

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



Caracterización bioquímica de *EhHAPp49*, una proteína amibiana del tipo HAP-fitasa que exhibe actividad pirofosfatasa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Celina Terán Ramírez

Tijuana, Baja California, México.

Agosto de 2020.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 296

Tijuana, B. C., a 4 de Agosto del 2020

C. Celina Terán Ramírez
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

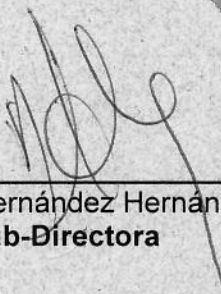
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dra. Rosa Elena Mares Alejandre

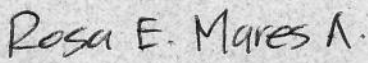
Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema “Caracterización bioquímica de *EhHAPp49*, una proteína amibiana del
tipo HAP-fitasa que exhibe actividad pirofosfatasa”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

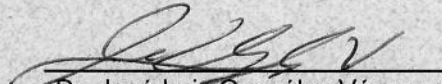
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA



Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Directora



Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Directora de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**Caracterización bioquímica de *EhHAPp49*, una proteína amibiana del tipo HAP-
fitasa que exhibe actividad pirofosfatasa**

Tesis de Maestría

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales; incluir la siguiente cita: **“Terán Ramírez Celina. Caracterización bioquímica de *EhHAPp49*, una proteína amibiana del tipo HAP-fitasa que exhibe actividad pirofosfatasa. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Agosto de 2020.”**
- 2) enviar un correo electrónico a rmares@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a rmares@uabc.edu.mx.

D.R. © Terán Ramírez, Celina. Tesista.

D.R. © Mares Alejandre, Rosa Elena. Directora de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2020.

Tesis: Caracterización bioquímica de *EhHAPp49*, una proteína amibiana del tipo HAP-fitasa que exhibe actividad pirofosfatasa

Grado: Maestría en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Celina Terán Ramírez

Fecha: Agosto de 2020

El presente trabajo de investigación se realizó en el **Laboratorio de Biotecnología y Biociencias** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC)**, bajo la dirección de la profesora **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre** y la asesoría del **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para Investigación en Ciencia Básica (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

El **Documento de Tesis** correspondiente fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

Dr. Samuel Guillermo Meléndez López	Presidente
Dra. Rosa Elena Mares Alejandre	Secretaria
Dra. Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz	Sinodal
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra	Suplente
M.C. Pablo Alfonso Madero Ayala	Suplente

Durante mis estudios de posgrado (Maestría), fui **Becaria** del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT** (Folio 902022, periodo 08/2018 – 07/2020).

En 2019, recibí el respaldo académico y apoyo económico de la **Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas (UABC)** para **asistir y presentar** los resultados del presente estudio en un evento académico: *VI Latin American Protein Society Meeting - VII Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas (Sociedad Mexicana de Bioquímica)*, realizado en la Cd. de México durante los días 20-23 del mes de Octubre.

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres**, los mejores, por el apoyo en cada sentido posible, por mi crianza, y por la libertad de decisión. A **mis hermanos**, por ser cada uno el mejor ejemplo a seguir, por cuidarme, soy la hermana menor más afortunada.

A mis amigas **Jaqueline** y **Griselda**, por el gran apoyo moral, que fue realmente importante para mí en los días oscuros.

A mi **Vero**, por compartir conmigo de manera tan cercana estos 2 años a pesar de no vernos tanto, por esas pláticas que me renovaron el alma tantas veces. Quiero ser para siempre tu amiga.

A **Eliseo**, por todas las anécdotas, risas, desayunos, por permitirme desahogar las penas tantas veces.

A **Jorge**, por todo el apoyo moral, los consejos, y en general, por ser como un hermano mayor.

A **Kat**, mis cejas se levantarán siempre para ti, gracias por las experiencias de vida que has puesto en mi camino. Ya sabes que si tengo una hija se llamará como tú.

A **Pablo Madero**, por el gran apoyo durante estos dos años, tus opiniones y consejos han sido realmente valiosos.

A **Álvaro Rodríguez**, por las experiencias compartidas en estos dos años, incluyendo comidas, momentos de estrés y cansancio, pero también celebraciones de fin de semestre.

A todos los compañeros del laboratorio Biotech: **Alejandro, Manuel, Gabriel, Ana Laura, Ariana, Álvaro Beltrán**; por el apoyo moral, académico, experiencias compartidas, anécdotas y risas.

A los profesores, que han sido importantes guías en este proceso, por enriquecerme con sus observaciones, cuestionamientos y comentarios en cada evaluación; además de tomarse el tiempo de revisar este documento y apoyarme con sus valiosas observaciones: **Dra. Rosy, Dr. Marco, Dra. Lilian, Dr. Samuel, M.C Pablo Madero.**

Especialmente al **Dr. Marco** y **Dra. Rosy** por abrirme de nuevo las puertas del laboratorio, por guiarme siempre de la mejor manera. Mi agradecimiento es infinito.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
CONTENIDO	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Importancia del fosfato para la vida	10
1.1.1. Importancia del fosfato para la vida en la tierra	10
1.1.2. Importancia del fosfato para la función celular	10
1.1.3. Fosfatasas: función y clasificación	11
1.1.4. Papel de las fosfatasas en la célula	12
1.2. Pirofosfato y pirofosfatasas.....	13
1.2.1. Importancia del pirofosfato	13
1.2.2. Regulación de la concentración de pirofosfato	14
1.2.3. Clasificación de pirofosfatasas	14
1.2.4. Importancia de las pirofosfatasas	16
1.3. La proteína amibiana <i>EhHAPp49</i>.....	16
1.3.1. <i>EhHAPp49</i> : una proteína con similitud HAP/fitasas	16
1.3.2. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	18
1.3.3. <i>EhHAPp49</i> en la fisiología y virulencia de <i>E. histolytica</i>	20
1.4. Aplicaciones de las fosfatasas.....	20
1.4.1. Importancia del estudio de las fosfatasas	20
1.4.2. Aplicaciones en el sector biomédico	21
1.4.3. Aplicaciones en el sector industrial y agropecuario	21
1.4.4. <i>EhHAPp49</i> como objeto de estudio	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
2.1. Hipótesis.....	23
2.2. Objetivo general.....	23
2.3. Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Reactivos biológicos y químicos.....	24
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos.....	24
3.1.2. Células bacterianas y medios de cultivo	24
3.1.3. Plásmido de expresión bacteriana: pQEhHAP-Myc22	25
3.2. Equipos y programas computacionales	25
3.3. Protocolos generales	26
3.3.1. Cultivos bacterianos	26

3.3.2.	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
3.3.3.	Cuantificación de proteínas (micro-Bradford)	27
3.3.4.	Determinación de fosfato en solución	27
3.4.	Expresión y purificación de rEhHAPp49	27
3.4.1.	Inducción de la expresión a midi-escala	27
3.4.2.	Extracción de proteínas en condiciones nativas	28
3.4.3.	Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel	28
3.4.4.	Purificación mediante cromatografía de permeación en gel	29
3.5.	Actividad enzimática de rEhHAPp49	29
3.5.1.	Actividad fosfatasa	29
3.5.2.	Actividad fitasa	30
3.5.3.	Actividad pirofosfatasa	30
3.6.	Caracterización de la actividad pirofosfatasa de rEhHAPp49.....	30
3.6.1.	Determinación de parámetros cinéticos	30
3.6.2.	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad	31
3.6.3.	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad	31
3.6.4.	Efecto de cationes divalentes sobre la actividad	31
3.6.5.	Efecto de iones fluoruro sobre la actividad	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1.	Producción de rEhHAPp49 pura y activa	32
4.2.	rEhHAPp49 exhibe actividad pirofosfatasa	33
4.3.	rEhHAPp49 es una pirofosfatasa alcalina.....	34
4.4.	rEhHAPp49: pH óptimo y estabilidad a pH	35
4.5.	rEhHAPp49: temperatura óptima y estabilidad térmica	36
4.6.	rEhHAPp49 es dependiente de Mg⁺²	37
4.7.	rEhHAPp49 es inhibida por iones fluoruro	37
5.	CONCLUSIONES	39
6.	BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación de la secuencia polipeptídica de <i>EhHAPp49</i>	17
Figura 2. Representación esquemática del mecanismo catalítico de enzimas HP.....	18
Figura 3. Representación esquemática del plásmido recombinante pQEhHAP-Myc22.	25
Figura 4. Purificación de <i>rEhHAPp49</i> por cromatografía de afinidad a Ni.	32
Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad enzimática de <i>rEhHAPp49</i>	36
Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática de <i>rEhHAPp49</i> . ..	36
Figura 7. Efecto de la concentración de Mg ⁺² sobre la actividad de <i>rEhHAPp49</i>	37
Figura 8. Efecto de iones fluoruro sobre la actividad de <i>rEhHAPp49</i>	38
Tabla 1. Producción de la proteína <i>rEhHAPp49</i>	33
Tabla 2. Análisis de actividad enzimática de la proteína <i>rEhHAPp49</i>	34
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la actividad pirofosfatasa de <i>rEhHAPp49</i>	35

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados (Celsius)
<i>EhHAP</i> p49	Fosfatasa ácida de histidina de <i>Entamoeba histolytica</i> (49.3 kDa)
h, min, s	Horas, minutos, segundos
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K_{cat}	Constante catalítica / número de recambio
kDa	Kilodaltons
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
M, mM, μM	Molar, milimolar, micromolar
mL, μL	Mililitros, microlitros
NTPs	Nucleótidos trifosfatos
PM	Peso molecular
pmol	Picomoles
<i>p</i> NPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenilo
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
rpm	Revoluciones por minuto
V_{max}	Velocidad máxima
μg, mg	microgramos, miligramos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del fosfato para la vida

1.1.1. Importancia del fosfato para la vida en la tierra

El fosfato, $[\text{PO}_4]^{-3}$ (Pi), es una sal con una identidad aniónica que posee un arreglo espacial tetraédrico, donde un átomo central de fósforo está rodeado por cuatro átomos de oxígeno. Pi es la forma más estable del fósforo y la más común en la biósfera. Diversas biomoléculas que contienen grupos fosfato en su estructura son esenciales para vida, por ejemplo, los fosfolípidos, los ácidos nucleicos (ADN y ARN), y las proteínas [1].

