

UCH-FC
Biotecnología
A 473
C1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS



“Síntesis, purificación y caracterización de la
enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1) de
Pseudomonas aeruginosa expresada en
Escherichia coli”

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

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

JAVIERA ANAXA ÁLVAREZ MORÁN

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

Noviembre, 2015



INFORME 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 Sta. Javiera Anaxa Álvarez Morán

“Síntesis, purificación y caracterización de la enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1) de *Pseudomonas aeruginosa* expresada en *Escherichia coli*”

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

Director Seminario de Título:

A blue ink signature of Francisco P. Chávez, written over a horizontal line.

Dr. Francisco P. Chávez

Co Director Seminario de Título:

Dr. Ricardo Cabrera

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

A blue ink signature of Julieta Orlando, written over a horizontal line.

Dra. Julieta Orlando

Evaluador:

A blue ink signature of Claudia Stange, written over a horizontal line.

Dra. Claudia Stange

Santiago de Chile, Noviembre de 2015

BIOGRAFÍA



Nací el 10 de noviembre de 1989 en Santiago. Mi infancia la viví en la comuna de La Florida, en donde ingresé al colegio Little College, ahí conocí a mis amigas las cuales conservo hasta el día de hoy; pilar fundamental en mi vida. En octavo básico mi profesora de matemáticas nos dio la tarea de realizar una disertación acerca del ADN. Con ese trabajo me di cuenta que iba a estudiar una carrera relacionada con eso.

El 2008 ingresé al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile ya que no me alcanzó el puntaje para la carrera que quería. Sin embargo, ese período fueron mis mejores años vividos hasta ahora. El 2010 me hice parte de la Facultad de Ciencias para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Entrar a esta carrera me hizo ver la vida de forma distinta, madurar muchas ideas y abrir mis ojos a muchas interrogantes que hoy busco solucionar.

Durante el primer año en la Facultad de Ciencias, atraída por la investigación, realicé una pasantía en el laboratorio del Dr. Christian González. Ahí tuve los primeros atisbos de la extraña sensación que en realidad no sé nada y que hay un universo por descubrir. El año 2011 ingresé al laboratorio del Dr. Francisco Chávez donde he permanecido hasta la fecha y fue allí donde realicé mi seminario de Título. El año 2012 obtuve el grado de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular y egresé de la correspondiente carrera profesional en 2013.

Entre medio de la realización de mi seminario de Título, junto con mis compañeros y amigos decidimos encaminarnos en el mundo del emprendimiento. Lo cual encendió en mí una pasión desconocida la cual quisiera seguir experimentando.

A mis padres
<3

AGRADECIMIENTOS

Al fin se termina este ciclo, aunque sólo ocurrirá cuando dé a luz a este elefante que tuvo un periodo de casi 22 meses de gestación. Y aunque fue difícil, fue hermoso y agradezco enormemente a la Universidad de Chile no sólo por formarme en el área científica, sino por enseñarme a vivir la vida de forma honesta, empática y humilde; forjando en mí el amor al conocimiento, al aprender; mostrarme que no estudiamos para la escuela, estudiamos para la vida. La fortaleza y perseverancia no la aprendí en clases, sino que con la gente que compone esta institución, sus alumnos y docentes son los que ponen a la Universidad de Chile en el pedestal en que hoy se encuentra, yo me siento orgullosa de ser parte de esto y le agradezco a la vida por ponerme en este camino.

En primer lugar quiero agradecer al Laboratorio Microbiología de Sistemas, por acogerme desde que era una mini científica perdida en el mundo, por enseñarme todo lo que sé hasta ahora en el mundo de la microbiología. Al Dr. Francisco Chávez, el Fran, por ser un amigo, tutor y maestro, por confiar en mí y siempre orientarme y apoyarme. Él me enseñó lo más importante de este trabajo, la pasión por la ciencia. Agradezco a mis compañeros del lab, esenciales en este trabajo: Nico, por la amistad y entrega, ella es fundamental en el lab; la Pai, por ser mi compañera, amiga y hombro, ella es el 50% de este trabajo; el Pancho, por sus consejos y amistad, su curiosidad y ganas de saber todo; la Cata, por su preocupación y apoyo, la Coni, que fue una compañía importante; y finalmente la Javi y la Maca, las amigas, mamás y jefas, ellas son las grandes maestras, mis primeras tutoras, ellas me enseñaron la disciplina en el trabajo, son personas íntegras, inteligentísimas y muy capaces, un ejemplo de científicas.

Muy importante en este trabajo fue el apoyo del laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Chile, les agradezco por brindarme su espacio y equipamiento. Al Dr. Ricardo Cabrera, quien fue un co-tutor magnífico, muy presente e interesado, quien me orientó cada vez que el camino se veía nebuloso, él es un gran amante de la bioquímica y un gran maestro, eso se agradece mucho. Tengo que agradecer eternamente a Rodrigo Muñoz, el daddy, mi gurú y guía científico indispensable, por enseñarme la tolerancia al fracaso y estar siempre ahí dándome ánimo y buenos consejos, en este espacio reducido no alcanzo a describir lo importante que fue y es.

Agradezco a la comisión evaluadora de este trabajo, Julieta Orlando y Claudia Stange, quienes, con gran voluntad, corrigieron este trabajo con muy poco tiempo de antelación.

Agradezco a mis amigas, eternas compañeras de vida, hermosas, locas, únicas e indispensables. Por su amor y por su apoyo en este camino. Por las noches y días de felicidad, por las distracciones y risas interminables. Por demostrarme que sí hay cosas que duran toda la vida #LDM.

Agradezco a mi pololo, mi Nechy, por su increíble amor, por sus abrazos únicos, por su apoyo incondicional, por su comprensión y real entrega. Por ser mi compañero y darme su energía, porque él hizo este camino más suave, tierno y llevadero, porque me alentó a diario, me tomó de la mano y caminó conmigo hasta el final.

Finalmente dar las gracias a mi familia, a mis padres a quienes admiro. Ellos me permitieron cumplir mis sueños a través de sus sacrificios personales, por ser los mejores padres del mundo. A mis hermanos, que no son los mejores del mundo, pero andan bien. Mentira xD, son lo mejor para mí, tengo la mejor familia, y en resumen esto es gracias a Dios, por darme todo sin merecer nada.

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.

ÍNDICE DE CONTENIDO

3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. Polifosfatos inorgánicos y polifosfato quinasa PPK1.....	1
3.2. Polifosfatos y <i>Pseudomonas</i>	5
3.3. Purificación y medición de la actividad de PPK1.....	9
3.4. Síntesis de los poliP como blanco para el diseño de antimicrobianos.....	11
3.5. Objetivos.....	14
3.5.1. Objetivo general.....	14
3.5.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y METODOS.....	15
4.1. Reactivos utilizados en este estudio.....	15
4.1.1. Cepas utilizadas en este estudio.....	15
4.1.2. Cepas de bacterias y medios de cultivo.....	16
4.2. Síntesis del gen <i>ppk1</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
4.3. Clonamiento del gen <i>Pappk1</i> en pET-TEV	18
4.4. Transformación bacteriana.....	19
4.5. Aislamiento de DNA plasmidial (miniprep).....	19
4.6. PCR de colonias	20
4.7. Secuenciación plasmidial.....	20
4.8. Ensayos de inducción de la proteína a pequeña escala.....	21
4.9. Inducción de la proteína a gran escala.....	22
4.9.1. Western Blot.....	24

4.10. Purificación de la proteína	25
4.10.1. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) ...	25
4.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y medición de la concentración.....	26
4.10.3 Corte de cola de histidina	27
4.11. Medición de la actividad de <i>PaPPK1</i> y cuantificación de polifosfatos.....	27
4.11.1. Ensayo para determinar las condiciones óptimas para la cuantificación de PoliP mediante la fluorescencia con DAPI.....	28
4.11.2. Ensayo para la determinación de las condiciones óptimas de actividad <i>PaPPK1</i>	28
4.11.3. Cinética de la enzima <i>PaPPK1</i> a distintas concentraciones de sustrato.....	29
4.12. Ensayo de inhibición de <i>PaPPK1</i>	30
4.13. Determinación de las constantes cinéticas aparentes.....	32
4.13.1. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Síntesis del gen <i>ppk1</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
5.2. Clonamiento del gen <i>Pappk1</i> en pET-TEV.....	34
5.3. Selección de clones y expresión de la proteína recombinante <i>PaPPK1</i>	40
5.3.1. Obtención de los parámetros óptimos para la inducción de la proteína <i>PaPPK1</i> a pequeña escala.....	40
5.3.2. Inducción de la proteína <i>PaPPK1</i> a gran escala.....	44
5.4. Purificación de la proteína <i>PaPPK1</i>	45
5.5. Medición de la actividad enzimática <i>PaPPK1</i>	47

5.5.1. Condiciones óptimas para la cuantificación de poliP mediante DAPI.....	47
5.5.2. Condiciones óptimas para la actividad PaPPK1.....	49
5.5.3. Parámetros cinéticos de PaPPK1.....	53
5.6. Inhibición de la actividad PaPPK1.....	56
6. DISCUSIÓN	58
6.1. Síntesis del gen <i>Pappk1</i> para optimizar el uso de codones en <i>Escherichia coli</i>	58
6.2. Elección del vector y de la cepa de <i>E. coli</i> para la expresión de PaPPK1.....	60
6.3. Purificación de PaPPK1.....	63
6.4. Medición de actividad PaPPK1 y cuantificación del poliP.....	65
6.5. Parámetros cinéticos de PaPPK1.....	69
6.6. Inhibidores de la PaPPK1.....	76
7. CONCLUSIONES.....	78
8. BIBLIOGRAFIA.....	79
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reactivos utilizados.....	15
Tabla 2	Cepas de <i>E.coli</i> usadas en este estudio.....	16
Tabla 3	Cebadores usados en este estudio.....	21
Tabla 4	Buffers usados en la purificación de PaPPK1.....	26
Tabla 5	IC ₅₀ para cada compuesto candidato (inhibidor).....	57
Tabla 6	Blast entre PaPPK1 estudiada y la PPK1 de diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i>	91
Tabla 7	Compuestos inhibidores utilizados.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Molécula de Polifosfato.....	1
Figura 2	Reacciones del metabolismo de los poliP descrita para <i>E. coli</i>	4
Figura 3	Reacciones descritas para la síntesis de PoliP en <i>P. aeruginosa</i>	6
Figura 4	Mapa del vector pUC57.....	17
Figura 5	Sobre-expresión de PaPPK1 en <i>E. coli</i>	23
Gráfico 1	Curva de calibración.....	30
Figura 6	Esquema de la metodología para la purificación de la PaPPK1.....	31
Figura 7	Digestión de los plásmidos pET-TEV y PUC57-Pappk1.....	35
Figura 8	Mapa del plásmido de expresión pET-TEV-Pappk1.....	36
Figura 9	Comprobación de la transformación de las cepas JM109 con el plásmido pET-TEV-Pappk1 por PCR de colonias	37
Figura 10	Digestión de pET-TEV-Pappk1	38
Figura 11	Blast entre PPK1 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y la secuencia derivada del gen Pappk1 secuenciado en este trabajo.....	39
Figura 12	Ensayo de inducción a pequeña escala para la temperatura de crecimiento del precultivo.....	40
Figura 13	Ensayo de inducción a pequeña escala para la temperatura	41
Figura 14	Ensayo de inducción a pequeña escala para la concentración de IPTG.....	41
Figura 15	Ensayo de inducción a pequeña escala para definir las horas de inducción.....	42

Figura 16	Ensayo de inducción a pequeña escala con diferentes cepas de <i>E. coli</i>	43
Figura 17	Ensayo de inducción a pequeña escala de clones.....	44
Figura 18	Purificación de la proteína PaPPK1.....	45
Figura 19	Western Blot.....	46
Figura 20	Efectos de los componentes de la solución amortiguadora sobre la dependencia de la fluorescencia con la concentración de DAPI.....	47
Figura 21	Dependencia de la fluorescencia con la concentración de poliP en diferentes concentraciones de DAPI.....	48
Figura 22	Efecto del parámetro Ganancia sobre la dependencia de la fluorescencia con la concentración de poliP.....	48
Figura 23	Determinación del rango lineal para la medición de poliP con DAPI	49
Figura 24	Efecto de la remoción de cola de His sobre la actividad PaPPK.....	50
Figura 25	Ensayos con sistema de regeneración de ATP (sist reg) más cebador.....	51
Figura 26	Actividad de extractos de cepas de <i>E. coli</i> inducidas para la expresión de PaPPK1.....	51
Figura 27	Efecto de la concentración de ATP en el ensayo de actividad y el tipo de medio de cultivo durante la inducción.....	52
Figura 28	Prueba de actividad de la proteína pura.....	52
Figura 29	Actividad enzimática de la enzima PaPPK1.....	54
Figura 30	Actividad enzimática de la enzima PaPPK1 a distintas concentraciones de sustrato.....	54
Figura 31	Cinética de PaPPK1 a distintas concentraciones de sustrato.....	55

