

UCH-FC
Biotecnología
C. 198
C. 2



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Desarrollo de un protocolo de sobreexpresión y purificación, y una metodología enzimática a gran escala (high-throughput) para medir la actividad de la proteína polifosfato quinasa 1, (PPK1) de *Escherichia coli*.”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

FRANCISCA CAMPOS URRUTIA

Director del Seminario de Título: Dr. Francisco P. Chávez
Co-Director de Título: Dr. Ricardo Cabrera

Enero 2016



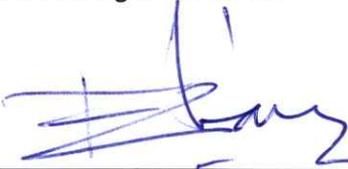
INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Francisca Campos Urrutia**

“Desarrollo de un protocolo de sobreexpresión y purificación, y una metodología enzimática a gran escala (high-throughput) para medir la actividad de la proteína polifosfato quinasa 1, (PPK1) de *Escherichia coli*.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título:



Dr. Francisco P. Chávez

Co-Director Seminario de Título:



Dr. Ricardo Cabrera



Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:



Dra. Victoria Guixé

Evaluador:



Dr. Andrés Marcoleta

Santiago de Chile, Diciembre 2015

Biografía



Llegué al mundo un 10 de noviembre del año 1988, 9 meses después de que el último ovocito disponible en el ovario de mi madre, y un espermatozoide senil y confundido chocara y penetrara una zona (ya no tan) pelúcida.

Luego de una milagrosamente sana gestación, logré conocer a mis padres y hermanita, esta última ansiosa por conocerme y, como es normal, enterrarme unos palillos de tejer en mis pequeños ojos. Por suerte mi madre lo impidió y crecí sana, y con ambos órganos visuales íntegros.

Desde los 6 a 12 años cursé parte de mi enseñanza básica en un colegio de estación central con nombre de metralleta, donde lidié con el *bulling* de mis compañeritos valiéndome de mi indiferencia hacia sus necios apodos y de mis uñas cuando colmaron mi paciencia.

(En paralelo disfrutaba la fría venganza hacia mi hermanita, planeando pequeños regalos de maldad que descubría meses después, y sin pruebas que me inculparan).

En sexto básico, y al borde de caer en las garras de las mafias villeras de mi colegio, decidí migrar al Liceo N°1 de niñas Javiera Carrera. Junto con el cambio de liceo, mis padres se separaron y llegué a vivir a Santiago centro, salvándome de ser reclutada por las Mojojo y las Calilas.

Por el Liceo N°1 pasé sin penas ni glorias, siendo una adolescente que adolecía demasiado como para destacar en nada, sin embargo conservo 1 amiga, los mejores

recuerdos de la revolución pingüina del 2006 y una concentración de notas inferior a la obtenida en mis años de Universidad.

Luego de mucho esfuerzo y un año de preuniversitario logré un puntaje que , por segunda vez, no me permitió entrar a la carrera de Tecnología médica, por lo que sin ánimos de una tercera, me conformé con Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias, donde pesar de mis constantes crisis existenciales y vocacionales pasé los más gratificantes años de mi vida, durante los cuales, una de las tantas crisis me hizo querer emprender una segunda carrera, Ingeniería en Biotecnología, enorme travesía que hoy termino victoriosa luego de derrotar a, cual "malo final" es este escrito de seminario de título, que tantos miedos provocó.

Hoy en día me siento feliz y enamorada de la biología y de los maravillosos misterios que día a día me sorprenden y motivan a seguir descubriendo el mundo de la ciencia. Agradezco haber obtenido un NEM deficiente que me hizo conformarme con la Facultad de Ciencias y haberme desarrollado por estos 8 años en el mundo de la biología. Espero pronto conseguir un trabajo al que desee renunciar, sin antes haber acumulado suficiente dinero en mis arcas para viajar por el mundo y explorar la flora y fauna que tanto me intriga, para quizás luego volver a la Universidad y enfrentarme al siguiente Gran *Koopa*.

A mi mamá, papá y hermana.

1.4 Agradecimientos

Luego de 10 meses de experimentos y casi 9 de escritura se acaba la tortura que la una palabra tesis implica y trae consigo, como un gran paquete de predisposiciones negativas. Tanto así, que incluso llegué a sentir que al iniciar este escrito, me había echado al hombro las inseguridades de todos mis antepasados de la facultad de ciencias.

Pero no todo fue sufrimientos, ya que enfrentarme a mis miedos, como me tocó hacerlo durante este periodo, me ha traído infinita enseñanza y gratitud, la que siento infinitamente hacia las personas que me han acompañado y han hecho de este ciclo el más fructífero de mi vida. Para comenzar, quisiera agradecer profundamente a las maravillosas personas con las que compartí ramos en la Facultad y que se convirtieron en mis queridos amigos: A Phillippi, por esa risa cómplice el primer día de clases, la que nos unió por estos 8 años. A Natalia, que aunque abandonó la facultad muy temprano, se quedó en mi corazón para conocernos y crecer juntas. A Gabriel por ser único, por su amistad y pasión ante la vida. A Javier por ser una de las personas más bondadosas y sencillas que conozco y por ser, junto a Gabriel, los mejores compañeros de estudio, por su generosidad al darse siempre el tiempo para ayudarme cuando estuve complicada con alguna asignatura. Al Joven Smith y al Joven Tapia por ser los pailones más adorables de JGM y por entregarme tanta alegría. A las ambientalistas (Jesusy, Bele, Gaby, Camili, Valentini, Chica y Cote) por ser tan inmensamente bellas personas. A la Coni Figue por saber cuándo necesito apoyo con solo mirarme a los ojos. A Eúde por ser magnánimo, un soñador libre en este mundo. Al Pollo por ser el mejor padrino y por haber mantenido nuestra amistad hasta hoy. A Antonio L. por ser el mejor y más seco. Al Cono por ser mi siamés desde que emprendimos el complicado viaje por la Biotecnología, por acompañarme en mis locuras y por animarme a soñar despierta. Sin duda podría agradecerles muchísimas cosas más, su amistad, apoyo

y cariño sincero y sencillo, y es que si hay algo que los resume a todos, es el amor y sencillez con la que recuerdo cada momento junto a ustedes en JGM.

Quisiera también agradecer infinitamente a las personas que me acompañaron en la etapa de realización de esta tesis. A Francisco P. Chávez (Fran), por generar una convivencia horizontal y cálida en Sysmicro Lab, y por supuesto por permitirme ser parte de la bella familia que lo compone. A Javi por sus conversaciones atentas, consejos y palabras de aliento. A Maca por su amistad, apoyo y generosidad, a ella y a Javiera por formarme y por entregarme, con toda generosidad, la expertiz y rigurosidad que tanto admiro de ellas y que las hace unas excelentes microbiólogas. A Cony por invitarme a ser parte del laboratorio, y por ser una persona admirable en cuanto a su equilibrio y energía ante la vida. A Panchito por ser el mejor compañerito Ñoñotec y por las discusiones que nos hicieron más breves las tardes de experimentos. A mi querida Nico, por ser la mami del laboratorio y por enseñarme que la sabiduría no es proporcional a los años, porque a pesar de haber nacido el mismo año que yo, para mi es una vieja sabia y admirable. A la bella Habibi por ser la mejor partner de investigación que me podría haber regalado la vida. Por su simplicidad, aguante y el optimismo que tanto me complementó en los momentos en que, dada mi rigidez mental y pensamiento catastrófico quise tirar la toalla. Por acompañarme y por ser la segunda mami de éste trabajo.

Quisiera agradecer también a Ricardo Cabrera, por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptar ser el co-tutor de mi tesis a pesar de llegar “como de colada” a su oficina y por hacer un espacio en su pizarrita para resolver nuestros dilemas, a pesar de irrumpir sin aviso en su oficina. A Yessy por su voluntad y generosidad. Al Daddy por ser el daddy de este trabajo, por escuchar mis divagaciones, por brindarme sus conocimientos de bioquímica con tanto entusiasmo y por alentarme a vencer mis miedos y seguir adelante.

A los amigos de la vida, a Jorge Antonio por acompañarme desde mi adolescencia, por su preocupación constante y por su fe en mis capacidades. A Valeska por ser la hermana que elegí tener, por conocerme mejor que nadie, por estar conmigo desde niñas, por amarme a pesar de mis periodos de ingratitud y odio al mundo, y por abrirme las puertas de su hermosa familia.

A Fernando por ser mi pololo y amigo, por apañarme en mis locuras ciclistas y viajeras, por sus abrazos de contención, por amarme y por enseñarme a perdonar.

Y por sobre todas las cosas agradezco a mi familia, porque a pesar de no ser la familia de catálogo, son las personas más importantes en mi vida. A mi hermana por enseñarme a sumar y leer, por esas tardes de cocinita, barbies y tortas de barro, por sorprenderme con su sabiduría y por ayudarme a perdonar. A mi mamá por ser mi mamá, por ese amor que es el más grande que existe y que alguien me brindará jamás, por entregarme todo lo que ha podido con esfuerzo, por enseñarme a amar a los animales, y por ser mi ejemplo, día a día, de fuerza ante la vida. Finalmente a los dos seres que hoy me acompañan desde el interior de mi corazón, a mi Minuna, mi compañera desde los 10 años, por el amor incondicional que sólo un animal puede brindar y por esa conexión tan especial que nos unió por 17 años y que nunca podré reemplazar. Y por supuesto a mi papá por ser el personaje que fue, por las tardes de verano jugando naipes y compartiendo un mate en el jardín, por los tangos de un lado al otro de la cama, por su humor diferente y por el recuerdo de su mirada de amor que me acompañan día a día.

Parecerá muy larga y melosa esta sección del escrito, pero esto refleja lo agradecida que estoy de la vida que me ha tocado vivir, y sin duda de las hermosas personas que me acompañan día a día, y que me han enseñado lo que hoy me hace ser lo que soy.

1.4.1. FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Microbiología de Sistemas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y fue financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico: Proyecto FONDECYT Regular 1120209.

1.5. INDICE DE CONTENIDOS

3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. Los polifosfatos inorgánicos.....	1
3.2. La polifosfato kinasa I de <i>Escherichia coli</i>	3
3.3. Condiciones para la catálisis in vitro de la EcPPK1.....	6
3.4. Metodologías de cuantificación de polifosfatos inorgánicos	6
3.5. Polifosfatos inorgánicos y virulencia en organismos enteropatógenos.....	9
3.6. La síntesis de los poliP como blanco para el diseño de nuevos antimicrobioanos.....	9
3.7. Objetivos.....	11
3.7.1. Objetivo general.....	11
3.7.2. Objetivos específicos.....	11
4. MATERIALES Y METODOS.....	12
4.1 Síntesis y clonamiento clonación del gen ppk1 de <i>Escherichia coli</i>	12
4.1.1. Cepas bacterianas, medios de cultivo y antibióticos.....	12
4.1.2. Síntesis del gen Ecppk1 y plásmidos utilizados.....	13
4.1.3. Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa.....	14
4.1.4. Purificación de DNA plasmidial desde gel de agarosa.....	14
4.1.5. Comprobación del plásmido obtenido por cultivo en placas.....	15
4.1.6. Purificación de ADN plasmidial (miniprep).....	15
4.1.7. Comprobación del plásmido obtenido por PCR de colonias.....	16
4.1.8. Comprobación del plásmido obtenido por pruebas de digestión.....	16
4.1.9. Comprobación del plásmido obtenido por secuenciación.....	17
4.2. Transformación bacteriana.....	18
4.2.1. Obtención de células <i>Escherichia coli</i> BL21 (AI) quimiocompetentes.....	18

4.2.2. Transformación de células <i>Escherichia coli</i> BL21 (AI) quimiocompetentes, con los plásmidos pUC57- <i>Ecppk1</i> y pET- His6-TEV- <i>Ecppk1</i>	18
4.3. Sobreexpresión de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	19
4.3.1. Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	19
4.3.2. Extracción de las proteínas solubles mediante B-PER®.....	19
4.3.3. Extracción de proteínas solubles mediante sonicación.....	20
4.3.4. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	20
4.3.5. Análisis de la enzima <i>EcPPK1</i> por Western Blot.....	21
4.3.6. Ensayos de sobreexpresión a gran escala.....	22
4.4. Purificación de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.1. Purificación de la proteína PPK1.....	22
4.4.2. Corte del Tag de histidina con proteasa TEV.....	24
4.5 Actividad enzimática de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	24
4.5.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de fluorescencia de polifosfatos inorgánicos utilizando DAPI.....	24
4.5.2. Ensayo discontinuo de la actividad enzimática PPK1 mediante DAPI.....	25
4.5.3. Electroforesis en gel de poli(acrilamida) para polifosfatos.....	27
4.5.4. Cuantificación de los polifosfatos.....	28
4.5.5. Cálculo de la producción de poliP a partir de la fluorescencia medida.....	28
4.5.6. Cinética enzimática y determinación de la actividad específica de la proteína PPK1.....	30
4.6. Compuestos inhibidores de la PPK1.....	32
4.6.1. Prueba de los compuestos inhibidores para la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Síntesis y clonación del gen <i>ppk1</i> de <i>Escherichia coli</i>	33

5.1.1. Construcción del plásmido pET- His6-TEV- <i>Ecppk1</i>	33
5.1.2. Comprobación del plásmido pET- His6-TEV- <i>Ecppk1</i>	35
5.2 Sobreexpresión de la proteína Polifosfato quinasa I PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	38
5.3 Purificación de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	39
5.4 Actividad enzimática de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	43
5.4.1 Determinación de las condiciones óptimas para la medición de los polifosfatos inorgánicos mediante fluorescencia de polifosfatos inorgánicos con DAPI.....	43
5.4.2 Determinación de las condiciones óptimas para la actividad enzimática de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i> mediante fluorescencia con Dapi.....	48
5.4.3 Ensayo de medición de la actividad enzimática de <i>EcPPK1</i>	51
5.4.4 Obtención de los parámetros cinéticos de la proteína <i>EcPPK1</i>	53
5.5. Inhibidores.....	54
5.5.1. Ensayos a gran escala para estimar la actividad inhibitoria sobre la enzima PPK1.....	54
6. DISCUSIÓN.....	56
6.1. Clonamiento y sobreexpresión.....	57
6.2. Purificación de la proteína recombinante <i>EcPPK1</i> con cola de histidina.....	58
6.3. Condiciones de medición de la actividad enzimática y la inhibición de la proteína <i>EcPPK1</i>	60
7. CONCLUSIONES.....	64
8. BIBLIOGRAFIA.....	65
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	70

1.6. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reactivos utilizados.....	12
Tabla 2	Partidores utilizados en la secuenciación plasmidial.....	17
Tabla 3	Composición buffers utilizados en la purificación de <i>EcPPK1</i>	23
Tabla 4	Condiciones probadas para la medición de PoliP	25
Tabla 5	Condiciones ensayadas para la actividad PPK1 mediante DAPI.....	26

1.7. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Molécula de polifosfato.....	2
Figura 2	Estructura cristalina de la PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	4
Figura 3	Alineamiento de secuencias de las polifosfato quinasa 1 (PPK1) de <i>E.coli</i> y 4 microorganismos patógenos.....	5
Figura 4	Esquema de dos metodologías de medición de polifosfatos.....	7
Figura 5	Espectro de emisión y Excitación de DAPI en presencia y ausencia de poliP, ATP y DNA.....	8
Figura 6	Curva de calibración.....	29
Figura 7	Digestión de los plásmidos pET-TEV y pUC57-Ecppk1 con las enzimas de restricción <i>HindIII</i> y <i>NdeI</i>	34
Figura 8	Comprobación del plásmido pET-His6-TEV-Ecppk1 por PCR de colonias...35	
Figura 9	Comprobación del plásmido pET- His6-TEV-Ecppk1 por prueba de digestión.....	36
Figura 10	Alineamiento entre secuencia aminoacídica derivada del gen <i>EcPPK1</i> secuenciado y la secuencia de la proteína PPK1 de <i>Escherichia coli</i>	37
Figura 11	Sobreexpresión de la PPK1 a baja escala en <i>E. coli</i>	39
Figura 12	Gel SDS-PAGE para visualizar la purificación de la proteína EcPPK1.....	40
Figura 13	Prueba de elución para la purificación de la enzima EcPPK1.....	42
Figura 14	Cuantificación de los poliP mediante fluorescencia con DAPI en diferentes buffers de reacción.....	44
Figura 15	Curva patrón para la cuantificación de los poliP ₄₅ mediante fluorescencia con DAPI.....	45
Figura 16	Prueba DAPI para medición de polifosfatos.....	46
Figura 17	Medición de los poliP sintetizados con diferentes ganancias (sensibilidades) del equipo Sinergy HT.....	47

Figura 18	Medición de los poliP sintetizados por <i>EcPPK1</i> , con distintos cebadores.	48
Figura 19	Medición de los poliP sintetizados por <i>EcPPK1</i> en presencia y ausencia de un sistema de regeneración de ATP.....	49
Figura 20	Medición de los poliP con <i>EcPPK1</i> fusionada a Tag de histidina	50
Figura 21	Medición de los poliP sintetizados luego de tratamiento con ácido perclórico	51
Figura 22	Actividad enzimática de la enzima PPK1 de <i>E. coli</i> mediante fluorescencia con DAPI.....	52
Figura 23	Cinética de la proteína <i>EcPPK1</i> a distintas concentraciones de sustrato.....	54
Figura 24	Actividad compuestos inhibidores.....	55
Figura S1.	Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	80
Figura S2.	Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	81
Figura S3.	Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	82
Figura S4.	Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	83
Figura S5.	Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.....	84
Figura S6	Gel de poliacrilamida para polifosfatos.....	85

1.8. LISTA DE ABREVIATURAS

Amp ^r	Resistencia a ampicilina
BSA	Albúmina sérica bovina
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanometros
<i>Ec</i> PPK1	Polifosfato quinasa de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactósido
kan ^r	Resistencia a Kanamicina
k _{cat}	Constante catalítica
K _i	Constante de inhibición
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
PoliP	Polifosfato inorgánico
PPK1	Polifosfato quinasa 1
<i>ppk1</i>	Gen de la polifosfato quinasa 1
PPX	Exopolifosfatasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
TAE	Tris-acetato de EDTA
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
V ₀	Velocidad Inicial

1. RESUMEN

Los polifosfatos inorgánicos son polímeros altamente ubicuos, presentes en todos los dominios de la vida. Estas moléculas pueden contener desde diez hasta cientos de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfo- anhidro de alta energía, lo que los hace muy buena fuente de energía alternativa al ATP, además de ser reservorios de fosfato inorgánico, quelantes de cationes metálicos, etc. Los niveles de éste polímero en la célula están relacionados con el estado metabólico y fisiológico de la célula, asociados al estado estacionario de la curva de crecimiento bacteriana, y a situaciones de estrés, donde se encuentran los niveles más elevados dentro de la célula. Los polifosfatos también han sido relacionados con procesos celulares asociados a la patogénesis bacteriana. Mutantes de la enzima PPK1 resultan ser viables, pero con fenotipos visiblemente atenuados en relación a la virulencia, patogénesis y resistencia a antibióticos en microorganismos enteropatógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes* entre otros.

Dadas estas características, es que la PPK1 se ha propuesto como un blanco prometedor para el diseño de nuevos compuestos antimicrobianos que no afecten la viabilidad bacteriana, sino que ataquen las funciones asociadas a la producción de factores de virulencia, resultando ser una alternativa antivirulencia, en contraposición al efecto bactericida logrado por los antibióticos de uso común.

Para el desarrollo de una terapia con un compuesto inhibidor de la PPK1 resulta necesario, en primera instancia, desarrollar una metodología de fácil implementación y aplicable a gran escala, que permita llevar a cabo estudios *in vitro* de la actividad enzimática de la PPK1 y que brinde la capacidad de obtener parámetros cinéticos que permitan cuantificar la actividad inhibitoria de dichos compuestos.

En este trabajo se clonó y purificó la PPK1 de *E. coli* a partir de la fracción soluble y se desarrolló una metodología para el estudio de la actividad enzimática de la enzima PPK1 de *E. coli*, aprovechando su condición de bacteria modelo del grupo de las gram negativas, además del alto grado de conservación de dicha enzima dentro del grupo de las bacterias enteropatógenas. Para lograr esto fue preciso sobreexpresar la proteína, a partir del clonamiento del gen *ppk1* de *E. coli* fusionado a una secuencia codificante para un *Tag* de 6 residuos de histidina (His6), lo que permitió realizar la purificación en un solo paso mediante cromatografía por afinidad. Luego de obtener la proteína purificada en su forma activa, se desarrolló un protocolo para realizar los ensayos de cuantificación de los poliP de forma eficiente y a gran escala mediante un ensayo fluorimétrico en placas multipocillos con DAPI. El desarrollo de esta metodología permitió determinar algunos parámetros cinéticos y realizar un ensayo de la actividad inhibitoria de 40 moléculas diseñadas previamente a través de un estudio de *docking* molecular *in silico*.

2. Abstract

Inorganic polyphosphates are a highly ubiquitous polymer, present inside all types of cell. These molecules may contain from tens to hundreds of orthophosphate residues linked by high-energy phosphorylated anhydrous links, making them very good alternative sources of energy similar to ATP. Besides being an obvious reservoir of inorganic phosphate and chelator of metal cations, this biopolymer is associated with metabolic and physiological state of the cell related with the steady state growth, and multiple cellular stresses. Polyphosphates also have been linked to cellular processes related to bacterial pathogenesis. Particularly, PPK1 enzyme mutants are viable, but with attenuated virulence phenotypes and antibiotic sensitivity in pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogens* among many others.

Given these characteristics, it has been proposed that PPK1 is a valid target for the design of new antimicrobial compounds that do not affect bacterial viability, but affect the functions associated with the production of virulence factors, proving an alternative antivirulence approach in opposed to bactericidal effect achieved by commonly used antibiotics.

For the development of a putative therapy with a compound that inhibit PPK1 activity initially is necessary to develop an easy and high-throughput enzymatic assay for the *in vitro* studies.

In this work we has cloned, overexpressed and purified the *E. coli* PPK1 enzyme from from the soluble fraction. To achieve this the protein was overexpress fused to tag of 6 histidine residues (His6), which allowed the one-step purification by affinity chromatography. After obtaining the purified protein into its active form, a protocol was developed for the quantitation of polyP by using a fluorimetric assay with DAPI in 96-

multiwell plates. The development of this methodology allowed us to determine some kinetic parameters and performing high-throughput assay to evaluate the inhibitory activity of 40 molecules pre-designed to bind the active site of the PPK1 enzyme through an *in silico* molecular docking study.

3. INTRODUCCIÓN:

3.1 Los polifosfatos inorgánicos.

Los polifosfatos inorgánicos son polímeros altamente ubicuos, presentes en todos los dominios de la vida [Jagannathan, 2010]. Estas moléculas pueden contener desde diez hasta cientos de residuos de ortofosfato unidos uno a uno por enlaces fosfo- anhidro [Achbergerová & Nahálka, 2011] (Figura 1). El rompimiento de dicho enlace es muy favorable energéticamente, lo que hace a estos compuestos una fuente energética alternativa al ATP. Los polifosfatos han sido encontrados en todo tipo de células: bacterias, arqueas, hongos, protozoos, vegetales y animales [Kornberg, 1999].

En bacterias, el metabolismo de los polifosfatos es controlado principalmente por las enzimas *PPK1* y *PPX*, donde la primera realiza la reacción reversible de polimerización de la cadena lineal de polifosfatos a partir del fosfato terminal del ATP, mientras que la segunda enzima mencionada es la encargada de la degradación del polímero a fosfato inorgánico (Pi) [Akiyama y col., 1993]. Además del almacenamiento de energía, se han descrito diversas funciones atribuidas a los polifosfatos, tales como ser reservorios de fosfato inorgánico, quelantes de cationes metálicos, específicamente Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , and Fe^{3+} , además de su capacidad de secuestrar metales tóxicos como Cd^{2+} y Hg^+ [Brown & Kornberg, 2004]. Los niveles de éste polímero en la célula están relacionados con el estado metabólico y fisiológico, por lo que es normal encontrarlo en cantidades elevadas en el estado estacionario de la curva de crecimiento bacteriano, así como en situaciones de estrés, donde se han reportado cambios considerables en los niveles de poliP entre los que se encuentra un aumento de hasta 100 veces en los niveles de este compuesto ante señales como disminución en el Pi, aminoácidos o nitrógeno, carencia de nutrientes o estrés por salinidad [Kornberg, 1999].

