérico) ambos a una concentración de 10 mM sobre la PPiasea citoplásmica de *H. salinarum*, se expresa en la reducción del 93% y 100%

respectivamente en la actividad hidrolítica de la enzima dando como resultado una inhibición característica de las PPiases de Familia I (Cooperman, 1992). En el caso del inhibidor de las fosfatasa se obtuvo el 100% de inhibición. En el caso del Imidodifosfato (IDP) un sustrato análogo del PPI se da una pérdida de la actividad del 65% este resultado es provocado por una interferencia en el sitio activo de la enzima no permitiendo el ingreso del sustrato verdadero y la progresión de la hidrólisis (Smirnova *et al.*, 1988).

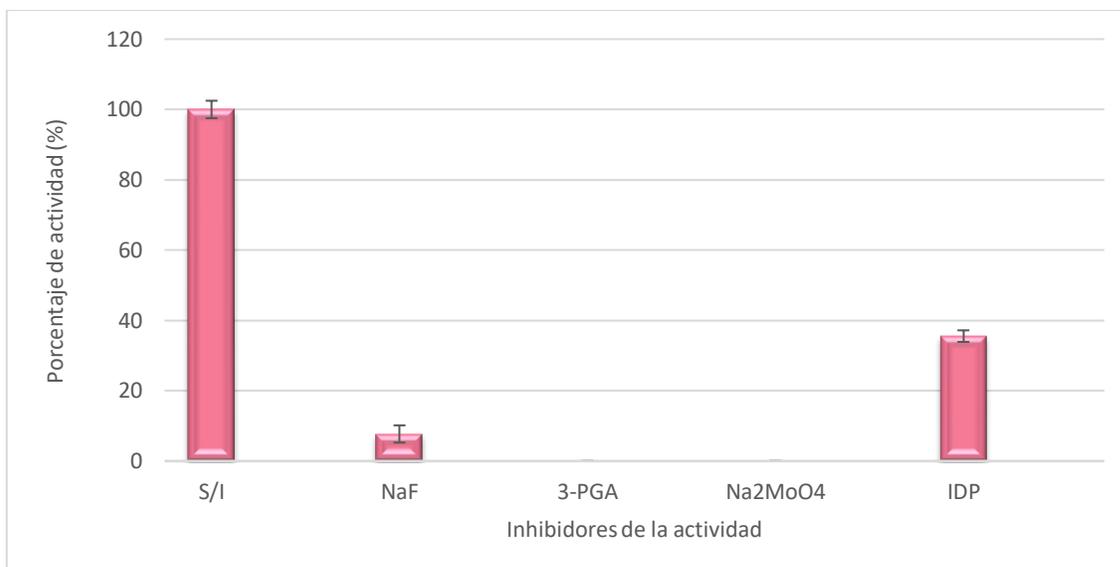


Figura 9. Modificadores de la actividad hidrolítica de la PPiase de *H. salinarum*. Para determinar si la PPiase presentaba la misma inhibición por los principales inhibidores de la actividad reportadas en las PPiases de Familia I, se utilizaron 4 modificadores: NaF (fluoruro de sodio), 3-PGA (ácido 3-fosfoglicérico), Na₂MoO₄ (molibdato de sodio) e IDP (imidodifosfato) un análogo del PPI. En cada uno de los modificadores se observa una disminución en la actividad específica de la enzima si son comparados contra el porcentaje de actividad sin inhibidor (S/I) que representa el 100%. Muestras de columna Sephacryl S-200 HR. Medio de reacción: Carbonato de Sodio 50 mM pH 10.5, 4 mM NaPPi, 6 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 10 mM NaF/3-PGA/ Na₂MoO₄ y 5 mM de IDP.

4.7 Activación por diferentes cationes monovalentes.

Se ha observado que en arqueas halófilas bombean grandes cantidades de potasio desde el ambiente al interior de la célula, de manera que la concentración de K⁺ intracelular es mayor y se trata de igualar las concentraciones de Na⁺ en el exterior, con el fin de mantener un equilibrio osmótico (Pastor *et al.*, 2013). Se ha observado en diferentes especies de archeas halófilas que las proteínas citoplásmicas requieren de cierta concentración de potasio para mantenerse activas (Bonet *et al.*, 1990; De Medicis *et al.*, 1982 y Mevarech, 1977). En la figura 10 se observa cómo al ir variando la concentración de este catión monovalente, se

puede identificar un inicio en la activación por K^+ a partir de 25 mM, hasta llegar a aumentar hasta más del 100% de su actividad a una concentración de 200 mM de K^+ en el medio de reacción; conforme se va aumentando la concentración del catión en el medio se ve una disminución en la actividad sin embargo es constante por lo que se considera estable la actividad.

Al observar un efecto positivo del K^+ sobre la enzima, se decidió comprobar si ocurría el mismo proceso de activación con los demás cationes monovalentes.

Igualmente, en la figura 10, se observa que los cationes Cs^+ y Ru^+ , muestran un efecto contrario sobre la actividad, al ir aumentando la concentración de estos, la enzima comienza a perder actividad, pero paulatinamente. En el caso de Li^+ y Na^+ , la inhibición es más marcada que en los cationes anteriores, inclusive se llega a una completa pérdida en la actividad de la enzima. Con estos experimentos se comprueba que existe un efecto de activación por potasio en la PPIasa de *H. salinarum* y es la primera vez que se tiene registro de esto, pues en otros trabajos con PPIasas de Familia I no se realizaban experimentos con cationes monovalentes y se enfocaban exclusivamente en la activación con el cationes divalente Mg^{2+} (Tuominen, 2011 y Sivula et al., 1990); esto corrobora el equilibrio osmótico que hay intracelularmente de los cationes en los organismos halófilos y la importancia que tiene el K^+ en la actividad enzimática (Ventosa, 1998).

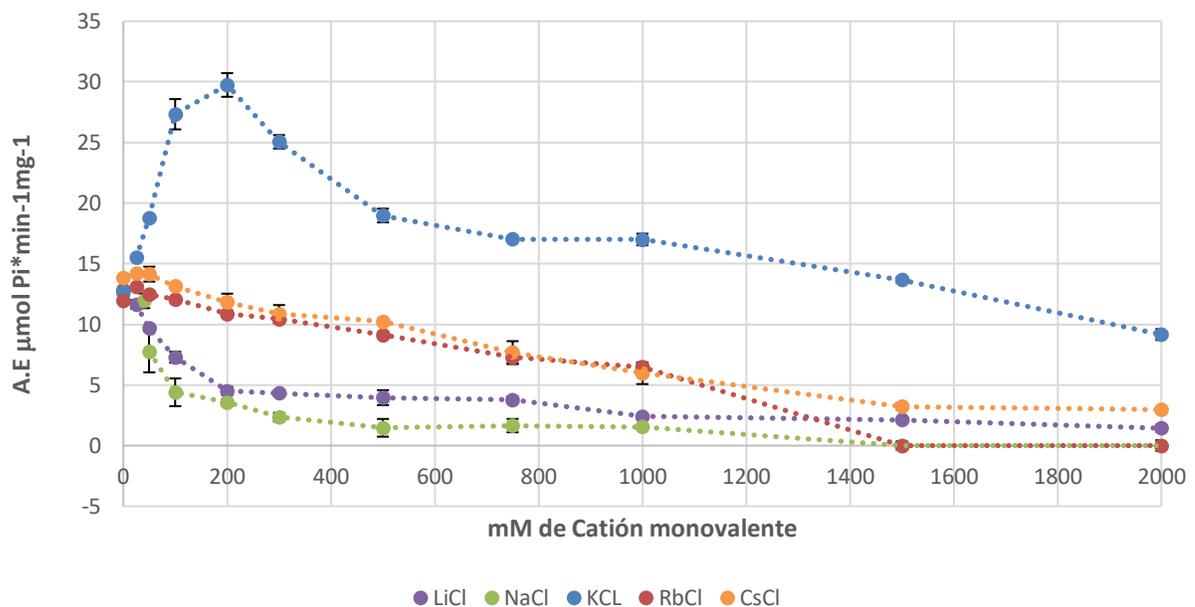


Figura 10. Activación de la PPIasa con cationes monovalentes. Al conocer que existe una concentración diferencial de los cationes Na^+ y K^+ intracelularmente en organismos halófilos se decidió comprobar si los diferentes cationes monovalentes mantenían el mismo efecto sobre la hidrólisis del PPI en la PPIasa de *H. salinarum*. Muestras de columna Sephacryl S-200 HR. Medio

de reacción: Carbonato de Sodio 50mM pH 10.5, 6mM MgCl₂, 4mM NaPPi y 5 cationes con un intervalo de concentración desde 0-2000 mM (2 M) de cada uno de cada catión monovalente.