Figura 32	Actividad inhibitoria de 39 compuestos en la enzima <i>PaPPK1</i>	56
Figura 33	Efecto del inhibidor según la dosis.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Ap^r</i>	Resistencia a ampicilina
BSA	Seroalbúmina bovina
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanometros
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EcPPK1</i>	Polifosfato quinasa de <i>Escherichia coli</i>
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactósido
<i>kan^r</i>	Resistencia a kanamicina
<i>K_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>K_i</i>	Constante de inhibición
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
ORF	Marco de lectura abierto de un gen
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<i>PaPPK1</i>	Polifosfato quinasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
pET- TEV- <i>Pappk1</i>	Plásmido compuesto por el pET-TEV y el inserto <i>ppk1</i>
PolIP	Polifosfato inorgánico

<i>ppk1</i>	Gen de la polifosfato quinasa 1
PPX	Exopolifosfatasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-acetato EDTA
TCEP	tris (2-carboxietil) fosfina
V_0	Velocidad Inicial
V_{MAX}	Velocidad máxima

RESUMEN

Los polifosfatos son biopolímeros lineales formados por residuos de ortofosfatos unidos por un enlace fosfoanhídrido. En bacterias, la enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1) sintetiza estos biopolímeros a partir de ATP y son degradados a fosfato inorgánico (Pi) por la enzima exopolifosfatasa (PPX). En bacterias, la carencia de los poliPs afecta procesos celulares como la motilidad, la formación de biopelículas y la patogénesis. En *Pseudomonas aeruginosa*, si bien la enzima PPK1 no es esencial para su crecimiento, es indispensable para la sobrevivencia de la bacteria en condiciones de carencia y estrés así como para los procesos de virulencia. Estas características hacen a la PPK1 un atractivo blanco para el diseño de nuevos compuestos antimicrobianos que no afecten la viabilidad bacteriana pero que sí afecten la producción de factores de virulencia.

Para poder descubrir inhibidores de la enzima PPK1, es importante contar con la proteína purificada. Para ello, es necesario sobre-expresar y posteriormente purificar la proteína en su forma activa. En este seminario de título se clonó, purificó y ensayó la actividad enzimática para establecer los parámetros cinéticos de la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* (*PaPPK1*). Esto nos permitió estudiar la inhibición producida por moléculas sintéticas generadas a partir de *docking* molecular *in silico* usando como blanco molecular la *PaPPK1*. Para esto se sintetizó el gen *ppk1* de *P. aeruginosa* PAO1 con el uso de codones adaptados a *Escherichia coli* y bajo el control del promotor del fago T7. Se subclonó en un vector de expresión y se sobreexpresó la proteína recombinante en la cepa BL21 AI de *E. coli* para luego purificar la enzima gracias a la cola de histidina fusionada al extremo amino. La actividad PPK1 se determinó mediante la cuantificación

del poliP sintetizado unido a un marcador fluorescente DAPI, que interactúa con el polifosfato cambiando su longitud de onda y permitiendo el uso de DAPI para la detección de poliP *in vitro* e *in vivo*. Finalmente pudimos establecer un protocolo de actividad enzimática de la enzima PaPPK1 que nos permitió descubrir 6 moléculas candidatas a inhibidores de la actividad PaPPK1 con posible uso como nuevos antimicrobianos.

ABSTRACT

Polyphosphates are linear biopolymers composed of orthophosphate residues linked by a phosphoanhydride bond. In bacteria, these biopolymers are synthesized by the enzyme polyphosphate kinase 1 (PPK1), from ATP and are degraded to inorganic phosphate (Pi) by the enzyme exopolyphosphatase (PPX). In bacteria, the lack of polyPs affects cellular processes such as motility, biofilm formation and pathogenesis. In *Pseudomonas aeruginosa*, although PPK1 enzyme is not essential for growth, it is essential for the survival of the bacteria in conditions of deprivation and stress as well as during the virulence processes. These characteristics make the PPK1 an attractive target for the design of novel antimicrobial compounds that do not affect bacterial viability but instead disturbs the production of virulence factors.

To discover PPK1 inhibitors is important to obtain the purified protein. For this the overexpression and purification of the enzyme in its active form is needed. Our aim in this thesis was to clone, purify and test the enzyme activity to establish the kinetic parameters of the *P. aeruginosa* enzyme PPK1 (*PaPPK1*). This allowed us to study the inhibition of the enzyme by synthetic molecules generated by using *in silico* molecular docking using *PaPPK1* as the molecular target. For this, the *ppk1* gene from *P. aeruginosa* PAO1 gene was synthesized with codon usage adapted to *Escherichia coli* under control of T7 phage polymerase and the recombinant protein was overexpressed in the strain *E. coli* BL21 AI. Then, the enzyme was purified by affinity chromatography thanks to the histidine tail fused to the amino terminus. The PPK1 activity was measured by quantifying the synthesized polyP linked to a fluorescent marker DAPI, which interacts with the

polyphosphate changing its wavelength and allowing the use of DAPI for detecting polyP in vitro and in vivo. Finally, we could establish a protocol *Pa*PPK1 enzymatic activity of enzyme that allowed us to discover six candidates inhibitors of *Pa*PPK1 activity with possible use as novel antimicrobial agents.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Polifosfatos inorgánicos y polifosfato quinasa PPK1

Una de las moléculas que recientemente se ha involucrado en la supervivencia ante distintos factores ambientales son los polifosfatos inorgánicos (poliP). Estos biopolímeros lineales están formados por decenas o centenas de ortofosfatos unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía (Kornberg, 1995; Kornberg y cols., 1999) (Figura 1). La energía liberada al hidrolizar el fosfato terminal de la cadena es utilizada por la célula para la producción de todas las moléculas vitales, tales como los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Achbergerová y Nahálka, 2011). Considerados clásicamente como componentes con función de reserva energética, la función de los poliP en los seres vivos permaneció desconocida por muchos años debido a la falta de métodos analíticos específicos.

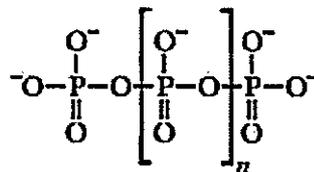


Figura 1. *Molécula de Polifosfato*. El valor de n varía dependiendo de la localización y el estado celular.

Los poliPs se han estudiado principalmente en microorganismos y está presente en todas las especies de los tres dominios de la vida. En cada célula de la naturaleza se ha encontrado este biopolímero, incluyendo bacterias, hongos, plantas, células animales (Wood y Clarck, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y cols., 1990), pero ninguno lo utiliza como fuente de energía esencial. Curiosamente, en

numerosos organismos si bien presentan poliPs no se conoce en detalle la enzima encargada de su síntesis.

La localización microscópica de los poliPs es importante para entender su función. En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble (Rao y cols., 1998). También existen pequeñas cantidades de poliP en las membranas plasmáticas, en complejo con poli- β -hidroxibutirato (PHB) y calcio (Reusch y Sadoff, 1988). En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y cols., 1999). Su carga negativa sugiere que podrían haberse adherido a las superficies de pirita donde se cree que se originaron los primeros metabolizadores quimioautotróficos en un ambiente no reductor y de altas temperaturas (Wächtershäuser, 1992). Según esta teoría los poliP habrían cumplido un rol en la activación de grupos como dadores de Pi en reacciones de fosforilación.

El posible origen prebiótico y el carácter ubicuo de los poliP sugieren una multiplicidad de funciones dependiendo del organismo o de la localización subcelular. En el pasado, Arthur Kornberg y su grupo propusieron diversas funciones alternativas para los poliPs (Kornberg y cols., 1999), tales como un medio de almacenamiento de energía, depósito celular de fosfato, quelante de iones metálicos, amortiguador frente a iones alcalinos, canal para la entrada de DNA, regulador de la tensión y la supervivencia, un factor relevante en la regulación de genes y un sustituto de ATP en reacciones de fosforilación (Kornberg, 1995). Adicionalmente, los poliP cumplen un rol importante en la respuesta ante ciertos factores de estrés (Ault-Riché y cols., 1998). Actualmente se sabe que los poliP regulan directamente algunos procesos en la célula, como la movilidad, la formación de biopelículas, la comunicación bacteriana (*quorum sensing*) y otros

procesos fisiológicos (Rashid y cols., 2000a; Rashid y cols., 2000b; Rashid y Kornberg, 2000c). También se utilizan como donantes de fosfato en la regulación génica, en la fosforilación de GDP a GTP por medio de la enzima PPK2 (más adelante mencionada) y en otros procesos de fosforilación dentro de la célula (Achbergerová y cols., 2011). El poliP puede ayudar a los organismos a adaptarse a condiciones extremas, como la salinidad, la osmolaridad, la desecación, la radiación UV, la presión barométrica, el pH y la temperatura (Crooke y cols., 1994; Rao, 1996; Keasling y Hupf, 1996; Keasling, 1997; Rao y Kornberg 1999).

Está bien establecido que los niveles de poliP aumentan en respuesta a la carencia de aminoácidos (Ault-Riché y cols., 1998). Sin embargo, sólo recientemente se dilucidó la función de los poliP en la respuesta adaptativa ante esta condición. Los poliP forman un complejo con la proteasa Lon que lleva a la degradación de varias proteínas ribosomales, proveyendo así los aminoácidos necesarios para responder a la condición de carencia (Kuroda y cols., 2001). Esta es la primera evidencia experimental directa sobre un rol de los poliP en la respuesta adaptativa a condiciones de estrés.

El metabolismo de los poliPs en las células es dinámico. En bacterias, la síntesis de los poliP se realiza mediante la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1). Esta enzima cataliza la síntesis de poliP desde ATP (Figura 2). La reacción es reversible, dando lugar a la síntesis de ATP desde ADP y poliP, lo que sólo ocurre ante un exceso de ADP (Ahn y Kornberg, 1990).

La PPK1 está bien estudiada en *E. coli* (*EcPPK1*), ha sido purificada y su gen clonado y secuenciado (Ahn y Kornberg., 1990; Akiyama y cols., 1992). Su sitio activo contiene dos histidinas fosforilables *in vitro* altamente conservadas (His 441 y His 460) (Kumble y

cols., 1996). Por otro lado, la enzima exopolifosfatasa (PPX) está involucrada en la hidrólisis de los polifosfatos para liberar fosfato inorgánico (Akiyama y cols., 1993).

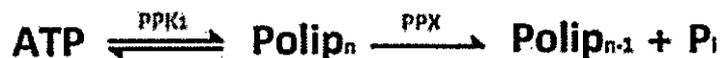


Figura 2. Reacciones principales del metabolismo de los poliP descritas para *Escherichia coli*.

La regulación coordinada de actividades *EcPPX* y *EcPPK* no es sorprendente. El gen *Ecppx* se encuentra río abajo de *Ecppk1* formando un operón. Esto significa que el nivel de degradación de poliP por *EcPPX* siempre depende del nivel de la síntesis de poliP por *EcPPK* (Akiyama y cols., 1992). Este ordenamiento del operón *ppk-ppx* no es una característica común en otros genomas bacterianos. Por ejemplo, en *Acinetobacter sp.* el gen *ppk* es una unidad transcripcional (Geißdörfer y cols., 1998).

Contrariamente a lo que sucede en *E. coli*, en *P. aeruginosa* el gen *ppx* se encuentra en una dirección opuesta al gen *ppk1*, y por lo tanto, no forman un operón (Zago y cols., 1999). Esto puede explicar la diferencia en los niveles de poliP entre diferentes bacterias. La acumulación de poliP en *P. aeruginosa* es varias veces mayor que en *E. coli* (Kim y cols., 1998). Al parecer los niveles de enzimas *PaPPX* se regulan independientemente de los niveles de *PaPPK1* (Miyake y cols., 1999; Zago y cols., 1999).

El gen codificante de la PPK1, la principal enzima que sintetiza poliP, está presente en varios genomas bacterianos, incluyendo numerosas bacterias patógenas (Tzeng y Kornberg, 1998). Por lo tanto, proteínas homólogas de PPK1 se han encontrado en más de 100 especies de procariotas, incluyendo 20 grandes agentes patógenos y, hasta la fecha, sólo en dos eucariotas, *Dictyostelium discoideum* y la levadura *Candida humicola* (Zhang y cols., 2005). La *DdPPK1* de *D. discoideum* comparte un 30% de identidad y

51% de similitud con la PPK1 de *E. coli* (Rao y cols., 2009). Sin embargo, todavía siguen siendo difícil de encontrar las enzimas encargadas del metabolismo de los poliPs en las células vegetales y de mamíferos.