Los polifosfatos también han sido relacionados con procesos celulares relacionados con la patogénesis bacteriana como la movilidad celular (swimming, swarming y twitching) en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella thiphymurium*, *Vibrio cholerae* [Achbergerová & Nahálka, 2011, Rashid y col, 2000c], la formación de biopelículas (*Pseudomonas aeruginosa*) [Rashid y col, 2000b] , la comunicación celular de tipo quórum sensing [Rashid y col, 2000a , Achbergerová & Nahálka, 2011], la producción de factores de virulencia como pigmentos tóxicos, sideróforos, elastasa y ramnolípidos (*Pseudomonas aeruginosa*) [Chávez y col, 2011, Ahn y Kornberg, 1990]. Adicionalmente, se ha estudiado la importancia de los polifosfatos en la regulación génica, específicamente relacionada al estado de persistencia, el cual es un fenómeno que provoca la baja en el metabolismo de un subset de células dentro de una población genéticamente indistinta, y que las hace resistentes temporalmente a la acción de antibióticos [Maisonneuve y col, 2013]. Finalmente, la deficiencia en la síntesis de los polifosfatos particularmente mutantes *ppk1* también se relacionan con una mayor sensibilidad a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* [Kim y col, 2002 , Ortiz-Severín y col, 2015]

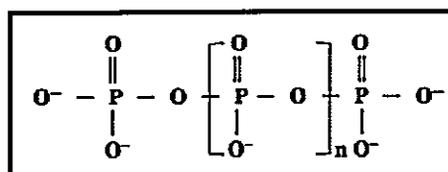


Figura 1: molécula de polifosfato [Achbergerová & Nahálka, 2011]

3.2 La polifosfato kinasa I de *Escherichia coli*.

La biosíntesis y degradación de polifosfatos en *E. coli* es catalizada por la enzima polifosfato quinasa PPK1 (*EcPPK*, EC 2.7.4.1), enzima que cataliza reversiblemente la polimerización del fosfato terminal del ATP a la cadena de poliP.: $NTP + PoliP_n \leftrightarrow NDP + PoliP_{n+1}$. Por otro lado, la degradación es catalizada por la exopolifosfatasa PPX, que libera ortofosfato al degradar la cadena de poliP [Chávez y col., 2011]. La PPK1 solo utiliza ATP para la síntesis de polifosfato, mientras que puede fosforilar los 4 nucleótidos difosfato, pero con preferencia por los nucleótidos púricos: $ADP > GDP > UDP > CDP$ [Achbergerová & Nahálka, 2011].

Particularmente la PPK1 de *E. coli* [PDB_1XDO] se trata de un homotetrámero de unidades asimétricas donde cada una de estas es formada por 2 subunidades entrelazadas de 80 KDa, y 687 aminoácidos [Achbergerová & Nahálka, 2011]. A su vez, cada subunidad contiene 4 dominios estructurales: un dominio amino (dominio N), un dominio cabeza o *head* (dominio H) y dos dominios carboxilo (dominios C1 y C2) (Figura 2). El primer paso en la catálisis de la PPK1 es la autofosforilación de los residuos de histidina 435 y 454 [Kumble, 1996], donde el primero es el encargado del ataque nucleofílico al fosfato y del ATP [Zhu y col., 2005]. Una vez autofosforilada, la PPK1 es capaz de seguir con la elongación de la cadena de polifosfatos [Zhu y col., 2005]. En el sitio activo de la PPK1, se encuentra un túnel formado entre el dominio H y los dominios C1 y C2. En un extremo de éste túnel, se encuentra un bolsillo hidrofóbico donde se une una molécula de ATP, con sus tres fosfatos coordinados por dos iones de magnesio (cofactor) [Zhu y col., 2005]. En el otro extremo del túnel hay residuos positivos altamente conservados que interactúan con la cadena de polifosfatos durante su elongación. Todos los residuos implicados en la interacción con el ATP son altamente conservados dentro de las PPK1 de numerosos

organismos patógenos, como se muestra en la (Figura 3). Por estas razones el uso del modelo de la enterobacteria *E. coli* es ventajoso para el estudio de esta enzima.

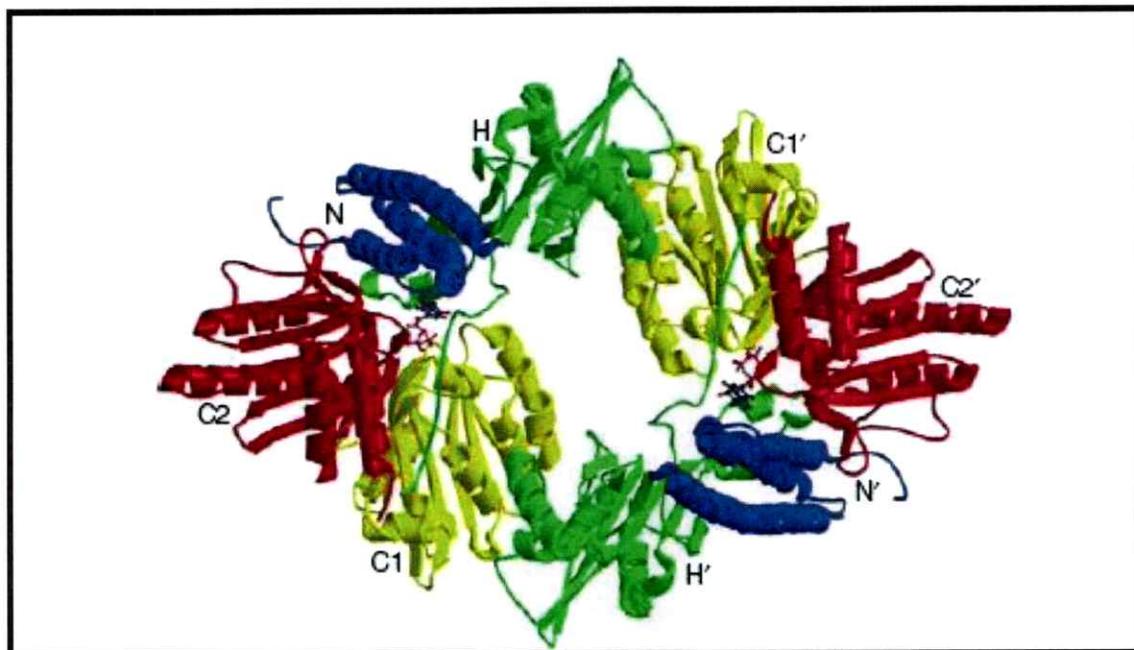


Figura 2: Estructura cristalina de la PPK1 de *Escherichia coli*. La imagen muestra una de las unidades asimétricas. Una unidad asimétrica es formada por dos subunidades que a su vez están formadas por los dominios N (residuos 2-106), H (residuos 107-321), C1 (residuos 322-502), C2 (residuos 503-687) y N', H', C1' Y C2' respectivamente. [Zhu y col., 2005].

Dentro de los estudios cinéticos de la enzima *EcPPK1*, se destacan los del grupo de Arthur Kornberg, quienes reportaron una actividad específica, para la proteína nativa, de 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ [Ahn & Kornberg, 1990], para la proteína recombinante, 600 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ [Ault-Riché & Kornberg, 1999], y 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para la proteína recombinante con cola de histidina [Tzeng & Kornberg, 2000]. Por otro lado se ha reportado, para 1Mm ATP como sustrato, una K_M de 2 mM, una V_{max} de 51 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y un número de recambio, kcat de 59 subunidades/ seg. [Ahn & Kornberg, 1990]

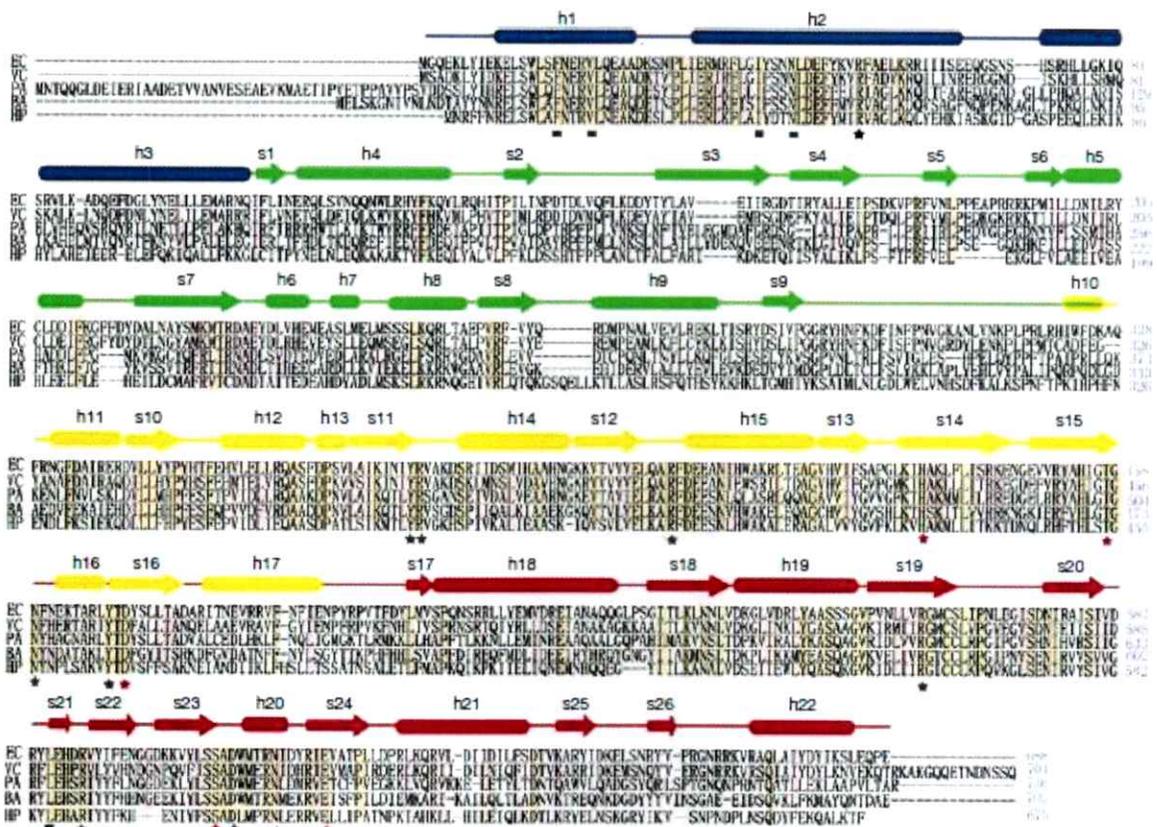


Figura 3. Alineación de las secuencias de las polifosfato quinzas 1 (PPK1) de varios patógenos. Los residuos idénticos están sombreados en amarillo, y los residuos parcialmente conservados están sombreados en color rosa. La estructura secundaria derivada de la proteína de *Escherichia coli*; la estructura tipo alfa hélice se representa como tubos y los barriles beta como flechas. En azul el dominio N' terminal, en verde el dominio H, en amarillo el dominio C1 y en rojo el dominio C2. Los residuos de unión a ATP (Mg-AMPPNP (β - γ -imidoadenosina 5-fosfato) se muestran con bloques y estrellas bajo la secuencia; los bloques representan los residuos involucrado en los contactos laterales con el anillo de adenina del AMPPNP, mientras que las estrellas representan los residuos que mantienen contacto con los grupos fosfatos del AMPPNP. El sitio fosforilado (H435) y los residuos involucrados con la autofosforilación (D470 y E623) se indican con estrellas rojas. EC, *Escherichia coli*; VC, *Vibrio cholerae*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; BA, *Bacillus anthracis*; HP, *Helicobacter pylori*. [Zhu y col., 2005]

3.3 Condiciones para la catálisis *in vitro* de la *Ec*PPK1.

En 1990 Ahn y Kornberg reportan una serie de condiciones fundamentales para la actividad enzimática de *Ec*PPK1, como es la presencia de Mg^{2+} (5-10 mM), 1 mM de ATP como sustrato, y que el sulfato de amonio (100 mM) estimula entre 3 y 4 veces la síntesis de polifosfatos [Ahn & Kornberg, 1990]. Por otra parte, determinaron que para estas concentraciones de ATP es necesario un cebador de polifosfatos, donde el más eficiente es una cadena de polifosfatos de 4 moléculas de ortofosfato (poliP₄) [Ahn & Kornberg, 1990]. Finalmente, indicaron que el ADP actúa como inhibidor competitivo, por lo que se recomienda utilizar un sistema de regeneración de ATP (creatina quinasa/creatina fosfato) que evite la inhibición por producto [Ahn & Kornberg, 1990].

3.4 Metodologías de cuantificación de polifosfatos inorgánicos.

Existen diversos métodos de cuantificación de los polifosfatos inorgánicos. La forma más clásica utilizada es el método que utiliza ATP marcado radiactivamente en el fosfato gamma [³²P], y la posterior filtración y medición del [³²P]-poliP producido mediante un contador de centelleo [Kornberg, 1956, Ahn & Kornberg, 1999]. Otra forma descrita es la conversión del polifosfato a ATP mediante la catálisis reversa de la enzima polifosfato kinasa y la posterior medición del ATP utilizando luciferina, proteína que lo utiliza para producir luz, la que posteriormente se mide en un lector de luminiscencia [Ault-Riché, 1998]. Una curva patrón permite relacionar la cantidad de luz emitida con la concentración de ATP y por consiguiente la de poliP. Existen también métodos colorimétricos basados en la capacidad de los polifosfatos inorgánicos de reaccionar con la toluidina azul, cambiando su espectro de absorción, y que permite medir el cambio en la razón de absorbancia 530/630 nm en presencia de la cadena creciente de polifosfatos [Mullan y col., 2002]. Cabe destacar que las metodologías anteriormente nombradas precisan de la purificación del polifosfato para su posterior cuantificación. En el caso del método colorimétrico la sensibilidad no es

elevada y se utiliza solo para tinciones en geles de los poliP. Finalmente otro método colorimétrico menos utilizado es cuantificar el poliP mediante la hidrólisis de este a fosfato inorgánico (Pi). Luego el fosfato puede ser cuantificado colorimétricamente con un kit (Phosphate Assay Kit) que contiene verde de malaquita y molibdato de amonio [Rodrigues y col, 2002] (Figura 4).

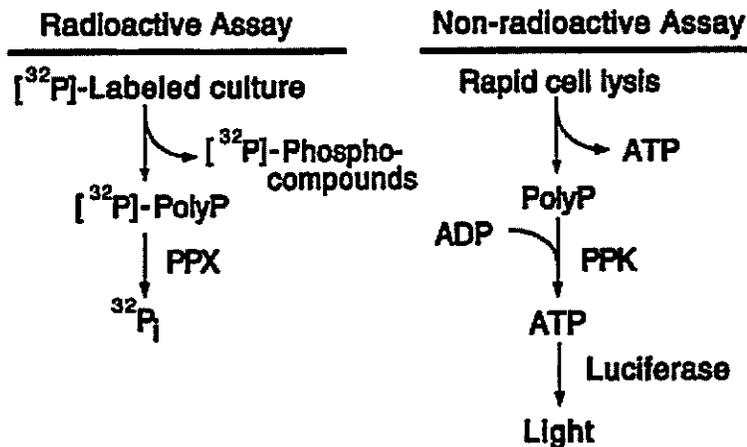


Figura 4: Esquema de dos metodologías de medición de polifosfatos. En A, ensayo radioactivo, y en B, ensayo no radioactivo basado en la medición por luciferasa. [Modificado de Ault-Riché & Kornberg, 1999].

En el año 2008 Aschar-Sobbi y colaboradores publicaron un método altamente sensible y cuantitativo de medición de polifosfatos inorgánicos mediante un ensayo basado en el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), utilizado comúnmente para detectar el ADN. Al igual que en el DNA, el DAPI se une a las cargas negativas del fosfato del poliP, pero cambiando su longitud de onda de emisión de 475 a 525 nm, lo que permite el uso de DAPI para la detección de poliP *in vitro* e *in vivo* sin interferir con el DNA ni tampoco con el ATP [Aschar-Sobbi y col., 2008]. La emisión de la fluorescencia de DAPI libre y DAPI-DNA son mínimos en esta longitud de onda, haciendo que la señal de DAPI-poliP sea altamente específica y esencialmente independiente de la presencia de ADN (Figura 5) [Kulakova y col., 2011].

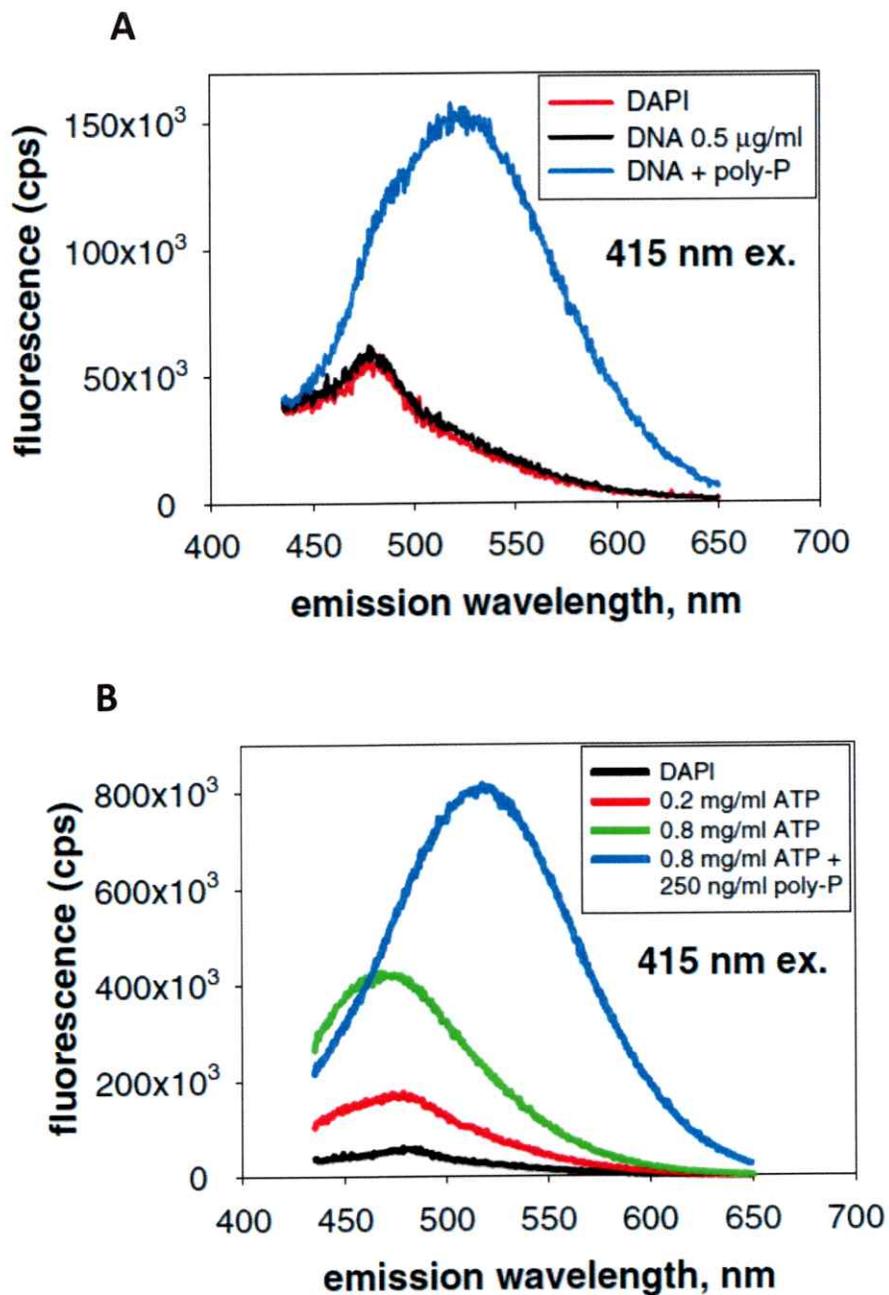


Figura 5: Espectro de emisión y Excitación de DAPI en presencia y ausencia de polyP, ATP y DNA. En **A**, efecto de la adición de ATP en la fluorescencia de DAPI. En **B**, espectro de emisión para 10 μM DAPI en ausencia y presencia DNA y DNA + polyP. En ambos casos la fluorescencia fue excitada a 415nm. [Aschar-Sobbi y col., 2008].

3.5 Polifosfatos inorgánicos y virulencia en organismos entero-patógenos.

Se han reportado ortólogos de la enzima PPK1 con un alto grado de conservación en diversas especies de procariontes, incluidas alrededor de 20 especies de microorganismos patógenos. La relación de los poliP con la virulencia se descubrió principalmente en trabajos donde se realizaron mutantes del gen *ppk1*, donde principalmente se reportaba atenuación de la virulencia y disminución de la producción de factores de virulencia que causan daño en los hospederos. Como ejemplo, podemos destacar al mutante $\Delta ppk1$ de *Salmonella sp.*, que presenta una reducción drástica en la tolerancia a pH ácido, en su invasividad en tejido epitelial y en su sobrevivencia en macrófagos [Kim y col., 2002]. Por otra parte, en *Shigella flexneri*, una delección en el gen $\Delta ppk1$ lleva a una baja en variados factores que influyen en su virulencia, incluyendo la invasividad en células epiteliales [Kim y col., 2002]. Además de los ejemplos anteriores, existen estudios similares en mutantes de *Vibrio cholerae* [Ogawa y col., 2000], *Neisseria meningitidis* [Tinsley & Gotschlich, 1995], *Mycobacterium tuberculosis* [Sureka y col., 2007], *Helicobacter pylori* [Ayraud y col., 2005] y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [Rashid y col., 2000], que refuerzan la idea de que el metabolismo de los polifosfatos es una pieza fundamental en mecanismos de virulencia y patogénesis bacteriana. Otro antecedente que es importante destacar, es la escasa presencia de ortólogos del gen *ppk1* en eucariontes superiores, ya que solamente ha sido reportada en la ameba social *Dictyostelium discoideum* y la levadura *Candida humicola* [Zhang y col., 2005].

3.6 La síntesis de los poliP como blanco para el diseño de nuevos antimicrobianos.

Debido a los problemas mundiales con el sobreuso de antibióticos y la alta resistencia a los mismos mostrados por los patógenos microbianos, en la actualidad el paradigma de los antibióticos ha sido cambiado por estrategias que buscan no matar a la

bacteria sino por el contrario, buscar blancos celulares que no sean esenciales para el crecimiento microbiano pero que sí afecten la producción de factores de virulencia de los patógenos (Cegelski y col, 2008). Teniendo en cuenta las características del metabolismo de los poliP que no es esencial para el crecimiento bacteriano pero sí para la regulación de procesos celulares relacionados con la virulencia, es que se ha propuesto al metabolismo de los poliP y particularmente a la síntesis de los poliP por la PPK1 como un blanco atractivo para el diseño de nuevos compuestos antivirulencia. A partir de lo anterior, surge la idea de investigar y desarrollar un mecanismo que utilice la enzima PPK1 como blanco molecular alternativo a los antibióticos convencionales actualmente utilizados, considerando que estos son poco específicos y, por ende, tienen un efecto negativo sobre los procariontes comensales propios del microbioma natural de los pacientes, además de las consecuencias de la sobre-medicación con respecto a la aparición de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (MDR, multi-drug resistant) que amenazan cada vez más la efectividad de dichos tratamientos [Tzeng & Kornberg, 1998, Chávez y col., 2011, Saha & Verma, 2013].

Un paso fundamental para el estudio antes mencionado es lograr desarrollar un protocolo tanto de purificación de la enzima *PPK1* de *E. coli* en su forma activa, como una metodología High-throughput de medición de actividad de la proteína, con el fin de llevar a cabo ensayos de inhibición, *in vitro* e *in vivo*, de la actividad de dicho blanco molecular frente a moléculas químicas diseñadas para unir al sitio activo de la PPK1, lo que permitirá avanzar en la búsqueda de los posibles tratamientos alternativos antes mencionados.

3.7 Objetivos

Objetivo General:

Desarrollo de un protocolo de sobreexpresión y purificación, y una metodología enzimática a gran escala (high-throughput) para medir la actividad de la proteína polifosfato quinasa 1, (PPK1) de *Escherichia coli*.

Objetivos específicos:

- I. Sintetizar y clonar el gen *ppk1* de *Escherichia coli* en el vector de expresión pET-TEV
- II. Sobreexpresar la proteína polifosfato kinasa 1 (PPK1) de *E. coli* con cola de histidina, bajo un promotor inducible.
- III. Purificar la enzima PPK1 de *E.coli* mediante cromatografía de afinidad.
- IV. Estudiar la actividad de la proteína purificada mediante ensayos de fluorescencia High-throughput con DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol.
- V. Ensayar la actividad 1 inhibitoria de compuestos químicos diseñados para unirse al sitio activo de la enzima PPK.

4. Materiales y Métodos:

Tabla 1. Reactivos utilizados éste estudio

Insumos	Proveedor
LB, LB Agar	Difco TM
Bradford (Coomassie Plus TM), Coctel de inhibidor de proteasas sin EDTA, TCEP	Thermo Fisher SCIENTIFIC
Gel Red	Biotium (CA-EEUU)
Glicina, Tween-20, SDS	Calbiochem (NJ-EEUU)
HisTrap TM HP	GE Healthcare (Sweden)
Acrilamida, BSA	Invitrogen (CA-EEUU)
Partidores	IDT (IO-EEUU)
LE Agarosa SeaKem [®]	Lonza (Basel-Switzerland)
Azul de Coomassie R-250, Tris, MgCl ₂ , NaCl, Imidazol	Merck (NJ-EEUU)
Fast digest HindII y NdeI	New England Biolabs [®] Inc (MA-EEUU)
E.Z.N.A (miniprep kit)	OMEGA Bio-tek (GA-EEUU)
β -mercapto-etanol, standard M.W., PoliP, Creatina quinasa, Creatina Fosfato	Sigma (MO-EEUU)
IPTG, Kanamicina, Ampicilina	US Biological (MA-EEUU)
Glicerol	Winkler (STGO-CHILE)
DAPI	Life Technologies

4.1 Síntesis y clonación del gen *ppk1* de *Escherichia coli*:

4.1.1 Cepas bacterianas

Para la mantención y amplificación de los plásmidos, se utilizó la cepa JM109 de *Escherichia coli*. Como vector de expresión de la proteína *EcPPK1* se utilizó la cepa de *E.coli* BL21 AI, que posee una regulación fina de la expresión, gracias a que contiene el promotor regulable por la inducción de L-arabinosa, río arriba del gen de la RNA polimerasa T7. Adicionalmente esta cepa bacteriana posee el gen de resistencia a tetraciclina.

4.1.2 Síntesis del gen *Ecppk1* y plásmidos utilizados.

Para el clonamiento, se utilizó el gen *ppk1* de *Escherichia coli*, de 2067 pb, sintetizado por GeneScript, entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* (CATATG) y *HindIII* (AAGCTT) en el plásmido pUC57, vector de 2710 pb que contiene un marcador de selección por resistencia al antibiótico Ampicilina (*amp^r*) (50µg/ml), además del promotor del fago T7.