4.8 Masa molecular del oligómero.

Para determinar la masa molecular del oligómero de PPi_{asa}, se decidió utilizar una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 HR. Primero se obtuvo una curva estándar con 3 proteínas de masa molecular conocida: Citocromo c (12 kDa), BSA (66 kDa) y β-amilasa (200 kDa). Para obtener esta curva a cada proteína se le midió la densidad óptica, la fracción que absorbía más indicó el volumen de elución (V_e) correspondía a cada una. Posteriormente para obtener una regresión lineal entre las proteínas, se divide el V_e entre el volumen vacío (V₀) y se grafica contra el logaritmo de la masa molecular conocida. En la figura 11 se muestra la regresión lineal obtenida a partir de las proteínas con masa molecular conocida, obteniendo la ecuación de la recta con la cual se realizó el cálculo para la masa molecular de la PPi_{asa}, así como el coeficiente de correlación obtenidos para la misma; aunque la correlación es de 0.91 entre los puntos de las tres proteínas utilizadas, esta puede darnos una aproximación de la masa molecular de la PPi_{asa} (figura 11 estrella).

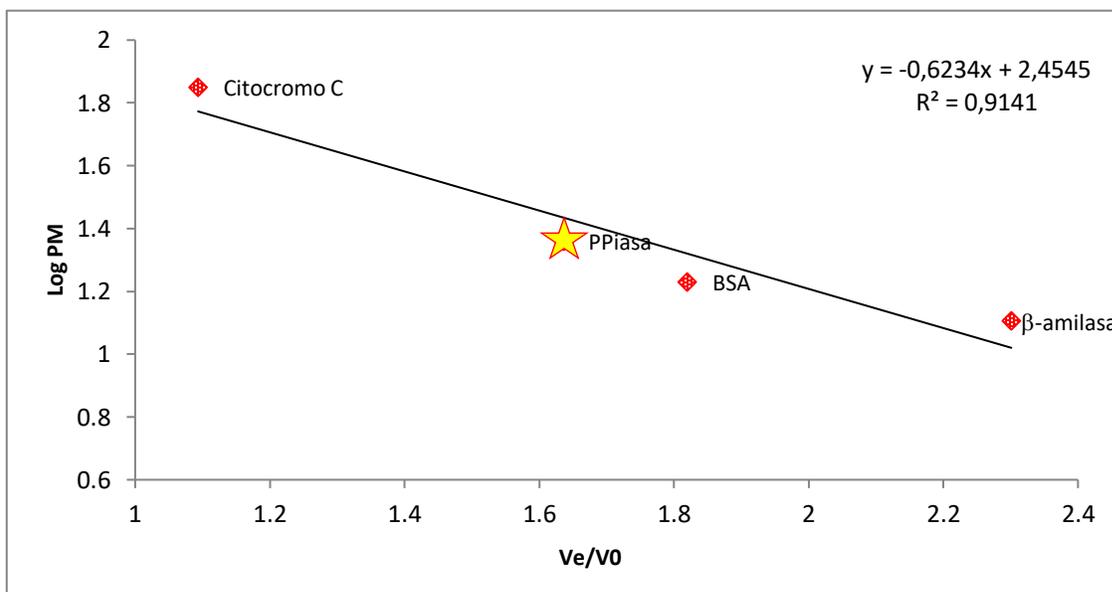


Figura 11. Regresión lineal de la curva de calibración de la columna Sephacryl S-200 HR. Para obtener una curva estándar en la columna de exclusión molecular, se utilizaron 3 proteínas de peso conocido: Citocromo c (12 kDa), BSA (66 kDa) y β-amilasa (200 kDa). Cada una de las proteínas se eluyó tres veces para poder hacer un promedio de los V_e y así poder obtener una regresión lineal y calcular la masa molecular de la PPi_{asa}.

Además de esta curva de calibración, en la figura 12 se muestran las curvas de actividad total (puntos azules) y densidad óptica detectada (puntos rojos) de las 15 fracciones colectadas a partir del volumen vacío (V0), mostrando que las 4 fracciones colectadas (flechas negras) muestran una actividad total alta, así como una mayor densidad óptica, lo que indica que se tiene una cantidad mayor de enzima en las fracciones. Por lo anterior, se determinó una masa molecular para la PPiase citoplásmica de *H. salinarum* de aproximadamente 43.23 kDa (tabla 6).

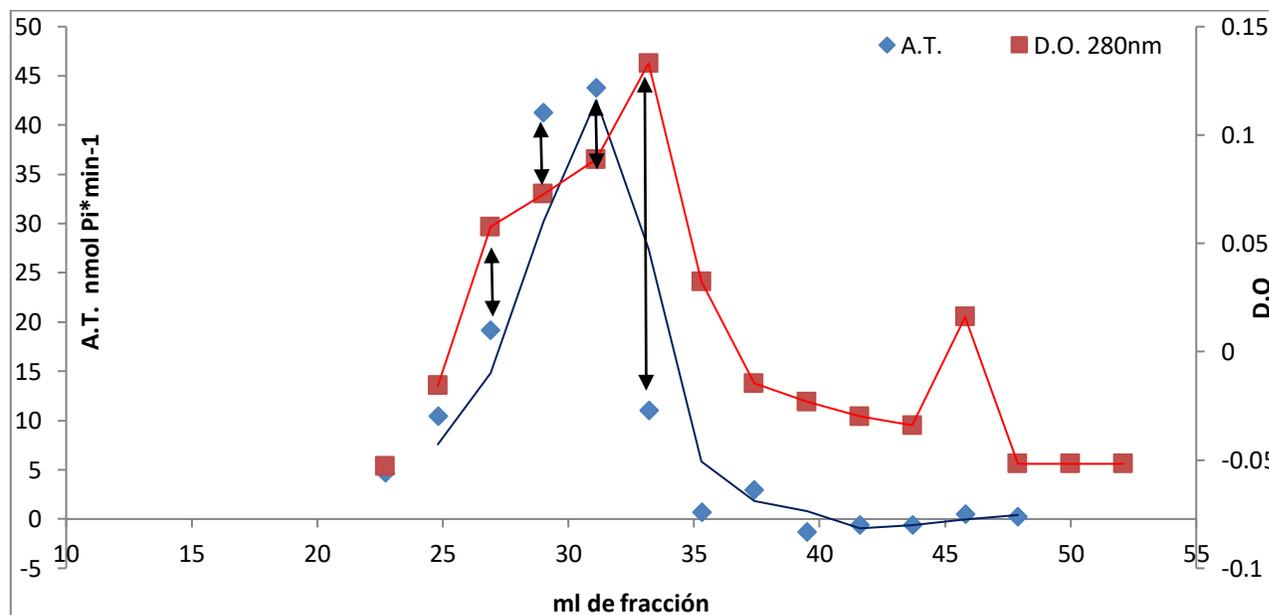


Figura 12. Curvas de actividad total (A.T.) y densidad óptica (D.O.) de las fracciones recolectadas de la muestra de la PPiase de *H. salinarum*. Los puntos rojos muestran la D.O y los puntos azules la A.T. Decidió recolectar y juntar sólo 4 fracciones (flechas negras) pues fueron las que mostraban mayor A.T y D.O lo que aumenta la pureza de la muestra.

Tabla 6. Masa molecular de las proteínas estándar empleados para la curva de calibración y la masa molecular calculada para la PPiase citoplásmica de *Halobacterium salinarum*.