Cepas mutantes del gen *ppk1* de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae* tienen afectadas varias funciones celulares y estructurales como la motilidad a pesar de la presencia del flagelo intacto (Rashid y cols., 2000a) y la virulencia (Rashid y cols., 2000b; Ortiz-Severín, 2013). Otras características observadas es que los mutantes son más sensibles a peróxido de hidrógeno, a las altas temperaturas y a los niveles de sal en comparación con la cepa de tipo silvestre (Rao y cols., 1996).

Por lo mencionado, y por el alto grado de identidad entre los ortólogos de PPK1 en algunas de las principales especies patógenas, se ha purificado la *EcPPK1* y se han reportado sus inhibidores metabólicos (Kornberg, 2003).

3.2. PaPPK1 y Pseudomonas

P. aeruginosa PAO1, al igual que otras bacterias, no posee uno, sino dos ortólogos PPK (PPK1 y PPK2). La PPK1 de *P. aeruginosa* (*PaPPK1*) tiene una masa molecular de 83,151 kDa, un punto isoeléctrico de 7,72, el gen de *Pappk1* está compuesto por 2208 pb que codifica una proteína de 736 aminoácidos, cuya secuencia muestra extensa similitud con las PPK1 conocidas (Ishige y cols., 1998). Los mutantes *ppk1* de *P. aeruginosa* PAO1 no muestran niveles de actividad PPK1 detectables pero aún poseen alrededor del 20% del poliP que tiene la cepa silvestre (Rashid y cols., 2000b). Esto es debido a la enzima PPK2, que fosforila GDP a GTP mediante el uso de poliP como donante de ortofosfato, pero que también puede utilizar GTP o ATP en la síntesis de las cadenas de poliP (Ishige y cols., 2002). Esto difiere de la *PaPPK1*, que utiliza

exclusivamente ATP para la síntesis de poliP (Varela y cols., 2009). Mientras PPK1 tiene como actividad principal sintetizar poliP, la PPK2 principalmente degrada poliP para fosforilar purinas (Achbergerová y cols., 2011) (Figura 3), por lo tanto, PPK1 es la principal enzima para la síntesis de poliP. Además *P. aeruginosa* también posee una PPX (no detallado en la figura 3), al igual que *E. coli*.



Figura 3. Reacciones descritas para la síntesis de PoliP en *P. aeruginosa*.

La PaPPK1 tiene un tamaño molecular mayor a las PPKs conocidas de otras especies ya que contiene un tramo extra de 46 aminoácidos en la región N-terminal nunca antes visto en otra PPK1. El primer codón del gen *Pappk1* está localizado sólo a 18 pb río abajo del codón de término del gen *hemB* que codifica para la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico, implicando que ambos genes podrían ser transcritos en la misma unidad de ARN mensajero (Ishige y cols., 1998).

Al igual que en otras bacterias, como ya se mencionó, en *P. aeruginosa* las alteraciones en el metabolismo de los poliP causan numerosas disfunciones estructurales y funcionales. Las bacterias mutantes de la enzima PaPPK1 están afectadas en el crecimiento durante la fase estacionaria, en la sobrevivencia al estrés por calor, a cambios en el pH y al estrés causado por agentes oxidantes, cambios osmóticos y de radiación (Ghafoor, Hay y Rehm, 2011). También se ven afectadas en la formación de biopelículas, el *quorum sensing*, la producción de exopolisacáridos y los tres tipos de motilidad como *swimming*, *swarming* y el *twitching* (Rashid y col, 2000c). Finalmente los mutantes *Pappk1* son más susceptibles a la acción de antibióticos y a la desecación

(Rashid y cols., 2000b y 2000c) y tienen problemas con la compactación del nucleóide y la distorsión de la envoltura nuclear (Fraley y cols., 2007).

En estudios de nuestro laboratorio, usando microarreglos, se analizaron los cambios fenotípicos que ocurren en las cepas mutantes del gen *ppk1* y *ppk2* en *P. aeruginosa*. Se encontró gran similitud fenotípica entre los dos mutantes *ppk*, características que no son compartidas por la cepa control, *P. aeruginosa* PAO1 silvestre. Por ejemplo, se evidenció una marcada sensibilidad de ambos mutantes a distintos iones tóxicos, desestabilizantes de membrana y numerosos antibióticos (Ortiz-Severín y cols., 2015). Por otro lado, al evaluar la producción de biopelículas en la interface aire-líquido mediante un ensayo con Rojo Congo, se determinó una menor producción de exopolisacárido *pel* en ambas cepas mutantes al compararlas con la cepa silvestre (Álvarez y cols., 2011). También en estudios de virulencia utilizando el pez cebra como modelo animal, se observó que los mutantes de *PaPPK1* tienen una virulencia atenuada a diferencia de lo observado en la cepa silvestre (Clatworthy y cols., 2009). Estos resultados sugieren que los múltiples defectos estructurales y funcionales encontrados relacionan el metabolismo de los poliPs en *P. aeruginosa* con una función reguladora celular.

Adicionalmente, la enzima *PaPPK1* es importante no sólo por la motilidad y el desarrollo de biopelículas en *P. aeruginosa*, sino también para la producción de factores de virulencia tales como la elastasa y los ramnolípidos (Hare y cols., 2012).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista, Gram negativo, de humanos que causa una alta mortalidad en pacientes con fibrosis quística o inmunocomprometidos (Lyczak y cols., 2000). Su patogenicidad se ha relacionado con el *quorum sensing* (Van Delden y

Iglewski, 1998) y con la gran capacidad de producir variados factores de virulencia, como el pili, el flagelo, el lipopolisacárido *pel*, el sistema de secreción tipo III (T3SS) (Yahr y Wolfgang, 2006), exotoxinas, pigmentos tóxicos (sideróforos, piocianina) (Clatworthy y cols., 2009), proteasas, ramnolípidos, entre otros. Estos numerosos factores son claves para la persistencia de la infección permitiéndole colonizar y sobrevivir en el hospedero.

El tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en pacientes intrahospitalarios es muy complejo y constituye un gran desafío científico, debido a que posee una gran resistencia intrínseca a numerosos antibióticos comparada con otras bacterias Gram negativas (Hancock, 1986; Breidenstein y cols., 2011). Se le ha denominado “súper bacteria”, por su gran capacidad de generar resistencia a una amplia variedad de antibióticos, y también por su capacidad de infectar una gran variedad de hospederos (Rahme y cols., 1997; Tan y cols., 1999; Jander y cols., 2000).

En muchos patógenos, incluyendo *P. aeruginosa*, se ha observado el fenómeno denominado “persistencia bacteriana”, el que ha sido implicado en muchas infecciones tanto crónicas como recurrentes (Maisonneuve y cols., 2013). La persistencia bacteriana es el fenómeno en el cual las poblaciones bacterianas sensibles a antibióticos, producen algunas células que se vuelven tolerantes a múltiples drogas de forma transitoria debido a mecanismos de dormancia (Maisonneuve y cols., 2013). Es decir, células vivas pero metabólicamente detenidas son capaces de resistir la acción de antibióticos que tienen como blanco procesos celulares activos (Bigger, 1944). Trabajos realizados en *E. coli*, revelaron que las células persistentes se generan estocásticamente y vinculan el grado de persistencia que pueden desarrollar las bacterias, con el nivel intracelular de los poliP, a mayor concentración de poliP, mayor persistencia (Maisonneuve y cols., 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, es de suma importancia estudiar la relación de estos aspectos con la virulencia bacteriana, especialmente en *P. aeruginosa*, por ser uno de los principales patógenos intrahospitalarios, por tener la capacidad de colonizar una amplia variedad de nichos (Hare y cols., 2012), por ser un patógeno con alta incidencia de mortalidad y, sobre todo, porque la virulencia de este patógeno oportunista puede relacionarse con el metabolismo de los polifosfatos. Es objetivo de este seminario estudiar más a fondo la principal enzima relacionada con la síntesis de poliP, ya que hasta la fecha no se ha purificado la PaPPK1.

3.3. Purificación y medición de la actividad PPK1

La enzima *EcPPK1* se purificó hasta homogeneidad (Ahn y Kornberg, 1990; Akiyama y cols., 1992), luego de identificar y clonar el gen de *Ecppk1*, para así, lograr su sobreproducción (alrededor de 100 veces). Se caracterizó su masa molecular, su radio de Stokes, el coeficiente de sedimentación, el coeficiente de fricción y concluyeron que la enzima era un tetrámero simétrico (Ahn y Kornberg, 1990; Akiyama y cols., 1992). En el año 2000, se volvió a purificar la enzima, pero esta vez se hizo mediante una columna de níquel-ácido nitrilotriacético. La enzima se eluyó y las muestras fueron verificadas por SDS-PAGE y Western Blot, además se caracterizó mediante ensayos de actividad (Tzeng y Kornberg, 2000). En literatura se han encontrado caracterizaciones de PPK1 de otros organismos, pero no hay reportes de que se caracterizaran los parámetros cinéticos de la PaPPK1, sólo se ha caracterizado la PaPPK2 (Zhang y cols., 2002).

Por su parte, para medir la actividad de la enzima PPK1, usualmente se utiliza ATP marcado con fosfato radiactivo y luego se purifica el poliP sintetizado y se mide por medio de un contador de centelleo, el cual mide el ^{32}P con una eficiencia del 81% (PerkinElmer,

2011). Así se han obtenido fuertes evidencias con respecto al papel desempeñado por los poliP en la regulación de la respuesta a deficiencias nutricionales, estrés ambiental y supervivencia en fase estacionaria en *E. coli* (Rao y Kornberg, 1999). Sin embargo, este método tiene la gran desventaja de trabajar con radiactividad y el protocolo es engorroso, ya que generalmente se debe hacer con numerosas muestras donde el poliP debe ser extraído. Otra forma alternativa de cuantificar el poliP es mediante un ensayo basado en la fluorescencia de 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) unido a poliP, que facilita su cuantificación sin interferencias con el ATP (Kulakova y cols., 2011). El fluoróforo DAPI es ampliamente utilizado para el DNA, pero también interactúa con el poliP, formando el complejo DAPI-PoliP, el cual cambia su longitud de onda de emisión de 475 a 550 nm y de excitación de 360 a 415 nm comparado con la unión de DAPI-DNA, permitiendo el uso de DAPI para la detección de poliP *in vitro* e *in vivo* (Aschar-Sobbi, 2008). Como la longitud de onda de excitación (≥ 400 nm) del complejo DAPI-poliP proporciona un significativo aumento en la sensibilidad de detección de poliP, el uso de excitación a 415 nm permite que la fluorescencia de este complejo sea detectado en una longitud de onda mayor (emisión a 550 nm) para detectar la fluorescencia de hasta 25 ng/ml de poliP (Aschar-Sobbi, 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 DNA y ATP (Aschar-Sobbi, 2008). Sin embargo, pese a la eficiencia de este método, hasta la actualidad ningún método de actividad PPK1 ha sido reportada con el uso del DAPI para cuantificar el poliP. Es objetivo de este seminario establecer un protocolo para medir la actividad PPK1 mediante el uso del fluoróforo DAPI.

3.4. Síntesis de los poliP como blanco para el diseño de antimicrobianos.

Las bacterias patógenas son la causa de un sinnúmero de enfermedades que afectan a la humanidad. La neumonía, fiebre tifoidea, la diarrea, la tuberculosis, el cólera, e incluso el cáncer son sólo algunos ejemplos. Grandes enfermedades provocadas por infecciones con bacterias patógenas han sido superadas por la acción de los antibióticos, el descubrimiento de estos fármacos revolucionó la medicina, pero con el paso de los años éste gran descubrimiento ha traído consecuencias colaterales (Maviglia y cols., 2009).

La mayoría de los antibióticos utilizados en la actualidad, apuntan a erradicar el patógeno o a interferir con su crecimiento, lo cual les interpone una fuerte presión selectiva, que se traduce en la evasión de este “ataque” creando resistencias o desarrollando persistencia, haciendo que los antibióticos no logren su efecto letal. El uso excesivo de antibióticos resultó en que ciertas cepas bacterianas se volvieron resistentes a estos fármacos, teniendo que aumentar la dosis para ciertos tratamientos, lo que trae consecuencias en el microbioma natural del paciente y en la aparición de cepas resistentes al mismo (Maviglia y cols., 2009).