Hace millones de años, en la tierra primitiva, el fósforo se encontraba de manera insoluble, exclusivo de minerales formadores de rocas. Con el paso del tiempo, fuertes colisiones con el agua de los océanos produjeron la liberación de fosfatos al medio acuoso, lo cual permitió la formación de las primeras moléculas orgánicas fosfatadas. Uno de los eventos clave para el surgimiento de las primeras formas de vida fue la formación de fosfolípidos, biomoléculas clave para la formación de bicapas lipídicas, dando lugar a formas primitivas parecidas a las membranas celulares [2].

1.1.2. Importancia del fosfato para la función celular

El fosfato reúne características importantes para preservar la vida. Los ésteres de fosfato son particularmente estables. Por ejemplo, en química sintética es difícil efectuar una fosforilación o desfosforilación en una molécula orgánica. Sin embargo, en seres vivos, la transferencia de fosfato representa una de las reacciones químicas más frecuentes e importantes para diferentes procesos biológicos, tales como señalización celular, generación y almacenamiento de energía, modificación postraduccional de proteínas, y biosíntesis de ácidos nucleicos [1].

Debido a su estabilidad química, los grupos fosfato garantizan la integridad de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, su presencia es fundamental para el almacenamiento y expresión de la información genética. Además, son responsables de otorgar el carácter iónico a los ácidos nucleicos, propiedad que aporta protección contra la hidrólisis [2].

En la mayoría de las células, la principal forma de obtención de energía es la hidrólisis de ATP, y de otros nucleótidos trifosfato (en menor medida, como GTP). Esta hidrólisis libera una gran cantidad de energía que es utilizada para favorecer diferentes reacciones metabólicas. Asimismo, la fosforilación de proteínas, siendo ATP el principal donador del fosfato, tiene un papel importante en procesos de señalización celular [2].

A nivel estructural, el grupo fosfato tiene una contribución clave: su presencia en los fosfolípidos otorga una propiedad anfipática a la molécula, la cual es esencial para la conformación de membranas celulares [2].

1.1.3. Fosfatasas: función y clasificación

Equivalente a la fosforilación (adición de fosfato), la defosforilación (remoción de fosfato) es una modificación bioquímica importante dentro de las células, ya que muchos procesos dependen de la defosforilación de ciertas biomoléculas para cumplir su función biológica. De manera significativa, tales reacciones suceden de manera lenta en ausencia de catalizadores (enzimas) [3].

Las fosfatasas catalizan la defosforilación de diversos sustratos de importancia biológica [3]. La clasificación típica de estas enzimas se basa en el pH óptimo de actividad catalítica, agrupándolas en ácidas o alcalinas. Otra clasificación, que emplea como criterio la preferencia por sustratos específicos las subdivide en cuatro grupos: (i) fosfatasas de serina o treonina (Ser/Thr-fosfatasas), (ii) fosfatasas de tirosina (Tyr-fosfatasas), (iii) nucleasas (fosfodiesterasas), o (iv) pirofosfatasas [4].

Las Ser/Thr-fosfatasas tienen como principales sustratos a proteínas con fosfoserinas o fosfotreoninas en su estructura. Este grupo incluye cuatro tipos principales: PP1, PP2a, PP2b, y PP2c; de los cuales, PP2b también recibe el nombre de calcineurina (activada por Ca^{+2} -calmodulina). De manera general, su mecanismo de acción consiste en

el ataque nucleofílico (asistido por un metal) de una molécula de agua al residuo fosforilado. A diferencia de otras, las Ser/Thr-fosfatasa no forman un intermediario fosforilado [5].

Las Tyr-fosfatasa son particularmente esenciales en diferentes procesos celulares. En conjunto con las cinasa de tirosina (Tyr-cinasa) regulan la activación-desactivación de proteínas señalizadoras. Este grupo de enzimas se subdivide en dos tipos: (i) Tyr-fosfatasa específica, que hidrolizan únicamente a fosfotirosinas del sustrato, o (ii) Tyr-fosfatasa de especificidad dual, que aparte de hidrolizar fosfotirosinas, también hidrolizan fosfoserinas o fosfotreonina de proteínas y, además, pueden defosforilar sustratos lipídicos [6].

Las nucleasa (fosfodiesteras) hidrolizan los enlaces fosfodiéster de ácidos nucleicos y se clasifican en dos grupos: (i) endonucleasa, que reconocen una secuencia de nucleótidos específica e hidrolizan enlaces fosfodiéster en el interior de una cadena polinucleotídica, o (ii) exonucleasa, hidrolizan enlaces fosfodiéster localizados en el extremo (ya sea 5' o 3') de la cadena polinucleotídica [7].

Las pirofosfatasa catalizan la hidrólisis del enlace de alta energía en moléculas de pirofosfato, produciendo dos moléculas de fosfato inorgánico (Pi). Son importantes para mantener las concentraciones de fosfato intracelular requeridas para el buen funcionamiento de la célula [8].

1.1.4. Papel de las fosfatasa en la célula

En organismos eucarióticos, las fosfatasa ocupan un alto porcentaje del valor total de proteínas celulares (0.5-3%). En coordinación con las cinasa, regulan diversas rutas de señalización mediante diferentes mecanismos de fosforilación-defosforilación de proteínas. Inclusive, se ha calculado que la función de un número cercano al 30% de las proteínas celulares se regula por un mecanismo fosforilación-defosforilación [4].

Durante la división celular mitótica, de principio a fin, concurren cerca de 32,000 eventos de defosforilación-fosforilación, los cuales regulan la reorganización celular, ruptura de la envoltura nuclear, condensación de la cromatina, y formación del huso mitótico [9]. De manera particular, las fosfatasa son factores importantes para el

mecanismo de apoptosis celular: defosforilan a proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas; por lo tanto, ejercen un efecto regulador de tal proceso celular [10].

Por otra parte, proteínas (o complejos proteicos) con actividad ATPasa acoplan la hidrólisis de ATP a procesos celulares importantes, tales como fosforilación oxidativa, fotofosforilación, acción muscular, y mantenimiento de gradientes iónicos [11].

1.2. Pirofosfato y pirofosfatasas

1.2.1. Importancia del pirofosfato

El pirofosfato (PPi), producto resultante de diferentes reacciones biosintéticas importantes para la célula, consiste en dos grupos ortofosfato unidos por un enlace fosfoanhídrido [12]. De manera general, la hidrólisis de PPi es una reacción indispensable para el metabolismo celular [13].

Algunas reacciones biosintéticas esenciales generan a PPi como subproducto a partir de la utilización de nucleótidos trifosfatados (NTPs) como sustratos [14]. Por ejemplo, la biosíntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) [13]. El PPi también es liberado durante la síntesis de diversos metabolitos, tales como nucleótidos, coenzimas, esteroides, terpenos, e isoprenoides. Incluso, algunas de estas reacciones bioquímicas (de naturaleza reversible) requieren acoplar la hidrólisis de PPi para favorecer el equilibrio hacia la formación del producto [14].

En diversos microorganismos, la ruta de glucólisis incluye reacciones dependientes de PPi. Por ejemplo, en algunas bacterias, la vía glucolítica principal requiere enzimas, como la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK) y la piruvato-fosfato dicinasa (PPDK), que acoplan la reacción de hidrólisis de PPi para favorecer las reacciones que catalizan. Aparentemente, la glucólisis dependiente de PPi es una ruta alternativa en bacterias fermentadoras ante situaciones donde los niveles de ATP son bajos [13].

El pirofosfato tiene particular relevancia metabólica en bacterias, protistas, y plantas. En estos organismos, diversas rutas metabólicas utilizan a PPi como fuente de energía (en lugar de ATP). Por otro lado, en mamíferos, el PPi tiene implicación en otros

procesos. Por ejemplo, en osteoblastos (células formadoras de hueso), una pirofosfatasa de superficie, llamada ecto-NTP, hidroliza a ATP y libera como productos AMP y PPi, donde PPi es el producto principal, ya que regula la formación de tejido óseo mineralizado [14].

1.2.2. Regulación de la concentración de pirofosfato

Durante el proceso de división celular, la producción de PPi aumenta, su acumulación en la célula impide el transcurso de las reacciones de síntesis requeridas para la proliferación celular, por lo tanto, es esencial que los niveles de PPi se mantengan constantes [13]. En este sentido, las pirofosfatasas participan manteniendo un equilibrio de las concentraciones Pi/PPi en el citoplasma celular (comúnmente llamado homeostasis de fosfato). Más aún, de manera experimental, se demostró que las pirofosfatasas son esenciales para el crecimiento celular en bacterias [15]. En organismos superiores, la energía liberada a partir de la hidrólisis de PPi no es utilizada; por el contrario, se disipa en forma de calor. Sin embargo, los organismos unicelulares que contienen pirofosfatasas transmembranales utilizan la energía liberada para translocar protones, estableciendo una fuerza motriz impulsada por PPi [13].

La hidrólisis de pirofosfato mediada por pirofosfatasas requiere como cofactor 3 o 4 iones metálicos. La naturaleza del metal depende del tipo de enzima (ver más adelante). En general, el mecanismo catalítico se basa en la generación de un nucleófilo y, a diferencia de otro tipo de fosfatasas, la reacción procede sin la formación de un intermediario enzima-fosfato. En su lugar, la catálisis ocurre dentro de una “caja” metal-fosfato, donde las cadenas laterales de la proteína y los cationes asociados activan una molécula de agua, formándose un grupo hidroxilo (OH^-), que se encuentra en el centro del sitio activo; posteriormente, el OH^- realiza un ataque nucleofílico a la molécula de pirofosfato [8].