Muestra	MM (kDa)	log	Ve/V0
β-amilasa	200	2.30	1.10
BSA	60	1.81	1.23
Citocromo C	12.5	1.09	1.85
PPiase citoplásmica de <i>Halobacterium salinarum</i>	43.23	1.63	1.35

4.8.1 Masa molecular del monómero.

Con el fin de determinar la masa molecular del monómero de la PPiase de *H. salinarum* se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con el sistema Laemmli (Laemmli, 1970). En la figura 13 se muestra el gel donde se corrieron las 4 fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular Sephacryl S-200HR. En esta electroforesis se observaron 4 bandas que están presentes en los 4 carriles (flechas negras y roja en el gel), con masas moleculares que va desde los 68.44 hasta los 19.73 kDa. Dado que estas bandas aparecen en todos los carriles, podemos proponer que alguna representa la masa molecular del monómero de la PPiase de *H. salinarum*. Tomando en cuenta los resultados del experimento anterior con la determinación de la masa del oligómero y el hecho que las subunidades de las PPiases citoplásmicas de arqueas termoacidófilas conocidas hasta ahora tienen una masa que va de los 19-25 kDa cada monómero (Wakagiet *al.*, 1992; Richter y Schafer 1992; van Alebeek *et al.*, 1994; Satoh *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 2000; Jeon y Ishikawa, 2005 y McMillan, 2016) la banda número 4 presente en los 5 carriles (flecha roja) con una masa de 19.73 kDa es la que más se acerca a la masa molecular esperada para las subunidades de la PPiase de *H. salinarum*. Aunque esta masa molecular del monómero se encuentra dentro del intervalo de las subunidades de PPiases citoplásmicas de Familia I de las otras arqueas, no concuerda con el peso del oligómero de 43.23 kDa, pues este resultado indicaría que experimentalmente la PPiase es un dímero, estructura cuaternaria que no concuerda con la literatura de las PPiases de Familia I de archaeas termoacidófilas y de BPNS halófilas.

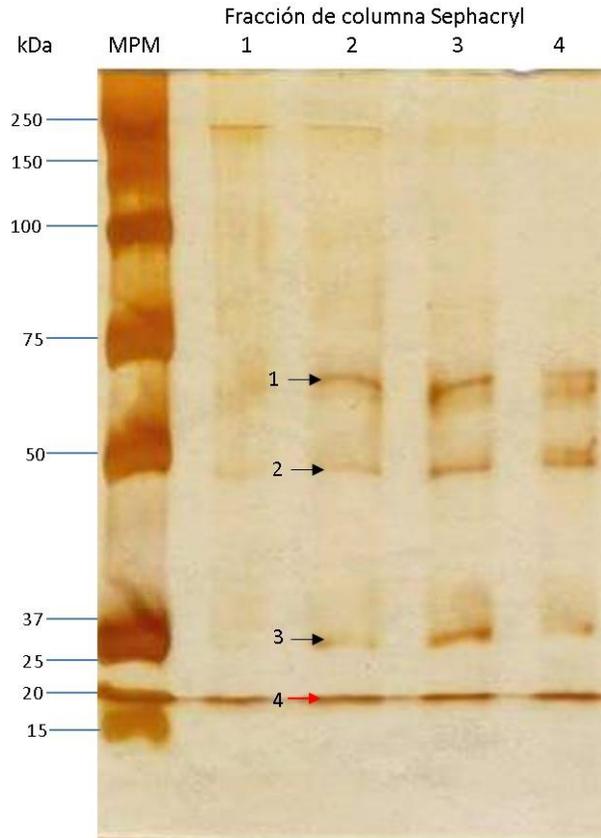


Figura 13. Determinación de la masa molecular del monómero de la PPiase de *H. salinarum*. Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y se tiñó con el método de tinción de plata rápida. La masa molecular de las 4 bandas (flechas negras y roja) que son constantes en las 4 fracciones recolectadas de la columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 HR presentan un intervalo que va de 68.44 (1), 47.96 (2), 24.63 (3) y 19.73 (4) kDa. La flecha roja representa la masa molecular calculada para la PPiase de *H. salinarum* comparando la masa calculada con la masa ya reportada de las PPiasas de Familia I de archaeas termoacidófilas. En cada carril fueron puestos 1.68 μg de proteína, 5 μL del buffer de corrida (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 64% y azul de bromofenol 0.05%); MPM: 3 μL marcador de masa molecular.

4.9 Constante de Michaelis-Menten (K_m) y Velocidad máxima (V_{max}).

La mayoría de las reacciones catalizadas por las PPiasas citoplásmicas tanto de Familia I como de Familia II, son adecuadamente descritas por los parámetros cinéticos clásicos de Michaelis-Menten (K_m y V_{max}), que generalmente se determinan por un perfil de saturación de la velocidad en la formación del producto frente a la concentración de sustrato (Berg et al., 2002). Sin embargo, algunas enzimas pueden presentar una cinética atípica o no-Michaelis-Menten, debido en gran parte a la inhibición en concentraciones más altas del sustrato (Kaiser, 1980).

Para determinar los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten de la PPiase, se realizó una curva de saturación por concentraciones equimolares de sustrato ($\text{MgCl}_2/\text{PPi}^{4-}$). Como se puede observar en la figura 14, sólo los puntos que corresponden a las concentraciones de 0.25-2.5 mM (figura 14 A) presentan una tendencia lineal. Para determinar los parámetros cinéticos se utilizó la ecuación de doble recíproco Lineweaver-Burke (Segel, 1975) donde se grafica el recíproco de la actividad específica y el recíproco de la concentración de sustrato utilizada con el fin de calcular la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m) a partir de la ecuación de la recta, en este caso se muestra en la figura 14 B, donde $y = 0.0465x + 0.0205$ con una correlación de los puntos de 0.98. Al sustituir los valores en la ecuación; al tener concentraciones equimolares del sustrato, es decir $\text{MgCl}_2/\text{PPi}^{4-}=1$, se obtuvieron los valores de 2.26 mM para K_m y una V_{max} de $48.78 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

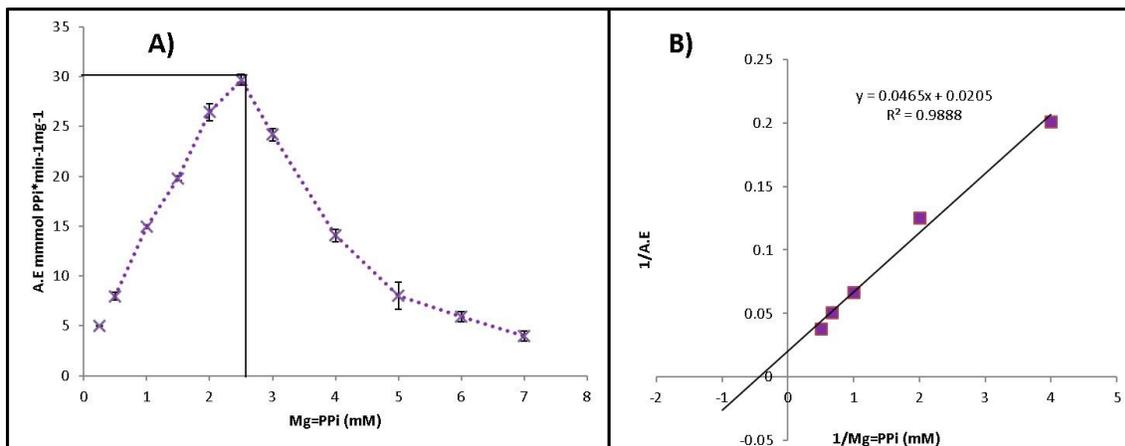


Figura 14. Estimación los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la PPiase de *Halobacterium salinarum*. Se observaron 6 puntos de la curva con una tendencia lineal (0.25-2.5 mM) (A) que fueron utilizados para poder realizar la ecuación de doble recíproco de Lineweaver-Burke (B) y poder determinar los parámetros cinéticos. Muestras de columna Sephacryl S-200 HR. Medio de reacción: Buffer de carbonatos 50mM pH 10.5, concentraciones equimolares de NaPPi y de MgCl_2 , 200mM de KCl y $1.34 \mu\text{g}$ de proteína, la reacción de hidrólisis fue durante 10 minutos.