Actualmente, la resistencia a la mayoría de los antibióticos aparece sólo unos pocos años después de su introducción en la práctica clínica (Sintim y cols., 2010). La mayoría de los antibióticos se dirigen a las funciones celulares bacterianas esenciales o procesos de crecimiento, pero los fármacos que tienen como blanco la síntesis de proteínas, son por lo general bacteriostáticos (Kaakoush y Mendz, 2009). Estos fármacos permiten la reducción de la virulencia bacteriana (antivirulencia) e incrementan la susceptibilidad a las defensas del hospedero, en vez de exterminar al patógeno (Pournaras y cols., 2009);

ya que al no ser bactericida son menos propensos a producir efectos secundarios y producen menos resistencia. Un ejemplo es un antimicrobiano dirigido al *quorum sensing* bacteriano, éste inhibe la comunicación bacteriana, degradando las moléculas auto-inductoras o bloqueando la recepción de éstas (Swem y cols., 2009).

Los compuestos químicos antimicrobianos dirigidos a la virulencia bacteriana, idealmente deben poseer un amplio espectro de actividad y poca toxicidad. La búsqueda de una molécula o proceso celular apropiado como blanco para dirigir un fármaco en la célula bacteriana es esencial para la eficacia de una nueva droga.

Teniendo en cuenta que el metabolismo alterado de los poliP, en particular la delección del gen *ppk1*, produce una disminución de la virulencia en varios microorganismos patógenos, se puede establecer que la PPK1 exhibe un buen potencial como un nuevo blanco para el diseño de fármacos antimicrobianos para el control de la virulencia, ya que tiene funciones de regulación importantes, pero no esenciales en las células (Rashid y cols., 2000a, 2000b y 2000c; Ortiz-Severín y cols., 2013). Además no se han encontrado ortólogos de PPK1 en eucariotas superiores (Zhang y cols., 2005) y existe un alto grado de identidad entre ortólogos de PPK1 en la mayoría de los principales patógenos bacterianos conocidos (Zhang y cols., 2002; Tzeng y Kornberg, 1998).

Para lograr estas proyecciones, es necesario en primer lugar poder obtener la enzima purificada en su forma activa y determinar posibles moléculas inhibidoras de la enzima.

En estudios previos en nuestro laboratorio se encontraron posibles inhibidores de la PaPPK1 mediante el diseño *in silico* de drogas (Chávez y cols., 2011). Primero se modeló la PaPPK1 a partir de la estructura 3D conocida de la EcPPK1 (Zhu y cols., 2005). La estructura obtenida se utilizó para hacer un sondeo biológico virtual de

pequeñas moléculas con la capacidad de unirse y desplazar al ATP del sitio activo de la PaPPK1. Para esto se utilizaron moléculas de la base Diversity Set II (National Cancer Institute, National Institutes of Health) y moléculas contenidas en la biblioteca química pública Maybridge Diversity Fragment Library (Thermo Fisher Scientific), una de las primeras bibliotecas de fragmentos disponibles comercialmente. Estas moléculas incluyen más de 140 mil compuestos y tienen la ventaja de estar disponible gratuitamente previa solicitud institucional. Ambas colecciones contienen estructuras optimizadas de dos tipos diferentes de candidatos a ligando, la primera colección comprende farmacóforos más globales, mientras que la segunda incluye principalmente fragmentos. Mediante los programas LibDock y CHARMMbased CDOCKER (Accelrys) se comprobó que varios compuestos se acoplaron al sitio activo de la estructura cristalina de PaPPK1. Se evaluó el puntaje con la función empírica consenso, Ludi, y se seleccionó un grupo de compuestos para su evaluación biológica. En este trabajo se estudió la acción de estas moléculas en la actividad enzimática PaPPK1 *in vitro*.

Resultados preliminares, indicaron que *in vivo*, estos compuestos químicos tienen efectos antivirulencia en *P. aeruginosa* al ser usada en un modelo patógeno-hospedero con *D. discoideum* (Bravo-Toncio, 2015).

3.5 Objetivos

3.5.1. Objetivo general

Expresar heterológamente y purificar la enzima PPK1 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en *Escherichia coli* para utilizar dicha enzima en ensayos de inhibición enzimática.

3.5.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar y sobre-expresar heterológamente en *E. coli* el gen *ppk1* de *P. aeruginosa* PAO1.
2. Purificar la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 en su forma activa.
3. Ensayar la actividad enzimática de PaPPK1 mediante DAPI y determinar algunos parámetros cinéticos de la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1.
4. Ensayar la actividad inhibitoria de moléculas sobre la actividad enzimática de la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos utilizados en este estudio

El agua utilizada en todos los experimentos se nanopurificó (Agua nanopura), hasta una resistencia de 18,2 ohm. La tabla 1 detalla los reactivos utilizados en esta tesis.

Tabla 1. Reactivos utilizados.

Insumos	Proveedor
LB, LB Agar	Difco™ (CHILE)
Coomassie Plus™, Inhibidor de proteasas, TCEP, kit Rapid Ligation, B-PER®	Thermo Fisher (CHILE)
Gel Red	Biotium (CA-EEUU)
Glicina, Tween-20, SDS	Calbiochem (NJ-EEUU)
HisTrap™ HP	GE Healthcare (Suecia)
Acrilamida, BSA, MassRuler™ DNA Ladder Mix	Invitrogen (CA-EEUU)
Partidores	IDT (IO-EEUU)
LE Agarosa SeaKem®	Lonza (Basilea-Suiza)
Azul de Coomassie R-250, Tris, MgCl ₂ , NaCl, Imidazol.	Merck (NJ-EEUU)
Fast digest <i>Hind</i> III y <i>Nde</i> I, 6X loading dye	New England Biolabs® Inc (EEUU)
E.Z.N.A (miniprep kit)	OMEGA Bio-tek (GA-EEUU)
β-mercapto-etanol, standard M.W., PolIP _{4s} , Creatina quinasa y fosfato	Sigma (MO-EEUU)
IPTG, Kanamicina, Ampicilina	US Biological (MA-EEUU)
Glicerol	Winkler (STGO-CHILE)
DAPI, UltraClean™ PCR Clean-up	Life Technologies (CHILE)

4.1.1. Cepas utilizadas en este estudio

Diferentes cepas de *E. coli* fueron usadas para evaluar cuál es la que da una mejor expresión de la proteína en su forma soluble y además medir la actividad de cada PaPPK1 proveniente de las distintas cepas, ya que alguna de éstas podría tener problemas en el plegamiento o la expresión de la proteína recombinante.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* usadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Característica	Referencia
DH5 α	endA1 gyrA96 hsdR17 Δ (lac)U169 recA1 relA1 supE44 thi-1 (ϕ 80 lacZ Δ M15)	Muy usada para clonar. Elevada eficiencia de transformación. Minimiza la recombinación y garantiza estabilidad al plásmido.	Grant y cols, 1990
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15] hsdR17(r _K m _K ⁺)	Alto rendimiento en la purificación DNA plasmidial. Minimizan la recombinación y garantiza estabilidad al plásmido. Alta eficiencia de transformación.	Mairhofer y cols, 2008
K-12	cepa silvestre	Se utilizan en biología molecular como un organismo modelo.	Bachman, 1972
BL21-AI TM	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP tetA	Para plásmidos con promotor T7. La expresión de la T7 RNA polimerasa es reprimida hasta que se induce con L-arabinosa.	Berrow y cols, 2006
Origami 2	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII por araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac ⁺ lacI q proj gor522::Tn10 trxB (StrR , TetR)	Control, no expresa proteína basal de hospedero. Permite la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma, lo que facilita el plegamiento de la proteína recombinante.	Pfeffer y cols, 2007
Origami 2 (DE3)*	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac ⁺ lacI q proj (DE3) gor522::Tn10 trxB (StrR , TetR)	Permite la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma, lo que facilita el plegamiento de la proteína recombinante.	Pfeffer y cols, 2007
BL21 (DE3) pLysS	F - ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm (DE3) pLysS (CmR)	Hospedero de alta expresión, con bajo número de copias plasmidial pero de gran rendimiento.	Berrow y cols, 2006

*(DE3): λ lisógeno que lleva el gen para la ARN polimerasa de T7, se utiliza para el sistema de expresión basado en promotor de T7.

4.1.2. Cepas de bacterias y medios de cultivo

E. coli JM109 fue usada para la mantención de los plásmidos. Distintas cepas de *E. coli* (Tabla 2) fueron usadas para la expresión de la proteína recombinante. Las cepas DE3 se obtuvieron gracias a la gentileza del laboratorio de genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, las demás cepas son propias del Laboratorio de Microbiología de Sistemas. Estas cepas se cultivaron aeróbicamente en medio líquido Luria-Bertani (LB), medio S.O.C. (2% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM (MgCl₂ 6H₂O + MgSO₄ 7 H₂O), 20 mM sucrosa) y en medio

4.3. Clonamiento del gen *Pappk1* en pET-TEV

El vector pET-TEV se utilizó para la expresión de la enzima PaPPK1 según se describe más adelante y para facilitar su purificación ya que presenta una cola de seis histidinas. El vector pET-TEV (facilitado por el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile) posee un tamaño aproximado de 6000 pb y contiene un marcador de selección por resistencia al antibiótico Kanamicina. El gen *Pappk1*, del vector pUC57-*Pappk1*, se clonó en pET-TEV y se secuenció para demostrar la ausencia de mutaciones espurias.

Para esto se digirieron los vectores pUC57-*Pappk1* y pET-TEV con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Las reacciones fueron incubadas a 37°C, por 2 horas. Sólo el vector pET-TEV se digirió secuencialmente, primero con *HindIII* y luego con *NdeI*, para evitar su recircularización.

Después de la digestión el gen de interés y los plásmidos de expresión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% p/v para luego ser purificados.

Cada muestra digerida de aproximadamente 150 ng de DNA se mezcló en proporción 5:1 con una solución de amortiguador de carga 6X loading dye y luego se cargaron en geles de agarosa. La agarosa se preparó en solución TAE 1X (Tris-HCl pH 8,3 40 mM, Acetato 20 mM y EDTA 1mM) y Gel Red 1X. En cada corrida electroforética se incluyó un carril con el estándar de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix de 10 Kpb para estimar los tamaños de las bandas de DNA resultantes de la digestión. Luego de la electroforesis se extrajeron las bandas de DNA desde el gel (el fragmento de tamaño 2,4 Kb que corresponde al gen *Pappk1* y la de 6 Kb que correspondía al vector pET-TEV linealizado) utilizando el kit de extracción de gel UltraClean™ PCR Clean-up de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA fue eluido con 50 μ L de agua nanopura y concentrado 20 veces por medio de speed vac al vacio.

Luego de purificadas y concentradas las bandas tanto del gen de interés, *Pappk1*, y el vector linealizado, pET-TEV, se ligaron 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. El plásmido resultante de la ligación fue llamado pET-TEV-*Pappk1*.

Debido a que el vector pET-TEV expresa constitutivamente un cassette del gen de resistencia a kanamicina, las ligaciones exitosas entre el gen de interés y el vector pudieron seleccionarse en placas de agar LB que contenían 50 μ g/mL de kanamicina, luego de la transformación en una cepa de *E. coli*.

4.4. Transformación bacteriana

Se transformó el plásmido pET-TEV-*Pappk1* en la cepa quimiocompetente *E. coli* JM109. Luego se extrajo el plásmido para transformarlo en otras cepas quimiocompetentes de *E. coli* en donde se sobre expresó la proteína PaPPK1.

Para transformar y preparar las células quimiocompetentes de *E. coli* se siguió el procedimiento descrito por Galván (2013).

4.5. Aislamiento de DNA plasmidial (miniprep)

Para la amplificación del plásmido, una colonia transformante de *E. coli* JM109 aislada se eligió al azar y se inoculó en 10 mL de LB con el antibiótico apropiado. Se incubó toda la noche a 37°C con agitación. El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit II. Se eluyó el DNA

plasmidial con 50 μ L de agua nanopura. Se determinó la concentración del plásmido eluído mediante medición con Nanodrop (EEUU). Se estimó el grado de pureza del DNA, mediante la relación Abs_{260}/Abs_{280} . Ésta siempre resultó superior a 1,8, lo cual indica un grado de pureza superior al 95%.