Con vistas a añadirle una cola de histidina y tener una expresión más regulada del gen *ppk1* de *E. coli* se clonó el gen *Ecppk* en el plásmido pET-TEV. Este vector de expresión tiene un tamaño aproximado de 6000 pb. En su estructura posee el marcador de selección *kan^r* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (50 µg/ml). Contiene además el promotor del bacteriófago T7, que es reconocido por la T7-RNA polimerasa, enzima inducible por isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) en cepas de *E. coli* BL21 AI. Como señalamos este vector también posee la secuencia codificante para una cola de seis aminoácidos de histidina (His-tag), seguido del sitio de corte para la proteasa TEV. Rio abajo contiene los sitios de corte para las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI* entre otras.

Se realizó la digestión de los plásmidos pET-TEV y PUC57-*Ecppk1* con las endonucleasas *HindIII* y *NdeI* (Fast Digest. Bio Labs). Las reacciones con la doble digestión fueron incubadas a 37 ° C, por 2 horas en tubos de PCR y su mix de reacción fue el siguiente: 1,5 µg de DNA plasmidial, buffer 10X, 1 µl *HindIII*, 1 µl *NdeI* y agua nanopura hasta completar un volumen final de 50 µl. Sólo el vector pET-TEV fue digerido secuencialmente, primero con *HindIII* y luego con *NdeI*, para evitar su recircularización.y se obtuvieron dos bandas de 2,1kb y 6kb aproximadamente.



4.1.3 Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa.

Luego de realizar las digestiones, se procedió a comprobarlas mediante un gel de agarosa. Se tomó un volumen con alrededor de 100 ng de DNA plasmidial y se mezcló en proporción 5:1 (volumen) con amortiguador de carga 6 X loading dye de Fermentas. En paralelo se preparó un gel de agarosa de 1 % p/v en solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y se cargaron las muestras además del estándar de peso molecular de 1 Kpb (BioLabs). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 80V (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad). Al cabo de aproximadamente 60 minutos, el gel se puso a teñir en una solución de 45 µl de Gel Red (Biotium), 15 ml de NaCl 1M estéril y 135 ml de agua nanopura. Finalmente, los geles se observaron sobre un transiluminador (FOTO/UV 21®, FOTODYNE® Inc.) y se fotografiaron.

4.1.4 Purificación de DNA plasmidial desde gel de agarosa

Una vez comprobadas las correctas digestiones plasmidiales mediante electroforesis, se cortó la porción del gel de agarosa que contenía las bandas con a) gen *Ecppk1* (a partir de la digestión del plásmido pUC57 y b) el plásmido pET-TEV abierto, y se realizó la purificación del DNA desde el gel mediante el kit de Gene Clean UltraClean™ 15 MO BIO Laboratories, Inc. de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La concentración del DNA obtenido en el Gene Clean fue menor que la mínima para una ligación efectiva por lo que fue necesario concentrar 50 veces mediante un concentrador SpeedVac™.

Una vez purificadas y concentradas las bandas de interés, se procedió a realizar la ligación de ambas muestras, el gen de interés *Ecppk1*, y el vector linealizado pET-TEV, se ligaron en tubos estériles de PCR con el kit Rapid Ligation (a razón de 5:1 respectivamente,

según el tamaño de cada fragmento y las instrucciones del fabricante). Las reacciones de ligación se mantuvieron a temperatura ambiente toda la noche. La composición del mix de ligación fue: 1 µl / 55,25 ng del inserto, 1 µl / 30 ng del vector linealizado, 1 µl / 3 U de T4 Ligasa (Invitrogen), 4 µl de Buffer 2x rapid ligation y 3 µl de agua nanopura. Finalmente se visualizó el resultado de la ligación mediante una electroforesis en gel de agarosa. El plásmido resultante de la ligación fue llamado pET- His6-TEV-*Ecppk1*.

4.1.5 Comprobación del plásmido obtenido por cultivo en placas.

A modo de comprobación, se transformaron células de la cepa de *E. coli* JM109 y se sembraron en placas de LB-Agar con kanamicina 50 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias sobrevivientes para guardar como stock a -80°C en glicerol 50%.

4.1.6 Purificación de ADN plasmidial (miniprep).

Para la amplificación del plásmido, una colonia aislada fue elegida al azar, picada desde la placa LB agar de células *EcJM109* transformadas con el plásmido de interés y se inoculó en 10 ml de LB con el antibiótico apropiado para cada plásmido. Se incubó toda la noche a 37 ° C con agitación. El ADN plasmidial de los clones recombinantes se purificó (colectando las células por centrifugación) mediante el uso del kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Se eluyó el ADN plasmidial con 50 µl de agua nanopura. Se determinó la concentración del plásmido eluido mediante medición con Nanofotometro IMPLEN NanoPhotometer®. Se estimó el grado de pureza del DNA, mediante la relación Abs_{260}/Abs_{280} .

4.1.7 Comprobación del plásmido obtenido por PCR de colonias.

A partir de las colonias seleccionadas, se realizó un PCR de colonias con los partidores universales externos del promotor y terminador del fago T7.

La reacción de amplificación por PCR se realizó en un volumen de 50 μ l. Se eligieron al azar 5 colonias de cada placa con los clones transformados, cada colonia se picó bajo esterilidad con un mondadientes estéril y se rayó en el fondo de un tubo estéril de PCR. La mezcla de reacción contenía 5 μ l de buffer PCR 10X, la colonia rayada en el fondo del tubo que contiene la muestra de ADN a amplificar, 1 μ l de ambos cebadores universales T7 (1 μ M finales para cada uno); 0,5 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs), 10 mM, 0,5 μ l (1,5 U) de la enzima Pfu Ultra II Fusion HS DNA®, y por último 47 μ l de agua nanopura estéril. Las reacciones de amplificación del ADN se realizaron en un termociclador Axygen® MaxyGene™ Thermal Cycler (Corning Incorporated). Se utilizó un protocolo que consistía de una etapa inicial de denaturación a 95 ° C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 20 segundos a 95 ° C; 20 segundos de alineación a la temperatura de apareamiento de los partidores utilizados (55 ° C) y una etapa de extensión a 72 ° C por 3 minutos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa esperándose una banda con migración electroforética cercana a los 2,2 Kb, correspondiente al tamaño del inserto *Ecppk1*.

4.1.8 Comprobación del plásmido obtenido por pruebas de digestión.

Se realizó la comprobación de los plásmidos obtenidos a partir del paso anterior de purificación a partir de colonias, mediante la digestión con enzimas de restricción (*NdeI* y *HindIII*), bajo las siguientes condiciones: 0,3 μ g de DNA plasmidial, 1 μ l de Buffer 10X, 0,2 μ l de *NdeI*, 0,2 μ l de *HindIII* y agua nanopura hasta completar un volumen final de 10 μ l.

Los productos de las digestiones se visualizaron en una electroforesis de gel de agarosa al 1%. De acuerdo con el tamaño de cada banda en el gel (en comparación con una estándar de ADN), se pudo determinar la presencia o ausencia de los fragmentos de ADN del tamaño esperado.

4.1.9 Comprobación del plásmido obtenido por secuenciación.

Para comprobar la ausencia de mutaciones en el plásmido obtenido, se envió a secuenciar los fragmentos del gen clonado, que pasaron satisfactoriamente los pasos anteriores de comprobación. Macrogen Inc. Fue el encargado de la secuenciación por el Método de Sanger. Se utilizaron los primers universales para el promotor terminador del fago T7 (Rio arriba y rio abajo del gen *Ecppk1* en el plásmido pET- His6-TEV-*Ecppk1*). Además se utilizaron primers diseñados para la región interna del gen con la herramienta Blast del NCBI, Tabla 2. Los cromatogramas obtenidos se analizaron con el programa Geneious v4.8 (Drummond y cols., 2009).

Tabla 2. Partidores utilizados en la secuenciación plasmidial.

Cebador Secuencia de oligonucleótido (5' - 3')	
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 reverse	TAATACGACTCACTATAGGG
Forward interno	CATTGCCATCGTTACTGGCG
Reverse interno	CGAAACCTTTGCTGTCCTGC

4.2 Transformación bacteriana

4.2.1 Obtención de células *Escherichia coli* BL21 (AI) quimiocompetentes

Se preparó un cultivo overnight a 37°C, de 10ml de cultivo LB fresco, inoculado con una colonia aislada de la cepa receptora BL21 AI. Una vez crecido, se separó el cultivo en alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga pre enfriados en hielo. Se centrifugó a temperatura ambiente por 30 s a 13000 g. inmediatamente se resuspendió el pellet en 1 ml de MgCl₂ 0,1 M y se centrifugó nuevamente por 30 s a 13000 g. Luego se resuspendió el pellet en 1ml de TG salino frío: 75 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂ y glicerol 15% v/v. Se mantuvo la suspensión en hielo por 10 min y luego se centrifugó por 30s a 13000g a temperatura ambiente. Acto seguido, el pellet se resuspendió en 200 µM de TG salino frío y se guardó a -80°C hasta su uso.

4.2.2 Transformación de células *Escherichia coli* BL21 (AI) quimiocompetentes, con los plásmidos pUC57-*Ecppk1* y pET- His6-TEV-*Ecppk1*.

Alícuotas de 100 µl de células quimiocompetentes fueron se transfirieron a tubos de microcentrífuga previamente enfriados en hielo. Se mezcló con 100-1000 ng de DNA plasmidial, además de un control con agua nanopura. La mezcla se incubó por 15 minutos en hielo. Inmediatamente se calentó por 2 minutos a 37°C y luego se transfirió a un tubo de recuperación de poliestireno de 5 ml con 500 µl de LB fresco, y se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron en placas LB-Agar el antibiótico correspondiente.

4.3 Sobreexpresión de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*.

4.3.1 Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala.

Se transformaron células quimiocompetentes de la cepa BL21Ai de *Escherichia coli* con los plásmidos: pET- His6-TEV-*Ecppk1* y pUC57-*Ecppk1*. Se escogieron 2 colonias de cada uno de los transformantes y se procedió a realizar la inducción, para lo que se crecieron pre-inóculos *over-night* a 37°C de los dos clones de cada plásmido en triplicado. Luego, se re-inocularon al 1% en matraces de 100 ml con 20 ml. de medio de cultivo LB fresco suplementado con los respectivos antibióticos y se incubaron a 37°C hasta alcanzar la D.O. de 0,5- 0,6. Llegado este punto, se dividieron en matraces de 50 ml con 10 ml de cultivo cada uno, los que se dividieron en "inducido" y "sin inducir". Los matraces para inducir, se complementaron con 1 mM de IPTG y L-arabinosa al 0,4%, luego se incubaron por 4 horas a 3 diferentes temperaturas: 25°, 28° y 37° Celsius. Los matraces sin inducir se dejaron el mismo tiempo de incubación a las correspondientes temperaturas.

Pasado el tiempo de inducción, los cultivos se centrifugaron a 6000 RPM por 10 minutos a 4°C. El pellet celular se almacenó a -20°C.

4.3.2 Extracción de las proteínas solubles mediante B-PER®

La extracción de las proteínas solubles desde las células bacterianas se llevó a cabo con el reactivo B-PER® (Bacterial Protein Extraction Reagents, Thermo Scientific) según el protocolo del fabricante: Se agregaron 4 ml de reactivo B-PER® por cada gramo de pellet celular. Luego se agregó 2 µl de lisozima y 2 µl de DNasal por cada 1 ml de B-PER® y 10 µl de inhibidor de proteasas libre de EDTA previamente incubado a temperatura ambiente.

La mezcla se suplementó con glicerol al 20 % y 10 mM de β-mercaptoetanol para estabilizar las proteínas. Se incubó la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14 mil RPM por 15 minutos. Se separó el sobrenadante (fracción soluble de proteínas) del pellet correspondiente a la fracción insoluble de proteínas.

De cada pellet celular tratado con BPER®, se obtuvo una fracción soluble y una insoluble de proteínas, las cuales se observaron en un gel SDS-PAGE.

4.3.3 Extracción de proteínas solubles mediante sonicación.

Como método alternativo de lisis celular para la extracción de las proteínas solubles, se utilizó la sonicación. Para esto el pellet fue resuspendido en 3 volúmenes/g de peso seco en un buffer de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, glicerol al 10 % v/v, lisozima 250 µg/ml, β-mercaptoetanol 20 mM y agua nanopura, hasta completar el volumen final). La muestra fue incubada a 37 °C por 10 min, luego se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación (incubada en hielo e incubada a 37 °C) de 10 min cada uno. Las células se sonicaron dos minutos (30 seg pulso/ 30 seg descanso) y se agregó 25 µg/ml de DNasa y RNasa por 30 min a 4 °C. Luego de esto, se agregó 1 M de KCl, 10 mM de Na₂CO₃ y 0,05% Triton X-100 y se incubó por 2 horas a 4 °C, para luego sonicar por un minuto (30 seg pulso/ 30 seg descanso), con el fin de desprender la proteína desde la membrana celular. El lisado celular resultante fue centrifugado por 30 min a 14000 g obteniendo el sobrenadante, usado posteriormente para purificar la proteína recombinante de interés.

4.3.4 Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

Se prepararon geles al 8% de poliacrilamida. En el caso de las fracciones insolubles, una muestra de aproximadamente 0,03 gr se mezclaron con 22,5 µl de agua nanopura con 7,5 µl de buffer de carga 4x (poner composición) se calentaron por 15 minutos a 95°C, y se centrifugó por 20 segundos a 14000 g. Se cargaron 10 µl del sobrenadante en el gel de SDS-PAGE.

En el caso de las fracciones solubles de proteínas y la solución de proteína purificada, se midió la concentración con el método de Lowry, y se tomaron 20 µg de proteína, las que se mezclaron con agua nanopura hasta alcanzar 7,5 µl y se añadieron 2,5 µl de buffer de carga 4x. El gel se corrió con una fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad a un voltaje de 80 V para la porción del gel de concentrado (stacking), y a 150 V en el caso de la porción de gel de corrida (running). Finalmente el gel fue teñido por 30 minutos en agitación en una solución de Azul de Coomasie 250 (Sigma).

Posteriormente el gel se incubó en una solución que contiene 10% metanol y 10% ácido acético por aproximadamente 12 horas en agitación, hasta lograr el contraste de bandas deseado. Para determinar la masa molecular relativa de las bandas se utilizó el estándar molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Luego de elegidos los clones que mejor expresaron la proteína en la fracción soluble, se tomaron y se almacenaron mezclados con glicerol 50 % v/v a -80 °C.

4.3.5 Análisis de la enzima EcPPK1 por Western Blot

Para detectar la expresión de la proteína y su correcta fusión a la cola de histidina se realizó la detección de la proteína ECPPK1 recombinante mediante el conjugado de Nickel-HRP, HisDetector™ (KPL).

Se transfirieron las bandas de un gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa. Se usó buffer de transferencia, 25 Mm Tris, 1,92 M glicina, 20% v/v metanol, pH 8,4. La transferencia se realizó por 2 h a 300 mA a 4°C.

Transcurrida la transferencia, se realizó el revelado de las bandas. Para esto se lavó la membrana de nitrocelulosa 2 veces por 10 minutos en agitación con buffer TBS: Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM. Se incubó por 1 h en una solución de proteína de leche al 3 % en buffer TBS, a temperatura ambiente y con agitación. Luego se hicieron 3 lavados por 10

minutos a temperatura ambiente y agitación, en buffer TBS-T: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM y Tween 20 al 0,05 %. Finalmente se incubó, por 1 hora a temperatura ambiente y agitación, la membrana junto con el conjugado de Níquel- ácido nitrilotriacético (NTA) 1:1000 en TBS-T e inmediatamente se lavó 3 veces por 10 minutos en agitación y temperatura ambiente con Buffer TBS-T.

La visualización de las bandas transferidas a la membrana se hizo con una solución de 18 mg de 4-cloro-1-naftol, en 6 ml de metanol, junto con 24mL de TBS y 60 µl de peróxido de hidrógeno al 30 % v/v.

4.3.6 Ensayos de sobreexpresión a gran escala

El clon elegido fue inducido a 28 °C por 4 horas en un matraz de 2 litros con 500 ml de medio de cultivo LB fresco con kanamicina 50 µg/ml inoculado al 1% con un cultivo en D.O. 0,5-0,6. Pasado el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 6000 RPM por 10 minutos a 4 °C. El pellet celular se almacenó a -20 °C.

4.4 Purificación de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*.

4.4.1 Purificación de la proteína PPK1

La proteína PPK1 se purificó a partir de la fracción soluble extraída con el reactivo B-PER®. Este procedimiento se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, utilizando columnas Ni Sepharose™ High Performance HisTrap™ HP de GE Healthcare, de 5 ml, donde se inyectó con jeringa, 15 ml de agua nanopura, luego 25ml de Buffer A (de equilibrio): 20 mM Tris-HCl pH 8,2, imidazol 20 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, glicerol al 20% Tween 20 al 0,05%, sulfato de amonio 50 mM y MgCl₂ 10 mM. Se aplicó la fracción soluble de proteínas y luego se pasaron otros 50 ml de Buffer A, acto

seguido, se inyectó el buffer de elución (Buffer B) a 3 concentraciones distintas sucesivamente: 25 mM de Buffer de elución con imidazol 80 mM, luego 10 ml de buffer de elución con 200 mM de imidazol, y finalmente 25 ml de buffer de elución con 600 mM de imidazol.

La elución con 200 mM de imidazol fue concentrada 10 veces en columnas de concentración (AMICON, MERCK) y seleccionada para los ensayos de actividad.

La proteína fue dializada contra un Buffer de diálisis 20 mM Tris-HCl pH 8,2, NaCl 150 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol al 20%, Tween 20 al 0,05%, sulfato de amonio 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM (Tabla 3) overnight en agitación.

Tabla 3. Composición buffers utilizados en la purificación de *EcPPK1*. Composición del buffer de equilibrio (Buffer A), los buffers de elución (B1, B2 Y B3) y el buffer de diálisis

Reactivo	Buffer A	Buffer B1	Buffer B2	Buffer B3	Buffer de diálisis
Tris-HCl Ph 8,2	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM	150 mM
β -Mercaptoetanol	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
glicerol	20%	20%	20%	20%	20%
Tween 20 0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
sulfato de amonio	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
$MgCl_2$	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Imidazol	20 mM	80 mM	200 mM	600 mM	-

4.4.2 Corte del Tag de histidina con proteasa TEV

Para obtener la proteína nativa, es decir, sin la cola de histidina se incubó la proteína purificada con proteasa TEV (fusionada desde fábrica a un Tag de histidinas) 0,4 µg/µl en la razón 10:1. El cálculo se hizo a partir de la cantidad de PPK1 contenida en 200 µl dependiendo de la concentración calculada. Se sumó TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) 1 mM. Y se incubó a 37 °C por 2 horas. Luego, se procedió a eliminar la proteasa TEV unida a la cola de histidina, pasando la solución por una columna Ni Sepharose™ High Performance HisTrap™ HP de GE: se inyectó con jeringa, 15 ml de agua nanopura, luego 25 ml de Buffer A (de equilibrio). La mezcla incubada se aplicó y se recuperó el frente correspondiente a la proteína sin cola. Finalmente se siguió el proceso de elución para eliminar la proteasa TEV y el tag escindido, unidos a la columna.

4.5 Actividad enzimática de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*

4.5.1 Determinación de las condiciones óptimas para la medición de fluorescencia de polifosfatos inorgánicos utilizando DAPI

Se realizaron pruebas preliminares para determinar: el buffer óptimo, la concentración de DAPI, la sensibilidad del equipo y el rango lineal de medición de la curva patrón de los polifosfatos. Para establecer la composición del buffer, primeramente se ensayaron varias concentraciones conocidas de polifosfatos (0, 16 y 32 µg/ml) con Hepes-KOH pH 7,2, KCl 150 mM, una mezcla de ambos y solo con agua. También se ensayaron 5 concentraciones de de DAPI (Tabla 4). Además de lo anterior, se hicieron pruebas con las distintas opciones de sensibilidad del equipo Sinergy HT de BIOTEK® y se realizaron las curvas de calibración a distintas concentración de polifosfatos de cadena 700 y 45 (SIGMA), Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones probadas para la medición de PoliP. En la tabla, las condiciones probadas para la puesta a punto de la medición, por fluorescencia, de polifosfatos inorgánicos unidos a DAPI. En negrita las condiciones seleccionadas para la metodología final.

Variable		Condición
Rango lineal de poliP-DAPI [μg PoliP]		0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8 y 24,6
Concentración DAPI [μM]		0.5, 10, 20, 50 y 200
Buffer de medición		HEPES-KOH pH 7,2, KCl 150mM HEPES-KOH pH 7,2 KCl 150mM Agua
Sensibilidad equipo (ganancia)	Synergy HT	150, 170, 190, 210, 230 , 250
	Synergy II	70, 100, 120
PoliP estándar		45, 700

4.5.2 Ensayo discontinuo de la actividad enzimática PPK1 mediante DAPI

Con la proteína purificada, se realizaron ensayos *in vitro* para medir la actividad de la enzima. Se probaron distintas condiciones de reacción, dentro de las cuales está: distintas concentraciones de ATP y MgCl_2 (en relación 1:5 ATP: MgCl_2). Además se probó con y sin sistema de regeneración de ATP (creatina quinasa y creatina fosfato), con y sin cebador (poliP₄₅) este último hidrolizado y sin hidrolizar. Se probó con la proteína dializada

o sin dializar. Finalmente se probó con 3 métodos de detención de reacción distintos: poniendo la muestra en frío, aplicando ácido perclórico, agregando EDTA 20 mM y frío, y solo agregando DAPI, Tabla 5.

El mix de reacción con las condiciones finalmente escogidas quedó de la siguiente manera: 50 mM de HEPES-KOH pH 7.2, MgCl₂ 5 mM, 1 µg/µl de poliP de largo 45, sulfato de amonio 50 mM, ATP 1 mM, creatina fosfato 2 mM y creatina quinasa 20 µg/ml y 16,7 µg/ml de la proteína EcPPK1, todo en un volumen final de 300 µl. Se tomó una alícuota de 20 µl en el tiempo cero, y luego se incubó a 37°C en un termobloque, donde se extrajeron alícuotas de 20 µl a los 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos.

Tabla 5. Condiciones ensayadas para la actividad PPK1 mediante DAPI. En la tabla, las condiciones ensayadas para obtener la catálisis efectiva de la enzima recombinante ECPPK1 in vitro. En negrita las condiciones finalmente seleccionadas

Variable	Condición
Sustrato: ATP	0 mM; 0,01 mM; 0,02 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,5 mM; 1 mM ; 2 mM; 5 mM y 10 mM
Cofactor: MgCl ₂	0; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 1,25 mM; 5 mM ; 10 mM; 25 mM; y 50 mM
Cebador: PoliP	Si / no Hidrolizado/ sin hidrolizar
Sistema de regeneración: Creatina quinasa/creatina fosfato	Si / no
Detención	Incubación a -20°C Ácido perclórico 3,5% EDTA + Frío (-20°C) DAPI 50 µM
Diálisis	Si / no

4.5.3 Hidrolisis y electroforesis en gel de poli(acrilamida) para Polifosfatos

Se realizó una hidrólisis de polifosfatos para obtener polifosfatos de cadena corta y probarlos como cebador de la proteína:

- 1 Precalentar por 3 minutos a 95 ° C 20 μ L de poliP a 2 mM
- 2 Precalentar por 3 minutos a 95 ° C 20 μ L de HCl a 40 mM
- 3 Mezclar poliP y HCl precalentados y mantener a 95 °C por 1 minuto
- 4 Detener la reacción con hielo y añadiendo 2 μ L de 1 M Tris-HCl a pH 7,4
- 5 Neutralizar con 250 μ L Hepes-KOH pH 7,0 40 mM y llevando a 1 mL final con agua nanopura. El ph final queda en 6,5

Para visualizar los poliP hidrolizados se utilizaron geles de poli(acrilamida) para poliP. Se prepararon geles de 0,75 mm de espesor. Los geles fueron hechos al 10% de poli(acrilamida), se prepararon de la siguiente forma: 2,5 ml acrilamida mix 40%, 1 ml Buffer TBE 10X, 0,1 ml PSA 10%, 8 μ l Temed y 6,4 ml de agua nanopura

Las muestras de poliP hidrolizado se mezclaron en proporción 3:1 con un buffer de carga poliP 4X, se cargaron aproximadamente 15 μ g de poliP. En cada pocillo del gel se cargó 10 μ l de las muestras. Los geles se corrieron de forma continua (80 mV con una fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad) en buffer TBE 1X, hasta que el buffer de carga alcanzara la parte posterior del gel. Posteriormente, los geles se visualizaron con la tinción de Azul de Toluidina donde se tiñeron durante aproximadamente 1 hora y se destiñeron en agua hasta obtener un contraste claro de las bandas. La masa molecular relativa de los poliP se determinó a partir de su migración electroforética en relación con muestras de poliP (SIGMA) sin hidrolizar de tamaños conocidos cargado generalmente en los primeros pocillos del gel.

El buffer TBE 10X se preparó de la siguiente forma: 1,1 M Tris-HCl pH 8,3, 900 mM de ácido bórico, 25 mM EDTA. La tinción de azul de toluidina consistió en 0,5% v/v azul de toluidina, 25% v/v metanol, 5% v/v glicerol y 5% v/v ácido acético. Finalmente, el buffer de carga de polifosfatos se preparó con TBE 1X, 10% p/v de sacarosa y 0,05% p/v de azul de bromofenol.