4.9.1 Inhibición por sustrato.

Un punto importante que sobresalta en perfil de saturación de la velocidad en la formación del producto frente a la concentración de sustrato mostrado en la figura 14, es que después de la concentración 2.5 mM de sustrato y conforme va aumentando la concentración de este en el medio de reacción, se observa una inhibición por sustrato en la PPiase de *H. salinarum*; aunque este comportamiento es una de las desviaciones más comunes de la cinética de Michaelis-Menten y

uno de los mejores datos documentados en enzimología, no se tiene reportado un comportamiento de este tipo en otras PPiasas de Familia I de archaeas termoacidófila, inclusive en bacterias.

DISCUSIÓN

Las PPiasas citoplásmicas catalizan la hidrólisis de PPi, un producto de numerosas reacciones metabólicas importantes como: síntesis y activación de coenzimas, polimerización del ácido nucleico, activación y síntesis de aminoácidos y grasas, etcétera. Por medio de la hidrólisis del PPi, la enzima cambia en su totalidad el equilibrio de las reacciones y mantienen la dirección de avance de éstas, por lo que el papel que tienen en todas las células es de vital importancia.

En este trabajo se presenta por vez primera la purificación y caracterización de la Pirofosfatasa citoplásmica de la archaea halófila *Halobacterium salinarum*. La mayoría de las propiedades de la PPiasa son similares con las otras PPiasas ya reportadas.

Las PPiasas de Familia I de arqueas termoacidófilas forman complejos hexaméricos o tetraméricos con subunidades simples que van de los 19-25 kDa (Wakagie al. 1992, Richter and Schafer 1992, van Alebeek et al. 1994, Satoh et al. 1998, Jeon & Ishikawa, 2005 y McMillan, 2016). Los resultados preliminares del gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, muestran que la PPiasa citoplásmica de *Halobacterium salinarum* es un dímero formado por 2 subunidades idénticas, con un peso molecular de 19.73 kDa y presenta un peso molecular del oligómero aproximado de 43.17 kDa obtenido a través de la columna Sephacryl S-200HR. Aunque no se tienen registros de la existencia de una PPiasa de Familia I homodimérica, se propone que este resultado se debe a que la enzima puede estar perdiendo una pequeña parte durante alguno de los pasos de purificación o estar cambiando ligeramente de conformación de tal manera que migra diferente en la resina. Debemos recordar que la concentración interna de las sales principales (Na^+ y K^+) y las concentraciones presentes en el método de purificación difieren un poco. Se sabe que la concentración interna de K^+ es casi tan alta como la concentración de Na^+ del medio externo (Lanyi, 1974) y que la de este último catión es de máximo 500 mM (Ginzburg et al., 1970). Estas concentraciones podrían tener influencia y es por ello por lo que la conformación cuaternaria de la enzima podría ser afectada.

Los resultados también exponen que la PPiasa de *H. salinarum* es un dímero. Existen reportes en los que se indican que la PPiasa de *Escherichia coli*, normalmente hexámerica, puede trabajar como dímero, trímero, e incluso monómero (Vainonen et al., 2002). Aunque en estos estudios se trató a la enzima nativa con detergentes o se realizó una mutagénesis dirigida de dos residuos perteneciente a la interfase entre subunidades, por lo que es igual probable que la PPiasa parcialmente purificada en este trabajo haya perdido a los otros dímeros

en alguno de los pasos del método de purificación, pero nos da una conformación activa; aunque en este trabajo no se demuestran experimentos que lo confirmen, podría realizarse un análisis de sedimentación como se reporta en el trabajo de Vainonen y colaboradores en el 2002, en donde se medirá la velocidad a la que la proteína sedimenta; utilizando una ultra centrífuga y escaneando a 280 nanómetros se calculará el coeficiente de sedimentación de la enzima en cuestión y de PPiasas con diferentes estructuras del oligómero (dímero, trímero, tetrámero y hexámero). Cada una de las subunidades, así como la enzima completa obtendrá diferentes coeficientes de sedimentación, de esta manera se medirá la actividad específica en cada una de las fracciones y podremos saber si estos resultados son debido a la fragmentación de la proteína o si realmente la enzima tiene una estructura dimérica.

El pH óptimo para la PPiasa de *Halobacterium salinarum* fue de 10.5. Este resultado difiere de las PPiasas citoplásmicas de Familia I de arqueas termoacidófilas e inclusive organismos de otros dominios. El pH óptimo que se tiene reportado de las Pirofosfatasa citoplásmicas de arqueas termoacidófilas se encuentra en un intervalo de 6.5-9; el organismo más cercano es *Pyrococcus horikoshii* con un pH de 10 donde la enzima aun presenta actividad (Park *et al.*, 2010), pero no se puede hacer una conclusión determinante respecto a si existe una variación entre la PPiasa de *H. salinarum* y las otras PPiasas de archaeas termoacidófilas. Adicionalmente este pH de 10.5 óptimo para la actividad de la PPiasa difiere aún más con el pH intracelular de *H. salinarum* que fue ha determinado por Tsujimoto y colaboradores (1988) donde en células intactas, se utilizó un colorante sensible al pH (BCECF/AM: 2', 7'-bis-(carboxietil)-5(6)-carboxifluorescein-acetiximetil éster), que se utiliza para monitorear el pH citoplásmico, dando como resultado un pH de 7.2.

Se encontró que el NaF (fluoruro de sodio) que es un inhibidor típico de las PPiasas citoplásmicas de Familia I en una concentración de 10 mM e inhibe el 92% de la actividad hidrolítica a la PPiasa citoplásmica de *Halobacterium salinarum*. El papel de la inhibición del fluoruro en estas enzimas se explica por la formación de un complejo que es sumamente estable, donde el PPi se une covalentemente a la enzima; por lo que el fluoruro se considera un potente inhibidor a nivel del sitio activo ya que impide la unión de los cationes que son indispensables para la actividad (Baykov *et al.*, 2000 y Kajander *et al.*, 2013). Dentro de las PPiasas de Familia I la inhibición por fluoruro va desde una disminución de la actividad del 50-100%: 50% a 1.7 mM en *Sulfolobus acidocaldarius* (Hansen *et al.*, 1999), 5 mM en 70% *Methanobacterium thermoautotrophium* (van Alebeek *et al.*, 1994), 91% en la PPiasa de *E. coli* 1 mM (Josse, 1996), *Thiobacillus thiooxidans* En 81% a 1.25 mM (Tominaga y Mori 1997)

y 100% 10 mM *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodospirillum gelatinosa* (Celis et al., 2003). Por lo que en comparación con la sensibilidad al fluoruro por parte de la PPiase de *H. salinarum* es similar a la de la mayoría de las arqueas acidófilas.

La PPiase de *H. salinarum* ha demostrado una fuerte dependencia de cationes divalentes, pues no se pudo encontrar actividad en ausencia de ellos, como se ha observado en las PPiases de familia II, como la de *Rhodobacter sphaeroides*, que puede llevar a cabo la hidrólisis de PPi aun cuando en el medio de reacción no se agregue algún catión (Celis et al., 2003 y Sarmina et al., 2016). El que una PPiase pueda llevar esto a cabo se atribuye a la presencia de cationes divalentes estructurales, pues aún después de haber pasado la muestra en una columna Sephadex G25 para quitar cualquier catión o molécula pequeña que funcionara como cofactor, la enzima no perdía actividad, pero con la presencia de EDTA la inactivaba.