4.6. PCR de colonias

Rutinariamente para comprobar las construcciones realizamos PCR en colonia. Para esto se eligieron al azar 15 colonias de los clones transformados con el mix de ligación, cada colonia se picó bajo esterilidad y se rayó en el fondo de un tubo de PCR estéril con 5 μ L de buffer PCR 10X. La mezcla de reacción contenía además 1 μ L de ambos cebadores universales T7 *forward* y T7 *reverse* (1 μ M final); 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 DNA se realizaron en un termociclador AXYGEN MAXIGEN. Se utilizó un protocolo que consistía de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguida por 30 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 20 s a 95°C; 20 s a la temperatura de apareamiento de los partidores utilizados (55°C) y una etapa de extensión a 72°C por 3 min. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

4.7. Secuenciación plasmidial

Para confirmar que no hubo mutaciones, los plásmidos (pET-TEV-*Pappk1*) que contenían los insertos del tamaño esperado, se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea), mediante la metodología de Sanger. El gen *Pappk1* clonado en vector pET-TEV se secuenció en ambas direcciones con los cebadores universales T7 *forward* y

T7 *reverse* ubicados río arriba y río abajo del gen *Pappk1* en nuestro vector de expresión. También se secuenció el gen con cebadores internos para obtener una completa secuenciación del gen. Los cebadores utilizados son mostrados en la Tabla 3 y fueron diseñados usando el programa Omega (Oxford Molecular) a partir de los datos enviados por GenScript de la secuencia del gen *Pappk1* modificado. Los cromatogramas de secuenciación fueron analizados con el programa Geneious 4.8.4 y las secuencias finales fueron contrastadas con la secuencia enviada por GenScript del gen *Pappk1*.

Tabla 3. Cebadores usados en este estudio

Cebador	Secuencia de oligonucleótido (5' - 3')
T7 <i>forward</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 <i>reverse</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
Interno <i>forward</i>	AGTGTGACCGGTCTGGAATC
Interno <i>reverse</i>	CAGAACGTTCCGGATCTTTGG

4.8. Ensayos de inducción de la proteína a pequeña escala

Para los ensayos de inducción, se usaron placas con diferentes cepas de *E. coli* (JM109, DH5 α , Origami2 (DE3), Origami2, BL21-AI y BL21 (DE3) pLysS) recién transformadas con el plásmido pET-TEV-*Pappk1* para todos los cultivos de expresión de la proteína (o placas que tenían menos de 3 días almacenadas a 4°C).

Se escogió al azar una colonia para inocular 5 mL de LB líquido con kanamicina (50 μ g/mL). Este pre-inóculo se incubó toda la noche a 37°C con agitación de 150 rpm. En la mañana del día siguiente se inoculó con 0,5 mL del pre-inóculo un matraz de 500 mL de volumen que contenía 100 mL de LB líquido fresco con kanamicina, el cual se incubó con agitación de 150 rpm hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,6. Antes de inducir el cultivo, se agregó L-arabinosa a una concentración final de 0,4 % p/v y luego este

cultivo se separó en distintos matraces para ser inducido bajo diferentes condiciones, señaladas a continuación:

- a. Temperatura de incubación del cultivo previo a la inducción: 28 y 37°C.
- b. Temperatura de inducción: 20, 28 y 30°C (Temperaturas mayores hacen que la proteína forme cuerpos de inclusión)
- c. Concentración final de IPTG: 0,1, 0,5 y 1 mM IPTG
- d. Horas de inducción: 1, 2 y 4 horas de inducción

Finalmente, los cultivos se centrifugaron en alícuotas de 2 mL a 6000 x g, por 10 min a 4°C. Los precipitados de células colectadas se lisaron en Sample Buffer (Tris-HCl pH 6,8 250 mM, Glicerol 4% v/v, SDS 8% p/v, β -mercaptoetanol 2,8 mM y Azul de bromofenol 4%) y se analizaron por medio de SDS-PAGE.

Luego de determinar las condiciones óptimas, se escogieron 3 colonias aisladas al azar y se indujeron bajo las condiciones determinadas, con el objetivo de escoger uno de estos clones para inducirlo a gran escala. Cada colonia escogida se contrastó contra un cultivo control sin inducir y un cultivo control inducido pero de una colonia sin transformar.

4.9. Inducción de la proteína a gran escala

De las condiciones analizadas se escogió el clon que produjo la mayor cantidad de proteína en forma soluble. Se picó la colonia y se inoculó en 5 mL de LB con kanamicina (50 μ g/mL), este pre-inóculo se incubó toda la noche a 37°C con agitación de 150 rpm. En la mañana del día siguiente se inoculó con 2,5 mL del pre-inóculo un matraz de 2 L de volumen que contenía 500 mL de LB con kanamicina. Este matraz inoculado se incubó por alrededor de 2 h, a 28°C, con agitación de 150 rpm hasta

alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,5 a 0,6. Luego el cultivo se indujo con las mejores condiciones elegidas en el acápite anterior. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 6000 x g, por 10 min a 4°C. Los precipitados de las células colectadas se lisaron para purificar la proteína PaPPK1 y se analizaron por medio de SDS-PAGE. En ocasiones que el precipitado no se lisó inmediatamente, se almacenó en tubos Falcon de 50 mL a -20°C para su posterior uso.

La Figura 5 ejemplifica los procedimientos descritos anteriormente.

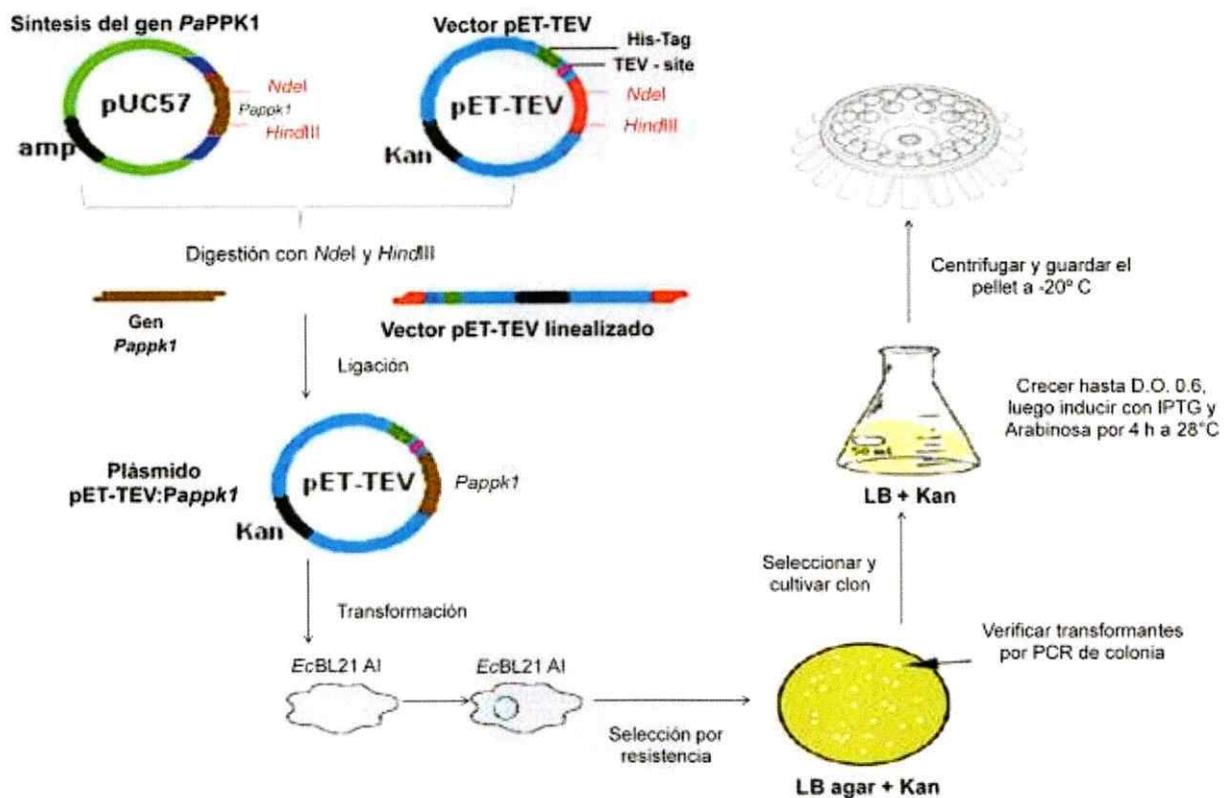


Figura 5. Sobre-expresión de PaPPK1 en *E. coli*. El gen *Pappk1* se sintetizó en el vector pUC57 con el uso de codones adaptados para *E. coli*. Por propósitos de purificación por afinidad se clonó el gen *Pappk1* en el vector pET-TEV que tiene una cola de 6 histidinas y un sitio de corte de la proteasa TEV entre el inserto y la cola. La cepa de *E. coli* BL21 AI se transformó con el plásmido resultante pET-TEV-*Pappk1* y los transformantes se seleccionaron usando placas de LB agar con kanamicina. Tres clones se seleccionaron al azar para ser crecidos e inducidos para producir la proteína recombinante PaPPK1.

4.9.1. Western Blot

Para comprobar que el inserto del gen *Pappk1* se clonó correctamente en el vector pET-TEV que codifica la cola de 6 histidinas, se realizó la detección de la cola de histidina mediante el conjugado de Nickel-HRP, HisDetector™ (KPL). Para esto fue necesario primero expresar la proteína en alguna cepa de *E. coli*, lisar las células para obtener las proteínas expresadas y visualizarlas en un gel SDS-PAGE, tanto las fracciones solubles e insolubles de proteínas y la PaPPK1 purificada.

Primero se corrieron dos geles SDS-PAGE idénticos, uno se usó para ser teñido con la solución de azul de Coomassie y el otro se usó para transferir las bandas de proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 4°C por dos horas a 300 mA, usando buffer de transferencia.

Para el revelado se lavó la membrana de nitrocelulosa con buffer TBS 2 veces por 10 min con agitación a temperatura ambiente y luego se bloqueó la membrana mediante incubación por una hora en una solución de proteína de leche al 3% en buffer TBS con agitación a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces con buffer TBS-T por 10 min a temperatura ambiente y con agitación. Finalmente se incubó la membrana con el conjugado de Níquel-ácido nitrilotriacético (NTA) 1:1000 en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente y agitación, y se lavó con buffer TBS-T 3 veces por 10 min en agitación a temperatura ambiente. Para visualizar las bandas transferidas correspondientes a la proteína con cola de histidina se incubó la membrana con la solución de revelado (18 mg de 4-cloro-1-naftol, 6 mL de metanol, 24 mL de TBS y 60 µL de peróxido de hidrógeno 30%) durante 5 min sin agitación.

4.10. Purificación de la proteína

Luego de obtener las condiciones de inducción óptimas, se procedió a la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTrap HP (GE) 5 mL eluyendo la proteína mediante un gradiente de imidazol.

Para esto, los precipitados celulares obtenidos de la inducción de la proteína se lisaron mediante el reactivo B-PER® (Bacterial Protein Extraction Reagents), un detergente agregado al pellet celular según las instrucciones del fabricante. Fue necesario agregar también lisozima, DNasa y un cóctel de inhibidor de proteasas libre de EDTA como lo especifica el fabricante dentro de los procedimientos opcionales.

Luego de la incubación a temperatura ambiente por 15 min, se agregó al lisado celular, glicerol y β -mercaptoetanol a una concentración final de 20% y 10 mM, respectivamente, para estabilizar las proteínas. Luego se centrifugó a 14000 x g por 15 min a temperatura ambiente para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante generado (extracto libre de células) corresponde a la fracción soluble de proteínas, la cual se separó de la fracción insoluble de proteínas (pellet), para purificar la enzima *PaPPK1*.

4.10.1. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC)

Para la purificación de toda la proteína recombinante fusionada con la cola de 6 histidinas se utilizó una columna de 5 mL Ni Sepharose™ High Performance HisTrap™ HP. Antes de cargar la muestra obtenida del procedimiento de lisis celular, se limpió el etanol que contiene con 5 volúmenes de agua nanopura, luego la columna se equilibró con 5 volúmenes de buffer A. El extracto libre de células se complementó con imidazol a una concentración final a 20 mM (igual a la concentración del buffer A) y cargado en

la columna. Las proteínas no específicamente adheridas a la columna se eluyeron usando 12 volúmenes de buffer A. La proteína recombinante se eluyó usando buffer B con una concentración creciente de imidazol (80, 200 y 600 mM en 2, 5, y 2 volúmenes, respectivamente). Finalmente se limpió la columna con 10 volúmenes de agua nanopura para retirar los excesos de sal e imidazol; y se guardó con etanol al 20% v/v. Las fracciones eluidas se colectaron, concentraron y analizaron en SDS-PAGE. Todas las cargas a la columna se hicieron con una jeringa a una velocidad aproximada de 5 mL/min. La proteína PaPPK1, obtenida de la purificación, se concentró usando las columnas Amicon MERCK, y luego se dializaron durante toda la noche a 4°C contra 2 L de buffer de diálisis. Los buffers usados para este procedimiento se muestran en la Tabla 4. Se analizó la pureza de las fracciones en geles SDS-PAGE y finalmente las proteínas puras se seleccionaron para los ensayos de actividad.