4.5.4 Cuantificación de los polifosfatos

Una vez extraídas, las alícuotas se mezclaron en placas de 96 pocillos negras no tratadas, con 20 mM HEPES-KOH pH 7.2, KCl 150 mM y DAPI 50 mM en un volumen final de 200 μ l.

La medición de los polifosfatos producto de la reacción enzimática se midió mediante la fluorescencia, excitando con un filtro de 400/10 nm y midiendo la emisión a 540/25 nm en un fluorímetro Sinergy II de BIOTEK®.

Se realizaron curvas de calibración a distintas concentraciones de polifosfatos de cadena 45 (Sigma-Aldrich).

4.5.5 Cálculo de la producción de poliP a partir de la fluorescencia medida.

El cálculo de la cantidad de producto obtenido, se realizó a partir de una curva patrón promedio, efectuada con cantidades crecientes conocidas de polifosfato inorgánico de cadenas de 45 monómeros de ortofosfato (Sigma-Aldrich). La medición se realizó en placas negras de 96 pocillos con un volumen de 200 μ l que contenía: Hepes KOH 20 mM pH 7,2, KCl 150mM, DAPI 50 μ M, PoliP entre 0 y 6,4 μ g y agua nanopura hasta el volumen final de 200 μ l. La medición se realizó excitando con un filtro de 400/10 nm y midiendo la emisión a 540/25 nm en un fluorímetro Sinergy II de BIOTEK®. Se graficaron los datos de fluorescencia entregados por el software de uso del equipo (Gen5) versus la cantidad de polifosfatos medidos y se obtuvo la ecuación de la recta en triplicado, por lo que los valores

(3) de fluorescencia para cada concentración de polifosfatos se promedió. A cada valor promedio se le restó el primer punto, es decir la medición promedio para la fluorescencia emitida con 0 µg de poliP, considerado el blanco de la medición. Con estos datos se procedió a graficar la curva promedio (Figura 6), de la cual se obtuvo la siguiente ecuación de la recta (ecuación [1]):

$$y = 9000000x - 5371 \quad [1]$$

donde despejamos y obtenemos:

$$x = \frac{y+5371}{9000000} \quad [2]$$

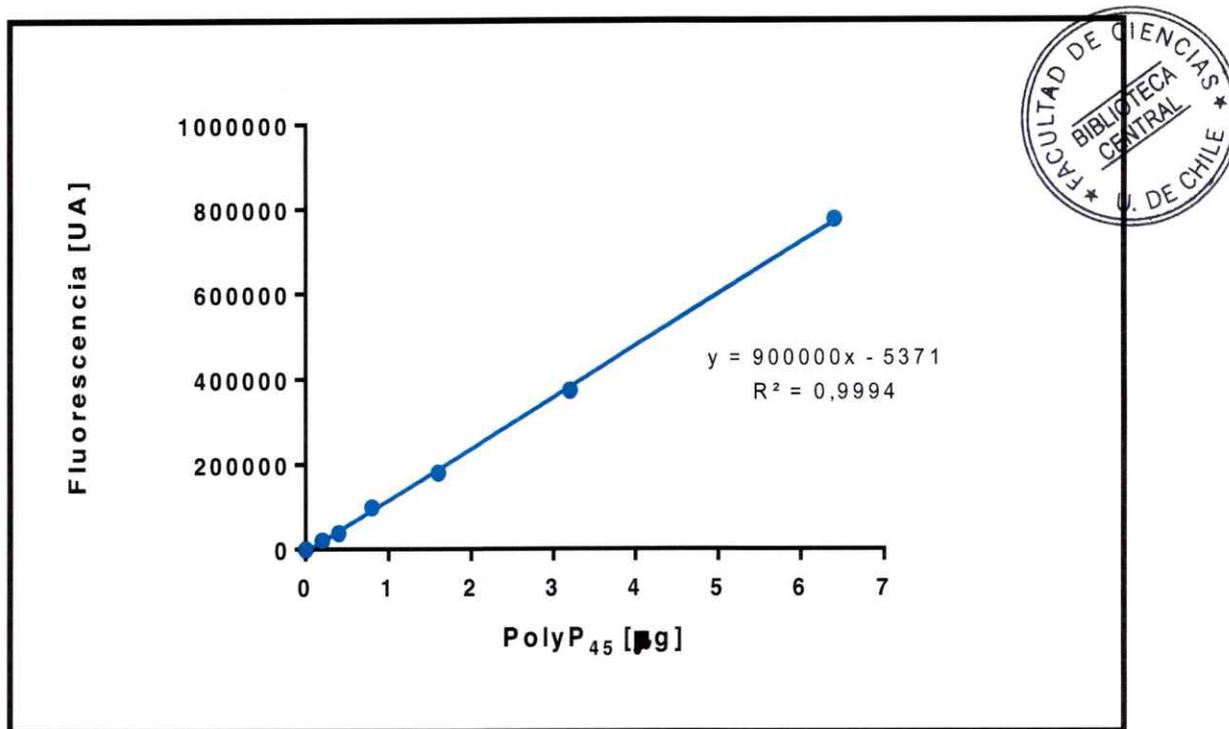


Figura 6: Curva de calibración. La imagen muestra la curva realizada a partir de la medición de fluorescencia de las distintas cantidades de polifosfato indicadas, bajo las condiciones definitivas del ensayo. La ecuación obtenida es la utilizada para la conversión de unidades de fluorescencia a cantidad de producto en µg.

El tratamiento de los datos de fluorescencia en unidades arbitrarias [UA] entregados por el equipo, consistió en los siguientes cálculos para llevarlos a μg de poliP. Para cada concentración de sustrato se utilizaron 3 o 4 réplicas técnicas promediadas.

En primer lugar, a cada valor de la cinética se le restó el valor promedio obtenido en el punto cero de cada medición. Acto seguido, se aplicó la ecuación de la recta de la curva de calibración mencionada anteriormente. Luego, dado que las mediciones se realizaron con alícuotas de $20\mu\text{l}$ extraídas del batch de reacción de $300\mu\text{l}$, se multiplicó por un factor de dilución de 15, obteniendo el valor de μg de producto, de la reacción de $300\mu\text{l}$, en el tiempo.

Finalmente obtenemos la siguiente ecuación:

$$poliP = \left[\left(\frac{UF - B}{9000000} + 5371 \right) * 15 \right] \quad [3]$$

Donde:

UF: es el valor de unidades de fluorescencia

B : es el blanco de la medición

15: es el factor de dilución

5371 y 9000000: se obtienen de la ecuación [2]

4.5.6 Cinética enzimática y determinación de la actividad específica de la proteína PPK1.

Se realizaron reacciones independientes para cada tiempo de determinación de la cantidad de producto (sección 2.4.2), en cuatriplicado, para 10 concentraciones de sustrato ATP: 0 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM. Se midió la fluorescencia de la reacción y se transformó a valores de μg de polifosfato como se indica en la sección anterior. Con estos valores, se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) para obtener los gráficos de cantidad de producto promedio,

en función del tiempo de reacción. De dichas curvas se obtuvieron las pendientes para los primeros 10 minutos (rango lineal) y se graficaron versus la concentración de sustrato, obteniendo el gráfico de velocidad inicial para la enzima PPK1 de *E. coli*. Los parámetros cinéticos, K_m , K_i y V_{max} , fueron entregados por el programa GraphPad, al ajustar los datos a una curva no hiperbólica de inhibición por sustrato (ecuación 4)

$$Y = \frac{V_{max} * X}{K_m + X * \left(1 + \frac{X}{K_i}\right)} \quad [4]$$

A partir del valor de velocidad máxima y del valor de concentración de enzima total utilizada, $[E]_T$, obtenemos la constante de recambio k_{cat} según la siguiente ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} \quad [5]$$

Para calcular la actividad específica, se utilizó cociente del valor de la pendiente antes mencionada (en $\mu\text{mol}/\text{min}$) y los miligramos de enzima utilizados en la reacción, obteniendo los micro moles de producto obtenido por cada miligramo de proteína purificada, por minuto.

4.6 Compuestos inhibidores de la PPK1

4.6.1 Prueba de los compuestos inhibidores para la proteína PPK1 de *Escherichia coli*

Se utilizaron 39 compuestos previamente seleccionados a partir de la base de datos del *NCI Open chemical library*, mediante un screening virtual, para realizar pruebas preliminares de inhibición enzimática para la PPK1.

El mix de reacción se realizó mezclando 50 mM de HEPES-KOH pH 7.2, MgCl₂ 5 mM, sulfato de amonio 50 mM, ATP 1 mM, creatina fosfato 2 mM y creatina quinasa 20 µg/ml, 1 µg/ml PoliP₄₅ [Ahn & Kornberg, 1990] 20 µM de inhibidor y 16,7 µg/ml de la proteína EcPPK1, todo en un volumen final de 30 µl. Se incubó en un termociclador AXYGEN MAXIGEN a 37 °C por 60 minutos. Se agregó DAPI 50µM, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la fluorescencia emitida

Resultados:

5.1 Síntesis y clonación del gen *ppk1* de *Escherichia coli*:

5.1.1 Construcción del plásmido pET- His6-TEV-Ecppk1

El gen *Ecppk1* fue sintetizado y posteriormente clonado en el vector de expresión pUC57 por la empresa GeneScript,. Dado que la purificación de una proteína nativa es más laboriosa que si ésta está fusionada a una cola de residuos de histidina, se propuso clonar el gen de interés en un vector que tuviera la secuencia codificante para una cola de seis aminoácidos de histidina (His-tag) para su purificación por cromatografía de afinidad.

Esa estrategia permite tanto la expresión con el tag como en estado nativo pues el mismo puede ser eliminado mediante la proteasa TEV adjunto al sitio de múltiple clonamiento (MCS). Para esto se utilizó el vector pET-TEV. Se realizó la digestión de los plásmidos pET-TEV y pUC57-Ecppk1 con las endonucleasas *HindIII* y *NdeI* y se obtuvieron exitosamente dos bandas de 2,1kb y 6kb aproximados, visualizadas en un gel de agarosa (Figura 7).

Luego, se purificó el DNA de las bandas de interés, correspondientes al gen *ppk1* (2,1 kb) y al plásmido pET abierto (6 kb aprox) usando un kit de purificación de ADN desde geles de agarosa. Con el resultado del paso anterior, se procedió a la ligación de ambas muestras, el gen de interés *Ecppk1*, y el vector linealizado pET-TEV. Finalmente se visualizó el resultado de la ligación mediante una electroforesis en gel de agarosa. El plásmido resultante de la ligación fue llamado **pET- His6-TEV-Ecppk1**.

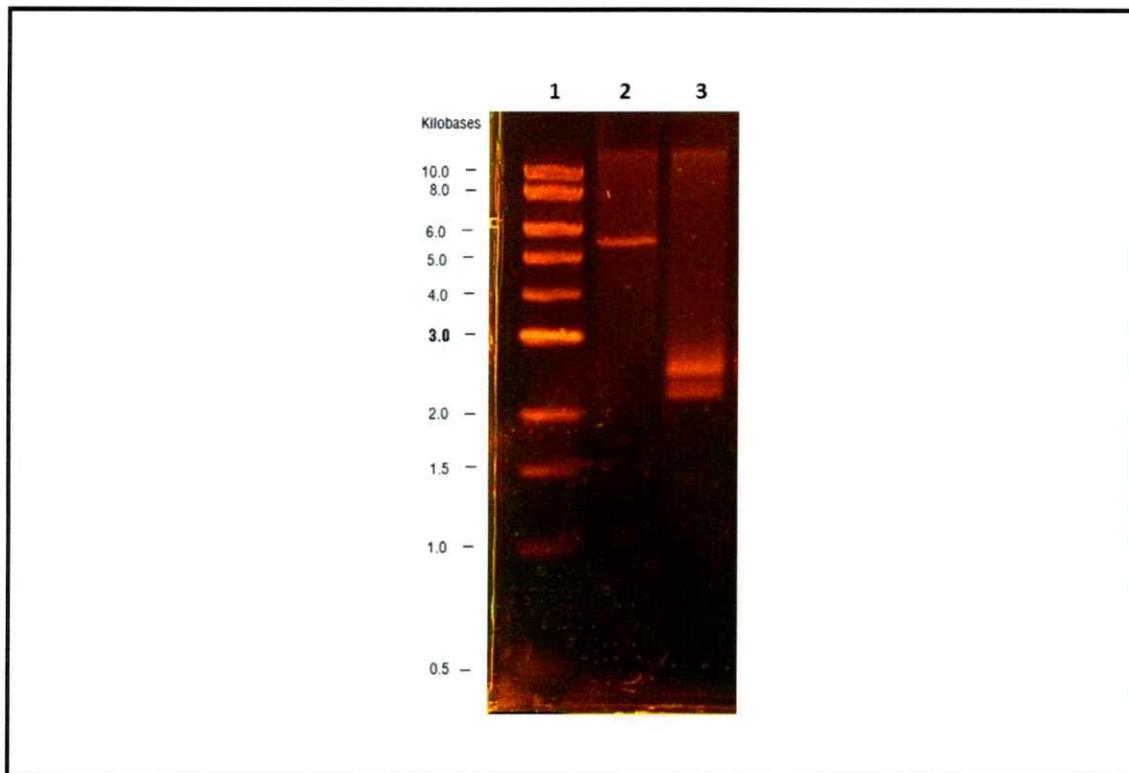


Figura 7. Digestión de los plásmidos pET-TEV y pUC57-Ecppk1 con las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI*. En la imagen se muestra el gel de agarosa con el resultado de la digestión de los plásmidos pET-TEV (carril 2) y pUC57-Ecppk1 (carril 3). En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 6 kilobases correspondiente al vector pET-TEV linealizado, mientras que en el carril 3 se ven dos bandas, una de aproximadamente 2,8 kilobases correspondiente al vector pUC57 sin inserto, y otra banda de aproximadamente 2,2 kilobases correspondiente al gen *Ecppk1*. En el carril 1 se muestra el patrón de DNA.

5.1.2. Comprobación del plásmido pET- His6-TEV-Ecppk1

Se realizaron cuatro pasos sucesivos de comprobación del plásmido de expresión clonado. En primer lugar se transformó la cepa JM109 de *Escherichia coli* y se sometió a la selección de los transformantes mediante el cultivo en placas de agar LB con antibiótico kanamicina. El segundo paso fue mediante la reacción de PCR en colonias transformantes con los partidores universales para el promotor y el terminador del fago T7, y visualizado en un gel de agarosa (Figura 8). El tercer paso de comprobación fue un ensayo de digestión doble del plásmido obtenido, con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* y su visualización en gel de agarosa (Figura 8) Para continuar con las comprobaciones se seleccionaron los clones 8 y 13, correspondientes a las bandas 4 y 6.

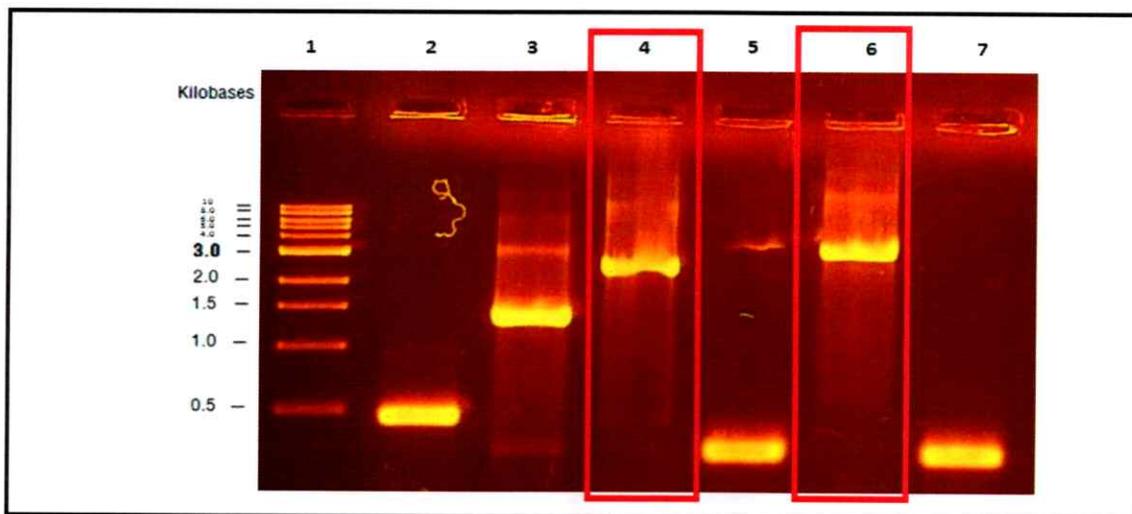


Figura 8. Comprobación del plásmido pET- His6-TEV-Ecppk1 por PCR de colonias. La imagen muestra el gel de agarosa con el resultado del PCR de 6 de las 10 colonias transformantes seleccionadas (carriles 2 al 7). En los carriles 4 y 6 las bandas de aproximadamente 2,1 kilobases corresponden a posibles productos del PCR deseados.

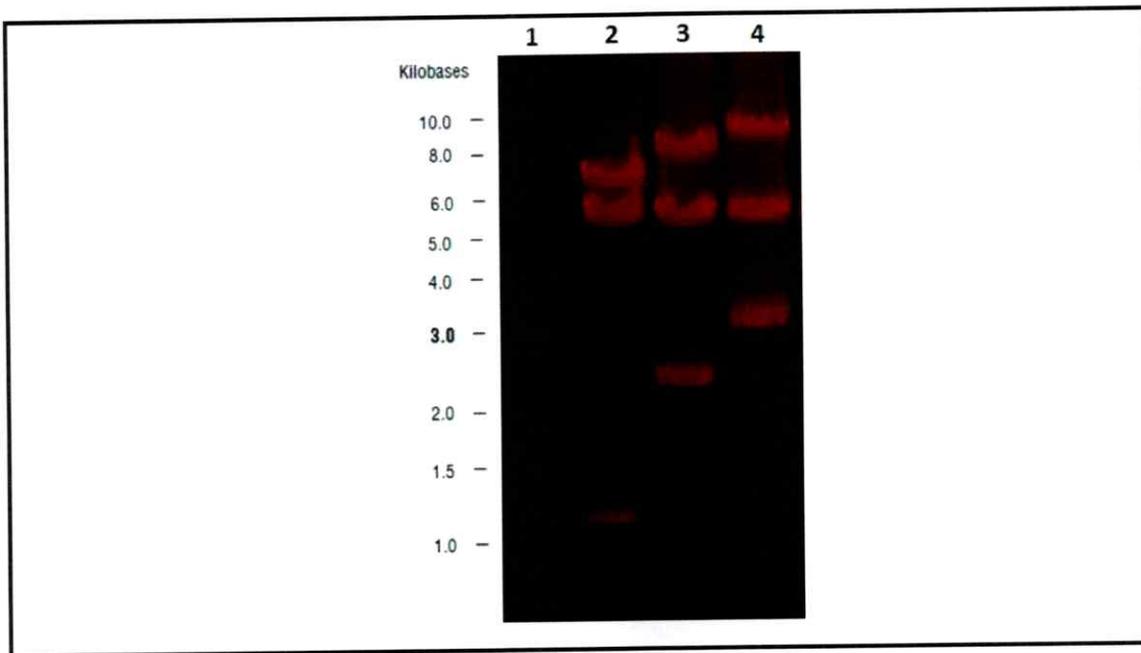


Figura 9 **Comprobación del plásmido pET- His6-TEV-Ecppk1 por prueba de digestión.** La imagen muestra parte de las digestiones realizadas transformantes exitosos (clones 8 y 13) (carriles 2 al 4), donde la muestra del carril 3 (clon 8) coincide con las bandas esperadas (~ 2,1 y ~ 6 kb). En el carril 1 se cargó el ladder de peso molecular, sin embargo la cantidad fue deficiente por lo que las marcas se ven muy tenue.

Como cuarto paso, se enviaron muestras del plásmido para la secuenciación del fragmento de interés, tanto con los promotores universales del promotor T7, como con partidores de la región interna del gen (Figura 10).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
1405 bits(3637)	0.0		Compositional matrix adjust.		688/688(100%)	688/688(100%)	0/688(0%)
Query	22		MGQEKLYIEKELSWLSFNERNVLQEAADKSNPLIERMRF LGIYSNNLDEFYKVRFAELKRR				81
Sbjct	3		MGQEKLYIEKELSWLSFNERNVLQEAADKSNPLIERMRF LGIYSNNLDEFYKVRFAELKRR				62
Query	82		IIISEEQGSNSHSRHLGKIQSRVLKADQEFDGLYNELLEMARNQIFLINERQLSVNQQ				141
Sbjct	63		IIISEEQGSNSHSRHLGKIQSRVLKADQEFDGLYNELLEMARNQIFLINERQLSVNQQ				122
Query	142		NWLRHYFKQYLRQHITPILINPDTDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTIRYALLEIPSDKVP				201
Sbjct	123		NWLRHYFKQYLRQHITPILINPDTDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTIRYALLEIPSDKVP				182
Query	202		RFVNLPEAPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMKMRDAEYDLVHEME				261
Sbjct	183		RFVNLPEAPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMKMRDAEYDLVHEME				242
Query	262		ASLME LMSSSLKQRLTAEPVRFVYQRDMPNALVEVLREKLTISRYSIVPGGRYHNFKDF				321
Sbjct	243		ASLME LMSSSLKQRLTAEPVRFVYQRDMPNALVEVLREKLTISRYSIVPGGRYHNFKDF				302
Query	322		INFPNVGKANLVNKLPLRLRHIWFDKAQFRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQA				381
Sbjct	303		INFPNVGKANLVNKLPLRLRHIWFDKAQFRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQA				362
Query	382		SFDPVLAIKINIYRVAKDSRIIDSMIAAHNGKKVTVVVELQARFDEEANIHWAKRLTE				441
Sbjct	363		SFDPVLAIKINIYRVAKDSRIIDSMIAAHNGKKVTVVVELQARFDEEANIHWAKRLTE				422
Query	442		AGVHVIFSAPGLKIHAKFLISRKENGVEVRYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADARI				501
Sbjct	423		AGVHVIFSAPGLKIHAKFLISRKENGVEVRYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADARI				482
Query	502		TNEVRRVFNFIENPYRPVTFDYL MVS PQNSRRLLYEMVDREIANAQQGLPSGITLKLNNL				561
Sbjct	483		TNEVRRVFNFIENPYRPVTFDYL MVS PQNSRRLLYEMVDREIANAQQGLPSGITLKLNNL				542
Query	562		VDKGLVDRLYAASSSGVPVNLVVRGMCSLIPNLEGISDNIRAIISIVDRYLEHDRVYIFEN				621
Sbjct	543		VDKGLVDRLYAASSSGVPVNLVVRGMCSLIPNLEGISDNIRAIISIVDRYLEHDRVYIFEN				602
Query	622		GGDKKVVYSSADWMTNRNIDYRIEVATPLLDPRKQVRVDIIDLFSDTVKARYIDKELSN				681
Sbjct	603		GGDKKVVYSSADWMTNRNIDYRIEVATPLLDPRKQVRVDIIDLFSDTVKARYIDKELSN				662
Query	682		RYVPRGNRRKVRQAQLAIDYIKSLEQPE	709			
Sbjct	663		RYVPRGNRRKVRQAQLAIDYIKSLEQPE	690			

Figura 10. Alineamiento entre secuencia aminoacídica derivada del gen *EcPPK1* secuenciado y la secuencia de la proteína *PPK1* de *Escherichia coli*. El alineamiento realizado con la herramienta BLASTp de la NCBI, muestra que no existen gaps y el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es de un 100%, por lo que confirmamos que no existen mutaciones en la proteína recombinante utilizada a lo largo de este trabajo.

5.2 Sobreexpresión de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*:

Luego de transformar la cepa de expresión BL21 (AI) de *Escherichia coli*, se escogieron, al azar, 2 colonias transformantes y se hicieron pruebas de inducción a 3 distintas temperaturas (25, 28 y 37°C) con cada una de las dos cepas transformadas con los vectores pET- His6-TEV-*Ecppk1* y pUC57.

Antes de la inducción, los cultivos se separaron en 2 partes iguales y solo una de ellas se indujo con 1 mM de IPTG y L-arabinosa al 0,4 % y la otra no recibió tratamiento (control sin inducir). Luego de las 4 horas de inducción, los cultivos se centrifugaron, los pellets se guardaron a -80 °C y posteriormente se extrajo la fracción soluble de las proteínas con B-PER®.

Para la elección del clon con mejor expresión de la enzima en la fracción soluble de proteínas se visualizó en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS PAGE) (Figura 11 y Figuras S1-S5) en contraste, se cargaron las fracciones solubles e insolubles de los cultivos inducidos y los no inducidos. Esto permitió la elección del clon con mejor producción de proteína soluble (Figura 11).

Este clon fue elegido ya que tiene una banda en el peso esperado más intensa en la fracción soluble de las proteínas. El clon elegido fue utilizado para la expresión a mayor escala y la consiguiente purificación por afinidad de la proteína.