El catión Mg^{2+} confiere la mayor actividad enzimática. Este fenómeno ha sido observado en todas las PPiases de Familia I donde el catión Mg^{2+} está involucrado en la actividad catalítica de dos maneras: a) como parte del sustrato ($MgPPi$) y b) como activador (Cooperman 1982). En arqueas se tiene reportado que la concentración mínima a la cual el Mg^{2+} comienza a fungir como activador es a partir de 1-2 mM (Wakagie et al. 1992, Richter and Schafer 1992, van Alebeek et al. 1994, Satoh et al. 1998, Jeon & Ishikawa, 2005 y McMillan, 2016) y la PPiase de *H. salinarum* muestra el mismo comportamiento. El Mg^{2+} es el único catión que se pega de manera adecuada al sitio activo en las PPiases de familia I, además, al hacerlo más positivo dado que se pega en carboxilos, permite que el PPi se una con mayor eficiencia (Tommi et al., 2013).

Los efectos de los cationes monovalentes fueron analizados en la actividad de PPiase en presencia de concentraciones variables de KCl, NaCl, RuCl, LiCl y CsCl. La enzima presentó un comportamiento halofílico típico, donde requieren altas concentraciones de estos, principalmente de KCl (más de 0.6 M KCl) para maximizar su actividad, aunque a partir de 25 mM se comienza a observar el incremento. Este comportamiento se ha observado en otra enzima presente en *H. salinarum* como la *p*-Nitrofenilfosfatofosfatasa (*p*NPPasa) (Bonet et al., 1991) donde el KCl y el NaCl activan a la enzima, pero sólo un 15%. Por lo que es la primera vez que se reporta que una PPiase citoplásmica de Familia I requiera de K^+ para incrementar en más de 100% su actividad hidrolítica. La activación por el catión monovalente en la PPiase puede explicarse debido a que las enzimas halofílicas requieren una alta concentración de sal para permanecer estable en su conformación cuaternaria, a bajas concentraciones de sal (<2 M NaCl) se

desnaturalizan (McLain, 2004; Bonet et al., 1991). La desnaturalización implica el despliegue, disociación e inactivación, procesos que pueden ocurrir juntos o por separado (Pundak et al., 1981). Se ha observado que algunas enzimas de organismos halófilos se pueden renaturalizar aumentando aún más la concentración de sal (Holmes y Halvorson, 1963); aunque la PPiase de *H. salinarum* muestra un absoluto requisito de una alta fuerza iónica para su estabilidad; pues la diálisis frente a una solución sin sal condujo a una pérdida completa de actividad y la enzima no pudo ser renaturalizada por una segunda diálisis contra buffers que contienen 3 M NaCl o KCl; en las PPiases de familia I tanto de archaeas termoacidófilas como de BPNS halófilas, no se ha comprobado éste método de renaturalización.

De acuerdo con los experimentos llevados a cabo con diferentes concentraciones de diferentes cationes monovalentes, la enzima parece estar estabilizada por algunas de las sales utilizadas en la serie Hoffmeister, esta serie muestra el efecto que tienen ciertas sales -orgánicas e inorgánicas- sobre la estabilidad de proteínas en disolución: algunas aumentan la solubilidad de la proteína (*salting-in*), mientras otras las precipitan (*salting-out*) (Kunz, 2010 y Kunz, 2004). Actualmente se ha clasificado el efecto de los cationes y aniones en la estabilidad de las proteínas, observándose que los aniones (11 de menor a mayor: SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , OH^- , Cl^- , Br^- , ClO_3^- , BF_4^- , I^- , ClO_4^- , SCN_6^- y PF_6^-) tienen un mayor impacto que los cationes (8 de mayor a menor: $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) estos efectos no sólo son en la solubilidad, sino también en la catálisis enzimática, interacción proteína-proteína, actividad óptica de azúcares y aminoácidos, cristalización y crecimiento bacterianos (Zhang, 2006). Las razones de este comportamiento se deben a la solvatación de estos iones, la influencia que tiene sobre la estructura del agua a sus alrededores y las interacciones directas entre los iones con las proteínas (Zhang, 2006). Los resultados (de acuerdo con la serie de Hoffmeister) muestran que: $\text{K}^+ \gg \text{Cs}^+ \gg \text{Rb}^+ \gg \text{Li}^+ \gg \text{Na}^+$ comportándose todos ellos como cosmótopos, es decir, disminuyen la desnaturalización de las proteínas.

La magnitud y significado real de la V_{max} y la 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 el número de los pasos intermedios de la reacción (Kaiser, 1980 y Chaplin y Bucke, 1990) aun así, estos valores sirven para caracterizar y comparar las eficiencias catalíticas de las enzimas. Bajo las condiciones ensayadas de equimolaridad de Mg^{2+} y PPi^{2-} , se obtuvo menos del 70% de actividad registrada con respecto a la relación $\text{Mg}^{2+}/\text{PPi}^{2-}=1.5$. Tanto el valor de la K_m como la V_{max} es similar al que presentan las PPiases citoplásmicas de arqueas termoacidófilas (Wakagi et al., 1992; Richter y Schafer 1992; van

Alebeek *et al.*, 1994; Satoh *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 2000; Jeon y Ishikawa, 2005 y McMillan, 2016).

Algo que cabe resaltar y que no es muy común en las Pirofosfatasa de Familia I es la inhibición por sustrato. Este fenómeno sólo ha sido reportado en la PPiase de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por Bailey y Webb en el año de 1944, donde a partir de una concentración equimolar de 3 mM de sustrato se observa una disminución en la actividad de la enzima, e inclusive se observó que al tener una concentración de 170 mM de sustrato se perdía por completo la actividad de la enzima, cabe mencionar que este fenómeno no se ha observado en algún organismo cercano filogenéticamente a *H. salinarum*. Lo que sí se sabe con certeza, es que las PPiases de Familia I presentan inhibición no competitiva cuando el PPi^{4-} se encuentra de forma libre (Lahti, 1983, Sosa *et al.*, 1992), sin embargo, en este trabajo el PPi^{4-} no se encontraba de forma libre pues se experimentó con concentraciones equimolares de sustrato, por lo que a pesar de que a inhibición por sustrato es una de las desviaciones más comunes de la cinética y uno de los mejores datos documentados en enzimología donde se han propuesto varios modelos para explicarlo, el resultado obtenido con la PPiase de *H. salinarum*, se debe a que la alta concentración de sustrato da una acumulación de producto más allá de un cierto límite inhibiendo la actividad de la enzima y que además, debido a la alta concentración de sustrato, éste pueda formar complejos con la enzima (S_2ES_1) que no son activos para convertirse en E y P (Kaiser, 1980).

La dependencia no hiperbólica de la actividad de la PPiase en la concentración del sustrato puede proporcionar una regulación versátil del nivel de PPi celular. La intensidad de las reacciones biosintéticas y, en consecuencia, de la producción de PPi está sujeta a grandes variaciones. La actividad de la PPiase hasta 2.5 mM de sustrato, aumenta en mayor medida de lo que se esperaría para una enzima de Michaelis-Menten clásica, al pasar de concentraciones bajas a altas. De este modo, la célula está protegida de la acumulación de grandes cantidades de PPi, lo que inhibe las demás reacciones del metabolismo (Veech, *et al.* 1980).

CONCLUSIONES

- ❖ La PPiase citoplásmica de la archaea halófila *Halobacterium salinarum* puede purificarse parcialmente por el método de familia I anteriormente descrito para bacterias fotosintéticas.
- ❖ La archaea halófila *Halobacterium salinarum* presenta una Pirofosfatasa perteneciente a la Familia 1 con características diferentes a las PPiases de esta familia.
- ❖ No se encontró una PPiase H⁺ en *Halobacterium salinarum*, es probable que pueda tener otro tipo de PPiase membranal.
- ❖ La PPiase presenta una activación por el catión monovalente K⁺ únicamente.
- ❖ La PPiase presenta una inhibición por sustrato.

Resumen de algunas propiedades de las PPiasas de arqueas.

Se compara la PPiasa de *H. volcanii* que es la PPiasa con un porcentaje de identidad mayor con respecto a la PPiasa de *H. salinarum*, ambas pertenecientes a Familia I y *M. jannaschii* perteneciente a Familia II.