1.2.3. Clasificación de pirofosfatasas

Las pirofosfatasas se clasifican en dos tipos: transmembranales o solubles. A la vez, este último se agrupa en tres familias (I, II, y III) [8].

1.2.3.1. Pirofosfatasas transmembranales

Estas poseen un dominio transmembranal de 15-17 α -hélices que atraviesan la membrana y contienen largas regiones hidrofílicas en el lado citoplásmico [8]. De manera común, se localización en la membrana citoplasmática y en membranas de organelos especializados, por ejemplo, vacuolas en plantas y acidocalcisomas en protozoarios y bacterias. Derivado de su ausencia en organismos multicelulares, son consideradas blancos farmacológicos viables para el control terapéutico de enfermedades causadas por bacterias o protozoarios. Además, se encuentran acopladas al bombeo de iones (bien sea H^+ o Na^+ , o ambos). Durante la catálisis, la enzima se une al sustrato, bombea los iones al interior de la célula en contra de un gradiente electroquímico y, posteriormente, hidroliza la molécula de pirofosfato. Este mecanismo proporciona a la célula una reserva de energía esencial durante situaciones de estrés [16].

1.2.3.2. Pirofosfatasas solubles de la familia I

Esta familia contiene el mayor número de integrantes y se considera el grupo de pirofosfatasas solubles más ancestral. Estudios filogenéticos revelaron dos linajes divergentes: uno procariótico y otro eucariótico. La pirofosfatasa de *E. coli* y de *S. cerevisiae* son los representantes más estudiados en ambos linajes [17].

1.2.3.3. Pirofosfatasas solubles de la familia II

Esta familia de enzimas, a diferencia de aquellas de la familia I, solo se encuentran en procariotas y arqueas, en particular, *Bacilli* y *Clostridia*. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de fosfoesterasas DHH, cuyo nombre se debe al motivo conservado Asp-His-His. Además, se caracterizan por contener dos dominios: DHH y DHHA2 [18].

1.2.3.4. Las pirofosfatasas solubles de la familia III

Fueron descubiertas recientemente en *Thermococcus onnurineus*. Muestran dependencia a metales divalentes, como Mg^{+2} , Ni^{+2} , o Co^{+2} , y pertenecen a la superfamilia de deshalogenasas haloácidas [19]. Además, son menos activas que las enzimas de las familias I y II [18].

1.2.3.5. Actividad catalítica

Las principales diferencias entre las pirofosfatasas se revelan en la capacidad catalítica, la sensibilidad a inhibidores: fluoruro y AMDP (aminometilendifosfonato), y en el efecto activador de Mn^{+2} [19]. En términos de catálisis, las membranales muestran el menor número de recambio ($K_{cat} = 3 s^{-1}$); mientras que la familia II de las solubles exhibe el valor más alto ($K_{cat} = 2000 s^{-1}$), seguida por la familia I ($K_{cat} = 200 s^{-1}$). Todas las pirofosfatasas requieren de Mg^{+2} como cofactor, pero sólo la familia II de las solubles es activada por Mn^{+2} . Por otro lado, las membranales presentan mayor sensibilidad a AMDP ($K_i = 1.2 - 1.8 \mu M$), mientras que las solubles son inhibidas de manera significativa por fluoruro ($K_i = 6 - 90 \mu M$) [8].

1.2.4. Importancia de las pirofosfatasas

Las pirofosfatasas son enzimas que cumplen un papel esencial en el metabolismo: contribuyen a reestablecer las concentraciones intracelulares de fosfato y pirofosfato. Además, el fosfato liberado es utilizado para los eventos de fosforilación. Inclusive, diversas enfermedades han sido asociadas a alteraciones en el metabolismo del pirofosfato [20].

El pirofosfato es considerado predecesor del ATP en las primeras etapas de la escala evolutiva y, además, es una alternativa de energía para algunas células [12]. Algunos protozoarios, y otros organismos que carecen de mitocondrias, contienen enzimas de la vía glucolítica que dependen de pirofosfato para llevar a cabo su actividad [20].

1.3. La proteína amibiana *EhHAPp49*

1.3.1. *EhHAPp49*: una proteína con similitud HAP/fitasas

La proteína *EhHAPp49* (UniProtKB Acc. C4M8S6) está codificada por el gen EHI_146950 del protozoario *Entamoeba histolytica*. Mediante un análisis proteómico, se detectó como parte del conjunto de hidrolasas presentes en el fagosoma amibiano. A la

fecha, no existe reporte de sus características bioquímicas y funcionales. Sin embargo, los análisis bioinformáticos mostraron similitud de secuencia con fosfatasa ácida de la subfamilia HAP/fitasa [21].

EhHAPp49 (Figura 1) es un polipéptido conformado por 418 residuos de aminoácidos (49.3 kDa), donde los primeros 18 corresponden a un péptido señal (N-terminal) y el resto al dominio fosfatasa. De manera particular, el arreglo estructural His_Phos_2 (residuos 34-337) ubica a esta fosfatasa amibiana en la rama 2 de la superfamilia HP (fosfatasa de histidina).

El sitio catalítico de todas las enzimas HP contiene: (i) un residuo de histidina que se fosforila durante el curso de la reacción hidrolítica y forma un intermediario de fosfohistidina, (ii) un par de residuos de arginina y otro de histidina que contribuyen a la estabilización del sustrato mediante la formación de puentes de hidrogeno, y (iii) un residuo de aspartato que actúa como donador de protones (Figura 2) [22]. En concordancia, *EhHAPp49* posee un sitio activo que incluye tales residuos: R41, H42, R45, R152, H334, y D335; donde, H42 es el residuo que se fosforila durante la reacción catalítica (Figura 1).

La superfamilia HP es un grupo bastante amplio de fosfatasa. El primer miembro descubierto fue la proteína fosfoglicerato mutasa dependiente de cofactor [22]. En 1987, se publicó el análisis del sitio activo de la enzima fructosa-2,6-bisfosfatasa hepática, hecho que ayudó a identificar un alto número de proteínas con alta similitud de secuencia, a nivel del sitio activo, y permitió la integración de tales proteínas en una superfamilia [23]. Esta superfamilia se divide en dos grandes grupos.

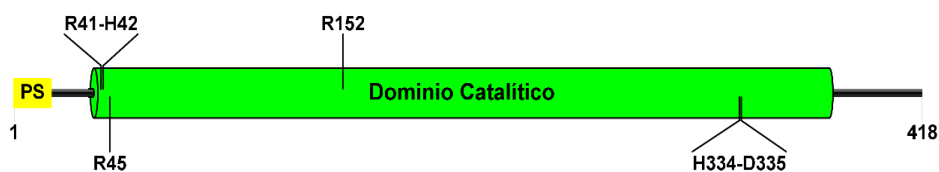


Figura 1. Representación de la secuencia polipeptídica de *EhHAPp49*.

El péptido señal (PS) se muestra en amarillo, mientras que el dominio catalítico en verde. Además, se indica la posición relativa de los residuos que conforman el núcleo catalítico.

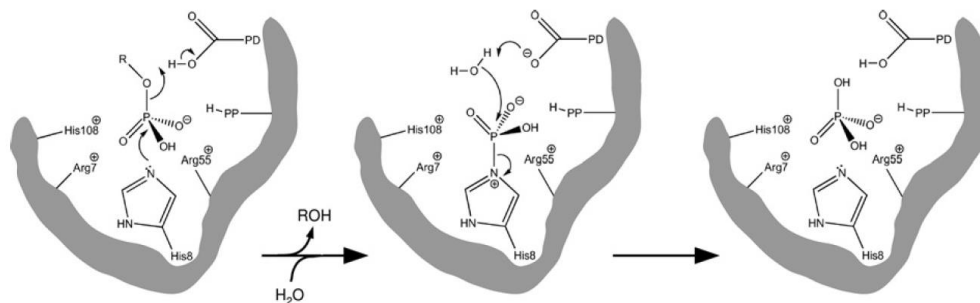


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo catalítico de enzimas HP.

(i) un residuo de His es fosforilado durante la reacción, (ii) dos residuos de Arg y uno de His estabilizan el sustrato, (iii) un residuo de Asp dona un protón al producto defosforilado, y (iv) finalmente, el residuo de His libera el grupo fosfato del sitio catalítico. Imagen tomada de Rigden, 2008 [22].

El grupo 1 incluye a las fosfoglicerato mutasas y fructosa-2,6-bisfosfatasa, entre otras. Los integrantes de este grupo se localizan principalmente en el citosol. Por otro lado, el grupo 2 comprende a las fosfatasa ácidas y fitasas. Aparentemente, todos sus miembros de este grupo entran en la vía secretora, localizándose tanto en los lisosomas (eucarióticos) como en el periplasma bacteriano, así como también en la membrana citoplásmica y el espacio extracelular.

El grupo 2, al cual se supone pertenece *EhHAPp49*, se caracteriza por la presencia del motivo RHG, donde el residuo His forma el intermediario fosforilado [22].

1.3.2. Amibiasis y *Entamoeba histolytica*

1.3.2.1. Amibiasis como problema de salud pública

La amibiasis, infección parasitaria causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*, es la segunda causa de muerte ocasionada por un protozoario en todo el mundo [24,25]. Se estima que alrededor de 500 millones de personas están infectadas por el parásito y el 10% de estas personas tienen amibiasis activa. Recientemente, se reportó una elevación de riesgo de infección en países del este de Asia y en Australia. Por esto, la amibiasis es reconocida en tales países como una enfermedad infecciosa en aumento [26].