Tabla 4. Buffers usados en la purificación de PaPPK1

Reactivo	Buffer A	Buffer B	Buffer de diálisis
Tris-HCl pH 8,2	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	300 mM	300 mM	150 mM
β -mercaptoetanol	10 mM	10 mM	10 mM
Glicerol	20% v/v	20% v/v	20% v/v
Tween 20	0,05% v/v	0,05% v/v	0,05% v/v
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 mM	50 mM	50 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM	10 mM
Imidazol	20 mM	80, 200 y 600 mM	-

4.10.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y medición de la concentración

Los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y su tinción con Azul Brillante de Coomassie se realizaron como se describe por Laemmli (1970). La concentración de proteína

presente en las fracciones purificadas y en los extractos crudos se midió por el método de Bradford (1976) con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

4.10.3. Procesamiento de la cola de histidina

Para analizar la actividad de la proteína nativa con y sin cola de histidina se clivó la misma de la proteína purificada. Para eliminar la cola de histidina se incubó la proteína purificada con la proteasa TEV en una razón 10:1, respectivamente. Se añadió el agente reductor TCEP a concentración final 1 mM. La mezcla de reacción resultante se incubó a 37°C por 2 h sin agitación.

Para eliminar la proteasa TEV presente en la mezcla de corte y las colas de histidina cortadas, la reacción se aplicó sobre una columna HisTrap™ HP (5 mL), según el procedimiento descrito anteriormente. Se recuperó la proteína sin cola del frente obtenido al cargar la columna con la mezcla de corte. La columna se lavó al pasar el buffer B (600 mM de imidazol) de elución.

4.11. Medición de la actividad de PaPPK1 y cuantificación de polifosfatos

La actividad de la enzima PaPPK1 se determinó mediante la cuantificación de la fluorescencia producida por la unión de DAPI al poliP sintetizado. DAPI se une a las cargas negativas de los grupos fosfato del polifosfato inorgánico (producto de reacción). Todos estos ensayos *in vitro* se realizaron primeramente con la fracción soluble de proteínas (extracto crudo) y luego con la proteína purificada incubada con su sustrato. A partir de un volumen de reacción stock se cuantificó la síntesis de poliP de manera discontinua extrayendo una alícuota (20 µL) en determinados tiempos, las cuales fueron incubadas por 10 min en placas de 96 pocillos negras opacas con 20 mM de HEPES-KOH pH 7,2, 150 mM de KCl y 50 µM de DAPI en un volumen final de 200

μL. Se utilizó un filtro de excitación de 400/10 nm y un filtro de emisión de 540/25 nm en el fluorímetro Synergy HT de BIOTEK® para medir la fluorescencia del poliP producido unido a DAPI.

4.11.1. Determinación de las condiciones óptimas para la cuantificación de PoliP mediante la fluorescencia con DAPI

Se ensayaron las siguientes variables para encontrar la mejor condición para la cuantificación de poliP, en estos ensayos no se utilizó el poliP sintetizado por la proteína purificada, sino que se utilizó poliP₄₅ como reactivo.

- a. Diferentes buffers: Hepes-KOH, Hepes-KOH más KCl, KCl o agua. En todas las mediciones se incluye PoliP y DAPI.
- b. Concentración de DAPI: 1, 10, 50 y 200 μM.
- c. Sensibilidad del equipo: 6 ganancias diferentes.
- d. Curva de calibración para obtener el rango lineal de la medición de poliP: entre 0 y 128 μg/mL.

Todas las reacciones se incubaron 10 min con DAPI y se midió su fluorescencia como se señala más arriba.

4.11.2. Ensayos para determinar las condiciones óptimas de la actividad PaPPK1

Se evaluaron diferentes condiciones de reacción señaladas a continuación:

- a. Efecto de la cola de histidina para la actividad PaPPK1,
- b. Uso de sistema de regeneración de ATP,
- c. Expresión de PaPPK1 en diferentes cepas de *E. coli*,
- d. Concentración de ATP,
- e. Medio de cultivo para la inducción (LB o S.O.C.)

f. Condición de la proteína *PaPPK1* purificada (dializada o sin dializar)

Resumidamente la mezcla de reacción del protocolo de actividad *PaPPK1* quedó de la siguiente manera: 50 mM de Hepes-KOH pH 7.2, 25 mM $MgCl_2$, 40 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM de ATP, 2 mM creatina fosfato y 20 $\mu g/mL$ de creatina quinasa como agentes regeneradores del ATP, 1 $\mu g/mL$ de poliP₄₅ como cebador (pequeña cadena de poliP que facilita el inicio de la síntesis de poliP por *PaPPK1*) y 7 μg de la proteína *PaPPK1*, todo en un volumen final de 300 μL . Luego se incubó en un termoblock a 37°C por 120 minutos, se sacó una alícuota en los tiempos establecidos. Finalmente, a estas alícuotas se les midió la fluorescencia del producto (poliP) unido a DAPI.

4.11.3. Caracterización cinética de la enzima *PaPPK1*

Para obtener las constantes cinéticas de *PaPPK1* fue necesario realizar pruebas de actividad variando la concentración de ATP: 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 18 mM. Los otros componentes de la mezcla de reacción se seleccionaron como se describe en la sección anterior. La mezcla de reacción se incubó a 37°C, por 2 h y se midió la actividad de la proteína de manera discontinua, midiendo alícuotas de 20 μL extraídas a los 0, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 25, 30, 60, 90 y 120 minutos de iniciada la reacción con la adición de la enzima. Para la obtención de los parámetros cinéticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA).

Se obtuvieron los nmoles de poliP desde la fluorescencia obtenida mediante la curva de calibración hecha a distintas concentraciones conocidas de poliP₄₅ (Gráfico 1).

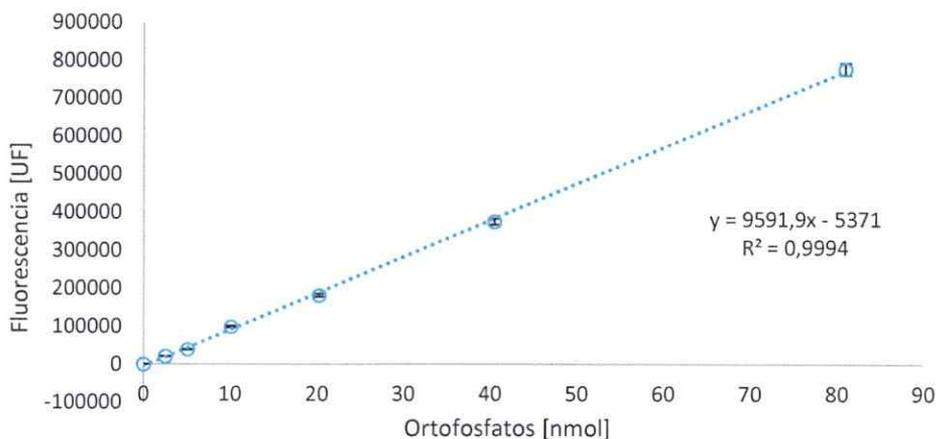


Gráfico 1. Curva de calibración. Esta curva es el promedio de tres curvas de calibración realizadas dentro del rango lineal de fluorescencia del poliP-DAPI.

4.12. Ensayos de inhibición de *PaPPK1*

Para realizar los ensayos de inhibición de la actividad de *PaPPK1* se utilizaron 39 compuestos seleccionados (Anexo 8) a partir de un *screening* molecular *in silico* hecho contra el sitio activo de la proteína *PaPPK1* modelada en base a la estructura de la proteína *EcPPK1* cristalizada, este *screening* se realizó previamente en nuestro laboratorio. Estas moléculas fueron provistas por el Instituto Nacional del Cancer *NCI Open chemical library* y se usaron para realizar las pruebas de inhibición enzimática para *PaPPK1*.

La mezcla de reacción de inhibición se realizó como en la sección anterior, salvo que se le agregó el inhibidor a una concentración de 20 μM y 1,5 μg de la proteína *PaPPK1*, todo en un volumen final de 50 μL . Luego se incubó a 37°C por 120 minutos, se sacó una alícuota de 20 μL al tiempo 0 y otra al tiempo 120 min. Finalmente, a estas alícuotas se les midió la fluorescencia del producto (PoliP) unido a DAPI. Para obtener el porcentaje de inhibición del compuesto se comparó el poliP producido por la enzima en la reacción con inhibidor versus la reacción sin inhibidor. La Figura 6 resume los procedimientos descritos anteriormente.

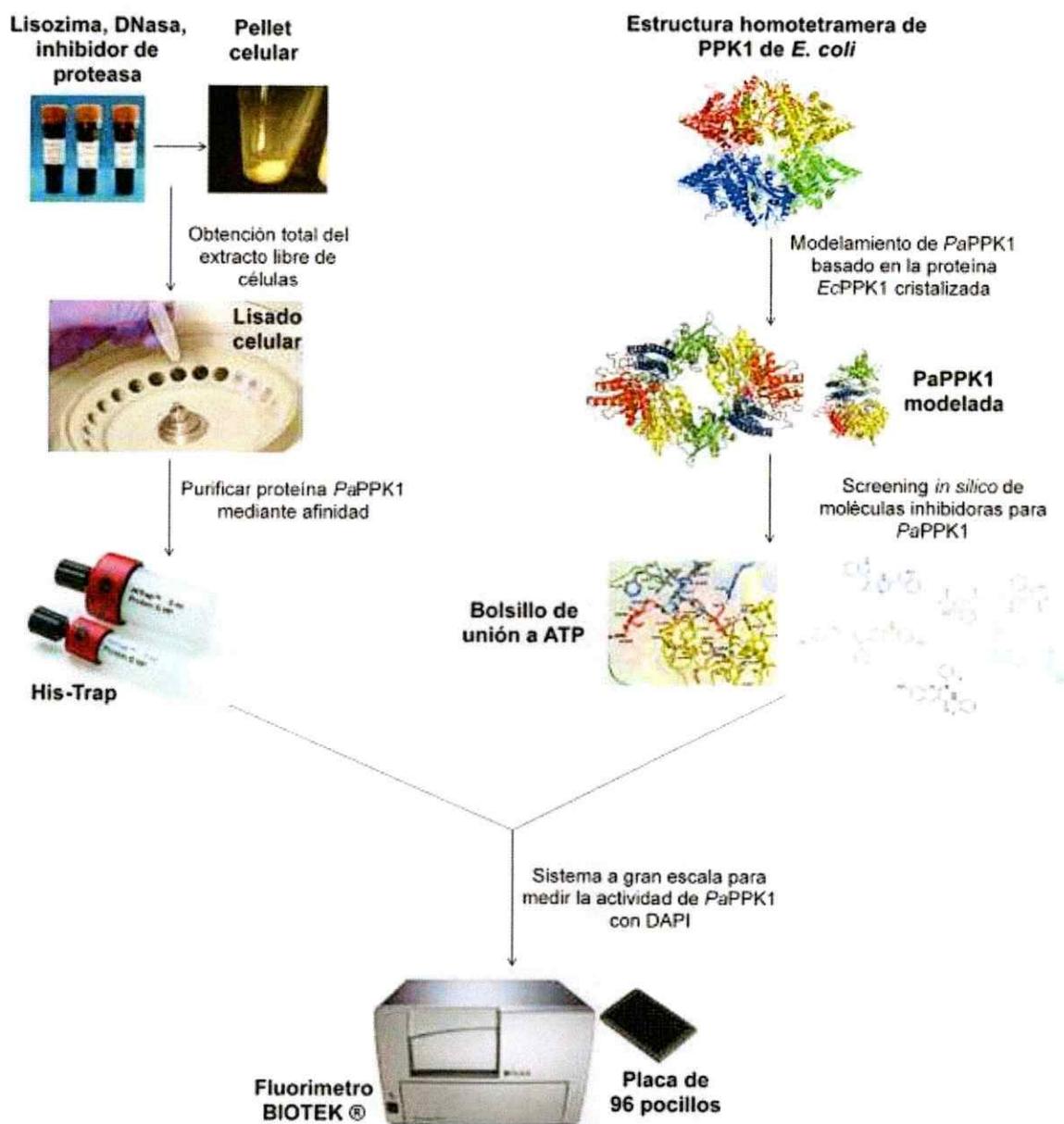


Figura 6. Esquema de la metodología para la purificación de la PaPPK1. El pellet guardado se trató con el detergente B-PER® para lisar las células, luego se centrifugó y se obtuvo la fracción insoluble y soluble de las proteínas. La fracción soluble se estabilizó y cargó en la columna de afinidad His-Trap® para purificar la proteína PaPPK1 (con cola de histidina). Previamente se modeló *in silico* la proteína PaPPK1 basándose en la proteína cristalizada EcPPK1. Contra el sitio activo de PaPPK1 se hizo un *docking* molecular y se encontraron 39 potenciales inhibidores de la proteína recombinante. Finalmente, la actividad enzimática se ensayó por la unión DAPI-poliP, lo cual nos permitió establecer un protocolo vinculante para cuantificar la inhibición producida por las moléculas sintéticas generadas.