Características	Familia I		Familia II
	<i>Halobacterium salinarum</i>	<i>Haloferax volcanii</i> ¹	<i>Methanococcus jannaschii</i> ²
pH óptimo	10.5	8.5	ND
Sustrato	MgP ₂ O ₇ ²⁻	MgP ₂ O ₇ ²⁻	MnP ₂ O ₇ ²⁻
Catión Activador	Mg ²⁺	Mg ²⁺	No
Inhibidor	NaF y MgP ₂ O ₇ ²⁻ a altas concentraciones	NaF	ND
Actividad con diferentes cationes divalentes	Mg ²⁺ >Co ²⁺ >Mn ²⁺ >Zn ²⁺	Mg ²⁺ >Mn ²⁺	Mn ²⁺ >Co ²⁺ >Mg ²⁺ >Zn ²⁺
Activación con diferentes cationes monovalentes	K ⁺ >Cs ⁺ >Ru ⁺ >Li ⁺ >Na ⁺	No	No
K _m (mM)	2.26	4.6	ND
V _{max}	48.78 ^a	465 ^b	ND
PM (kDa)	Homodímero 43.23	Homohexámero o homotetrámero	Homodímero 64.24
Subunidades moleculares (kDa)	19.73	20.4	34.12

a=μmol Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹ con concentraciones equimoleculares de sustrato

b= μmol PPI * min⁻¹ * mg proteína⁻¹

ND= dato no disponible

1: Kuhn *et al.* 2000

2: McMillan, 2016

PERSPECTIVAS

- *Realizar una PPIasa recombinante, para caracterizar a la enzima purificada.
- *Con la proteína recombinante purificada, repetir los experimentos presentados en este trabajo, para corroborar los resultados obtenidos en esta tesis.
- *Para determinar el tipo de inhibición que presenta la PPIasa, se realizarán curvas con diferentes condiciones: a) con concentraciones equimolares de sustrato, b) PPi^{4-} libre en el medio de reacción (ejemplo de inhibidor no competitivo) y c) concentraciones equimolares de sustrato + concentraciones equimolares de imidodifosfato- Mg^{2+} (ejemplo de inhibidor competitivo). En las tres condiciones se irán cambiando las concentraciones de 0-10 mM de los sustratos a un tiempo fijo de 10 minutos. Se determinará la actividad específica y se realizarán dos graficas: una donde solamente se grafique la hidrólisis del sustrato y con ello observemos qué tipo de curva presentan (hiperbólica, sigmoideal o campana) las tres condiciones y otra utilizando los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para calcular los parámetros cinéticos de k_m y V_{max} de cada condición en específico la condición que nos interesa de concentraciones equimolares de sustrato, y con ello determinar qué tipo de inhibición presenta la enzima, pues se sabe que si tenemos una inhibición competitiva se ve modificada la k_m , mientras que en una inhibición no competitiva la V_{max} es el parámetro que se verá modificado.
- *Analizar cuáles son los residuos de aminoácidos implicados en la hidrólisis del PPI mediante inhibidores hidrofílicos de carboxilos, así como cristalografía de la enzima.
- *Resolver la estructura de la enzima mediante cristalización de rayos X, para determinar si tiene sitios de alta o baja afinidad al sustrato modelada por homología.
- *Al no haber encontrado una PPIasa H^+ de membrana, es probable que al habitar en un ambiente hiper salino la PPIasa membranal corresponda a una de Na^+ , por lo que se buscaría en el genoma las secuencias conservadas presentes en estas Pirofosfatasas y verificar la existencia de una en *Halobacterium salinarum*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, S., Milner, A. J., Fütterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young, T. W., & White, S. A. (2001). The “open” and “closed” structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 797–811.
2. Anwar, T., & Gourinath, S. (2013). Analysis of the Protein Phosphatome of *Entamoeba histolytica* Reveals an Intricate Phosphorylation Network. *PLoS ONE*, 8(11), 78714.
3. Aravind, L., & Koonin, E. V. (1998). A novel family of predicted phosphoesterases includes *Drosophila* prune protein and bacterial recJ exonuclease. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1), 17–19.
4. Auernik, K. S., Cooper, C. R., & Kelly, R. M. (2013). NIH Public Access, 19(5), 445–453.
5. Baltcheffsky H, Lundin M, Luxemurg C, Nyrén P, Baltcheffsky M. (1986). Inorganic pyrophosphate and the molecular evolution of biological energy coupling. *Chem. Ser. 26B*: 259-262.
6. Baltcheffsky, M. (1967). Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature* 216; 241-243.
7. Baltcheffsky, M., Schultz, A., Baltcheffsky, H. (1999). H-protonpumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*. 452; 121-127
8. Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 9188–9193
9. Baykov, A.A., Fabrichniy, I.P., Pohjanjoki, P., Zyryanov, A.B. and Lahti, R. (2000) Fluoride effects along the reactions pathways of pyrophosphatase: evidence for a second enzyme center pyrophosphate intermediate. *Biochemistry* 39,11939–11947.
10. Bayley, S. T., and R. A. Morton. 1978. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 6:151-205.
11. Belay, N., Sparkling, R. & Daniels, L. (1984). Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. *Nature* 312, 286–288.
12. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 8.4, The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes.
13. Betlach MC, Leong D, Boyer HW (1986) Bacterio-opsin gene expression in *Halobacterium halobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:83–89

14. Birge RR, Gillespie NB, Izaguirre EW, Kusnetzow A, Lawerence AF, Singh D, Song QW, Schmidt E, Stuart JA, Seetharaman S, Wise KJ (1999) Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memories. *J. Phys. Chem. B.* 103:10746–10766
15. Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W. y Stetter, K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles*, 1 pp. 14-21.
16. Bonet, M. L. (1991). Purification and some properties of an atypical alkaline phosphatase activity from *Halobacterium Halobium*. *International Journal of Biochemistry*, 23(12), 1445–1451.
17. Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Rev. Microbiol.* 6, 245–252
18. Brock, T.D., Brock K.M., R.T. Belly, R.L. (1972), Weiss *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.*, 84 pp. 54-68
19. Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (2009). *Guide to protein purification*. Academic Press/Elsevier. Retrieved from Kankare, J., Neal, G. S., Salminenlr, T., Glumhoff, T., Cooperman, B. S., Lahti, R., & Goldman, A. (1994). The structure of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase at 2.7 Å resolution. "Protein Engineering, Design and Selection," 7(7), 823–830.
20. Cavicchioli, R. (2011). Archaea - Timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, 9(1), 51–61.
21. Celis, H. and I. Romero. 1987. The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19:255–272.
22. Celis, H., Escobedo, S., y Romero, I. (2003). Los dos tipos de pirofosfatasas fotosintéticas. Diferencias en su requerimiento de cationes. *Memorias. XII Congreso de Bioenergetica y Biomembranas.* (Pag 49). Patzcuaro, Michoacan: Editorial Universitaria UMSNH.
23. Chi, A., & Kemp, R. G. (2000). The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate? *The Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35677–35679.
24. Christian, J. H. B., and J. A. Waltho. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 65:506-508.
25. Chu L-K, Yen C-W, El-Sayed MA (2010) Bacteriorhodopsin-based photoelectrochemical cell. *Biosens Bioelectron* 26:620–626
26. Cooperman, B.S. 1982. The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods. Enzymol.* 87:526–548.

27. Cooperman, B.S., Baykov, A. A., and Lahti, R. (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends. Biochem. Sci.* 17, 262-266 3.
28. Cori GT., Ochoa S., Slein M.W., Cori C.F. The Metabolism of Fructose in Liver. Isolation of Fructose-1-phosphate and Inorganic Pyrophosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1951; 7:3 04-17
29. Dalton, H. (2005). The Leeuwenhoek Lecture 2000: the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360,1207–1222
30. Danon A, Stoeckenius W (1974) Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1234–1238
31. DasSarma S. (2006). Extreme halophiles are models for astro-biology. *Microbe.* 1: 120-127.
32. DasSarma, S., and P. Arora. 2002. Halophiles, p. 458–466. In *Encyclopedia of life sciences*, vol. 8. Nature Publishing Group, London, United Kingdom
- DasSarma P, Coker JA, Huse, V, DasSarma S. (2010). Halophiles, Biotechnology. In: Flickinger MC (ed.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons Ltd, 2769-2777.
33. Davies, J. M., Poole, R. J., & Sanders, D. (1993). The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance. for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1141(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90185-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90185-1)
34. De Medicis E., Laliberte J. F. and Vass-Marengo J. (1982). Purification and properties of pyruvate kinase from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. biophys. Acta* 708,57-67.
35. de Meis, L. (1984). Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca²⁺, Mg²⁺, and water to free energy of hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6090–6097.
36. DSMZ: List of Media for Microorganisms. (n.d.). Retrieved January 17, 2019, from <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms.html>
37. Efimova, I. S., Salminen, A., Pohjanjoki, P., Lapinniemi, J., Magretova, N. N., Cooperman, B. S., ... Baykov, A. A. (1999). Directed mutagenesis studies of the metal binding site at the subunit interface of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3294–3299.
38. Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., Von Gronau, S. y Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12(2), 177–196.