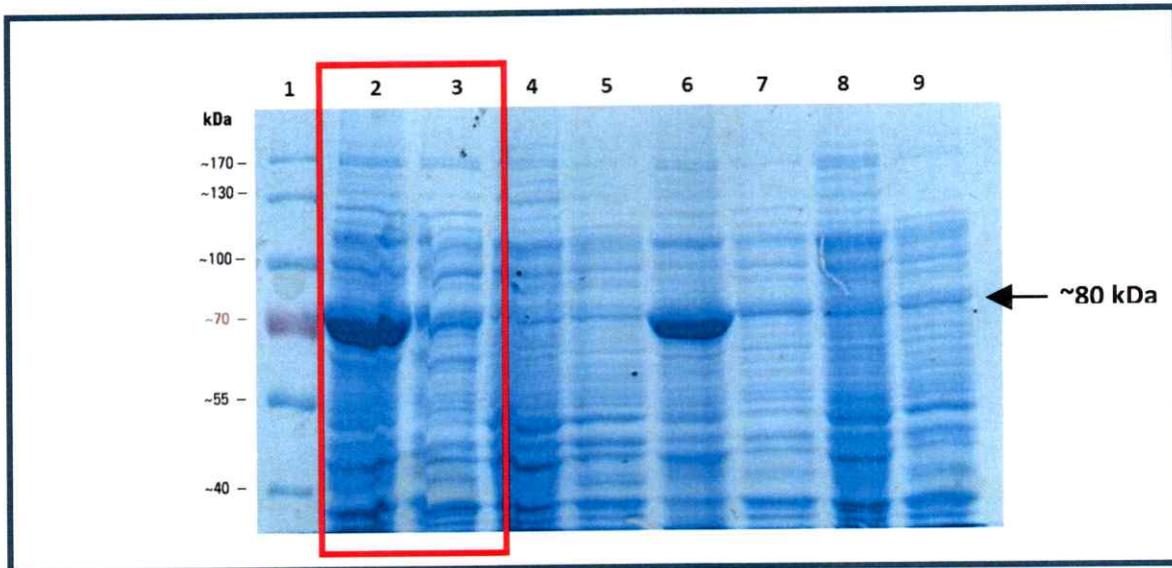


Figura 11: Sobreexpresión de la PPK1 a baja escala en *E. coli*. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pET- His6-TEV-*Ecppk1* (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 28°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (20 µg) (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas (20 µg) (Carriles 5 y 9). Dada la intensidad de banda en la fracción soluble, se eligió el clon I para proseguir con la purificación de la proteína. En esta sección solo se muestra el gel con el clon escogido, los otros 5 geles se encuentran en el Anexo 2 Figuras S1-S5.

5.3 Purificación de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*.

A partir de los ensayos de inducción a baja escala, se escogió uno de los clones transformados con el plásmido pET-His6-TEV-*Ecppk*. Dado que este vector de expresión posee la secuencia codificante para un His-tag río arriba del gen, la proteína PPK1 se expresa fusionada a una cola de 6 Histidinas, lo que permite la purificación por cromatografía de afinidad en matrices asociadas a níquel.

Para esto se utilizaron columnas Ni Sepharose™ High Performance HisTrap™ HP (GE, EEUU), de 5 ml y se realizó un protocolo por inyección con jeringa. A partir de la prueba de elución, se estableció la concentración óptima de imidazol para eluir la proteína (200 mM). En la Figura 12 se observa un gel de SDS-PAGE donde se contrasta en los carriles 2 y 3 las fracciones insolubles y solubles de los cultivos sin inducir, mientras que en los carriles 4 y 5 las fracciones insolubles y solubles respectivamente, de un cultivo inducido. A partir del extracto del carril 5 se obtuvo la purificación que se muestra en el carril 6, donde se observa una banda única y nítida de alrededor de 80 kDa según permite determinar el estándar del carril 1. Dado que la proteína cargada (alrededor de 2,5 mg) es muy poca, no podemos afirmar la purificación a homogeneidad.

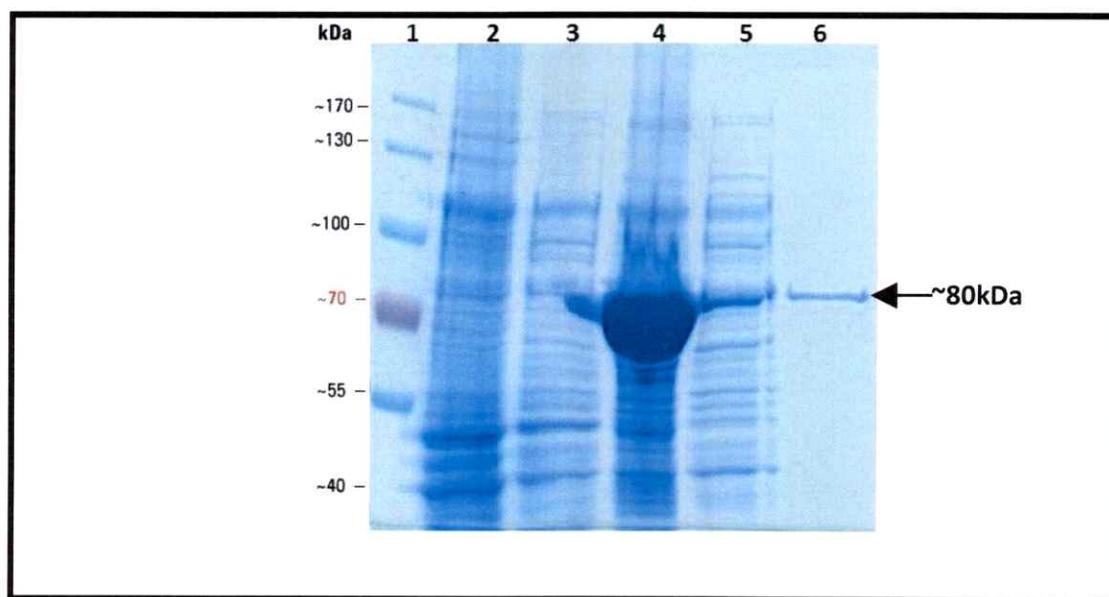


Figura 12. Gel SDS-PAGE para visualizar la purificación de la proteína EcPPK1. Se cargaron las fracciones insoluble y soluble de las proteínas de un cultivo transformado con el plásmido pET-His6-TEV-*Ecppk* sin inducir, (Carriles 2 y 3), la fracción insoluble y soluble de proteínas inducidas (Carriles 4 y 5) y la proteína EcPPK1 purificada por cromatografía de afinidad en matriz asociada a níquel (carril 6).

Para determinar la condición óptima de purificación en cuanto a la concentración de imidazol, agente responsable de la elución de la proteína, se realizó una prueba con distintas concentraciones del mismo en el buffer de elución. Se obtuvieron 6 fracciones de elución provenientes de las diferentes concentraciones de imidazol (100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM) y 20 μ l se visualizaron en un gel de SDS-PAGE (Figura 13A). Además, para verificar la correcta fusión de la PPK1 con la cola de 6 histidinas, se realizó la detección mediante el conjugado de Nickel-HRP, HisDetector™ (KPL) (Figura 13B).

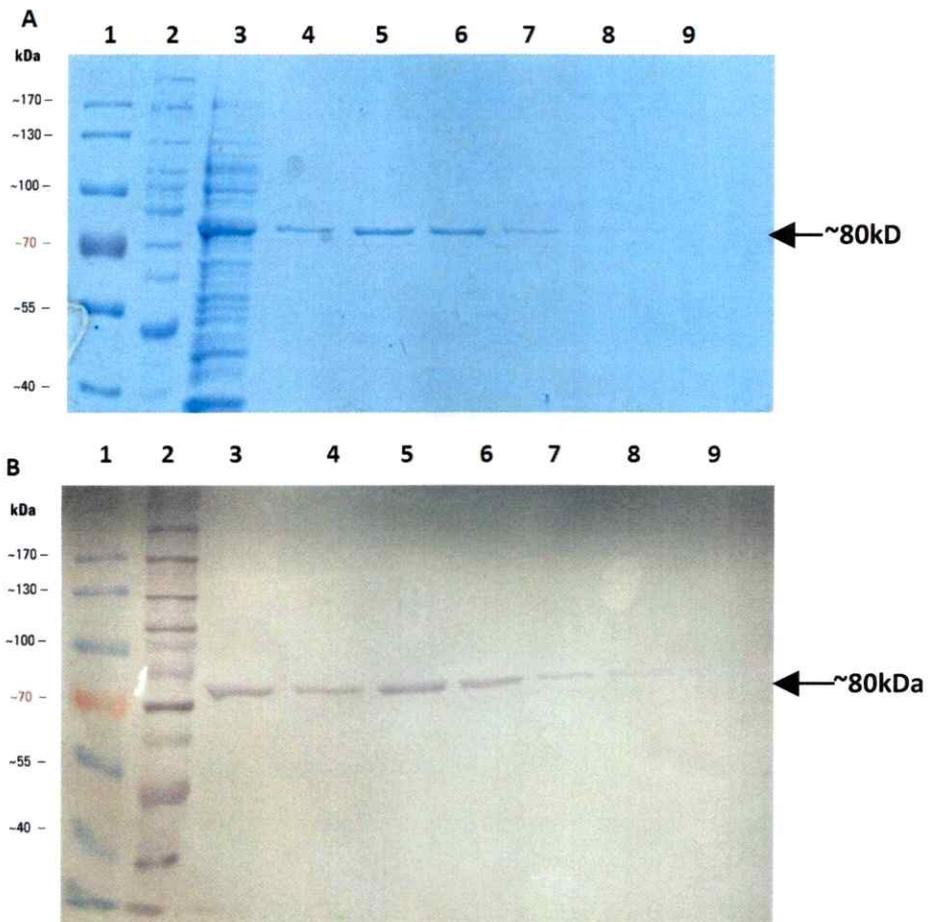


Figura 13. Prueba de elución para la purificación de la enzima EcPPK1. En el panel A se observa el gel de SDS-PAGE mientras que en el panel B se observa un Western Blot del mismo gel para detectar la presencia de proteínas con colas de histidina. En ambos casos, el carril 1 corresponde al estándar de proteínas, el carril 2 el estándar para Western Blot (Bench Marck), En el carril 3 la fracción soluble de proteínas antes de la purificación. Finalmente en los carriles 4, 5, 6, 7, 8 y 9 las eluciones con 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM de imidazol respectivamente.

5.4 Actividad enzimática de la proteína PPK1 de *Escherichia coli*:

5.4.1 Determinación de las condiciones óptimas para la medición de los polifosfatos inorgánicos mediante fluorescencia con DAPI

Se realizaron pruebas preliminares para determinar la mejor forma de cuantificar los poliP, uno de los productos de la reacción de la actividad enzimática de la proteína PPK1. Esto se realizó por medio de la medición de la fluorescencia emitida por el fluoróforo DAPI en complejo con los polifosfatos inorgánicos producidos por la enzima. Para esto se probaron diferentes condiciones como: 1) el buffer de reacción, 2) la concentración de DAPI, 3) la sensibilidad del equipo y 4) el rango lineal para la medición de los polifosfatos inorgánicos, todo lo anterior en pos de encontrar la mejor manera de cuantificación dentro de los parámetros descritos en la literatura.

En cuanto al buffer utilizado en la medición, se probó con i) HEPES-KOH pH 7,2, ii) KCl 150 mM, iii) una mezcla de HEPES-KOH pH 7,2 y KCl 150 mM y iv) solo agua nanopura. En la Figura 14 se observa que la mejor pendiente resultó de la medición con el buffer HEPES-KOH pH 7,2 y KCl 150Mm, por lo que este fue el escogido para las posteriores mediciones.

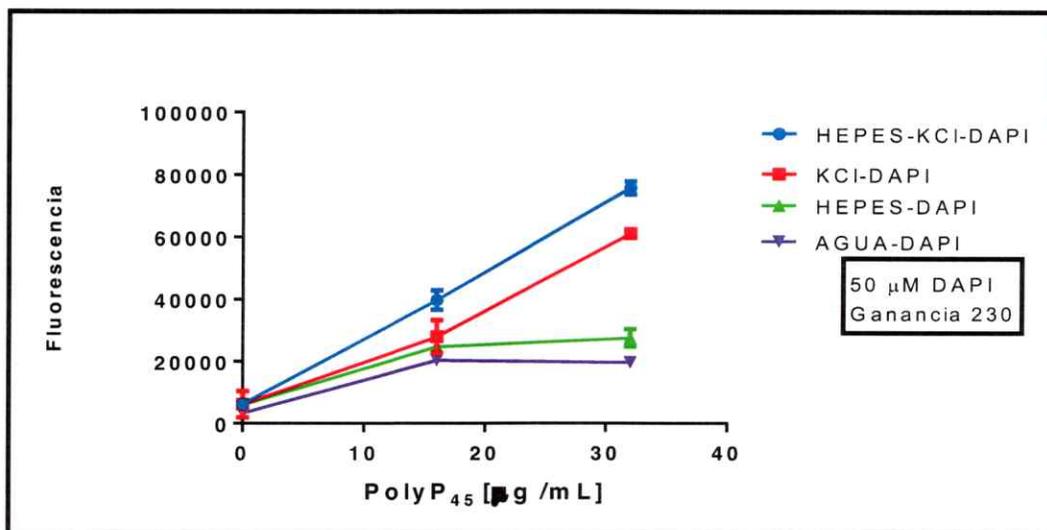


Figura 14. Cuantificación de los poliP mediante fluorescencia con DAPI en diferentes buffers de reacción. La gráfica muestra la medición de fluorescencia para 3 cantidades de polifosfatos unidos a DAPI 50 µM, en 4 condiciones distintas. La medición se realizó en un equipo Sinergy HT (Biotek) con una ganancia de 230 (sensibilidad).

Con vistas a realizar una curva patrón de la fluorescencia según la concentración de poliP, se utilizaron polifosfatos de largo de cadena 45 como patrones para observar el comportamiento poder determinar el rango lineal de medición de fluorescencia. Se utilizó un rango de concentración entre 0 y 25,6 µg de poliP (Figura 15 A) y como se observa en la Figura 15 B. El rango lineal de fluorescencia para la cuantificación de poliP en nuestras condiciones va desde los 0 hasta los 6,4µg de PoliP₄₅, por lo que definimos este rango como el óptimo para realizar las mediciones.

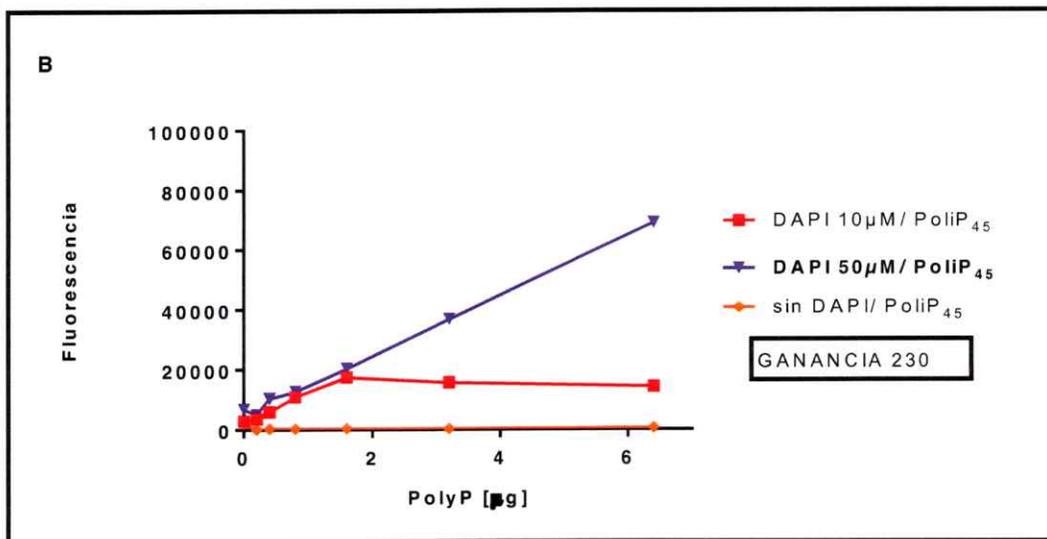
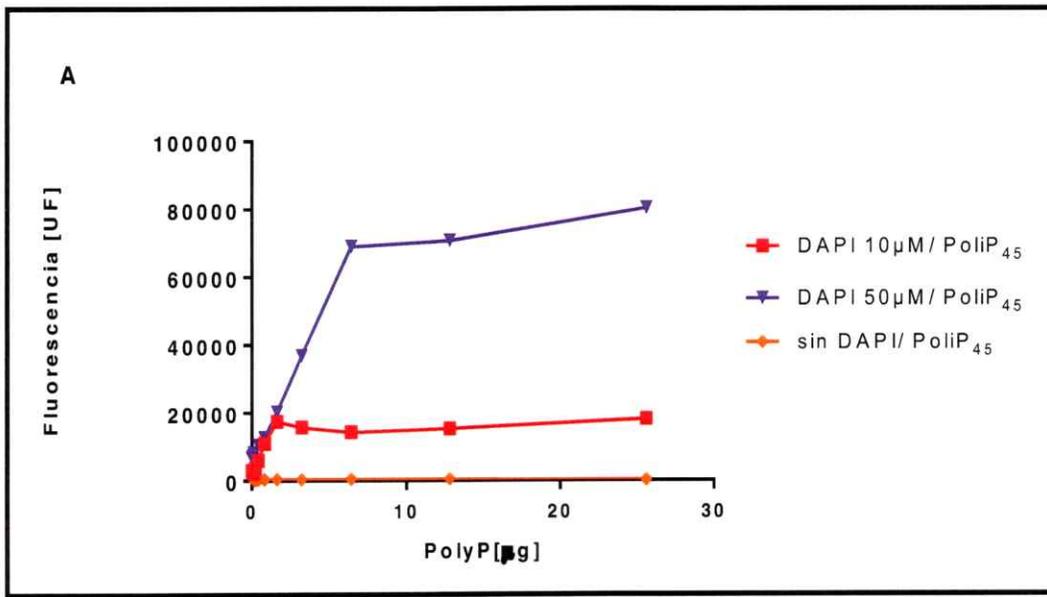


Figura 15. Curva patrón para la cuantificación de los poliP₄₅ mediante fluorescencia con DAPI.

La imagen muestra los resultados de la medición de fluorescencia para poliP de largo de cadena 45 en un rango de concentración creciente y unido a DAPI (10 y 50 µM). En A se muestran los valores de fluorescencia para el rango completo de concentraciones, mientras que en B se acota la gráfica al rango lineal de medición con poliP₄₅ y 50µM DAPI, condición seleccionada para las mediciones posteriores.

Se hicieron pruebas a distintas concentraciones de DAPI, para determinar la condición que nos entregará una curva lineal con pendiente alta, lo que nos entregaría una medición más sensible. Se probó la cuantificación de los poliP con 0,5 20, 50 y 200 μM de DAPI. Con estos resultados pudimos elegir la concentración 50 μM , ya que su curva es lineal, tiene la mayor pendiente y comparado con 200 μM usaremos 4 veces menos fluoróforo.

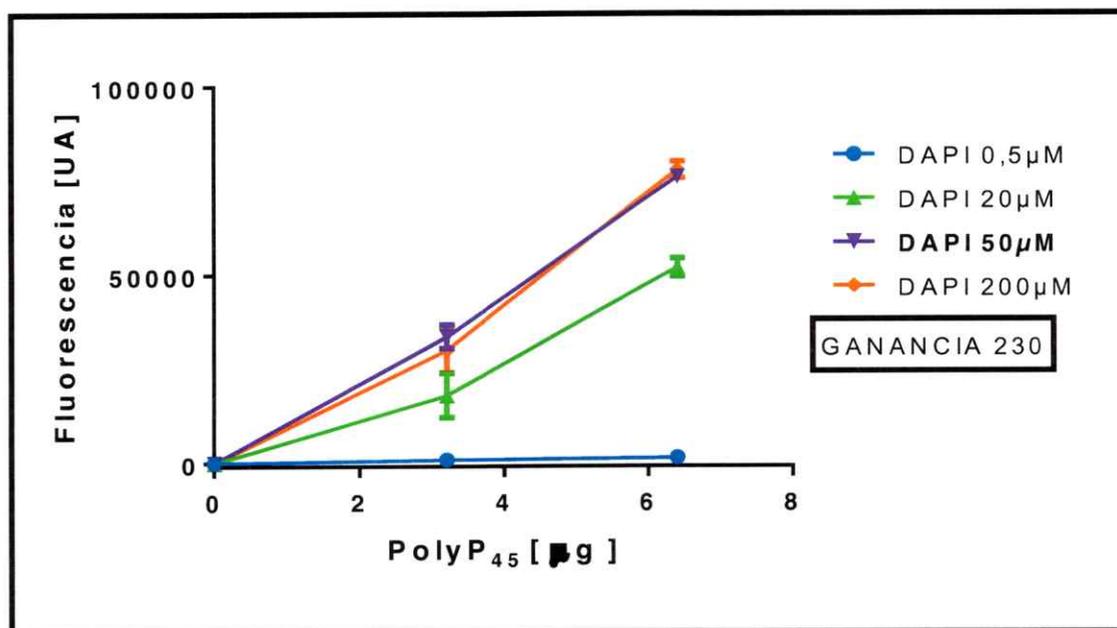


Figura 16. Prueba DAPI para medición de polifosfatos. La figura muestra la medición de fluorescencia de 3 cantidades crecientes de polifosfatos unidos a DAPI en 5 concentraciones distintas. Podemos notar que la curva que se ajusta mejor a nuestro criterio de selección es la obtenida para la medición con 50 μM de fluoróforo DAPI. La medición se realizó en un equipo Sinergy HT de Biotek con una ganancia de 230 (sensibilidad).

Siguiendo el proceso de puesta a punto de la metodología de medición por fluorescencia de los poliP mediante DAPI, se efectuaron mediciones para las mismas muestras ajustando la sensibilidad del equipo, obteniendo valores para cada una de las 6 ganancias utilizadas. Los resultados arrojados permiten concluir que la ganancia 230 para el equipo Synergy HT es la que mejor pendiente entrega antes de saturarse la lectura como se ve para la curva 250 (Figura 17).

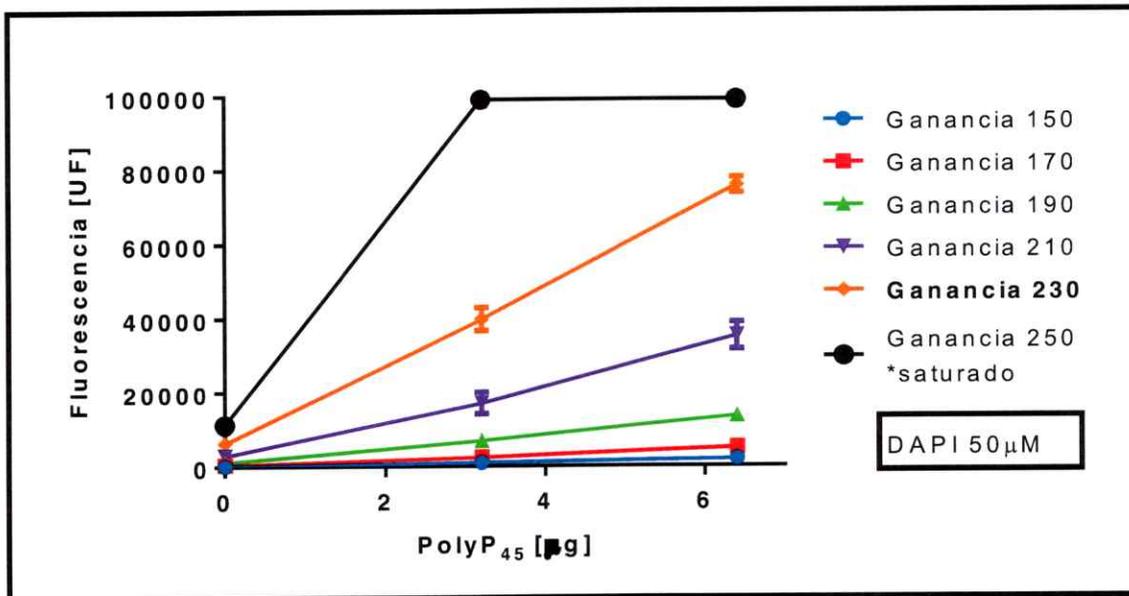


Figura 17: Medición de los poliP sintetizados con diferentes ganancias (sensibilidades) del equipo Synergy HT. El gráfico muestra la medición de fluorescencia, para la misma muestra ajustando el equipo en 6 sensibilidades distintas (ganancias). Vemos que la medición con la ganancia 230 entrega un rango mayor en la escala de valores de fluorescencia sin llegar a saturarse como en el caso de la ganancia 250.

5.4.2 Determinación de las condiciones óptimas para la actividad enzimática de la proteína PPK1 de *Escherichia coli* mediante fluorescencia con DAPI.

Una vez determinadas las condiciones para la cuantificación del producto de la reacción enzimática (poliP), se ensayaron diferentes condiciones de reacción para realizar el ensayo de actividad. Para esto se comenzó probando la proteína purificada de un extracto lisado con B-PER®, con 1 mM de ATP como sustrato. En nuestros ensayos preliminares comprobamos que tanto el uso de cebador (poliP de cadena pequeña) (Figura 18), como el de un sistema de regeneración de ATP son esenciales para la actividad enzimática (Figura 19).