4.13. Determinación de las constantes cinéticas aparentes

Las constantes cinéticas de la enzima recombinante, se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial (v_0) a diferentes concentraciones de sustrato (S), ajustando a los datos el modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]}$$

En donde,

$$V_{MAX} = k_{cat} \times E_T$$

En esta ecuación, K_M es la constante de Michaelis-Menten, que operacionalmente corresponde a la concentración de sustrato a la cual $v_0 = \frac{1}{2} V_{MAX}$. La V_{MAX} por su parte, es la velocidad máxima de la reacción catalizada por la enzima y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica k_{cat} por la concentración de enzima total $[E]_T$. Específicamente, la k_{cat} se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat}(\text{min}^{-1}) = \frac{V_{MAX} \times PM_{(PaPPK1)} \times 0.001}{\text{mg de PaPPK1}}$$

En donde, V_{MAX} es la velocidad máxima expresada en unidades de $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$; PM el peso molecular de la PaPPK1 expresado en g/mol y 0,001 el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ μmol . El peso molecular (PM) de PaPPK1 es 83.151 Da. Finalmente, la k_{cat} se expresa en min^{-1} .

4.13.1. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los ajustes del modelo Michaelis-Menten con los datos experimentales de v_0 y concentración de S, se realizaron en GraphPad Prism 6. Este programa entregó para cada ajuste su coeficiente de determinación (R^2) y la desviación estándar (DS) de sus parámetros V_{MAX} y K_M .

5. RESULTADOS

5.1. Síntesis del gen *ppk1* de *Pseudomonas aeruginosa*

En numerosos intentos previos del laboratorio no se pudo sobre-expresar el gen *ppk1* de *P. aeruginosa* PAO1 en *E. coli*. Es por eso que en esta ocasión el gen fue sintetizado con codones adaptados al uso de *E. coli*. La secuencia resultante del gen *Pappk1* se muestra en el Anexo 1. El gen sintetizado se envió clonado entre los sitios de corte cohesivos *NdeI* (CATATG) y *HindIII* (AAGCTT) del vector pUC57 que tiene 2710 pb y contiene además un marcador de selección por resistencia al antibiótico ampicilina. El plásmido recibido denominado pUC57-*Pappk1* contiene 5111 pb. La sobreexpresión de *PaPPK1* con el plásmido pUC57-*Pappk1*, resultó en su totalidad en la fracción insoluble de proteínas (datos no mostrados). Esto sumado a que el plásmido no tiene cola de histidina se decidió clonar el gen *Pappk1* del vector pUC57-*Pappk1* en el vector de expresión pET-TEV ya que introduce una cola de histidina y un sitio de corte de la proteasa TEV en el N-terminal de la secuencia de la proteína.

5.2. Clonamiento del gen *Pappk1* en pET-TEV

El gen *Pappk1* se clonó entre los sitios *HindIII* y *NdeI* del sitio múltiple de clonamiento del vector pET-TEV, en el mismo marco de lectura que la secuencia que integra los 6 residuos de histidina y un sitio de corte para la proteasa TEV. Este sitio se encuentra entre la cola de histidina y la región amino terminal de la secuencia de la proteína, lo que permite escindir la cola de la proteína.

Para esto se digirieron los vectores pUC57-*Pappk1* y pET-TEV con las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI* (Figura 7). Se obtuvieron tres fragmentos de ~2,4 Kpb, 2,7 Kpb

y ~6 Kpb referentes al estándar de DNA. Estas bandas corresponden al gen *Pappk1*, al vector pUC57 linealizado y al vector pET-TEV linealizado, respectivamente. Para verificar que el vector pET-TEV se linealizó se transformó el vector digerido en una cepa de *E. coli*. No se observaron colonias al plaquear la transformación en placas de LB agar con kanamicina, por lo tanto, la digestión fue exitosa.



Figura 7. Digestión de los plásmidos pET-TEV y pUC57-*Pappk1*. Gel de agarosa al 0,8% p/v. Carril 1: estándar de peso molecular en Kpb; carril 2: digestión del plásmido pUC57 y carril 3: digestión del plásmido pET-TEV.

La purificación de los fragmentos del gel permitió proceder con el clonamiento del gen *Pappk1* en el vector pET-TEV linealizado. Luego se transformó el plásmido resultante, pET-TEV-*Pappk1* en la cepa de *E. coli* JM109. En la Figura 8 se muestra un esquema con la disposición de los elementos en el vector pET-TEV-*Pappk1*.

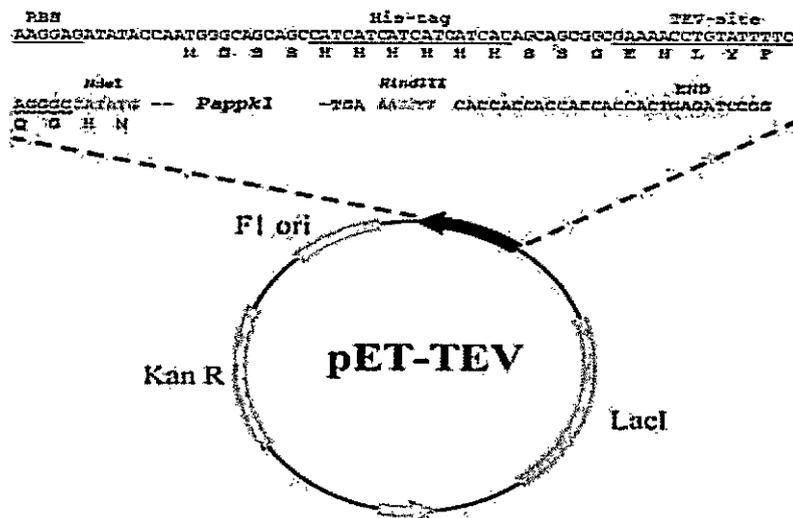


Figura 8. Mapa del plásmido de expresión pET-TEV-*Pappk1*. Flanqueando al gen *ppk1* de *P. aeruginosa*, dos sitios de corte *NdeI* y *HindIII*. Rio arriba del sitio de corte *NdeI* está el sitio de corte para la proteasa TEV y un His-tag: Secuencia codificante para la cola de 6 histidinas. El gen *ppk1* se encuentra bajo el control del promotor del bacteriófago T7, que es reconocido por la T7 RNA polimerasa.

Se transformó el producto de la ligación inicialmente en la cepa JM109 para así tenerla como reservorio del plásmido construido, por lo tanto, la células transformadas se conservaron en glicerol a -80°C . Luego se extrajo el plásmido para transformar las demás cepas mencionadas en la Tabla 2. Se seleccionaron 15 colonias resultantes del clonamiento del plásmido pET-TEV-*Pappk1* en la cepa JM109 para analizarlas mediante PCR de colonias y mediante la digestión de plásmidos. Las 2401 pb del gen *Pappk1* se amplificaron a partir de las colonias transformadas. Los fragmentos de PCR correspondientes a la amplificación del gen tienen un tamaño de $\sim 2,4$ Kpb referente al estándar de DNA (Figura 9). Los fragmentos con un menor tamaño se estima que representan los fragmentos de DNA amplificados del vector pET-TEV recircularizado cortado con una o con las dos enzimas de restricción.

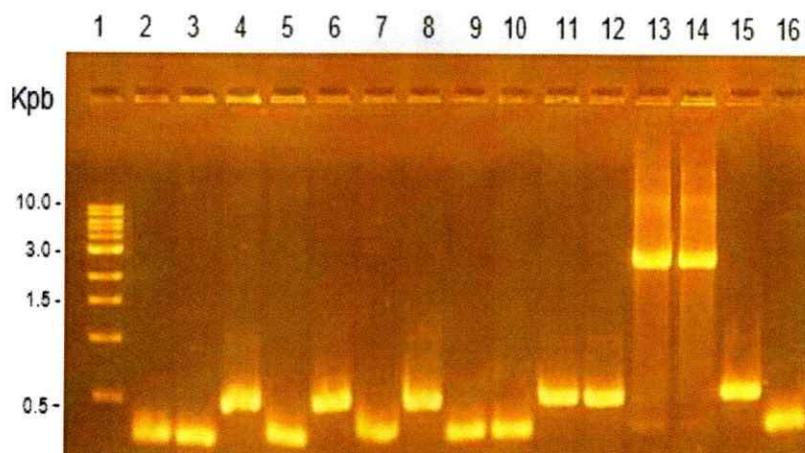


Figura 9. PCR de colonias de cepas JM109 transformadas con el plásmido pET-TEV-*Pappk1*. Gel de agarosa al 1% p/v. Carriles: 1: Estándar de peso molecular en Kpb; 2 al 16: PCR de 15 diferentes colonias seleccionadas al azar, transformadas con el plásmido pET-TEV-*Pappk1*. En los carriles 13 y 14 se observan bandas de ~2,4 Kpb que corresponden posiblemente al gen *Pappk1*.

El resultado del PCR de colonia mostró que 2 de las colonias tenían el fragmento de PCR correspondiente al gen esperado, por lo tanto, se hizo un cultivo de cada colonia y se extrajo el plásmido.

Los plásmidos se denominaron plásmido 1 y plásmido 2, y se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Los fragmentos de ~2,4 Kpb, ~6 Kpb y ~8,4 Kpb corresponden al gen *Pappk1*, el vector pET-TEV linealizado y el plásmido pET-TEV-*Pappk1*, respectivamente (Figura 10). Estos fragmentos de DNA tienen el tamaño esperado por la digestión realizada del plásmido pET-TEV-*Pappk1*.

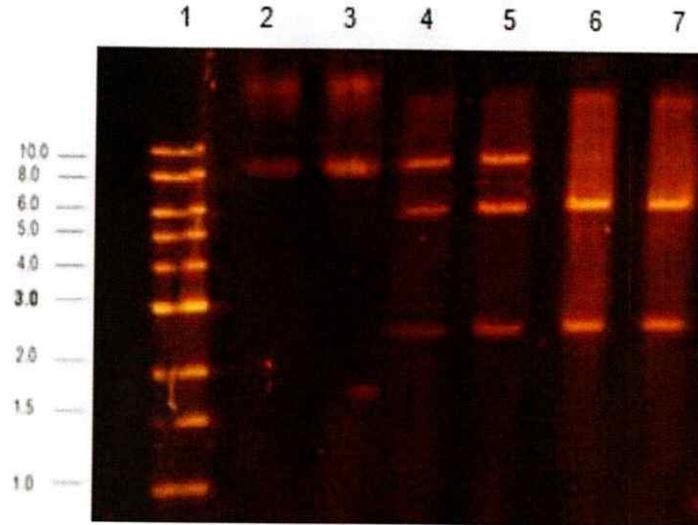


Figura 10. Digestión de pET-TEV-*Pappk1*. Gel de agarosa al 0,8% p/v. Carriles: 1: estándar de peso molecular en Kpb; 2: plásmido 1; 3: plásmido 2; 4: plásmido 1 parcialmente digerido; 5: plásmido 2 parcialmente digerido; 6: plásmido 1 digerido totalmente y 7: plásmido 2 digerido totalmente.

Finalmente, de los plásmidos 1 y 2 purificados, se secuenció el gen *Pappk1* clonado. Los resultados se analizaron y se obtuvo un 100% de identidad entre la secuencia aminoacídica del gen sintetizado y la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre. No se encontraron mutaciones al comparar el gen secuenciado y la secuencia enviada por GenScript (Figura 11). En el Anexo 2 se muestran los cromatogramas enviados por MacroGen y más detalles de las secuencias obtenidas.