Durante su ciclo de vida, *E. histolytica* puede encontrarse en dos estadios estables: quiste (forma infectiva) o trofozoíto (forma invasiva) [24]. La infección inicia mediante ingestión de alimentos o bebidas contaminados con quistes. Durante su tránsito por el tracto gastrointestinal, los quistes sufren el proceso llamado «desenquistamiento», liberándose cuatro trofozoítos por quiste en la región ileocecal. En este punto, los trofozoítos se dividen activamente y colonizan el intestino, adhiriéndose a la pared. Ocasionalmente, se despegan y continúan hacia el exterior. Durante ese trayecto, los trofozoítos sufren el proceso llamado «enquistamiento», y los quistes producidos son excretados en las heces. Por otro lado, en algunos casos, la infección inicial puede extenderse hacia otros órganos (extraintestinal), especialmente al hígado, causando abscesos que pueden ser fatales si la infección no se trata a tiempo [26].

1.3.2.2. *E. histolytica* como modelo de estudio atípico

La examinación microscópica de *E. histolytica* muestra un citoplasma simple, carente de mitocondrias y de un sistema endomembranoso típico (aparato de Golgi y retículo endoplásmico). Sin embargo, presenta un gran número de vacuolas no diferenciadas.

A pesar de la aparente ausencia de estructuras endomembranasas, estudios de identificación microscópica usando enzimas (glucosa 6-fosfato y tiaminopirofosfatasa) o colorantes fluorescentes (DiOC6 y el C6-NBD) como biomarcadores permitieron comprobar que algunas vacuolas contienen componentes de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, sugiriendo la existencia de un posible estado de inmadurez o subdesarrollo subcelular [27]. Por otro lado, ante la ausencia de mitocondrias, exhibe adaptaciones metabólicas como alternativas para producir energía. Además, al igual que otros protistas carentes de mitocondrias, como *Giardia lamblia*, alberga mitosomas, los cuales cumplen con diversas funciones importantes para la vida del parásito asociadas a mitocondrias típicas [28].

El tráfico vesicular tiene un papel importante en la patogénesis de *E. histolytica*, ya que permite liberación de enzimas hidrolíticas y amibaporos hacia el ambiente extracelular, y además participa en procesos asociados a la fagocitosis. Los análisis genómicos

permitieron identificar factores esenciales para tales procesos: COP I, COP II, y clatrina, entre otros [29].

1.3.3. *EhHAPp49* en la fisiología y virulencia de *E. histolytica*

La virulencia de *E. histolytica* se asocia a la habilidad de ingerir células del hospedero. Inclusive, la eritrofagocitosis se considera un indicador diagnóstico de amibiasis invasiva, ya que indica destrucción del tejido intestinal [21]. En resumen, la fagocitosis está directamente relacionada con los mecanismos virulentos del parásito, incluyendo el desarrollo de absceso hepático [30].

El proteoma de *E. histolytica* destaca por contener un alto porcentaje de fosfatasas, comparado con otros organismos eucarióticos [4]. De manera particular, *EhHAPp49* se identificó como componente molecular del fagosoma amibiano (en diferentes etapas del proceso de fagocitosis), lo que sugiere una contribución en la virulencia del parásito [21]. Aunque se desconoce su participación en el metabolismo celular, estudiar sus propiedades bioquímicas aportará conocimiento valioso sobre su función proteica.

1.4. Aplicaciones de las fosfatasas

1.4.1. Importancia del estudio de las fosfatasas

Las fosfatasas son objetos de estudio de relevancia bioquímica, ya que representan biomoléculas con potencial aplicación en diferentes sectores industriales, desde dianas terapéuticas o marcadores clínicos de interés biomédico hasta biocatalizadores de interés biotecnológico. Las fosfatasas involucradas en los procesos bacterianos asociados a la infección y colonización dentro del hospedero [3,31] y las fosfatasas (en particular las Tyr-fosfatasas) que participan de manera significativa en la formación y persistencia de tumores en humanos [10] representan dianas terapéuticas viables. Además, derivado de su importancia para la fisiología celular, algunas fosfatasas son usadas como biomarcadores determinantes del estado de salud en humanos, lo cual a su vez permite identificar y

distinguir enfermedades [32]. Por otro lado, las fosfatasa (en particular las fitasas) son empleadas como suplementos en alimentos para animales de granja [33].

Por otro lado, su diversidad bioquímica y genética tiene utilidad como criterio para la clasificación taxonómica en situaciones particulares. Por ejemplo, la actividad fosfatasa se utiliza para diferenciar especies de *Mycoplasma* [34]. Asimismo, los genes codificantes para fosfatasa en *Providencia stuartii* permiten distinguirla del resto de las especies del mismo género [35].

1.4.2. Aplicaciones en el sector biomédico

La fosfatasa alcalina es una enzima empleada como reportera acoplada a anticuerpos para detectar antígenos en diversos estuches diagnósticos [36] y es utilizada como proteína de fusión para monitorear el transporte intra- o extracelular de proteínas [37]. Además, es un biomarcador de daño hepático, fallo cardíaco, leucemia, y cáncer de mama, entre otras [38,39]. Por otro lado, las fosfatasa ácidas son biomarcadores de enfermedades renales, vasculares, óseas, y de manera particular, cáncer de próstata [40].

1.4.3. Aplicaciones en el sector industrial y agropecuario

Las fitasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de ácido fítico (liberando mio-inositol y fosfato inorgánico), tienen relevancia industrial como catalizadores biológicos de aplicación en el sector alimenticio. De manera habitual, estas enzimas se encuentran en plantas y microorganismos (bacterias, hongos, y levaduras).

El ácido fítico, principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de plantas, no es digerible por animales monogástricos como cerdos y aves, ya que su tracto digestivo carece de fitasas producidas por su microbiota. Además, impide la absorción de minerales en el tracto digestivo de dichos animales, ya que forma complejos denominados «fitatos»; por tal motivo, se considera una molécula con propiedades anti-nutricionales [33]. De manera adicional, representa una fuente de contaminación de suelos. Los animales que consumen alimentos ricos en ácido fítico excretan los fitatos (mezclas de sales resultantes

de la unión del ácido fítico con metales divalentes, como calcio, cobre, magnesio, manganeso, y zinc), lo que su vez causa problemas ecológicos, como la eutrofización (proliferación anormal de algas en lagos, mares, y ríos) [41]. Por lo anterior, la degradación enzimática de ácido fítico en alimentos para animales monogástricos conlleva múltiples beneficios [33].

1.4.4. *EhHAPp49* como objeto de estudio

El estudio de la relación estructura-función de *EhHAPp49*, incluyendo especificidad y propiedades bioquímicas, será determinante para valorar sus particularidades enzimáticas y, además, permitirá establecer su potencial como diana terapéutica en la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento contra la amibiasis. Por otro lado, la preferencia por diferentes sustratos puede ampliar el panorama de aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, la actividad fitasa tiene aplicación como aditivo en alimento para animales de granja, y la actividad polifosfatasa tiene utilidad en procesos de descontaminación de suelos y lagos. De igual manera, las aplicaciones pueden bifurcarse y potenciarse mediante estrategias de ingeniería de proteínas. En específico, aumentar: (i) la estabilidad a pH bajo [42], (ii) la termoestabilidad [43], y (iii) la resistencia a proteasas [44].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

EhHAPp49 exhibe actividad enzimática y muestra estabilidad proteica en un amplio rango de pH y temperatura.

2.2. Objetivo general

Determinar parámetros bioquímicos de la actividad pirofosfatasa de la proteína amibiana *EhHAPp49* empleando ensayos de actividad y determinación colorimétrica de fosfato libre para establecer las condiciones óptimas de funcionamiento de la proteína.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener la proteína *rEhHAPp49* purificada mediante procedimiento estándar de producción recombinante en *E. coli* transformada con pQEhHAP-Myc22.
2. Evaluar la actividad enzimática de *rEhHAPp49* mediante ensayos bioquímicos típicos usando tres sustratos: fosfato de *p*-nitrofenilo, ácido fítico, y pirofosfato de sodio.
3. Determinar los parámetros de cinética enzimática de *rEhHAPp49* mediante evaluación de la actividad en función de la concentración de sustrato.
4. Analizar el efecto del pH sobre la actividad enzimática de *rEhHAPp49* mediante ensayos estándar realizados en diferentes condiciones de pH.
5. Analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de *rEhHAPp49* mediante ensayos estándar realizados en diferentes condiciones térmicas.
6. Estudiar el efecto cofactor de iones magnesio (Mg^{+2}) e inhibidor de iones fluoruro (F^-) sobre la actividad enzimática de *rEhHAPp49* mediante ensayos estándar realizados en presencia de diferentes concentraciones de cada ion.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Becton Dickinson: agar bacteriológico; extracto de levadura; triptona. *Biorad*: azul brillante de *Coomassie*; solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30%. *EM Science*: 2-mercaptoetanol. *Fermont*: Persulfato de amonio. *IBI Scientific*: dodecil sulfato de sodio (SDS); Tris (tris-[hidroximetil]-aminometano). *JT Baker*: ácido acético; cloruro de sodio (NaCl). *Merck*: fluoruro de sodio (NaF). *MP Biomedicals*: glicina. *New England Biolabs*: estándar para electroforesis de proteínas (*Blue Protein Standard - Broad Range, 11-190 kDa*). *Productos Químicos Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂). *Qiagen*: resina de agarosa-NTA-níquel. *Research Organics*: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES). *Sigma*: ácido fítico; ampicilina; cóctel de inhibidores de proteasas; imidazol; isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); lisozima de clara de huevo; molibdato de amonio tetrahidratado ([NH₄]₆Mo₇O₂₄·4H₂O); fosfato de *p*-nitrofenilo; pirofosfato de sodio; reactivo de *Bradford*; reactivo *CellLytic B*; sulfato de magnesio (MgSO₄); N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED); Tween-20; verde de malaquita.