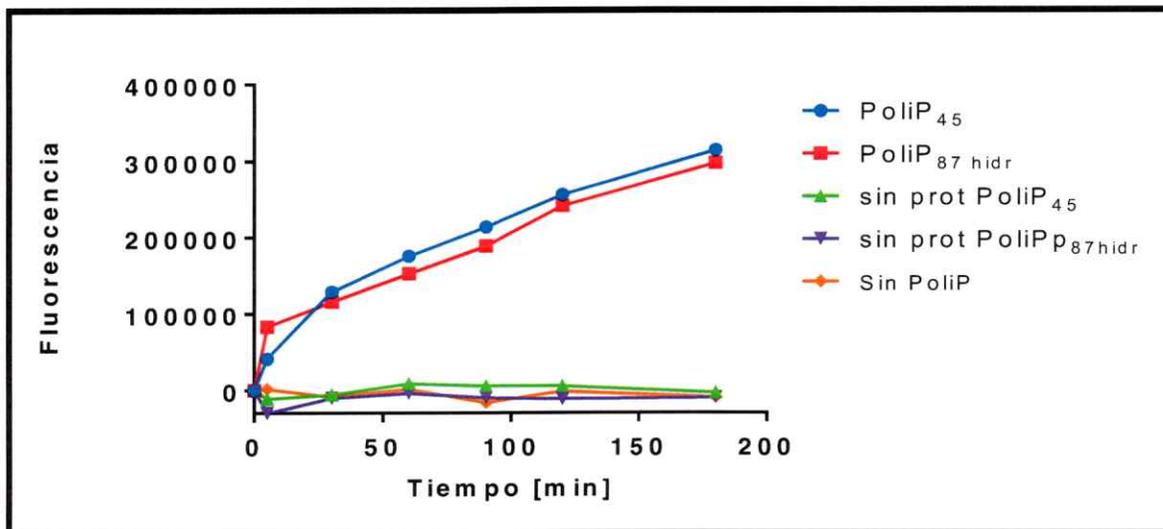


Figura 18: Medición de los poliP sintetizados con diferentes cebadores. Se muestra la medición de fluorescencia para la actividad de la proteína PPK1 utilizando como cebador un hidrolizado del poliP87 y un poliP 45 sin hidrolizar. Se observa una leve diferencia a favor del polifosfato 45, por lo que se selecciona para las mediciones posteriores. Además se observa que en ausencia de cebador, no se registra producción de poliP

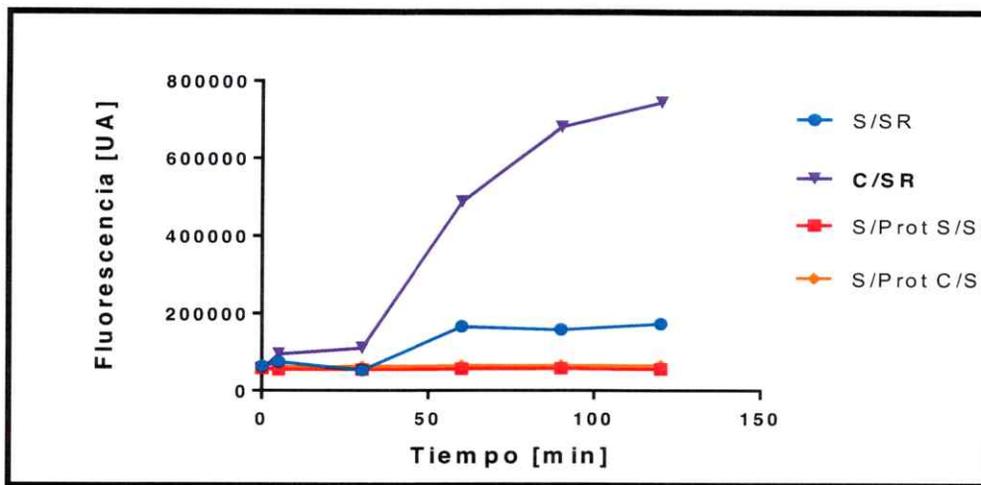


Figura 19: Medición de los poliP sintetizados en presencia de un sistema de regeneración de ATP. El gráfico muestra la medición de fluorescencia, en presencia y ausencia del sistema de regeneración de ATP creatina fosfato 2 mM y creatina quinasa 20 µg/ml

También probamos cortar la cola de histidina fusionada a la proteína. Como se aprecia en la Figura 20 la presencia del Tg de histidinas favorece la producción de poliP.

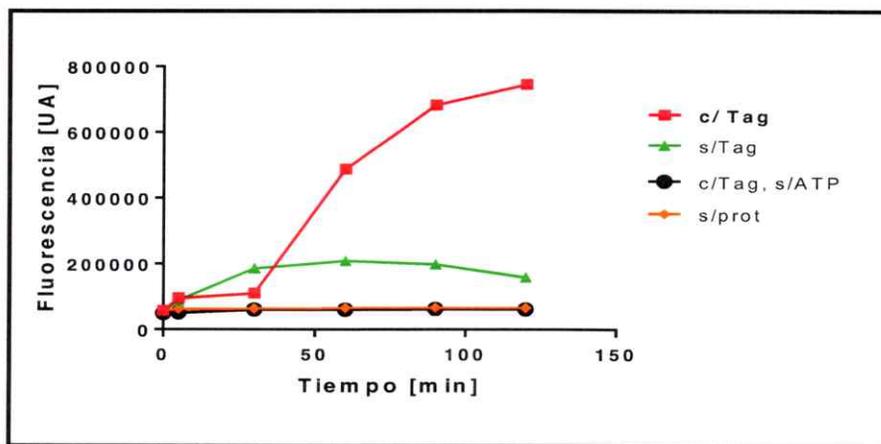


Figura 20: Medición de los poliP sintetizados con *Ec*PPK1 fusionada a Tag de histidina. En el gráfico se muestran los resultados de la medición de fluorescencia para las reacciones de actividad discontinua de la proteína PPK1 antes y después de cortar la cola de histidinas (Tag). El punto en el minuto 30 queda fuera del rango lineal, sin embargo los valores en tiempos mayores si indican, consistentemente, una mayor cantidad de producto, por ende la opción de la proteína fusionada con el Tag de histidina es la seleccionada para los siguientes ensayos.

Teniendo en cuenta que nuestro método de cuantificación de poliP es un ensayo discontinuo, se probaron distintos métodos para detener la reacción, dentro de los cuales se incluyó la detención con frío (-20°C), con EDTA 10 mM y frío (-20°C) y con ácido perclórico al 3,5% final. Las dos primeras no resultaron efectivas (datos no mostrados), mientras que el ácido detuvo la reacción sin embargo la incubación que resultaba del tiempo de detención hasta la medición, precipitaba el poliP disminuyendo la fluorescencia de la muestra (Figura 21). Por esto realizamos un ensayo continuo en cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro HP y en paralelo se realizó el ensayo discontinuo deteniendo con ácido perclórico. De esta prueba resultó, por sorpresa, que el DAPI es un inhibidor de la reacción, por lo que en los ensayos posteriores se detuvo la reacción utilizando el mismo fluoróforo a $50\mu\text{M}$.

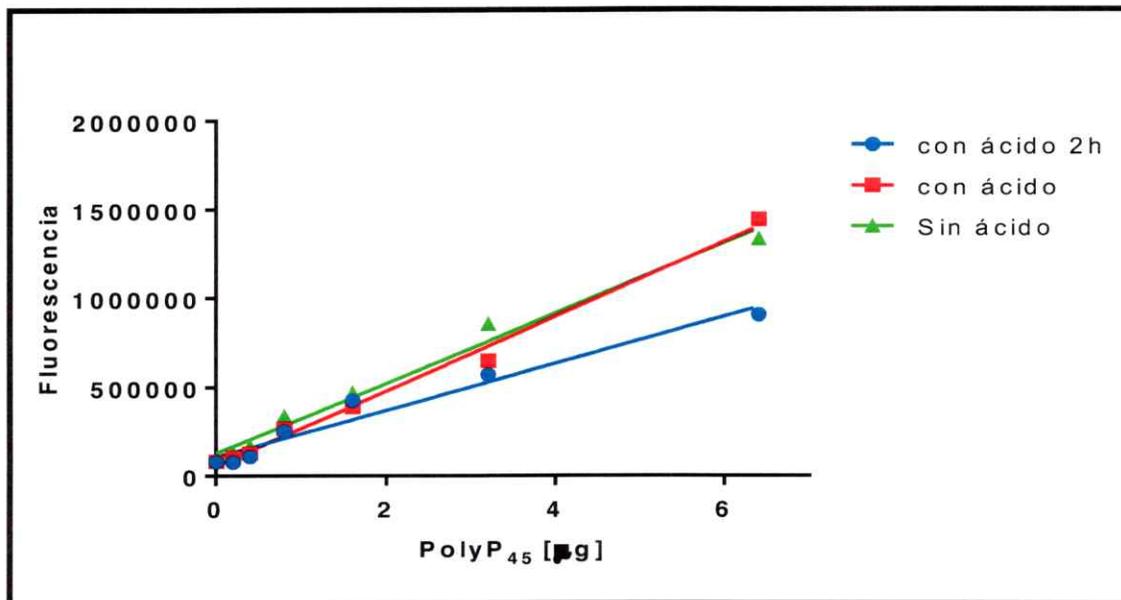


Figura 21: Medición de los poliP sintetizados luego de tratamiento con ácido perclórico. En el gráfico, resultados de la medición de la curva de calibración sin ácido, con ácido pre-incubado por 2 horas y con ácido agregado inmediatamente antes de medir. La Incubación con ácido disminuye la fluorescencia emitida.

Dado que la proteína era eluida con una concentración elevada de imidazol y esto podría afectar su estabilidad, se decidió someter a un protocolo de diálisis, lo que le permitió mantener la estabilidad al menos el doble de tiempo (3-4 días versus 2 semanas) (datos no mostrados). Otro aspecto a considerar según la literatura es la importancia de un cebador de poliP de cadena corta para una eficiente polimerización del poliP. Aunque en la literatura se recomienda moléculas de pentafofosatos (5 monómeros) lamentablemente comercialmente no hay disponible. Para intentar resolver este problema hidrolizamos el poliP para obtener cadenas más cortas del polímero. Utilizamos como sustrato poliP con largo de cadena 87 y 700. Se visualizó en gel de poliacrilamida para los polifosfatos hidrolizados que la hidrólisis con mejores resultados, bajo nuestras condiciones, resultó con el poliP₈₇ (Figura S3). En el ensayo de medición de los poliP comparamos la reacción con el hidrolizado (poliP₈₇) como cebador versus el poliP₄₅ comercial sin hidrolizar. (Figura 18). Como se aprecia en la Figura 18 ratificamos que es estrictamente necesario la presencia del cebador y que no hay mayor diferencia entre ambos cebadores. Por esto decidimos seguir utilizando el poliP₄₅ como cebador.

5.4.3 Ensayo de medición de la actividad enzimática de EcPPK1

Como lo indica el objetivo específico número IV, se estudió la actividad enzimática de la proteína EcPPK1 de. Para esto se utilizó la proteína purificada junto con ATP como sustrato, el cofactor Mg⁺⁺, sulfato de amonio y un sistema de regeneración del ATP que consistió en creatina quinasa y creatina fosfato. Todo lo anterior en amortiguador HEPES-KOH pH 7.2 El ensayo fue discontinuo y se midió y detuvo utilizando el fluoróforo DAPI, el cual se une a las cargas negativas de los grupos fosfato del polifosfato inorgánico (producto de reacción). Se tomó una alícuota en el tiempo cero, y luego se incubó a 37°C en un termobloque, donde se extrajeron alícuotas de 20 µL a los 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos

de iniciada la reacción con la adición de la enzima. En la Figura 22 se observa la cantidad de producto a lo largo del tiempo, donde dicha cantidad de polifosfatos se calculó a partir de la fluorescencia emitida al unirse el poliP al DAPI, mediante la ecuación de la recta de una curva de reacción realizada dentro del rango lineal de fluorescencia del poliP-DAPI.

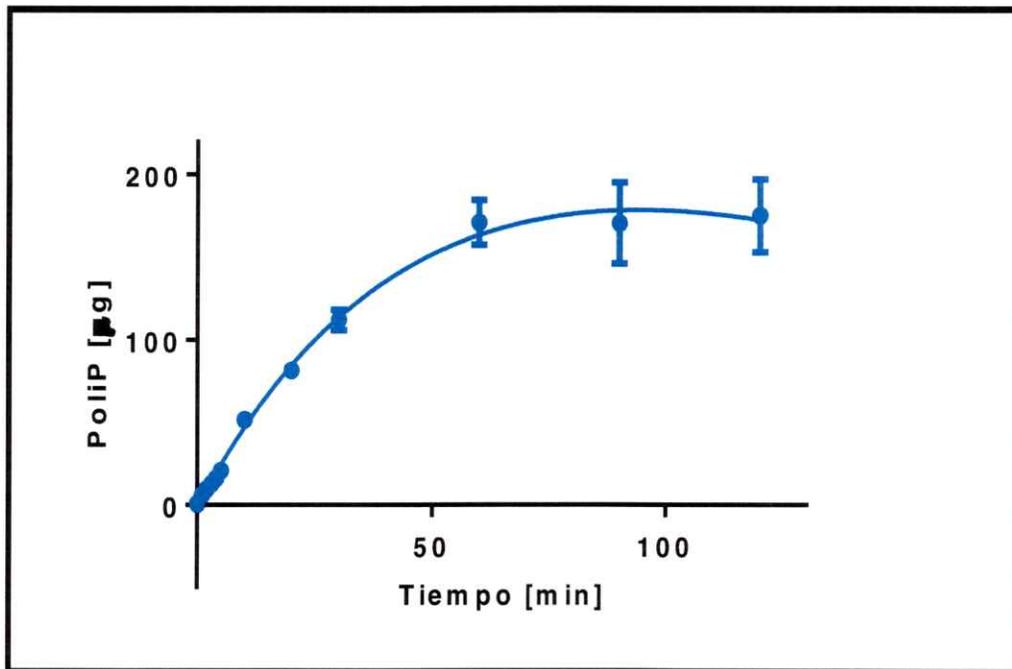


Figura 22: Actividad enzimática de la enzima PPK1 de *E. coli* mediante fluorescencia con DAPI.

Se observa la producción de poliP en el tiempo desde el inicio de la reacción, donde se añadió la proteína 16,5 µg/mL al mix de reacción: 50 mM de HEPES-KOH pH 7.2, MgCl₂ 5 mM, sulfato de amonio 50 mM, ATP 1 mM, poliP₄₅ 1 µg/ml, creatina fosfato 2 mM y creatina quinasa 20 µg/mL.

El mix de reacción para las condiciones óptimas de actividad para EcPPK1 resultó en: 50 mM de HEPES-KOH pH 7.2, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 1 mM de ATP, 1 mM creatina fosfato, 20 µg/mL de creatina quinasa, 1 µg/mL de poliP₄₅ como cebador y 16,7 µg/ml de EcPPK1 con cola de histidina, obtenida de un cultivo de la cepa EcBL21 AI en

medio LB, crecido e inducido a 28°C, lisado con B-PER, purificada con un buffer de elución que contiene 200 mM de imidazol, concentrada y dializada en frío.

Además la reacción debe ser incubada por un máximo de 2 horas a 37 ° C sin agitación y cada alícuota de 20 µL debe ser detenida con DAPI concentración final 50 µM. Con esto se cumple el objetivo específico II en su totalidad ya que se tiene la *EcPPK1* purificada en su forma activa. Con estas condiciones óptimas se hicieron ensayos de actividad en diferentes concentraciones de sustrato con vistas a determinar algunos parámetros cinéticos de la proteína purificada.

5.4.4 Obtención de los parámetros cinéticos de la proteína *EcPPK1*

Se realizaron ensayos para medir la cinética enzimática de la PPK1 con distintas concentraciones de sustrato, ATP. Se calculó la pendiente de las curvas de cantidad de producto en los primeros 10 minutos de reacción y luego se graficó dicha pendiente correspondiente a la velocidad inicial versus la concentración de sustrato (Figura 23). Es posible observar una disminución de la velocidad inicial a medida que aumenta la concentración de sustrato, lo que podríamos atribuir preliminarmente al fenómeno de inhibición por sustrato. Gracias a estos ensayos se obtuvieron los valores de V_{max} de 0,07 [µmol/min], de K_m de 2,4 mM, k_{cat} de 0,024 s⁻¹ y una K_i de 2,37 mM. Para 1 mM de ATP, se calculó una actividad específica de 11,3 [µmol/min/mg].

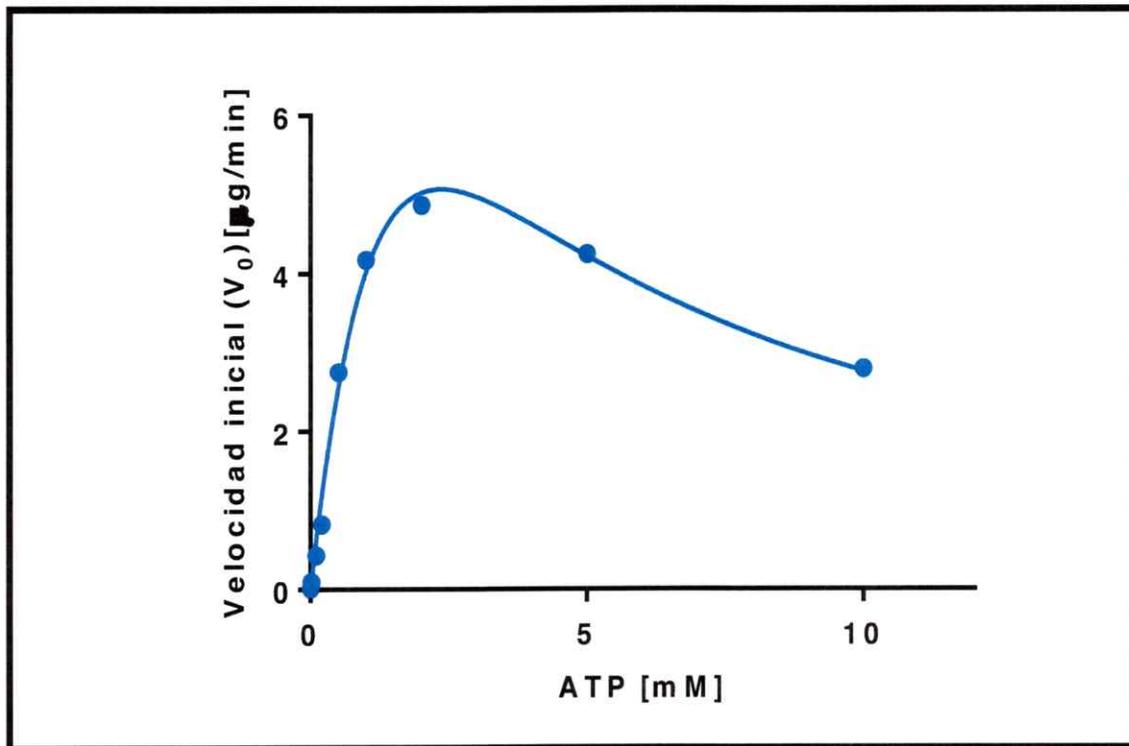


Figura 23: Cinética de la proteína EcPPK1 a distintas concentraciones de sustrato. Se observa la velocidad inicial calculada para los primeros 20 minutos de reacción versus la concentración de ATP utilizada. La curva se ajusta con un valor de $R^2= 0,9927$ a la ecuación de inhibición por sustrato.

5.5. Inhibidores

5.5.1 Ensayos a gran escala para estimar la actividad PPK1 en presencia de moléculas inhibitorias diseñadas *in silico*.

Previamente en nuestro laboratorio y mediante diseño *in silico* de drogas se obtuvieron 39 compuestos con el potencial de unirse al sitio activo de la proteína PPK1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Con vistas a ver si algunos de estos compuestos eran capaces de inhibir a la EcPPK1 se realizaron ensayos de actividad enzimática a una concentración de 20 μM del compuesto. En este ensayo se agregó el posible inhibidor al mix de reacción de la proteína y se midió la fluorescencia emitida en el tiempo cero y luego de 60 minutos

de reacción (Figura 24). Como se aprecia hay algunos compuestos que son capaces de inhibir cerca del 60% de actividad. Otros ensayos a diferentes concentraciones serán necesarios para determinar la concentración capaz de inhibir el 50% de la actividad enzimática (IC_{50}) de cada compuesto.

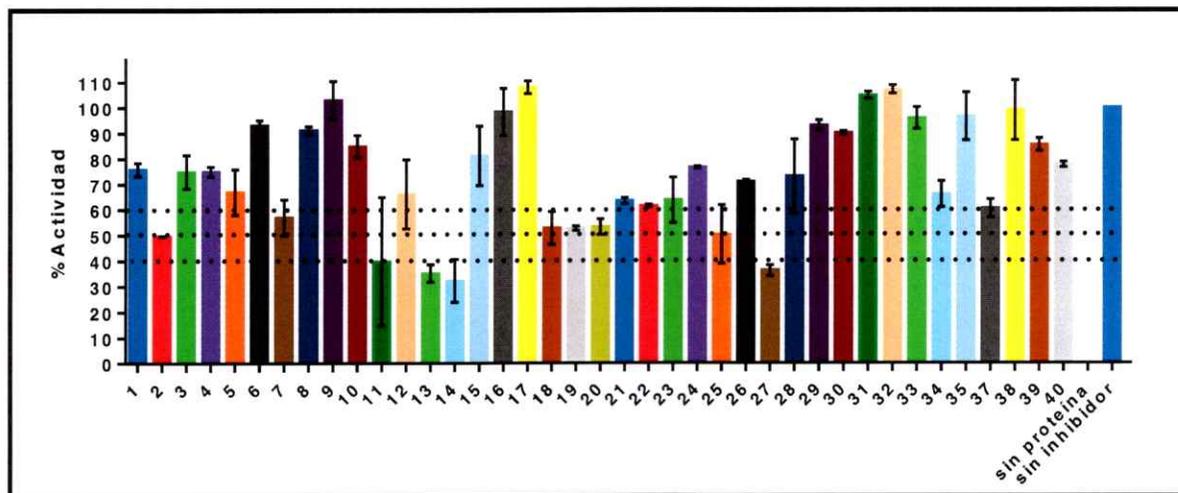


Figura 24: En la imagen se muestran los resultados con 2 réplicas para cada una de las reacciones, transformados a porcentaje de Actividad calculado en función a la reacción sin proteína (0% de Actividad) y a la reacción sin inhibidor (100% de actividad). Se destacan los compuestos 11, 13, 14 y 27, todos con valores menores al 40% de actividad. El ensayo se realizó bajo las condiciones de actividad determinadas en los ensayos anteriores.

6. Discusión y Proyecciones.

La enzima Polifostato quinasa 1 (PPK1), encargada de la biosíntesis y degradación de los polifosfatos inorgánicos, es una proteína altamente conservada en los organismos procariontes, destacándose estas similitudes entre las bacterias enteropatógenas, como es el caso del modelo entérico *Escherichia coli*.

Dado el alto grado de conservación de ésta proteína dentro de los enteropatógenos, sumado al rol de los polifosfatos inorgánicos en el metabolismo bacteriano, y al fenotipo atenuado que resulta de la deleción de la proteína PPK1 [Crooke y col, 1994, Rao y col., 2009, Rashid & Kornberg, 2000 a, Rashid y col., 2000 b,c], es que se ha propuesto a la síntesis de los poliP y particularmente a la PPK1 como un blanco prometedor para un posible tratamiento antimicrobiano (antivirulencia), que en contraste con los antibióticos convencionales no tenga como objetivo matar a la bacteria patógena sino atenuar la virulencia bacteriana y por ende reducir la presión selectiva que rápidamente provoca la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos.

En este escenario, se han reportado un número considerable de estudios y revisiones respecto a los poliP y su rol en el metabolismo bacteriano, sin embargo pocos estudios se han realizado últimamente en cuanto a la cinética enzimática de la PPK1, donde los ya existentes utilizan metodologías engorrosas y poco sensibles. Estos estudios resultan esenciales a la hora de desarrollar estudios de inhibición enzimática que tengan como objetivo el descubrimiento de compuestos inhibidores de la proteína PPK1.

Adicionalmente, los actuales métodos enzimáticos para en ensayo de la actividad PPK1 no permiten su uso a gran escala (high-throughput).

En vista de la necesidad de contar con una metodología de amplia reproducibilidad y fácil ejecución para ensayar un gran número de réplicas como significa el screening de compuestos inhibitorios de una enzima, y para la validación de esta nueva metodología propuesta, es que como objetivo de este trabajo, se planteó purificar la proteína PPK1 de *Escherichia coli*, estandarizar la medición de la actividad de la proteína recombinante y finalmente poner a punto un método high throughput de detección de los polifosfatos inorgánicos, de manera simple y reproducible mediante la unión del polímero con el fluoróforo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

6.1 Clonamiento y sobreexpresión

Como primer objetivo específico se planteó *clonar el gen ppk1 de Escherichia coli en el vector de expresión pET-TEV*. Las ventajas que presenta este vector están basadas directamente en el sistema de sobre expresión que presenta, desde la ubicación de un sitio de reconocimiento para la T7 polimerasa río arriba del sitio de clonamiento, hasta la producción de una proteína recombinante con elementos que facilitan su purificación: una cola de 6 residuos de histidina y un sitio de corte por la proteasa TEV. Este último elemento queda fusionado al extremo carboxilo de gen y por ende al realizar la purificación mediante cromatografía de afinidad en resinas de Níquel- Sepharosa, el producto puede ser digerido con la proteasa, con tal de remover la cola de 6 histidinas y presentar una proteína equivalente a una silvestre. El vector resultante fue denominado pET- His6-TEV-*Ecppk1*.

El segundo objetivo específico fue sobre expresar el gen de *Ecppk1* en la cepa de *E.coli* BL21 AI. Para esto se realizaron pruebas de sobreexpresión utilizando como control positivo el vector pUC57-*Ecppk1* (diseñado previamente por integrantes del laboratorio SysMicroLab) el cual presenta una alta fracción de proteína insoluble. Es decir, la proteína expresada en el vector pET-TEV aunque tuvo niveles comparables de expresión que el

vector pUC57-*Ecppk1*, resultó con mayor expresión de proteína en la fase soluble. Eso sumado a las ventajas que presenta en la etapa de purificación de la proteína de interés nos hizo inclinarnos por este plásmido. Una vez determinado y seleccionado el clon con mejor expresión de la proteína en la fracción soluble dentro de las pruebas realizadas con pET-TEV-*Ecppk1*, se procedió a realizar el tercer objetivo específico correspondiente a purificar la enzima PPK1 de *E.coli*.