39. Garrett, R. & Klenk, H.-P. (2007). *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology*. Blackwell, Oxford, UK.
40. Gest, H. (1993). Photosynthetic and quasi-photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 112(1), 1–5
41. Ginzburg, M., L. Sachs, and B. Z. Ginzburg. (1970). Ion metabolism in a Halobacterium. Influence of age of culture on intracellular concentrations. *J. Gen. Physiol.* 55:187-207.
42. Gonzalez, O., Gronau, S., Pfeiffer, F., Mendoza, E., & Zimmer, R. (2009). Systems Analysis of Bioenergetics and Growth of the Extreme Halophile Halobacterium salinarum. *PLoS Comput. Biol.* 5(4), 1000332.
43. Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. & Ventosa, A. (2001b). Order I. Halobacteriales Grant and Larsen 1989b, 495VP (Effective Publication: Grant and Larsen 1989a, 2216). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 294–299. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.
44. Hampp N (2000a) Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories. *Chem. Rev.* 100:1755–1776
45. Hampp N (2000b) Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:633–639
46. Hartmann R, Sickinger H-D, Oesterhelt D (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:3821–3825
47. Hartmann, R., & Oesterhelt, D. (1977). Bacteriorhodopsin-Mediated Photophosphorylation in Halobacterium halobium. *European Journal of Biochemistry*, 77(2), 325–335.
48. Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B. S., & Goldman, A. (1996). The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure (London, England : 1993)*, 4(12), 1491–508.
49. Heinonen, J. K. (2001). Biological Production of PPI. In *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate* (pp. 1–28). Boston, MA: Springer US.
50. Hochstein LI, Tomlinson GA (1985) Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 27:329–331
51. Holm, N. G., & Baltscheffsky, H. (2011). Links between hydrothermal environments, pyrophosphate, Na(+), and early evolution. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere: The Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 41(5), 483–493.
52. Holmes P. K. and Halvorson H. O. (1963) The inactivation and reactivation of salt-requiring enzymes from an extreme obligate halophile. *Can. J. Microbiol.* 9,904-906.
53. Hong FT (1986) The bacteriorhodopsin model membrane system as a prototype molecular computing element. *Biosystems* 19:223–236
54. Horn, A., Bornig, H.,y Thiele, G. (1967) *Eur. J. Biochem* 2.243-249.

55. Huber, H. et al. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67 (2002).
56. Iketa, M., Nakanishi, Y., Matsuda, N., Aizawa, K., Kashiyama, T., Yamamoto, K., Mmura, Y., Maeshima, M. (1999). Molecular cloning and sequencing of the cDNA for vacuolar H⁺-pyrophosphatase from *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* 50; 139-140.
57. Jeon, S. J., & Ishikawa, K. (2005). Characterization of the family I inorganic pyrophosphatase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Archaea*, 1(6), 385–389.
58. Kajander, T., Kellosalo, J., & Goldman, A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters*, 587(13), 1863–1869. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.05.003>
59. Keister, D. L., Minton, N.J. (1971). ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42; 932-939.
60. Keister, D. L., Yike, N. J. (1967). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*. 6:3847-3857.
61. Keister, D. L., Yike, N. J. (1967). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD⁺ reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 121; 415-422.
62. Khandelwal, R. L., y Hamilton, I. R. (1982) *Canal J. Bidwm.* 60,452-462
63. Kim. E. J., Zhen, R. G., Rea, P. A. (1991). Heterologous expresión of plant vacuolar pyrophosphaase in yeast demonstrates sufficiency of tje substrate-binding subunit for proton transport. *Procedings of National Academy of Sciences.* 91 (13): 6128-6132.
64. Klemme, J. H., y Gest, H. (1974) *Eur. J. Biw them* 47,57-66.
65. Klemme, J.-H., & Gest, H. (1971). Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *European Journal of Biochemistry*, 22(4), 529–537.
66. Kornberg, A. (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. *Advances in Enzimology.* Interscience 18: 191-240.
67. Kornberg, A. (1962). On the metabolic significance of phospholytic reactions. *En Horizons in Biochemistry.*
68. Kozubal, M. A. et al. (2013). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *ISME J.* 7, 622–634
69. Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S., & Young, T. W. (2000). *Methanococcus jannaschii* ORF mj0608 codes for a class C inorganic pyrophosphatase protected by Co²⁺ or Mn²⁺ ions against fluoride inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(2), 292–298.

70. Kunitz, M. (1952) Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from Baker's yeast. *J. Gen. Physiol.* 35, 423–450.
71. Kunz, W. (2004) The present state of affairs with hoffmeister effects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 9, 1-18.
72. Kunz, W. (2010) Specific ion effects in colloidal and biological system. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 15, 34-39.
73. Kurilova, S.A., Bogdanova, A.V., Nazarova, T.I. and Avaeva, S. (1984) Changes in the *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase activity on interaction with magnesium, zinc, calcium and fluoride ions. *Bioorg. Khim.* 10, 1153–1160.
74. Kushner, D. J. 1968. Halophilic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 10:73-99.
75. Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriology Reviews*, 38(3), 272–290.
76. Lahti, R. (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiological Reviews*, 47(2), 169–178.
77. Larcher W. (2001). Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups. *Biochem. Cell Biol.* 64: 675-680
78. Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1:97-132.
79. Lata DB, Chandra R, Kumar A, Misra A (2007) Effect of light on generation of hydrogen by *Halobacterium halobium*. *Int. J. Hydrogen. Energ.* 32:3293–3300
80. Lipmann, F. (1965). Projecting Backward from the Present Stage of Evolution of Biosynthesis. *The Origins of Prebiological Systems and of Their Molecular Matrices*, 259–280.
81. Liu, Y., Beer, L. L., & Whitman, W. B. (2012). Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2632–2644.
82. Lundin, M., Baltscheffsky, H., & Ronne, H. (1991). Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12168–12172.
83. Luoto, H. H., Belogurov, G. A., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2011). Na⁺-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H⁺-translocating pyrophosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21633–21642.
84. Lynch, J. H., Sa, N., Saeheng, S., Raffaelli, N., & Roje, S. (2018). Characterization of a non-nudix pyrophosphatase points to interplay between flavin and NAD(H) homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*, 13(6), e0198787.
85. Mancinelli RL, Hochstein LI (1986) The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 55-58.