3.1.2. Células bacterianas y medios de cultivo

La producción de la proteína rEhHAPp49 se realizó empleando la bacteria *E. coli* SHuffle[®] Express [*fhuA2 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacI^q) AtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10]* transformada con el plásmido pQEhHAP-Myc22 como fábrica microbiana. Tal cepa es deficiente de tiorredoxina reductasa (*AtrxB*) y glutatión reductasa (*Δgor*), y expresa de manera constitutiva y citosólica a la disulfuro-isomerasa DsbC. Este fenotipo favorece el correcto plegamiento de proteínas que contienen enlaces disulfuro

cuando se expresan en el citosol bacteriano. Las células bacterianas se cultivaron en medio *Luria Bertani* (LB) líquido (1% Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 1% NaCl).

3.1.3. Plásmido de expresión bacteriana: pQEhHAP-Myc22

El plásmido recombinante pQEhHAP-Myc22 (Figura 3) se obtuvo de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología y Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC). Es un vector bacteriano derivado de pQE30 (Qiagen) que promueve la sobreexpresión citosólica de rEhHAPp49 cuando se induce la transcripción génica con IPTG (esto es, la secuencia codificante se encuentra bajo el control del promotor T5/lacO). La proteína rEhHAPp49 contiene la etiqueta molecular 6xHis en el extremo N-terminal, que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC), y el epítipo Myc en el extremo C-terminal, el cual permite su detección mediante inmuno-reconocimiento.

3.2. Equipos y programas computacionales

Los cultivos bacterianos se propagaron en incubadoras con ambiente controlado: *Incubator Shaker Series 25* (New Brunswick Scientific Co.) y *MaxQ 4450* (Thermo Scientific). La incubación en microtubos a 37°C se realizó en la incubadora *Boekel Mini Incubator* (Boekel Industries Inc.). Las separaciones en bajo volumen (menor a 2 mL) se efectuaron en micro-centrifugas: *Biocentrifuge Fresco* (Heraeus), y *MiniSpin® Plus*

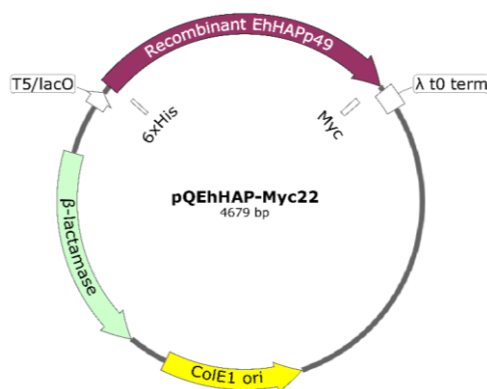


Figura 3. Representación esquemática del plásmido recombinante pQEhHAP-Myc22.

Plásmido bacteriano (4679 pb) que contiene el origen de replicación ColE1 y el gen codificante para la β -lactamasa (que confiere resistencia a ampicilina). La posición relativa de las secuencias regulatorias que controlan la expresión de rEhHAPp49 se indican en el exterior. De igual manera, la etiqueta molecular 6xHis (hexahistidinas) y el epítipo Myc se indican en el interior.

(Eppendorf). Las separaciones en alto volumen (mayores a 10 mL) se realizaron en una centrífuga *Allegra™ X-22R* (Beckman Coulter). La lisis celular se completó en un sonicador *Ultrasonic Liquid Processor XL-2000* (Misionix). La incubación de microtubos a diferentes temperaturas se llevó a cabo en el termociclador de gradiente *MultiGene™* (Labnet International). Las lecturas de absorbancia en microplacas se realizaron empleando un equipo *Microplate Reader 680* (Biorad). Todos los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete computacional para tratamiento estadístico de datos *Prism® v.4* para Windows (*GraphPad*).

3.3. Protocolos generales

3.3.1. Cultivos bacterianos

Todos los cultivos bacterianos se proliferaron en medio LB-Amp, suplementado con ampicilina (150 µg/mL), mediante incubación a 37 °C con agitación constante (300 rpm). Los cultivos bacterianos para producción recombinante se prepararon mediante subcultivos 1:50 de un cultivo joven (proliferado durante la noche).

3.3.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se prepararon mediante dilución 1:1 con solución 2X del amortiguador de carga para proteínas (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol). La desnaturalización térmica se promovió mediante incubación a 95-100 °C durante 10 min. El volumen analítico (10 µL) de cada muestra se cargó en un gel SDS-poliacrilamida al 13.5%. Las proteínas se separaron mediante electroforesis sumergida (en solución 1X del amortiguador TANK: 25 mM de Tris; 200 mM de glicina; 0.1% de SDS) durante 90-120 min a voltajes constantes: 80 V (concentración) y 120 V (separación). El patrón electroforético se analizó mediante tinción con azul brillante de *Coomassie* y se documentó mediante fotografía digital.

3.3.3. Cuantificación de proteínas (micro-Bradford)

Las soluciones de proteína recombinante se diluyeron a una concentración de 10-40 $\mu\text{g/mL}$, usando agua destilada como diluyente. A la par, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de BSA: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 $\mu\text{g/mL}$. En una microplaca, 50 μL de cada muestra se mezclaron con 100 μL del reactivo de *Bradford*. Después de 5 min de estabilización, las absorbancias a 450 y 595 nm (A_{450} , A_{595}) se determinaron usando un lector de microplacas. La concentración de proteína fue establecida interpolando la relación A_{450}/A_{595} de la muestra analítica sobre la curva estándar (A_{450}/A_{595} en función de $\mu\text{g/mL}$ de BSA) y multiplicando por el factor de dilución utilizado [45].

3.3.4. Determinación de fosfato en solución

La cantidad de fosfato inorgánico se determinó mediante un ensayo colorimétrico estándar, empleando a verde de malaquita [46], con ligeros ajustes. El reactivo de color se preparó minutos antes de cada determinación, mezclando tres diferentes soluciones en el siguiente orden: 5 volúmenes de molibdato de amonio al 7.8%, 20 volúmenes de verde de malaquita al 0.13% (en H_2SO_4 a 2.4 M), y 1 volumen de Tween-20 al 5.2%. La solución se reposó durante 30 min a temperatura ambiente y se clarificó mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 10 min. 25 μL del reactivo de color se mezclaron con 100 μL de solución problema. Después de 10 min (exactos) de estabilización, la absorbancia a 650 nm (A_{650}) se determinó usando un lector de microplacas.

3.4. Expresión y purificación de rEhHAP49

3.4.1. Inducción de la expresión a midi-escala

5 mL de medio LB-Amp se inocularon con 50 μL de una suspensión fresca de bacterias SHuffle[®] Express portadoras de pQEhHAP-Myc22. Este cultivo se proliferó durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, se prepararon dos subcultivos 1:50 en medio

LB-Amp fresco (100 mL) y se proliferaron durante 2 h en condiciones típicas. Enseguida, se suplementaron con el inductor, IPTG a una concentración final de 0.5 mM, y se continuó la proliferación durante 16 h a 30 °C. Los paquetes celulares se colectaron mediante centrifugación (9,000 rpm; 15 min; 10 °C) y se almacenaron en congelación (-14 °C).

3.4.2. Extracción de proteínas en condiciones nativas

Después de la fase de descongelación, cada paquete celular (100 mL de cultivo) se resuspendió en 5 mL de solución de lisis *CellLytic B* y se suplementó con 100 µL de lisozima a 10 mg/mL, 50 µL de mezcla 100X de inhibidores de proteasas, y 2 µL de benzonasa a 250 U/µL. Después de 10 min de agitación por balanceo, la suspensión se sonicó usando un protocolo típico (10 ciclos: 30 s *ON* + 30 s *OFF*; en hielo). Los restos celulares se separaron mediante centrifugación 9,500 rpm (15 min, 10 °C) y la fracción soluble (FS) se clarificó mediante centrifugación a 13,000 rpm (15 min; 10 °C).

3.4.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel

Previo a la fase de purificación, cada FS clarificada se diluyó con un volumen de solución NPD (600 mM NaCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8.0; 40 mM imidazol, pH 8.0). Una columna con 0.5 mL (un volumen) de colchón de resina agarosa-NTA-níquel se utilizó como fase estacionaria para la cromatografía de afinidad a metales. Después de eluir el preservador (30% etanol) y ambientar la columna con 5 volúmenes de solución NPD, la FS clarificada y diluida (fase móvil) se pasó por la columna en 3 ocasiones consecutivas (para favorecer el reconocimiento). Después, la columna se lavó con 15 volúmenes de solución NP20 (300 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM imidazol, pH 8.0). La proteína *rEhHAPp49* se recuperó en fracciones de 1 volumen mediante elución con solución NP250 (300 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM imidazol, pH 8.0).

La eficiencia de la fase de purificación por afinidad a níquel se comprobó mediante SDS-PAGE de muestras analíticas obtenidas durante todo el proceso cromatográfico. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron las fracciones de elución con mayor

cantidad de proteína pura, se mezclaron en un tubo cónico de 15 mL, y se cuantificó la concentración de proteína total de la solución resultante.

3.4.4. Purificación mediante cromatografía de permeación en gel

La solución de proteína pura se sometió a una fase de cromatografía de permeación en gel (GPC) empleando una columna PD-10 (*Sephadex*TM G-25; *GE Healthcare*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante: después de eluir el preservador y lavar la resina con 25 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), se cargaron 2.5 mL de la solución muestra (fase móvil). La proteína *rEhHAPp49* pura se recuperó mediante elución con 3.5 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). Este procedimiento se realizó un número de veces suficiente hasta completar cada lote de solución de proteína pura. Una vez mezcladas las eluciones en un tubo cónico de 15 mL, la concentración de *rEhHAPp49* se cuantificó mediante *micro-Bradford* y la mezcla se conservó en refrigeración (4 °C).