6.2 Purificación de la proteína recombinante *EcPPK1* con cola de histidina

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante un simple paso de purificación por cromatografía de afinidad con resina de Níquel-Sepharosa, y se comprobó mediante SDS-PAGE el resultado de la misma. Dada la mínima concentración de la proteína purificada, y la insuficiente concentración lograda, es que la cantidad cargada en el gel de SDS-PAGE (2,5 mg) fue insuficiente y por ende no podemos afirmar la homogeneidad de la purificación, ya que no fue posible descartar presencia de impurezas en el resultado. A partir de la proteína purificada se determinó su actividad específica, obteniendo un valor de 11,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, diez veces mayor que el reportado por Kornberg en 1956 (1,07 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). El aumento en dicho valor puede ser atribuido en primer lugar, al método de purificación realizada por Kornberg, el que consistió en sucesivos pasos de precipitación de proteínas y tratamiento con nucleasas, metodología que podría no haber resultado en una muestra homogénea, o haber afectado la estabilidad de la enzima pura.

En contraste, el grupo de Kornberg reportó la purificación de la proteína *EcPPK1* con cola de histidina por cromatografía de afinidad, reportando una actividad específica de 9,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ [Tzeng & Kornberg, 2000], lo que se aproxima considerablemente al valor obtenido en este trabajo. En este caso, si la diferencia fuera significativa podría ser atribuida a la metodología utilizada por Kornberg, ya que previo a la medición de la radiactividad

emitida, es preciso precipitar y purificar el polímero de polifosfatos, proceso que según lo que se ha registrado, no logra un rendimiento del 100% [Mullan y cols., 2002]. Esto podría contribuir a la subestimación de la actividad catalítica de la enzima en cuestión. En contraste, la metodología aquí expuesta, permite la medición directa del producto de la reacción, lo que evita el error asociado al proceso de purificación del producto, antes mencionado. El contar con un método de fluorescencia que no tiene interferencia con los sustratos y productos de la reacción y que tiene muy buena resolución para cuantificar tanto poliP cortos como largos, ayuda en el establecimiento de un protocolo a gran escala (high-throughput) para la búsqueda de inhibidores de dicha enzima.

Por otro lado, Ault-Riché y Kornberg afirmaron que la actividad de la proteína *EcPPK1* recombinante sin cola de histidina, tendría alrededor de 60 veces mayor actividad que la purificada con cola (600 versus 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente) [Ault-Riché & Kornberg, 1999]. En contraste, el presente trabajo se probó cortar la cola de histidina con la proteasa TEV, sin embargo esta proteína no logró una mayor actividad relativa respecto a la proteína que conservaba la cola, por el contrario, ésta resultó ser 4 veces menor que la actividad de la proteína con cola. Este resultado podría ser atribuido a alguna desestabilización sufrida por la proteína durante el proceso de digestión, por ejemplo causado por el agente reductor TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) utilizado en este proceso, o por una falla en la eliminación de la proteasa luego de la digestión, lo que pudo provocar una sobreestimación de la cantidad de *EcPPK1* al agregarla al mix de reacción. Esto, sin embargo, no tiene incidencia en nuestro objetivo de buscar inhibidores pues esta inhibición siempre será relativa al valor de la enzima que medimos con respecto a un control sin inhibidor.

6.3 Condiciones de medición de la actividad enzimática y la inhibición de la proteína EcPPK1

Finalmente y como cuarto objetivo específico se planteó: *Estudiar la actividad de la proteína purificada mediante ensayos de fluorescencia High-throughput con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)*. Para ésta etapa, se tomó como referencia principal el trabajo de Kornberg y cols, 1990, donde reportaron una serie de condiciones esenciales para la actividad *in vitro* de la proteína PPK1 de *E. coli*, dentro de las cuales se destaca la inhibición por parte del ADP resultante de la desfosforilación del ATP, por lo que se indica la necesidad de un regenerador del ATP en la reacción. En este trabajo se comprobó dicha inhibición, la que fue revertida al utilizar el sistema regenerador de ATP formado por el sustrato creatina fosfato y la enzima creatina quinasa. Por otra parte, en el mismo trabajo se indica que, al usar muy bajas concentraciones de ATP (5 μM) existía una fase de retardo o *lag* en la curva de tiempo para la formación de producto, que se veía disminuida si se añadía poliP de cadena corta (4 fosfatos) a modo de cebador del inicio de la polimerización. En nuestro caso, no se registró actividad enzimática medible sin la presencia de dicho cebador, por lo que resultó imprescindible su adición al mix de reacción en todos los ensayos realizados.

Teniendo en cuenta que la medición de los poliP formados en la reacción no es directa, fue necesario probar un método de detención de la reacción de polimerización de los poliP. Para esto, se realizaron modificaciones con respecto al trabajo de Kornberg ya que este último utiliza ácido perclórico y BSA, lo que detiene la reacción debido a la precipitación del poliP en presencia de ambiente ácido, por lo que resulta necesaria la neutralización de la solución con NaOH para su cuantificación [Kornberg, 1956]. En contraste, en éste trabajo se observó que el mismo fluoróforo DAPI utilizado para la medición del polifosfato, detiene la reacción. Lo que nos permite pensar que el fluoróforo estaría inhibiendo la polimerización de éste por parte de la enzima al unirse a las cargas negativas del ATP, secuestrándolo.

En cuanto a los métodos de detección de poliP que se encuentran en la literatura, se utiliza principalmente el método de medición de la radiactividad del fósforo marcado transferido desde la posición gamma del ATP a la cadena de polifosfatos [Kornberg, 1999, Ault-Riché & Kornberg, 1999]. Como mencionamos anteriormente, éste método resulta altamente engorroso, considerando tanto el uso de radioactividad y las consideraciones de seguridad que esto requiere, además del tiempo que requiere, considerando que para la medición de los poliP, estos deben ser filtrados y sometidos a la catálisis por parte de la enzima PPX, para la posterior medición de los residuos de ortofosfato. Por otro lado, se han desarrollado otros métodos alternativos no radiactivos, como el uso de la reacción reversa de la PPK1, seguido de la medición del ATP generado usando luciferasa [Ault-Riché & Kornberg, 1999]. Sin embargo éste último también requiere de la purificación y el tratamiento enzimático del producto, sumado a que se limita a cadenas de poliP de al menos 60 residuos [Ault-Riché y cols., 1998], lo que sin duda implica una subestimación en la medición del polímero. En contraste, la detección y cuantificación de los poliP utilizando la fluorescencia emitida por el complejo poliP-DAPI no se solapa con la emisión de otras molécula como el ADN o el ATP, por lo que no es necesaria la purificación del producto desde el mix de reacción, evitando la pérdida y la consecuente subestimación del producto de reacción. Además, es un método altamente económico en cuestión de tiempo, ya que no es necesario ningún tratamiento del producto, más que la incubación por un tiempo fijo de entre 5 y 10 minutos antes de la medición.

Con la metodología de medición high-trougput puesta a punto se llevaron a cabo ensayos cinéticos de la proteína, de esta forma se logró determinar una K_M de 2,4 mM, valor cercano al registrado en la literatura (2 mM [Ahn & Kornberg, 1990, Ault-Riché & Kornberg, 1999]). Sin embargo, sorprendentemente se registró un comportamiento cinético distinto al descrito anteriormente, de hecho la curva de cinética enzimática no parecía una

hipérbole a simple vista, por lo que se decidió ajustar a la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación 4), la que resultó con un valor de $R^2 = 0,992$. Si bien este comportamiento inhibitorio por parte del ATP en concentraciones elevadas, no se ha reportado para la enzima *EcPPK1*, si se registra en la proteína PPK1 de *Mycobacterium smegmatis* [Suzuki y cols., 1971].

Actualmente se sabe que en *E.coli*, la regulación de la acumulación de polifosfatos que ocurre durante la fase estacionaria [Kolter y cols., 1993], al cambiar de medio de cultivo rico a uno bajo en nutrientes [Ault-Riché y cols., 1998] (o incluso frente a niveles bajos de nitrógeno, aminoácidos o fosfatos [Kornberg, 1999]) es generada por la inhibición de la exopolifosfatasa PPX en presencia de (p)ppGpp [Siegele y Kolter, 1992]. Debido a esto, no podemos relacionar directamente una situación de aumento en los niveles de ATP, con una inhibición de la PPK1, más aun sabiendo que en condiciones fisiológicas los niveles de ATP/ADP se mantienen relativamente constantes [Siegele y Kolter, 1992].

Además de lo anterior, cabe destacar que el actual trabajo solo concluye parámetros cinéticos aparentes de la enzima PPK1 de *E. coli*, por lo que resulta necesario realizar más estudios que permitan afirmar que el comportamiento visualizado se trata efectivamente de un efecto de inhibición por sustrato. Para esto debiese realizarse una caracterización cinética detallada, donde se prueben, además de distintas condiciones de buffer, DAPI, y sustrato, distintas concentraciones de enzima, para así lograr calcular parámetros cinéticos reales, que permitan concluir respecto al posible efecto inhibitorio por parte del sustrato.

Finalmente, se realizaron ensayos preliminares de inhibición de la actividad de la proteína *EcPPK*, donde se probaron 40 compuestos diseñados *in silico* (trabajos previos SysMicroLab) para hacer *docking* con el sitio activo de la proteína PPK1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Si bien se utilizaron compuestos que no fueron diseñados para la proteína estudiada en este trabajo, este ensayo es una primera aproximación a la aplicación de la metodología desarrollada, en el screening de sustancias inhibitoras de la PPK1 en el

estudio de ésta enzima como blanco de un futuro tratamiento antibiótico alternativo a los actualmente utilizados. En las condiciones ensayadas de 20 uM del inhibidor igual encontramos moléculas con la capacidad de inhibir el 100% de la reacción. Otros ensayos con diferentes concentraciones del inhibidor serán requeridas para determinar con exactitud la IC_{50} , es decir, la concentración que es capaz de inhibir el 50% de la actividad PPK1.

Gracias al trabajo realizado contamos con una enzima PPK1 de *E. coli* purificada y activa que puede ser utilizada con fines prácticos para la síntesis de poliP y también nos permite contar con un novedoso ensayo de actividad PPK1 mediante fluorescencia con DAPI que nos ayudará en el futuro para la búsqueda de nuevos inhibidores PPK1 con posible uso antimicrobiano.

7. CONCLUSIONES

1. Mediante el clonamiento del gen *Ecppk1* en el vector pET-TEV, se pudo sobreexpresar y purificar la enzima en su forma activa.
2. Mediante el uso de DAPI fue posible cuantificar los poliP formados durante la reacción de la *EcPPK1*, y desarrollar un ensayo de actividad enzimática discontinuo a gran escala.
3. Mediante el ensayo de actividad enzimática DAPI-poliP determinamos los parámetros cinéticos de la enzima *EcPPK1* y corroborar la factibilidad del ensayo.
4. Finalmente y gracias al ensayo a gran escala en placas de multipocillos fue posible ensayar preliminarmente cerca de 40 posibles inhibidores de la enzima PPK1.

8. Bibliografía:

- Achbergerová, L., & Nahálka, J. (2011). Polyphosphate-an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microb Cell Fact*, 10(63), 14170-14175.
- Ahn, K., & Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 265(20), 11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E., & Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 633-639.
- Aschar-Sobbi, R., Abramov, A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J., & Pavlov, E. (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of fluorescence*, 18(5), 859-866.
- Ault-Riché, D., & Kornberg, A. (1999). Definitive enzymatic assays in polyphosphate analysis. In *Inorganic Polyphosphates* (pp. 241-252). Springer Berlin Heidelberg.
- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841-1847.
- Ayraud, S., Janvier, B., Labigne, A., Ecobichon, C., Burucoa, C., & Fauchère, J. L. (2005). Polyphosphate kinase: a new colonization factor of *Helicobacter pylori*. *FEMS microbiology letters*, 243(1), 45-50.
- Barie, P. S. (2012). Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. *Surgical Clinics of North America*, 92(2), 345-391.
- Brown, M. R., & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16085-16087.

Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 17-27.

Chavez, F., F Lagos, C., Reyes-Parada, M., Guiliani, N., & A Jerez, C. (2011). Polyphosphate synthesis as a target for novel antibiotics. *Current Enzyme Inhibition*, 7(3), 163-168.

Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N. N., & Kornberg, A. (1994). Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6290-6295.

Jagannathan, V., Kaur, P., & Datta, S. (2010). Polyphosphate kinase from *M. tuberculosis*: an interconnect between the genetic and biochemical role. *PloS one*, 5(12), 2143336.

Kim, K., Rao, N., Fraley, C. & Kornberg, A. (2002). Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Nat Acad Sci USA*, 99: 7675-7680.

Kolter, R., Siegele, D. A., & Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Reviews in Microbiology*, 47(1), 855-874.

Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Inorganic polyphosphates* (pp. 1-18). Springer Berlin Heidelberg.

Kornberg, A., Kornberg, S. R., & Simms, E. S. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 20, 215-227.

Kulakova, A. N., Hobbs, D., Smithen, M., Pavlov, E., Gilbert, J. A., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2011). Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Environmental science & technology*, 45(18), 7799-7803.

Kumble, K. D., Ahn, K., & Kornberg, A. (1996). Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14391-14395.

Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., & Gerdes, K. (2013). (p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, 154(5), 1140-1150.

Mullan, A., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2002). A nonradioactive method for the assay of polyphosphate kinase activity and its application in the study of polyphosphate metabolism in *Burkholderia cepacia*. *Analytical biochemistry*, 308(2), 294-299.

Ogawa, N., Tzeng, C. M., Fraley, C. D., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6687-6693.

Ortiz-Severín, J, Varas, M, Bravo-Toncio, C, Guiliani, N, & Chávez, FP. (2015). Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis. *Biological Research*, 48, 1-6.

Rao, N. N., Gómez-García, M. R., & Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual review of biochemistry*, 78, 605-647.

Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, A. N., Iglewski, B. H., & Kornberg, A. (2000a). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9636-9641.

Rashid, M. H., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2000b). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of bacteriology*, 182(1), 225-227.

Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000c). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885-4890.

Rodrigues, C. O., Ruiz, F. A., Rohloff, P., Scott, D. A., & Moreno, S. N. (2002). Characterization of isolated acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* tachyzoites reveals a novel pool of hydrolyzable polyphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48650-48656.

Saha, S. B., & Verma, V. (2013). In Silico analysis of *Escherichia coli* polyphosphate kinase (PPK) as a novel antimicrobial drug target and its high throughput virtual screening against PubChem library. *Bioinformation*, 9(10), 518.

Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Singh, A. K., Dasgupta, A., Rodrigue, S., & Kundu, M. (2007). Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 65(2), 261-276.

Siegele, D. A., & Kolter, R. (1992). Life after log. *Journal of bacteriology*, 174(2), 345.

Suzuki, H., Kaneko, T., & Ikeda, Y. (1972). Properties of polyphosphate kinase prepared from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 268(2), 381-390.

Tinsley, C. R., & Gotschlich, E. C. (1995). Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infection and immunity*, 63(5), 1624-1630.

Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Molecular microbiology*, 29(1), 381-382.

Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (2000). The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3977-3983.

Zhang, H., Gómez-García, M. R., Brown, M. R., & Kornberg, A. (2005). Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2731-2735.

Zhu, Y., Huang, W., Lee, S. S., & Xu, W. (2005). Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO reports*, 6(7), 681-687.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

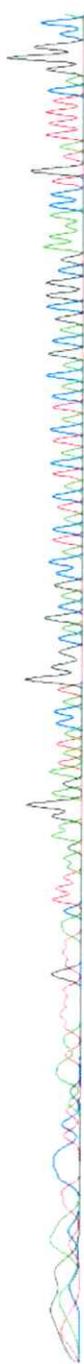
Anexo 1

Cromatogramas resultado de la secuenciación realizada por Macrogen

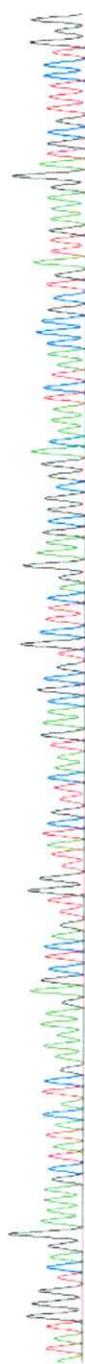


File: 11_EcPPK1a_T7promoter.ab1 Run Ended: 2015/4/17 16:6:22 Signal G 3519 A 6904 C 6941 T 6665
Sample: 11_EcPPK1a_T7promoter Lane: 12 Base spacing: 15.294064 1558 bases in 18788 scans Page 1 of 2

10 G G G A C G G K C A T T C C C C T C T A G A A T A T T T T G T T T A A C T T T T A A G A G G A G A T A T A C C A T G G G C A G C A G C C A T C A T C A C A G C A G C G G C A A A C C T G T A T T T C A G G G C C



130 A T A T G G T C A G G A A A A G C T A T A C A T C G A A A A A G A G C T C A G T T G G T T A T C G T T C A A T G A A C C G C T G T T C A G G A A B C G G G A C A A A T C T A A C C C G T G A T T G A A A G G A T G C G T T T C C T G G G



250 G A T C T A T T C C A A T A C C T T G A T G A G T T C T A T A A A G T C C G C T T C C G T G A A C T G A A G C G A C G C A T C A T T A T T A G C G A A G A A C A A A G G C T C C A A C T C T C A T T T C C C G C C A T T T A C T G G G C A A A A T T C A



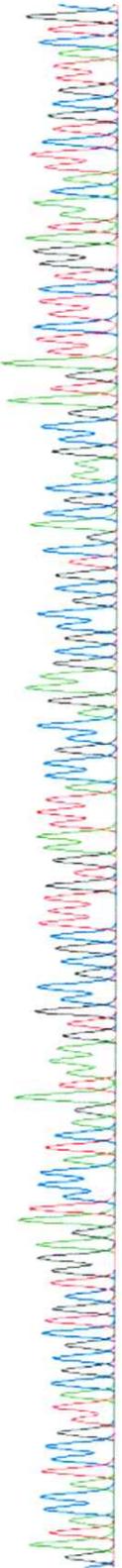
370 G T C C C G G G T G C T G A A A G C C G A T C A G G A A T T C G A C G G C C T C A C A A C G A G T T T G C T G G A G A T G G C G C G C A A C C A G A T C T T C C T G A T T A A T G A A C G C C A G C T C C C G T C A A T C A A C A A A A C T G G C



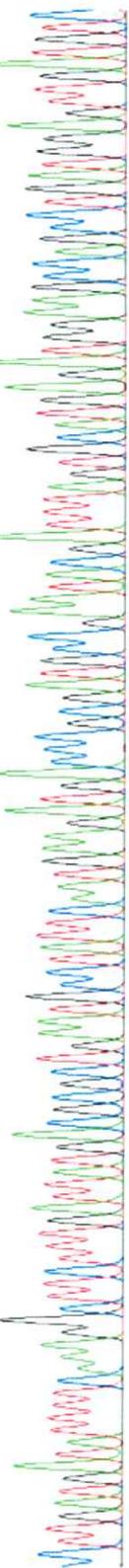
490 T G C G T C A T T A T T T A A G C A G T A T C T G C G T C A G C A C A T T A C G C G A T T T A A T C A A T C C T G A C A C T G A C T T A G T G C A G T T C C T G A A A G A T G A T T A C A C C T A T C T G G C G G T G G A A A T T A T C C G T G G C



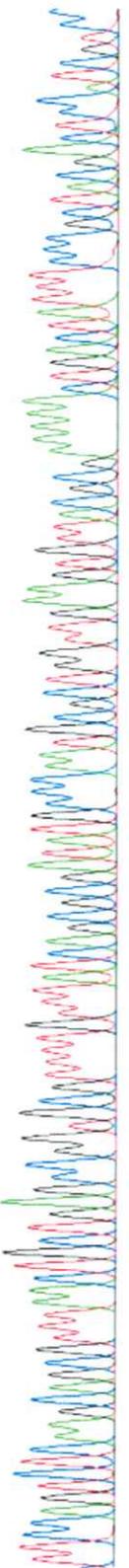
620 GATACCAATCCGTTACGCCTGCTGGAGATCCCATCAGATAAAGI GCCGCCGCTTGGTGAATTTACCGCCAGAAAGCGCCGCTCGACGCAAGCCGATGATTTCTTGGATAACATICTCCGTTACTG 730



740 CCTTGATGATATTTCAAAGGCTTCTTTGATTAATGACGCCTGAAATGCTTATCAATGAAAGATGACCCGCGATGCCGAATACGATTTTGTGCATGAGATGGAAACGAGCTTGATGGAGTTGATGTC 860



870 TTCAGTCTCAAAGCAGCGTTTAACTGCTGAGCCGGTGC GTTTTTGTTTATCAGCCGATATGCCCAAATGCGCTGGTTGAAAGTGTACGCGAAAAACTGACTATTTTCCCCTACGACTCCATCGTCC 990



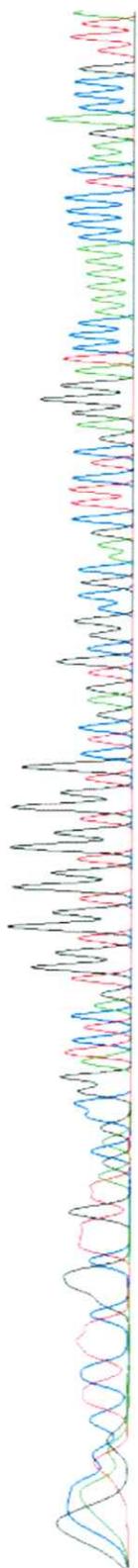
1000 CCGGCGGTCGTTATCATAAATTTTAAAAAGACTTTTAAATTTCCCCAAATGTCGGCAAAAGCCAAATCTGGTGAACAAACCACTGCCGC GTTTAAGCCCTATTTTTGGTTTGATAAAAACCCAGTTCCC 1110



1120 CCAAAGGTTTGTATGCCCCTTTCCC GA AAA CCC AAGTGG TGGTCTATATCCCTTTTCCACCCTTIGAACAAATGGTTGGAAATGCTTGTTCAAGGTTCTTTTACCCGACGGGCTTGGGGAT 1230



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
CGG C AC TGG C T TCC T T TCG GGC T T TGT T A GCA GCC G G A T C T C A G T G G T G G T G G T G G T C G A G T G C G G C C C A A G C T T C T C G A G G G A T C C C A A A A A C C C C T C A A G A C C C G T T T A



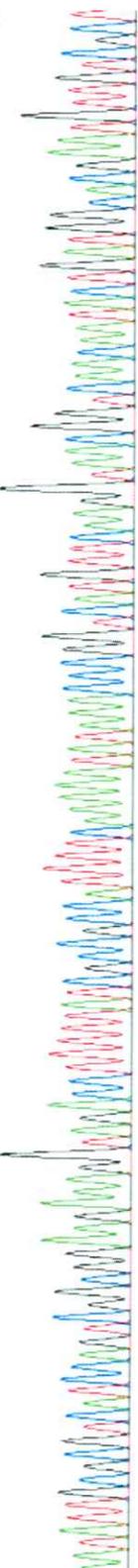
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
G A G G C C C A A G G G G T T A T G C T A G C G G C C G C T A T T T C A G G T T G T T C G A G T G A T T G A T T A G T A G C A T A A A T C G C C A A C T G C C C C G T A C T T T G C G G C G A T T T G C C G C G G G G A A C G T A G C G A T T



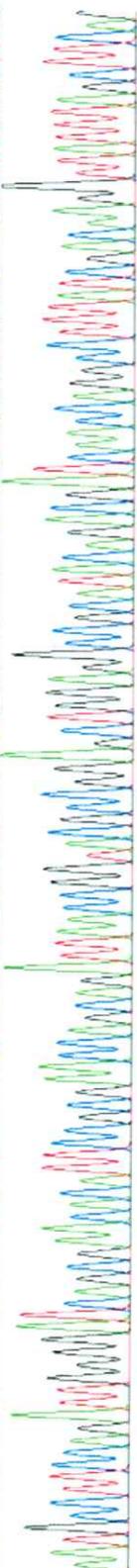
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
A C T G A G T T C T T A T C G A T A A C G T G C T T T G A C C G T A T C G T G A A C A A T A T G C G A T G A T T C C A G T A C C C G C T G T T C A G G C G G A T C G A G C A G C G G C T C G C C A C T T C A A T A C G A T A A T C