86. Matheson, A. T., G. D. Sprott, I. J. McDonald, and H. Tessier. (1976). Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology. *Can. J. Microbiol.* 22:780-786.
87. McIntosh, M. T., & Vaidya, A. B. (2002). Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. *International Journal for Parasitology*, 32(1), 1–14.
88. McLain, J. E. T. (2004). Archaea. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, (Editores: Jerry L Hatfield, Kate M Scow, David S Powlson, Michael J Singer, Cynthia Rosenzweig, Donald L Sparks). Academic Press, Volumen 1, USA. 88–94.
89. McLaughlin, J., Aly, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Protozoology*. 32; 221-240.
90. McMillan, L. J., Hepowitz, N. L., & Maupin-Furlow, J. A. (2016). Archaeal inorganic pyrophosphatase displays robust activity under high-salt conditions and in organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 538–548.
91. Merckel, M. C., Fabrichniy, I. P., Salminen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A. A., Lahti, R., & Goldman, A. (2001). Crystal Structure of *Streptococcus mutans* Pyrophosphatase: A New Fold for an Old Mechanism. *Structure*, 9(4), 289–297.
92. Mevarech M., Eisenberg H. and Neumann E. (1977) Malate dehydrogenase isolated from extremely halophilic bacteria of the Dead Sea. Purification and molecular characterization. 16, 3781-3785.
93. Moe, o., y Butler, L. (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. III. Kinetics of Ca²⁺ inhibition. *The Journal of biological chemistry*, 247 (22), 7315-7319.
94. Mullakhanbhai, M. F., and H. Larsen. 1975. *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* 104:207-214.
95. Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., ... DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12176–12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.190337797>
96. Novitsky, T. J., and D. J. Kushner. 1975. Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic "*Micrococcus*" sp. *Can. J. Microbiol.* 21:107-110.
97. Nunoura, T. et al. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic. Acids. Res.* 39, 3204–3223
98. Nyrén, P., Strid, A. (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototropic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77; 265-270.

99. Oesterhelt D (1982) Anaerobic growth of halobacteria. *Meth. Enzymol.* 88:417–420
100. Oesterhelt D, Krippahl G (1983) Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann. Microbiol.* 134B:137–150
101. Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature* 233:149–152
102. Oren A (1994) The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:415–440
103. Oren A, Litchfield CD (1999) A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 173:353–358
104. Oren A. (2006). The order Halobacteriales. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, (eds) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Vol. III. (Ed. 3)* Springer, New York. 113–164.
105. Oren A. (2012). Taxonomy of the family Halobacteriaceae: a paradigm for changing concepts in prokaryote Systematics *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 263–271
106. Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56–63.
107. Oren, A. (2013) The Family Halobacteriaceae. En: *The prokaryotes*. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (edits). Berlin, Springer. 1118 pp.
108. Papadopoulos, J. S., & Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(9), 1073–1079.
109. Park SY, Lee B, Park KS, Chong Y, Yoon MY, Jeon SJ, Kim DE. 2010. Facilitation of polymerase chain reaction with thermostable inorganic pyrophosphatase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:807–812.
110. Pastor JM, Bernal V, Salvador M et al. (2013). Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* 288: 17769-17781.
111. Pérez-Castiñeira, J. R., Gómez-García, R., López-Marqués, R. L., Losada, M., & Serrano, A. (2001). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 4(3), 135–142.

112. Pfeiffer, F., Schuster, S. C., Broicher, A., Falb, M., Palm, P., Rodewald, K., ... Oesterhelt, D. (2008). Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics*, 91(4), 335–346.
113. Plasmids - Genome - NCBI. (n.d.)<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/1051?>(accessed Oct. 26, 2018).
114. Richter, O. H., & Schäfer, G. (1992). Purification and enzymic characterization of the cytoplasmic pyrophosphatase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 343–349.
115. Robinson, C. E., Harris, J. K., Spear, J. R. & Pace, N. R. (2005). Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 638–642
116. Robinson, J. L., Pyzyra, B., Atrasz, R. G., Henderson, C. A., Morrill, K. L., Burd, A. M., ... Shand, R. F. (2005). Growth Kinetics of Extremely Halophilic. *Society*, 187(3), 923–929.
117. Rodriguez-Valera, F. (1995). Cultivation of halophilic archaea, p. 13–16. In F. T. Robb, A. R. Place, K. R. Sowers, H. J. Schreier, S. DasSarma, and E. M. Fleishmann (ed.), *Archaea, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y
118. Romero, I., Celis, H. (1990). El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bionergetica. *Ciencia* 41; 297-305.
119. Rosenberg, E. et al. (2014). *The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
120. Rothschild, L. J. & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101.
121. Ruepp A, Soppa J (1996) Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *J. Bacteriol.* 178:4942–4947
122. Sakakibara, Y., Kobayashi, H., Kasamo, K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *J. Mol. Biol.* 366; 1305-1317.
123. Sarmina, A., Peña-Segura, C., & Celis, H. (2017). Family II pyrophosphatases from photosynthetic bacteria can hydrolyze free pyrophosphate. *Research and Reports in Chemistry*, Volume 1, 1–5.
124. Satoh, T., Samejima, T., Kaji, H., ... Nogi, G. (1998). Molecular Cloning, Expression, and Site-Directed Mutagenesis of Inorganic Pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.* 124, 79-88.
125. Schleper, C., G. Piihler, I. Holz, D. Janekovic, U. Santarius, Klenk, and W. Zillig. (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic,

- thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* 172:7050-7059.
126. Schobert B, Lanyi JK (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* 257:10306–1031
 127. Schöcke, L. y Schink, B. (1998). Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentiaae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *Eur. J. Biochem.* 256; 589-594.
 128. Scott, D. A., De Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L. Hong-Gang, L., Moreno, S., Docampo, S. (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273; 22151-22158.
 129. Shand RF, BetlachMC (1991) Expression of the *bop* gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J. Bacteriol.* 173:4692–4699
 130. Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G (2005) Oxidation of thiosulfate by an haloarchaeon isolated from hypersaline habitat. *Extremophiles* 9:501–506
 131. Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I., Celis, H. (1992). Mg²⁺ is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry Journal.* 283; 561-566.
 132. Talaue, C. O., del Rosario, R. C. H., Pfeiffer, F., Mendoza, E. R., & Oesterheld, D. (2016). Model Construction and Analysis of Respiration in *Halobacterium salinarum*. *PLOS ONE*, 11(3), e0151839.
 133. Tomlinson GA, Jahnke LL, Hochstein LI (1986) *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:66–70
 134. Tommi, k., Juho, K. y Goldman A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters* 587) 1863–1869
 135. Tuominen, H. (2011). The structural basis for inorganic pyrophosphatase catalysis and regulation. Retrieved from <https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/69593/AnnalesAI417Tuominen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 136. van Alebeek GJ, Keltjens JT, van der Drift C. 1994. Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain delta H). *Biochim. Biophys. Acta.* 1206:231-239.
 137. Vainonen, Y. P., Kurilova, S. A., & Avaeva, S. M. (2002). Hexameric, trimeric, dimeric, and monomeric forms of inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 28(5), 385–391.
 138. van Wazer J.R. Phosphorus and its compounds. Phosphorus and its compounds. Vol. 2, Technology, Biological Functions, and Applications. Edited by Interscience Publishers, New York. 1,092 pp.

139. Veech, R. L., Cook, G. A., & Todd King, M. (1980). Relationship of free cytoplasmic pyrophosphate to liver glucose content and total pyrophosphate to cytoplasmic phosphorylation potential. *FEBS Letters*, 117(S1), K65–K72.
140. Ventosa A, Oren A (1996) *Halobacterium salinarum* nom. corrig., a name to replace *Halobacterium salinarum* (Elazari-Volcani) and to include *Halobacterium halobium* and *Halobacterium cutirubrum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:347
141. Vidilaseris, K., Kellosalo, J., & Goldman, A. (2018). A high-throughput method for orthophosphate determination of thermostable membrane-bound pyrophosphatase activity. *Analytical Methods*, 10(6), 646–651.
142. Wakagi, T., Lee, C. H., & Oshima, T. (1992). An extremely stable inorganic pyrophosphatase purified from the cytosol of a thermoacidophilic archaebacterium, *Sulfolobus acidocaldarius* strain 7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1120(3), 289–296.
143. Wise KJ, Gillespie NB, Stuart JA, Krebs MP, Birge RR (2002) Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices. *Trends Biotechnol* 20:387–394
144. Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74, 5088–5090
145. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 4576–4579
146. Wolfe, R. S. The sixth A. J. Kluyver (1979). Memorial Lecture. Methanogens: a surprising microbial group. *Antonie Van Leeuwenhoek* 45, 353–364
147. Wood, HG. (1997). Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proc.* 36: 2197-2205.
148. Zabut B, El-Kahlout K, Yu'cel M, Gu'ndu'z U, Tu'rker L, Eroglu I (2006) Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeoides* O.U. 001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy*
149. Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 658–663.