3.5. Actividad enzimática de *rEhHAPp49*

Tres actividades enzimáticas: fosfatasa, fitasa, y pirofosfatasa, se analizaron en tres condiciones de pH (solución amortiguadora): 5.0 (acetatos), 7.0 y 9.0 (Tris-HCl). Las reacciones enzimáticas se realizaron a 37 °C

3.5.1. Actividad fosfatasa

La actividad fosfatasa se evaluó usando a fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP) como sustrato cromogénico. Se prepararon mezclas de reacción (0.2 mL) conteniendo 5 mM MgSO₄, 1 μM *rEhHAPp49*, y 10 mM *p*NPP, en 100 mM de solución amortiguadora. Después de 1 hora de hidrólisis, la reacción se detuvo con NaOH (0.4 N, final) y la mezcla se centrifugó a 14,500 rpm durante 1 min. Una muestra del sobrenadante (0.2 mL) se trasladó a una microplaca y se determinó la absorbancia a 415 nm (A_{415}).

3.5.2. Actividad fitasa

La actividad fitasa se determinó cuantificando la cantidad de fosfato liberado después de una reacción enzimática de hidrólisis de ácido fítico. Se prepararon mezclas de reacción (0.1 mL) conteniendo 5 mM MgSO₄, 1 μM *rEhHAPp49*, y 1.5 mM ácido fítico, en 100 mM de solución amortiguadora. Después de 3 horas de hidrólisis, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (0.2%, final) y la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min (10 °C). Una muestra del sobrenadante (0.1 mL) se empleó para cuantificar el fosfato libre por el método colorimétrico de verde de malaquita.

3.5.3. Actividad pirofosfatasa

La actividad pirofosfatasa se evaluó cuantificando la cantidad de fosfato liberado después de una reacción enzimática de hidrólisis de pirofosfato. Se prepararon mezclas de reacción (0.1 mL) conteniendo 5 mM MgSO₄, 1 μM *rEhHAPp49*, y 0.5 mM pirofosfato de sodio, en 100 mM de solución amortiguadora. Después de 1 hora de hidrólisis, la reacción se detuvo y el fosfato libre se cuantificó como antes.

3.6. Caracterización de la actividad pirofosfatasa de *rEhHAPp49*

A menos que se especifique un ajuste, todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron bajo las siguientes condiciones estándar: 1 hora de reacción hidrolítica a 37 °C, en mezclas amortiguadas con 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) conteniendo 5 mM MgSO₄, 1 μM *rEhHAPp49*, y 0.5 mM pirofosfato de sodio.

3.6.1. Determinación de parámetros cinéticos

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática se evaluó añadiendo diferentes concentraciones de pirofosfato de sodio (0.02 - 1.5 mM) a las mezclas de reacción. Los parámetros enzimáticos se determinaron en tres condiciones de pH: 5.0,

7.0, y 9.0. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y se determinaron los valores de K_m , V_{max} , y K_{cat} .

3.6.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad

El pH óptimo de actividad enzimática se determinó usando distintas soluciones amortiguadoras para las mezclas de reacción: glicina-HCl (pH 2.0-3.5), acetatos (pH 4.0-5.0), MES-NaOH (pH 5.5-6.5), Tris-HCl (pH 7.0-9.0) y glicina-NaOH (pH 9.5-11.0). El impacto del pH sobre la estabilidad enzimática se determinó evaluando la actividad residual después de incubar la proteína durante 14-20 horas (4 °C) en las soluciones amortiguadoras antes descritas.

3.6.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad

La temperatura óptima de actividad enzimática se determinó realizando los ensayos en diferentes condiciones térmicas (30-75 °C). La termoestabilidad enzimática se determinó evaluando la actividad residual después de incubar la proteína durante 30 min a distintas temperaturas (30-75 °C).

3.6.4. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad

El efecto de los cationes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2} sobre la actividad enzimática se determinó realizando los ensayos en presencia de diferentes concentraciones (0-5 mM) de $MgSO_4$, $MnCl_2$, y $CaCl_2$.

3.6.5. Efecto de iones fluoruro sobre la actividad

El efecto del ion fluoruro sobre la actividad enzimática se determinó pre-incubando la enzima durante 30 min (37 °C) en presencia de concentraciones crecientes de fluoruro de sodio (0.001-0.25 mM) y valorando la actividad residual.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de rEhHAPp49 pura y activa

La proteína rEhHAPp49 se produjo en *E. coli* SHuffle® Express portadora de pQEhHAP-Myc22 siguiendo un protocolo estándar de expresión inducida por IPTG. En lotes de cultivo de 100 mL, la inducción transcripcional de rEhHAPp49 se realizó en la fase temprana del crecimiento exponencial mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Después de 16 horas de proliferación, para favorecer la sobre-expresión recombinante, las células bacterianas se colectaron por centrifugación.

La extracción de proteínas solubles totales se realizó en condiciones nativas empleando el reactivo comercial *CellLytic B* (Sigma). La proteína rEhHAPP49 se aisló mediante cromatografía de afinidad a metales usando una columna de agarosa-NTA-Ni (Qiagen) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (*The QIAexpressionist*). El análisis electroforético de muestras analíticas demostró que la proteína del tamaño esperado se obtiene en cantidades aceptables, mayores a 90% (Figura 4).



Figura 4. Purificación de rEhHAPp49 por cromatografía de afinidad a Ni.

SDS-PAGE al 13.5% teñido con azul brillante de *Coomassie*. Muestras analíticas de fracciones cromatográficas: LT, lisado bacteriano soluble total; NP, fracción no pegada; WS, lavado; E1-E3 eluciones (1-3). PM, marcador de proteínas (peso molecular en kDa).

Tabla 1. Producción de la proteína rEhHAPp49.

Fase de Purificación	Proteína total (mg) ^b	Actividad específica (UA ₆₅₀ h ⁻¹ mg ⁻¹) ^c	Actividad total ^c	Rendimiento de recuperación (%) ^d
Extracto crudo ^a	270.2	ND	ND	ND
Afinidad a Ni	5.8	21.0	121.8	100.0
Exclusión (GPC)	4.4	14.2	62.5	51.0

^a Obtenido de 10 pastillas celulares de 100 mL (total: 1 L de cultivo bacteriano). ^b Concentración de proteína obtenida mediante micro-Bradford. ^c Actividad enzimática determinada mediante ensayo colorimétrico. ^d Cantidad relativa de actividad total comparado con el primer paso. ND, no determinado.

De manera adicional, un procedimiento de purificación por cromatografía de permeación en gel (*Sephadex*TM G-25) permitió la separación de contaminantes proteicos de bajo peso molecular, remoción de sales, y el cambio de solución amortiguadora. La actividad pirofosfatasa de la proteína pura se determinó en muestras analíticas de los productos finales de cada fase de purificación.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos del proceso de producción de rEhHAPp49. Considerando el rendimiento de recuperación como parámetro de eficiencia, los resultados indican una pérdida significativa en la fase de purificación por GPC. Sin embargo, a favor de los objetivos de estudio, la proteína conservó su actividad.

4.2. rEhHAPp49 exhibe actividad pirofosfatasa

La actividad enzimática de EhHAPp49 se estableció con base en la capacidad de hidrolizar tres sustratos típicos: fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP), ácido fítico y pirofosfato de sodio (Na-PPi), bajo tres condiciones de pH distintas: ácidas (5.0), neutras (7.0), y alcalinas (9.0). La Tabla 2 muestra los resultados globales. Contrario a lo esperado, rEhHAPp49 mostró deficiente actividad fosfatasa/fitasa en condiciones ácidas (pH 5.0), en comparación con la actividad pirofosfatasa. Esto condujo a postular dos supuestos sobre la función de la proteína ambiana: (1) es una fosfatasa/fitasa ácida con actividad limitada, o (2) es una pirofosfatasa que muestra un parecido estructural a HAP/fitasas.

El análisis de resultados en condiciones neutras-alcalinas reforzó ambos supuestos. La actividad fosfatasa/fitasa disminuyó significativamente, siendo indetectable en

Tabla 2. Análisis de actividad enzimática de la proteína *rEhHAPp49*.

pH	Actividad Enzimática por Sustrato (μmol de Pi por μmol de enzima por hora)		
	pNPP	Ácido Fítico	Na·PPi
5.0	2.81	0.88	11.08
7.0	0.13	0.22	169.05
9.0	ND	0.03	555.42

ND, No determinado.

condiciones alcalinas (pH 9.0). Por el contrario, la actividad pirofosfatasa aumentó notoriamente, logrando máximos aparentes en las condiciones alcalinas.

Con base en lo anterior, es factible suponer que *EhHAPp49* es una enzima atípica, ya que despliega un dominio estructural parecido a HAP/fitasas, pero exhibe actividad pirofosfatasa. Tal inconsistencia puede ser explicada considerando un proceso evolutivo de selección dirigida hacia migración catalítica: HAP/fitasa \rightarrow pirofosfatasa, en respuesta a una necesidad fisiológica del parásito (p.ej., nutrición vía fagocitosis) y la disponibilidad del sustrato (pirofosfato). La hipótesis anterior se apoya en el siguiente hecho: *EhHAPp49* sigue la vía de secreción y se identificó en un compartimiento del sistema lisosoma-endosoma que habitualmente no contiene pirofosfatasas solubles.

El establecimiento de la actividad pirofosfatasa de *EhHAPp49* permite especular sobre posibles aplicaciones de la enzima amibiana. Por ejemplo, como biocatalizador en la degradación de trifosfatos-polifosfatos, proceso importante para la descontaminación ambiental [47]. Además, persiste la noción que apoya una actividad fosfatasa ácida eficiente sobre un sustrato fisiológico, esto considerando que sea secretada y actúe sobre sustratos fosforilados que serán endocitados [48].