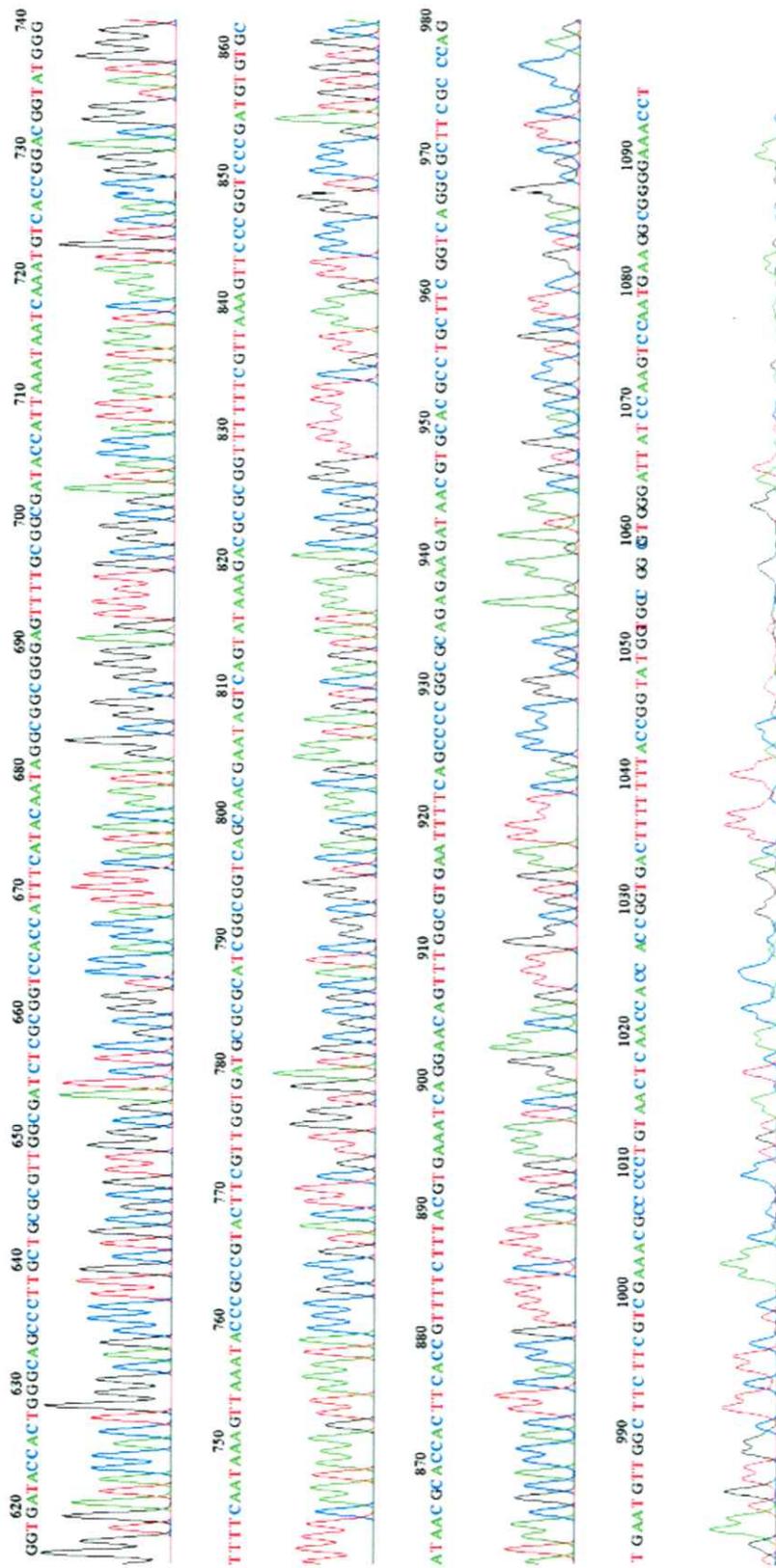


370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
A A T A T T C C G C T A T C C A G T C G G C G G A A G A A G G T A G A C C T T T T T A T C G C C G C C A T T T C A A A A A T A T A A A C C C G G T C A T T C A A G G A T A C G G T C A A C A A T A C T G A T G G C A G A A T T G T G C G C T

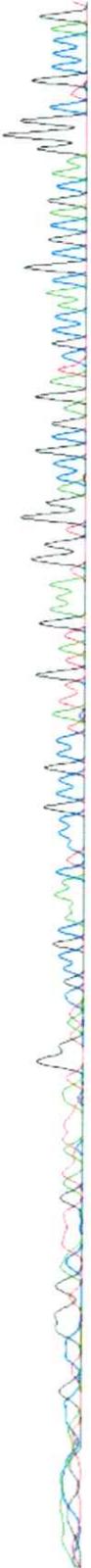


500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610
A A T G C C T T C C A G A T T G G G G A T C G C G A A C C A C A T T C C G C A A C C A G A T T A A C C G G T A C G C C G G A G C T G G A G C C G C A T A C A G A C G A T C A A C C A G C C T T T A T C A C A A G G T T A T T A G C T T C A G





10 CTA G C A G T A C C T C C G G T G A C T T T T G A T A T T A A T G G T A C C C G C A A A C T C C C G C C G C T A T I G T A T G A A A T G G T G G A C C G C G A G A T C G C C A A C G C G C A G C A A G G G C T G C C C A G 120



130 T G G T A T C A C C C I G A A G C T A A A T A A C C T I G T C G A T A A A G G C C T G G T T G A T C G T C T G T A T G C G G C C T C C A G C T C C G G C G T A C C G G T A A A T C T G C T G G T T C G C G G A A T G T T C C T G A T C C C C 240



250 A A T C T G G A A G C A T T A G C G A C A A C A T T C G I G C C A T C A G T A T T T G A C C G T T A C C T T G A A C A T G A C C G G T T A T A T T T T T G A A A A T G G C G G G A T A A A A A G G T C T A C C T T T C C G C G G A C 360



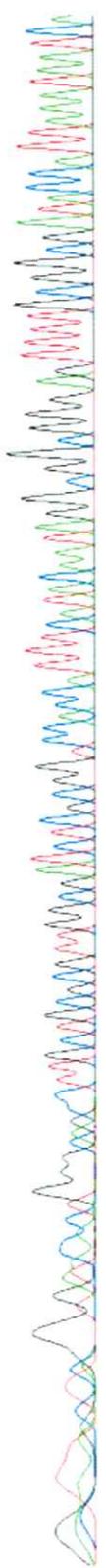
370 I G G A T G A C C G C C A A T A T T G A T T A T C G T A T T G A A G T G G C G A C C C C G C I G T C G A T C C G G C C C T G A A G C A G C G G G T A C T G G A C A T C A T C G A C A T A T T T G T T C A G C G A T A C G G T C A A A G C A C G T T A T 480



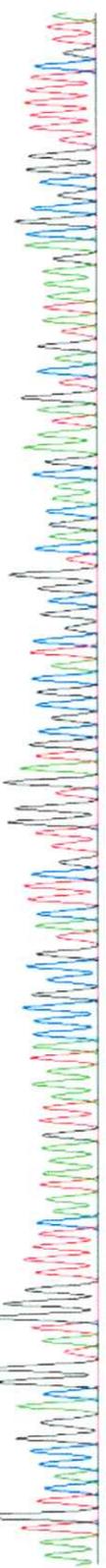
490 C G A T A A A G A A C T C A G T A A T C G T C C C C G C G G G A A T C G C C C G A A A G T A C G G G C G A G T T G G C G A T T A T G A C T A C A A T C A A A C A A C C T G A A T A A A G C G G C C G C T A G C A T A A C C C C 610



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 GGGCA TTTTAGC TTAG CGTG AXCAC TGG GGCAC CTTGCTGGCG TTGGCG ATCCACCA TTTCA TACAATA GCGGGGG AG TTTTGC GCG ATACCA TTAATAA TAACTCA



130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 AATGTCACCGGACGGTATGGGTTTTCAA TAAAG TAAATACCCCGCG TACTTCG TTGG TGA TGGCGGC ATCGGGCTCAGCAACGAA TAGTCAG TATAAAGACGCGGG TTTTTCGTTA



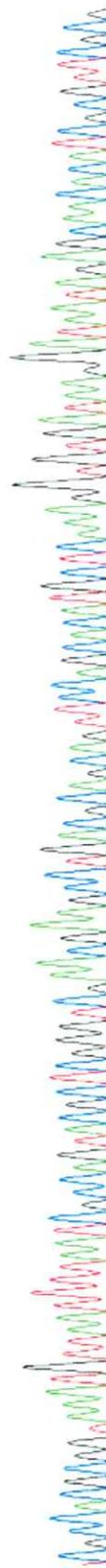
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 AAGTCCCGG TCCCGATG TGCATAACGCACCTTCACCGTTTTC TTACGTG AAA TCAAG AACAG TTTTGGCGTGAATTTTCAGCCCGGGCGCAGAG AAGATAACGTGCACGCC TGC TTCGG

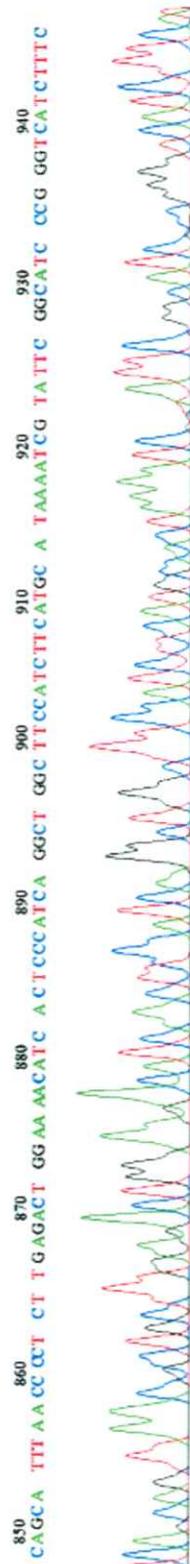
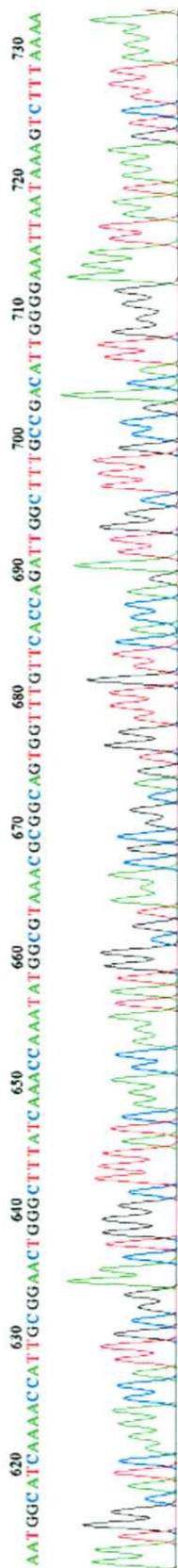


370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 ICAGCGC TTCGCCAGTGAATTTGGC TTTCTCGTGAACGCGCC TGTAACTCAAC CACCACGGT GACTTCTTACC GTTATG TGGCGGTGGATCA TCGAGTCGATGATGCGTGAATCTTT



490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610
 CGCCACGCGG TAAATGTTAA TTTTAA TCGCCAGTACGC TCGGGTCGAACGAAAGCC TGCACGCGAGGTTC CAGCACATGC TCAAAGGTGTGATTAAGGATAATAGACCAACACATCGCGTTTCGCG





Secuencia nucleotídica consenso de *EcPPK1* obtenida de la secuenciación analizada en el programa Geneious 4.8.4.:

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAAAACCTGTA
TTTTTCAGGGCCATATGGGTCAGGAAAAGCTATACATCGAAAAAGAGCTCA
GTTGGTTATCGTTCAATGAACGCGTGCTTCAGGAAGCGGCGGACAAATCT
AACCCGCTGATTGAAAGGATGCGTTTCCCTGGGGATCTATTCCAATAACCT
TGATGAGTTCATAAAAGTCCGCTTCGCTGAAGTGAAGCGACGCATCATTA
TTAGCGAAGAACAAGGCTCCAACCTCATTCGCGCCATTTACTGGGCAAA
ATTCAGTCCCGGGTGCAGAAAGCCGATCAGGAATTCGACGGCCTCTACAA
CGAGCTATTGCTGGAGATGGCGCGCAACCAGATCTTCCCTGATTAATGAAC
GCCAGCTCTCCGTCGAATCAACAAAACCTGGCTGCGTCATTATTTTAAGCAG
TATCTGCGTCAGCACATTACGCCGATTTTAATCAATCCTGACACTGACTT
AGTGCAGTTCCTGAAAGATGATTACACCTATCTGGCGGTGGAAATATCC
GTGGCGATACCATCCGTTACGCGCTGCTGGAGATCCCATCAGATAAAAGTG
CCGCGCTTTGTGAATTTACCGCCAGAAGCGCCGCGTCGACGCAAGCCGAT
GATTCCTTCTGGATAACATCTGCGTTACTGCCTTGATGATAATTTTCAAAG
GCTTCTTTGATTATGACGCGCTGAATGCCTATTCATGAAGATGACCCGC
GATGCCGAATACGATTTAGTGCATGAGATGGAAGCCAGCCTGATGGAGTT
GATGTCCTCCAGTCTCAAGCAGCGTTAACTGCTGAGCCGGTGCCTTTTG
TTTTATCAGCGGATATGCCCAATGCGCTGGTTGAAGTGTACGCGAAAAA
CTGACTATTTCCCGCTACGACTCCATCGTCCCGGGCGGTCGTTATCATAA
TTTTAAAGACTTTATTAATTTCCCAATGTCGGCAAAGCCAATCTGGTGA
ACAAACCCTGCGCGGTTTACGCCATATTTGGTTTGATAAAGCCCAGTTC
CGCAATGGTTTTTGATGCCATTCGCGAACGCGATGTGTGCTCTATATATCC
TTATCACACCTTTGAGCATGTGCTGGAACCTGCTGCGTCAGGCTTCGTTCCG
ACCCGAGCGTACTGGCGATTTAAATTAACATTTACCGCGTGGCGAAAGAT
TCACGCATCATCGACTCGATGATCCACGCCGACATAACGGTAAGAAAGT
CACCGTGGTGGTTGAGTTACAGGCGCGTTTCGACGAAGAAGCCAACATTC
ACTGGGCGAAGCGCCTGACCGAAGCAGGCGTGCACGTTATCTTCTCTGCG
CCGGGGCTGAAAATTCACGCCAAACTGTTCCCTGATTTACGTAAGAAAA
CGGTGAAGTGGTGCCTTATGCACACATCGGGACCGGGAACTTTAACGAAA
AAACCGCGCGTCTTTATACCTGACTATTCGTTGCTGACCGCCGATGCGCGC
ATCACCACGAAGTACGGCGGGTATTTAACTTTATGAAAACCCATACCG
TCCGGTGACATTTGATTATTTAATGGTATCGCCGCAAAACCTCCCGCCGCC
TATTGTATGAAATGGTGGACCAGGATCGCCAACGCGCAGCAAGGGCTG
CCAGTGGTATCACCTGAAGCTAAATAACCTTGTTCGATAAAGGCTGGT
TGATCGTCTGTATGCGGCCCTCCAGCTCCGGCGTACCGGTTAATCTGCTGG
TTCGCGGAATGTGTTCGCTGATCCCAATCTGGAAGGCATTAGCGACAAC
ATTCGTGCCATCAGTATTTGTTGACCGTTACCTTGAACATGACCGGGTTTA

```

TATTTTGGAAAATGGCGGCGATAAAAAGGTCTACCTTTC'TTCCGCCGACT
GGATGACGCGCAATATTGATTATCGTATTGAAGTGGCGACGCCGCTGCTC
GATCCGCGCCTGAAGCAGCGGGTACTGGACATCATCGACATATTGTTTCAG
CGATACGGTCAAAGCACGTTATATCGATAAAGAAGTACAGTAATCGCTACG
TTCCCCCGGCAATCGCCGCAAAGTACGGGCGCAGTTGGCGATTTATGAC
TACATCAAATCACTCGAACAACCTGAATAAGCGGCCGCTAGCATAACCCC
TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGGGATCCCTCGAGAAG
CTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGC
TAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAAT
AACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
CTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGC
GGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC
ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTT

Secuencia aminoacídica consenso de *EcPPK1* obtenida de la secuenciación analizada
en el programa Geneious 4.8.4.:

1	10	20	30	40	50

MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMGOEKLYIEKELSWLSFNERNVLQEAADKS
NPLIERMRFGLIYSNNLDEFYKVRFAELKRRIIIEEQGSNSHSRHLGK
IQSRVLKADQEFDGLYNELLEMARNQIFLINERQLSVNQNWLRHYFKQ
YLRQHITPILINPDTDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTIRYALLEIPSDKV
PRFVNLPPEAPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMKMTR
DAEYDLVHEMEASLMELMSSSLKQRLTAEPVRFVYQRDMPNALVEVLREK
LTISRYDSIVPGGRYHNFKDFINFPNVGKANLVNKPLPRLRHIWFDKAQF
RNGFDAIRERDVLLLYPYHTFEHVLELLRQASFDPVLAIKINIYRVAKD
SRIIDSMIHAHNGKKVTVVVELQARFDEEANIHWAKRLTEAGVHVIFSA
PGLKIHAKLFLISRKENGEVVRVYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADAR
ITNEVRRVFNFIENPYRPVTFDYLMVSPQNSRRLLYEMVDREIANAQQGL
PSGITLKLNNLVDKGLVDRLYAASSSGVPVNLVLRGMCSLIPNLEGISDN
IRAISIVDRYLEHDRVYIFENGDKKLYLSSADWMTRNIDYRIEVATPLL
DPRLKQRVLDIIDLFSDTVKARYIDKELSNRYVPRGNRRKVRACLAIYD
YIKSLEQPE*AAASITPWGL*TGLEGFFGIPREACGRTRAPPPPLRSGC
*QSPKGS*VGCCHR*AITSIPTWGL*TGLEGFFAERRNYIRIGEWDAPCS
GALSAAGVVVTRSVTATLASALAPAPFAFFP

Anexo 2

Geles ensayo sobreexpresión a baja escala

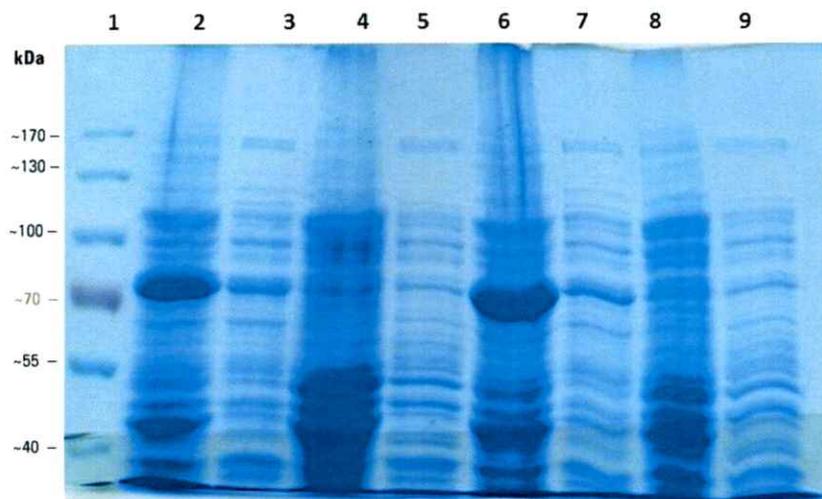


Figura S1. Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pET- His6-TEV-*Ecppk1* (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 25°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas (Carriles 5 y 9)

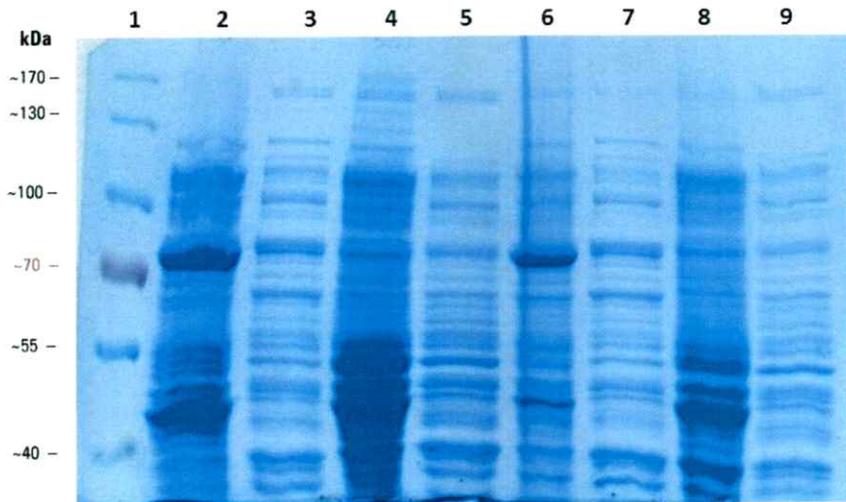


Figura S2: Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pET- His6-TEV-*Ecppk1* (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 37°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas (Carriles 5 y 9).

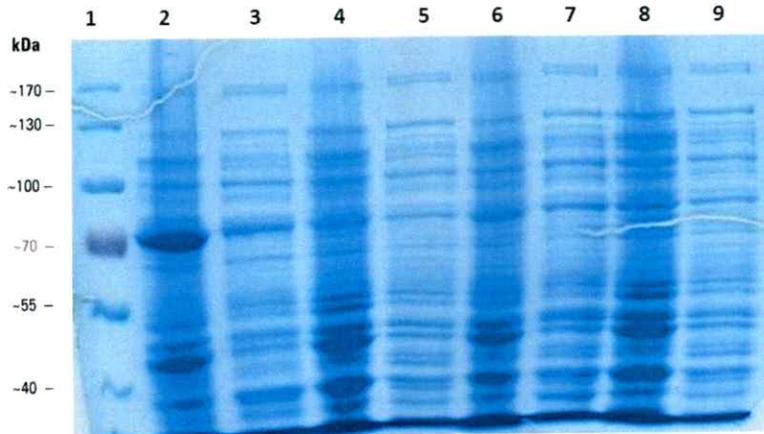


Figura S3: Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pUC57-Ecppk1 (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 25°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas Carriles 5 y 9).

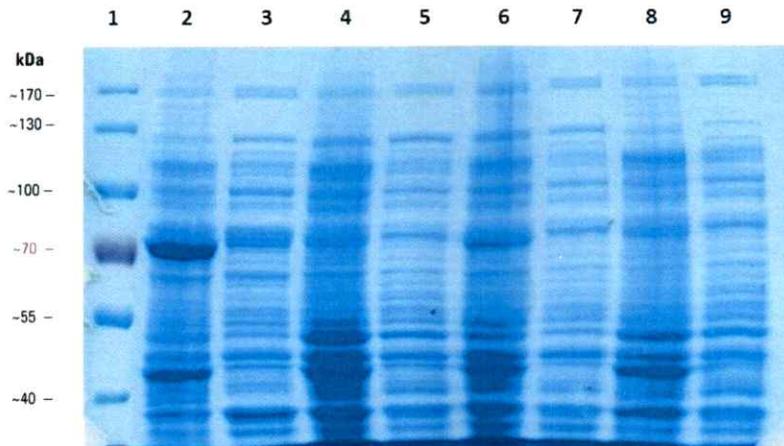


Figura S4: Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pUC57-Ecppk1 (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 28°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas Carriles 5 y 9).

Anexo 3

Hidrolisis poliP

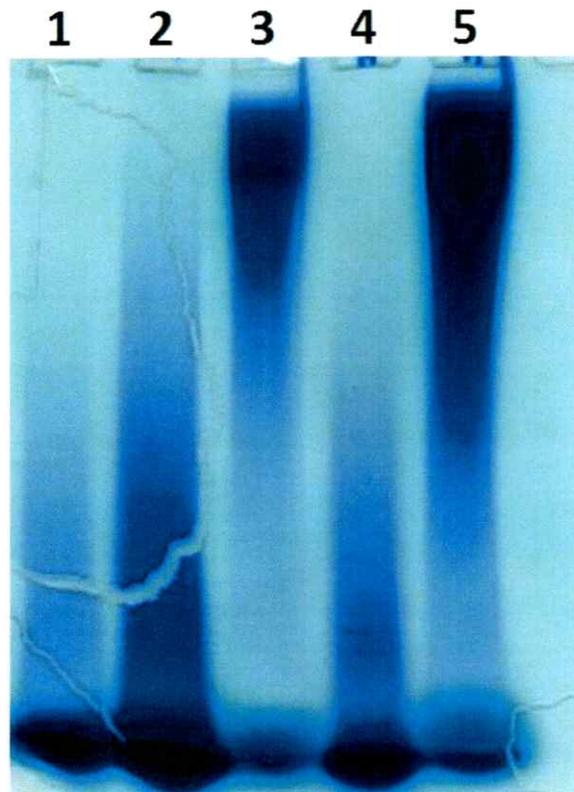


Figura S6. Gel de poliacrilamida para polifosfatos. En la figura se aprecia la visualización de polifosfatos de distinto largo de cadena de forma relativa (No se presenta carril con estándar). En 1, 2 y 3 Polifosfatos de largo 45, 87 y 700 respectivamente. En 4 y 5 polifosfatos de cadena 87 y 700 hidrolizados por 1 minuto a 90°C con HCl 20mM, respectivamente.

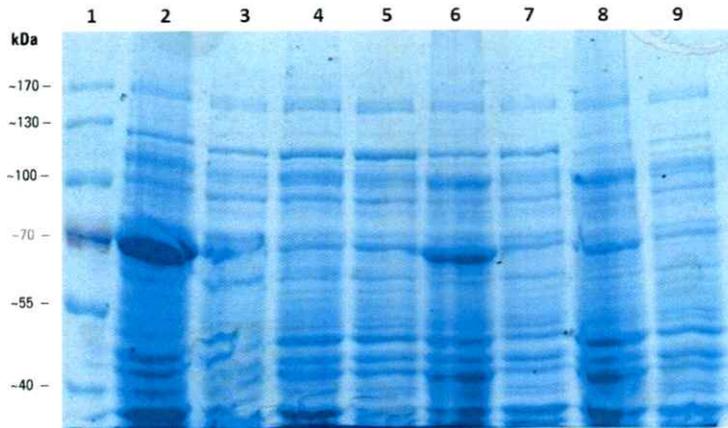


Figura S5. Prueba de sobreexpresión de PPK1 a baja escala. Se seleccionaron 2 colonias al azar de la cepa BL21 (AI) transformadas con el plásmido pUC57-Ecppk1 (Carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la colonia I, mientras que los carriles 6,7,8 y 9 corresponden a la colonia II) y se sometieron a inducción por 4 horas con IPTG 0.1mM y L-arabinosa al 0,4% a 37°C. Para cada colonia se cargó la fracción insoluble de proteínas inducidas (Carriles 2 y 6), la fracción soluble de proteínas inducidas (Carriles 3 y 7), la fracción insoluble de proteínas no inducidas (Carriles 4 y 8) y la fracción soluble de proteínas no inducidas Carriles 5 y 9).