4.3. *rEhHAPp49* es una pirofosfatasa alcalina

Los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , y K_{cat}) fueron calculados mediante ensayos de actividad empleando diferentes concentraciones de sustrato (pirofosfato de sodio), y bajo tres condiciones de pH: ácidas (5.0), neutras (7.0), y alcalinas (9.0). Los datos obtenidos se

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la actividad pirofosfatasa de *rEhHAPp49*.

pH	K_m (μM)	V_{max} (pmol min^{-1})	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
5.0	30	39.2	0.20	0.006
7.0	8.7	73.5	3.67	0.42
9.0	12	238.1	11.9	0.99

ajustaron al modelo enzimático de Michaelis-Menten. La Tabla 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Consistente con los resultados previos, *rEhHAPp49* exhibe valores de V_{max} y K_{cat} elevados en condiciones alcalinas (pH 9.0), comparados con los calculados para las otras. Aún más, la eficiencia catalítica es congruente con lo esperado. Considerando al número de recambio (K_{cat}) como valor de clasificación, la enzima amibiana exhibe parecido catalítico a pirofosfatasas membranales, mostrando un valor estimado 0.2 s^{-1} . Por otro lado, su especificidad (K_m : $12 \mu\text{M}$) es comparable con la reportada para otras pirofosfatasas, siendo menor con respecto a enzima de *E. coli* (K_m : $0.13 \mu\text{M}$) [49], pero mayor que las enzimas de *H. pilory* (K_m : $90 \mu\text{M}$) [50] y *Shewanella* sp. (K_m : 0.24 mM) [51].

4.4. *rEhHAPp49*: pH óptimo y estabilidad a pH

En tanto el pH óptimo se determinó ensayando las reacciones en diferentes condiciones de pH, la estabilidad se estableció evaluando la actividad residual después de incubar la enzima ($17 \pm 3 \text{ h}$; $4 \text{ }^\circ\text{C}$) en soluciones amortiguadoras a distinto pH. Los resultados mostraron que la enzima *rEhHAPp49* exhibe un pH óptimo de 9.0 y conserva más del 50% de su actividad en valores de pH superiores a 6.0 (Figura 5).

Como se vislumbraba, el pH óptimo es consistente con el observado en la mayoría de las pirofosfatasas, que oscila entre 7.0 y 9.0 [8,47]. Además, la enzima muestra un amplio rango de estabilidad a pH, reteniendo su actividad pirofosfatasa al máximo (>90%) en condiciones de pH 8.0-11.0. Estos datos sugieren que el mecanismo de actividad enzimática depende de residuos ionizados en el sitio activo (es decir, desprotonados), requeridos para la interacción con los cofactores (cationes) y el sustrato.

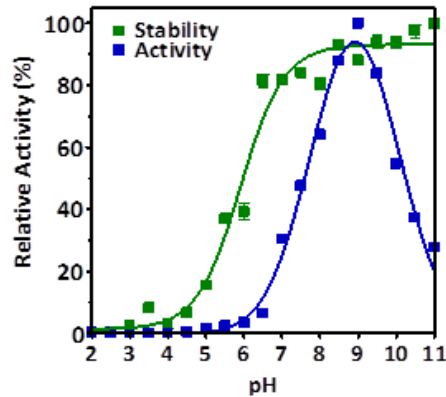


Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad enzimática de *rEhHAPp49*.

Gráfico Azul: dependencia de la actividad pirofosfatasa al valor del pH de reacción. Gráfico Verde: impacto del pH sobre la estabilidad enzimática. Los resultados se presentan como actividad relativa, donde los valores mínimo y máximo corresponden a los límites (0 a 100%).

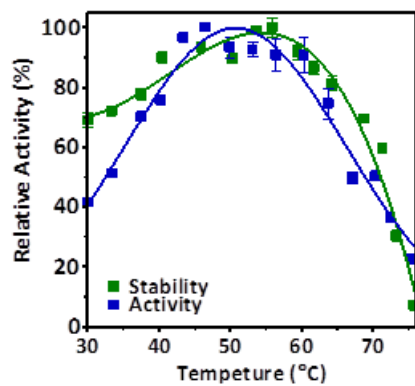


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática de *rEhHAPp49*.

Gráfico Azul: actividad pirofosfatasa en función de la temperatura de reacción. Gráfico Verde: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática. Los resultados se presentan como actividad relativa, donde los valores mínimo y máximo corresponden a los límites (0 a 100%).

4.5. *rEhHAPp49*: temperatura óptima y estabilidad térmica

Mientras que la temperatura óptima se estableció ensayando las reacciones en diferentes condiciones, la estabilidad se determinó evaluando la actividad residual después de incubar la enzima (30 min; pH 9.0) en distintas condiciones térmicas. Los resultados mostraron que la enzima *rEhHAPp49* exhibe una temperatura óptima de 50 °C y conserva más del 50% de su actividad bajo las condiciones térmicas de 35 y 65 °C (Figura 6).

Como se esperaba, tanto la temperatura óptima como la termoestabilidad enzimática coinciden con los valores observados en pirofosfatasas solubles [8,47]. Estos datos sugieren que la proteína posee una conformación estructural que permite la catálisis en un amplio rango de temperatura, manteniendo estable al sitio activo. Además, permiten especular que

EhHAPp49 tiene potencial como biocatalizador de aplicación en procesos industriales dirigidos a la degradación de sustratos naturales, como pirofosfatos o polifosfatos.

4.6. *rEhHAPp49* es dependiente de Mg^{+2}

Sabiendo que las pirofosfatasas dependen de Mg^{+2} , y en menor grado Mn^{+2} , para llevar a cabo su función hidrolítica [8], se evaluó el efecto de cationes divalentes sobre la actividad de *rEhHAPp49*.

La Figura 7 muestra el efecto de Mg^{+2} sobre la actividad. El resultado indica que la enzima depende de Mg^{+2} , ya que mostró nula actividad en su ausencia y alcanzó valores $>90\%$ en presencia de $MgSO_4$ a concentraciones >1 mM. Por otro lado, los cationes Mn^{+2} y Ca^{+2} (5 mM, final) no mostraron efecto (resultados no mostrados).

De manera común, se requieren de 2-4 cationes divalentes en el sitio activo de una pirofosfatasa. Estos se asocian a residuos con carga negativa y, junto con un residuo Asp, activan una molécula de agua, que actúa como nucleófilo durante la hidrólisis del sustrato [8].

4.7. *rEhHAPp49* es inhibida por iones fluoruro

El potencial de una proteína como diana terapéutica está determinado por varios factores, donde figura la sensibilidad a agentes que bloquean o inhiben su función. Las

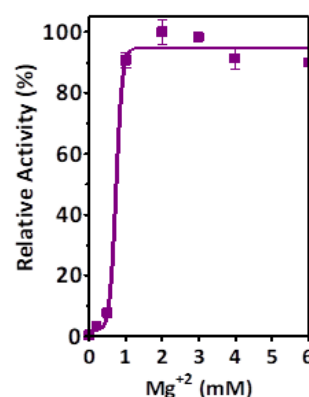


Figura 7. Efecto de la concentración de Mg^{+2} sobre la actividad de *rEhHAPp49*.

Gráfico: actividad pirofosfatasa en función de la concentración de $MgSO_4$ (Mg^{+2}). Los resultados se presentan como actividad relativa, donde los valores mínimo y máximo corresponden a los límites (0 a 100%).

pirofosfatasas solubles muestran sensibilidad a iones fluoruro, los cuales actúan como inhibidores, desplazando a la molécula de agua que participa en la catálisis.

El efecto de iones fluoruro (F^-) sobre la *rEhHAPp49* se determinó ensayando la actividad después de incubar la enzima (30 min; $37^\circ C$) en presencia de concentraciones crecientes de NaF. Los resultados indican que *EhHAPp49* es inhibida por F^- (IC_{50} de $57.9 \mu M$), con pérdidas de actividad $>95\%$ en presencia de concentraciones de NaF >1 mM (Figura 8). En este aspecto, la enzima amibiana mostró una IC_{50} parecido al calculado para las pirofosfatasas solubles de la familia I, $11-90 \mu M$ [8]. Con base a esto, es factible suponer que *EhHAPp49* lleva a cabo un proceso catalítico parecido al establecido en pirofosfatasas clásicas.

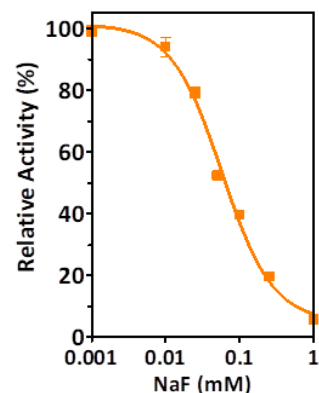


Figura 8. Efecto de iones fluoruro sobre la actividad de *rEhHAPp49*.

Gráfico: actividad pirofosfatasa en función de la concentración de NaF. Los resultados se presentan como actividad relativa, donde los valores mínimo y máximo corresponden a los límites (0 a 100%).

5. CONCLUSIONES

EhHAPp49, una proteína amibiana con parecido estructural a fosfatasas del tipo HAP/fitasa, se obtuvo de forma pura y activa mediante un proceso estándar de producción recombinante en *E. coli*. Contrario a lo esperado, posee actividad HAP/fitasa limitada. No obstante, exhibe actividad pirofosfatasa significativa en condiciones ácidas y una mejor eficiencia catalítica en condiciones alcalinas.

EhHAPp49 requiere condiciones alcalinas (pH 9.0) y una temperatura de reacción de 50 °C para actuar de manera óptima como pirofosfatasa. Además, muestra estabilidad enzimática en un amplio rango de pH y temperatura. Por otro lado, la actividad pirofosfatasa depende completamente de Mg^{+2} (como cofactor) y es sensible a inhibición por iones fluoruro. Estas características bioquímicas la exponen como enzima amibiana parecida a pirofosfatasas solubles de la familia I.

De manera global, las propiedades estructurales y funcionales reveladas en el presente estudio permiten vislumbrar dos aplicaciones del conocimiento generado: (1) la completa inhibición de la función enzimática permite proponer a *EhHAPp49* como diana terapéutica para la búsqueda de moléculas específicas orientadas al control de la amibiasis, y (2) la consistente actividad enzimática apoya el potencial biotecnológico de *EhHAPp49* como biocatalizador en procesos de descontaminación de ecosistemas ricos en pirofosfatos o polifosfatos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kamerlin SCL, Sharma PK, Prasad RB, Warshel A. 2013 Why nature really chose phosphate. *Q. Rev. Biophys.* **46**, 1–132. (doi:10.1017/S0033583512000157)
2. Adcock CT, Hausrath EM, Forster PM. 2013 Readily available phosphate from minerals in early aqueous environments on Mars. *Nat. Geosci.* **6**, 824–827. (doi:10.1038/ngeo1923)
3. Sajid A, Arora G, Singhal A, Kalia VC, Singh Y. 2015 Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 527–547. (doi:10.1146/annurev-micro-020415-111342)
4. Anwar T, Gourinath S. 2013 Analysis of the Protein phosphotome of *Entamoeba histolytica* reveals an intricate phosphorylation network. *PLoS One* **8**, e78714. (doi:10.1371/journal.pone.0078714)
5. Ernest Villafranca J, Kissinger CR, Parge HE. 1996 Protein serine/threonine phosphatases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 397–402. (doi:10.1016/S0958-1669(96)80114-5)
6. Tiganis T, Bennett AM. 2007 Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* **402**, 1–15. (doi:10.1042/BJ20061548)
7. Aggarwal AK. 1995 Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 11–19. (doi:10.1016/0959-440X(95)80004-K)
8. Kajander T, Kellosalo J, Goldman A. 2013 Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms. *FEBS Lett.* **587**, 1863–1869. (doi:10.1016/j.febslet.2013.05.003)
9. Moura M, Conde C. 2019 Phosphatases in Mitosis: Roles and Regulation. *Biomolecules* **9**, 55. (doi:10.3390/biom9020055)
10. Narla G, Sangodkar J, Ryder CB. 2018 The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2695–2718. (doi:10.1007/s00018-018-2826-8)
11. Knowles JR. 1980 Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 877–919. (doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.004305)
12. Daouda MP, Bouchra EK, Roman P-CJ, Aurelio SD, Abdelaziz S. 2017 Inorganic Pyrophosphatases: Study of Interest. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **08**, 388–397. (doi:10.4236/abb.2017.810028)
13. Bielen AAM, Willquist K, Engman J, Van Der Oost J, Van Niel EWJ, Kengen SWM. 2010 Pyrophosphate as a central energy carrier in the hydrogen-producing extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: P_{PPi} as an energy carrier in *C. saccharolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **307**, 48–54. (doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01957.x)
14. Heinonen JK. 2001 *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate*. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-1-4615-1433-6)

15. Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmitter JM, Blanquet S, Plateau P. 1990 Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 5686–5689. (doi:10.1128/JB.172.10.5686-5689.1990)
16. Harborne SPD, Strauss J, Turku A, Watson MA, Tuma R, Harris SA, Goldman A. 2018 Defining Dynamics of Membrane-Bound Pyrophosphatases by Experimental and Computational Single-Molecule FRET. In *Methods in Enzymology*, pp. 93–130. Elsevier. (doi:10.1016/bs.mie.2018.04.017)
17. Gómez-García MR, Losada M, Serrano A. 2007 Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria: Pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *FEBS J.* **274**, 3948–3959. (doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05927.x)
18. Baykov AA, Anashkin VA, Salminen A, Lahti R. 2017 Inorganic pyrophosphatases of Family II—two decades after their discovery. *FEBS Lett.* **591**, 3225–3234. (doi:10.1002/1873-3468.12877)
19. Lee HS, Cho Y, Kim Y-J, Lho T-O, Cha S-S, Lee J-H, Kang SG. 2009 A novel inorganic pyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 68–74. (doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01766.x)
20. Bruchhaus I, Jacobs T, Denart M, Tannich E. 1996 Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem. J.* **316**, 57–63. (doi:10.1042/bj3160057)
21. Boettner DR, Huston CD, Linford AS, Buss SN, Houpt E, Sherman NE, Petri WA. 2008 *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog.* **4**, e8. (doi:10.1371/journal.ppat.0040008)
22. Rigden DJ. 2008 The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem. J.* **409**, 333–348. (doi:10.1042/BJ20071097)
23. Pilkis SJ, Lively MO, el-Maghrabi MR. 1987 Active site sequence of hepatic fructose-2,6-bisphosphatase. Homology in primary structure with phosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* **262**, 12672–12675.
24. Naiyer S, Bhattacharya A, Bhattacharya S. 2019 Advances in *Entamoeba histolytica* Biology Through Transcriptomic Analysis. *Front. Microbiol.* **10**, 1921. (doi:10.3389/fmicb.2019.01921)
25. Lozano R *et al.* 2012 Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* **380**, 2095–2128. (doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
26. Watanabe K, Petri WA. 2015 Molecular biology research to benefit patients with *Entamoeba histolytica* infection: Research for controlling amebiasis. *Mol. Microbiol.* **98**, 208–217. (doi:10.1111/mmi.13131)
27. Mazzuco A, Benchimol M, De Souza W. 1997 Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* **28**, 241–247. (doi:10.1016/S0968-4328(97)00024-3)
28. Santos HJ, Hanadate Y, Imai K, Nozaki T. 2019 An *Entamoeba*-Specific Mitosomal Membrane Protein with Potential Association to the Golgi Apparatus. *Genes* **10**, 367. (doi:10.3390/genes10050367)
29. Loftus B *et al.* 2005 The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865–868. (doi:10.1038/nature03291)

30. Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sánchez T. 1983 Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* **158**, 1511–1521. (doi:10.1084/jem.158.5.1511)
31. Kang Q, Zhang D. 2020 Principle and potential applications of the non-classical protein secretory pathway in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 953–965. (doi:10.1007/s00253-019-10285-4)
32. Shi X, Yang W, Wang N, Zhu J. 2019 Circulating JNK pathway-associated phosphatase level correlates with decreased risk, activity, inflammation level and reduced clinical response to tumor necrosis factor- α inhibitor in Crohn disease patients: *Medicine (Baltimore)* **98**, e16622. (doi:10.1097/MD.00000000000016622)
33. van Hartingsveldt W *et al.* 1993 Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* **127**, 87–94. (doi:10.1016/0378-1119(93)90620-I)
34. Shibata K, Totsuka M, Watanabe T. 1986 Phosphatase activity as a criterion for differentiation of oral mycoplasmas. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 970–972.
35. Thaller MC, Berlutti F, Riccio ML, Rossolini GM. 1992 A species-specific DNA probe for *Providencia stuartii* identification. *Mol. Cell. Probes* **6**, 417–422. (doi:10.1016/0890-8508(92)90036-W)
36. Avrameas S. 1969 Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* **6**, 43–52. (doi:10.1016/0019-2791(69)90177-3)
37. Manoil C, Beckwith J. 1985 TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 8129–8133. (doi:10.1073/pnas.82.23.8129)
38. Zhang X, Chen X, Liu K, Zhang Y, Gao G, Huang X, Hou S. 2020 Near-infrared ratiometric probe with a self-immolative spacer for rapid and sensitive detection of alkaline phosphatase activity and imaging in vivo. *Anal. Chim. Acta* **1094**, 113–121. (doi:10.1016/j.aca.2019.10.001)
39. Xu J, Zhang H, Zhang W, Li P, Zhang W, Wang H, Tang B. 2020 Fluorescent nanosensor for *in situ* detection of phosphate and alkaline phosphatase in mice with parathyroid dysfunction. *Chem. Commun.* **56**, 2431–2434. (doi:10.1039/C9CC08828H)
40. Fredj Z, Ben Ali M, Abbas MN, Dempsey E. 2019 Determination of prostate cancer biomarker acid phosphatase at a copper phthalocyanine-modified screen printed gold transducer. *Anal. Chim. Acta* , S000326701930025X. (doi:10.1016/j.aca.2018.12.058)
41. Niño-Gómez DC *et al.* 2017 “In Silico” Characterization of 3-Phytase A and 3-Phytase B from *Aspergillus niger*. *Enzyme Res.* **2017**, 1–23. (doi:10.1155/2017/9746191)
42. Zhou S, Liu Z, Xie W, Yu Y, Ning C, Yuan M, Mou H. 2019 Improving catalytic efficiency and maximum activity at low pH of *Aspergillus niger* phytase using rational design. *Int. J. Biol. Macromol.* **131**, 1117–1124. (doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.140)
43. Han N, Miao H, Yu T, Xu B, Yang Y, Wu Q, Zhang R, Huang Z. 2018 Enhancing thermal tolerance of *Aspergillus niger* PhyA phytase directed by structural comparison and computational simulation. *BMC Biotechnol.* **18**, 36. (doi:10.1186/s12896-018-0445-y)
44. Wang X, Du J, Zhang Z, Fu Y, Wang W, Liang A-H. 2018 A rational design to enhance the resistance of *Escherichia coli* phytase appA to trypsin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 9647–9656. (doi:10.1007/s00253-018-9327-4)

45. Zor T, Selinger Z. 1996 Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302–308. (doi:10.1006/abio.1996.0171)
46. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. 1988 A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **171**, 266–270. (doi:10.1016/0003-2697(88)90484-8)
47. Jeon S-J, Ishikawa K. 2005 Characterization of the Family I inorganic pyrophosphatase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Archaea* **1**, 385–389. (doi:10.1155/2005/591628)
48. Müller IB, Knöckel J, Eschbach M-L, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. 2010 Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* **12**, 677–691. (doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01426.x)
49. Avaeva SM. 2000 Active site interactions in oligomeric structures of inorganic pyrophosphatases. *Biochem. Biokhimiia* **65**, 361–372.
50. Oliva G, Romero I, Ayala G, Barrios-Jacobo I, Celis H. 2000 Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* **174**, 104–110. (doi:10.1007/s002030000182)
51. Ginting EL, Iwasaki S, Maeganeku C, Motoshima H, Watanabe K. 2014 Expression, purification, and characterization of cold-adapted inorganic pyrophosphatase from psychrophilic *Shewanella* sp. AS-11. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **44**, 480–492. (doi:10.1080/10826068.2013.833114)