> 113358 | 5902386 - 5904596 | PA5242 | polyphosphate kinase[Pseudomonas_aeruginosa_PAO1_uid57945]
Length=736

Score = 1510 bits (3910), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 736/736 (100%), Positives = 736/736 (100%), Gaps = 0/736 (0%)

```
Query 22  MNTQQGLDEIERIAADETVVANVESEAEVKMAETIPVETPPAVVPSVDDSSLYIHRELSQ 81
MNTQQGLDEIERIAADETVVANVESEAEVKMAETIPVETPPAVVPSVDDSSLYIHRELSQ
Sbjct 1  MNTQQGLDEIERIAADETVVANVESEAEVKMAETIPVETPPAVVPSVDDSSLYIHRELSQ 60

Query 82  LQFNIRVLEQALDESYP LLERLKFLLIFSSNLDEFFFEIRIAGLKKQITFAREQAGADGLL 141
LQFNIRVLEQALDESYP LLERLKFLLIFSSNLDEFFFEIRIAGLKKQITFAREQAGADGLL
Sbjct 61  LQFNIRVLEQALDESYP LLERLKFLLIFSSNLDEFFFEIRIAGLKKQITFAREQAGADGLL 120

Query 142 PHQALARISELVHEQVSRQYRILNETLLPELAKHQIRFIRRRHNTLKIKTWVRRFFRDEI 201
PHQALARISELVHEQVSRQYRILNETLLPELAKHQIRFIRRRHNTLKIKTWVRRFFRDEI
Sbjct 121 PHQALARISELVHEQVSRQYRILNETLLPELAKHQIRFIRRRHNTLKIKTWVRRFFRDEI 180

Query 202 APIITPIGLDPTHFP LLLVKNKSLNFIVELEGMDAFGRDSGLAIIPAPRLLPRIIRLPEDV 261
APIITPIGLDPTHFP LLLVKNKSLNFIVELEGMDAFGRDSGLAIIPAPRLLPRIIRLPEDV
Sbjct 181 APIITPIGLDPTHFP LLLVKNKSLNFIVELEGMDAFGRDSGLAIIPAPRLLPRIIRLPEDV 240

Query 262 GGEGDNYVFLSSMIHAHADLFPGMKVKGCYQFRLTRNADLSVDTEDVEDLARALRGELF 321
GGEGDNYVFLSSMIHAHADLFPGMKVKGCYQFRLTRNADLSVDTEDVEDLARALRGELF
Sbjct 241 GGEGDNYVFLSSMIHAHADLFPGMKVKGCYQFRLTRNADLSVDTEDVEDLARALRGELF 300

Query 322 SRRYGDVAVRLEVVDTC PQNLTNYLLKQFGLSESELYKVS GPNLTRLFSVTGLESHP ELQ 381
SRRYGDVAVRLEVVDTC PQNLTNYLLKQFGLSESELYKVS GPNLTRLFSVTGLESHP ELQ
Sbjct 301 SRRYGDVAVRLEVVDTC PQNLTNYLLKQFGLSESELYKVS GPNLTRLFSVTGLESHP ELQ 360

Query 382 YPPFTPAIPRLLQKKENL FNVLSKLDVLLMHPFESFTPVIDLRRQAADPNVLAIKQ TLY 441
YPPFTPAIPRLLQKKENL FNVLSKLDVLLMHPFESFTPVIDLRRQAADPNVLAIKQ TLY
Sbjct 361 YPPFTPAIPRLLQKKENL FNVLSKLDVLLMHPFESFTPVIDLRRQAADPNVLAIKQ TLY 420

Query 442 RSGANSEIVDALVEAARNGKEVTAVIELRARFDEESNLQLASRLQQAGAVVIYGVVGFKT 501
RSGANSEIVDALVEAARNGKEVTAVIELRARFDEESNLQLASRLQQAGAVVIYGVVGFKT
Sbjct 421 RSGANSEIVDALVEAARNGKEVTAVIELRARFDEESNLQLASRLQQAGAVVIYGVVGFKT 480

Query 502 HAKHMLILRRREDGELRRY AHLGTGN YHAGNARLYTDYSLLTADVALCEDLHKL FNQLIGM 561
HAKHMLILRRREDGELRRY AHLGTGN YHAGNARLYTDYSLLTADVALCEDLHKL FNQLIGM
Sbjct 481 HAKHMLILRRREDGELRRY AHLGTGN YHAGNARLYTDYSLLTADVALCEDLHKL FNQLIGM 540

Query 562 GKTLRMKKLLHAPFTL KKNLLEMINREAAQAALGQPAHIMAKVNSLTDPKVIRALYKASQ 621
GKTLRMKKLLHAPFTL KKNLLEMINREAAQAALGQPAHIMAKVNSLTDPKVIRALYKASQ
Sbjct 541 GKTLRMKKLLHAPFTL KKNLLEMINREAAQAALGQPAHIMAKVNSLTDPKVIRALYKASQ 600

Query 622 AGVRIDL VVRGMCCLRPGIPGVSHN IHVRSIIIGRFL EHSRIYFFLNGGDEKLYLSSADWM 681
AGVRIDL VVRGMCCLRPGIPGVSHN IHVRSIIIGRFL EHSRIYFFLNGGDEKLYLSSADWM
Sbjct 601 AGVRIDL VVRGMCCLRPGIPGVSHN IHVRSIIIGRFL EHSRIYFFLNGGDEKLYLSSADWM 660

Query 682 ERNLDHRVETCFPVEGK KLVQRVKK ELETYLT DNTQAWVLQADGSYQRLSPTGNQNPRT 741
ERNLDHRVETCFPVEGK KLVQRVKK ELETYLT DNTQAWVLQADGSYQRLSPTGNQNPRT
Sbjct 661 ERNLDHRVETCFPVEGK KLVQRVKK ELETYLT DNTQAWVLQADGSYQRLSPTGNQNPRT 720

Query 742 QATLLEKLAAPVLTAR 757
QATLLEKLAAPVLTAR
Sbjct 721 QATLLEKLAAPVLTAR 736
```

Figura 11. Alineamiento de secuencias mediante blast entre la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 y la secuencia proteica derivada del gen *Pappk1* secuenciado en este trabajo. Se observa que no hay ningún Gap y que hay 100% de identidad entre las dos secuencias, por lo tanto, no hay mutaciones en la proteína recombinante. Este análisis se realizó en el sitio web www.Pseudomonass.com. Más información en el Anexo 2.

5.3. Selección de clones y expresión de la proteína recombinante PaPPK1

5.3.1. Obtención de los parámetros óptimos para la inducción de la proteína PaPPK1 a pequeña escala

Después de transformar la cepa de *E. coli* BL21 AI (excepto en la Figura 16) con el plásmido obtenido, se realizaron pruebas de inducción a pequeña escala, es decir, en poco cultivo para probar distintas variables. En cada ensayo se seleccionó una colonia transformada con el vector pET-TEV-*Pappk1*, se incubó e indujo la enzima. Como se aprecia en los gels a continuación, en las muestras inducidas vemos una banda más intensa a la altura de 80 kDa que corresponde a la proteína PaPPK1.

- a. Temperatura de incubación del cultivo previo a la inducción: La mejor temperatura de incubación fue a 28°C, ya que la proteína purificada del cultivo crecido a 28°C tuvo mejor actividad, pues sintetiza más poliP que la de un cultivo crecido a 37°C, como se indica más adelante.

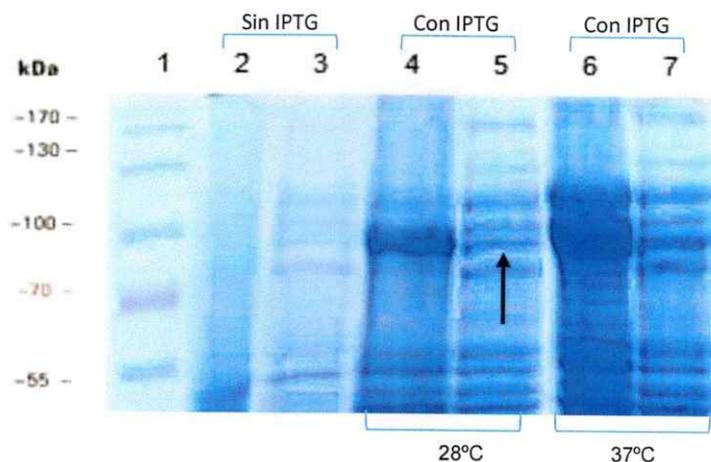


Figura 12. Ensayo de inducción a pequeña escala para la temperatura de crecimiento del precultivo. Se observa un gel de poliacrilamida al 8%. Se indujo a 28°C, 1 mM de IPTG, durante 4 horas y se comparó el cultivo crecido a 28 y a 37°C. El gel se cargó con los extractos crudos lisados con el reactivo B.PER. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: fracción insoluble de muestra sin inducir; 3: fracción soluble de muestra sin inducir; 4 y 6: fracción insoluble de muestra inducida; 5 y 7: fracción soluble de muestra inducida.

- b. Temperatura de inducción: De las temperaturas ensayadas la escogida fue de 28°C, ya que a temperaturas más altas hay mayor expresión de proteínas en estado insoluble. A 28°C se obtuvo la mayor expresión soluble de la proteína PaPPK1.

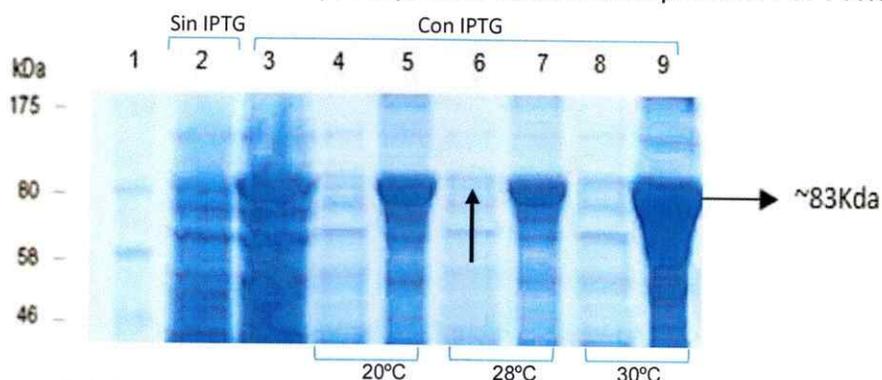


Figura 13. Ensayo de inducción a pequeña escala para la temperatura. Se indujeron con IPTG 1 mM durante 4 horas a diferentes temperaturas. El gel tiene una concentración de poliacrilamida de 10%. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: extracto crudo sin inducir; 3: extracto crudo inducido a 30°C; 4, 6 y 8: fracción soluble de muestra inducida; 5, 7 y 9: fracción insoluble de muestra inducida.

- c. Concentración de IPTG: La concentración de IPTG elegida fue de 1 mM, ya que es la condición en donde hay una banda más intensa en la fracción soluble de proteínas, como se indica en la Figura 14. Esto coincide con otros reportes (Ishige y cols., 1998; Novy y cols., 2001).

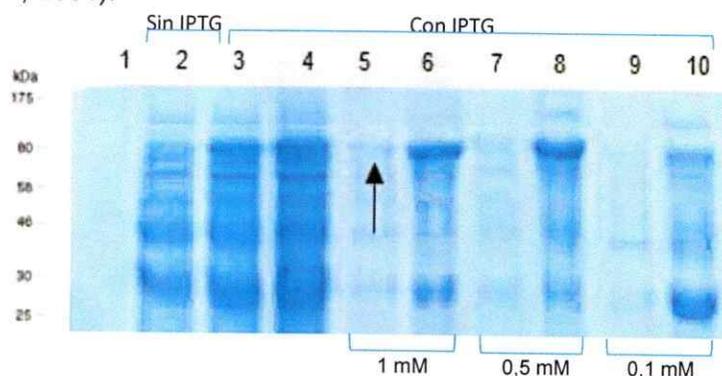


Figura 14. Ensayo de inducción a pequeña escala para la concentración de IPTG. Gel de poliacrilamida al 12,5%. Se sometió a inducción a 28°C, durante 4 horas (excepto el carril 3) a diferentes concentraciones de IPTG. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: extracto crudo sin inducir; 3: extracto crudo inducido con 1 mM de IPTG por 2 horas; 4: extracto crudo inducido con 1 mM de IPTG por 4 horas; 5, 7 y 9: fracción soluble de muestra inducida; 6, 8 y 10: fracción insoluble de muestra inducida.

- d. Tiempo de inducción: Los tiempos ensayados para la inducción por IPTG fueron de 1, 2 y 4 horas. El tiempo de inducción escogido fue de 4 horas pues mientras más tiempo se induce el cultivo, más proteína es expresada tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble (Figura 15).

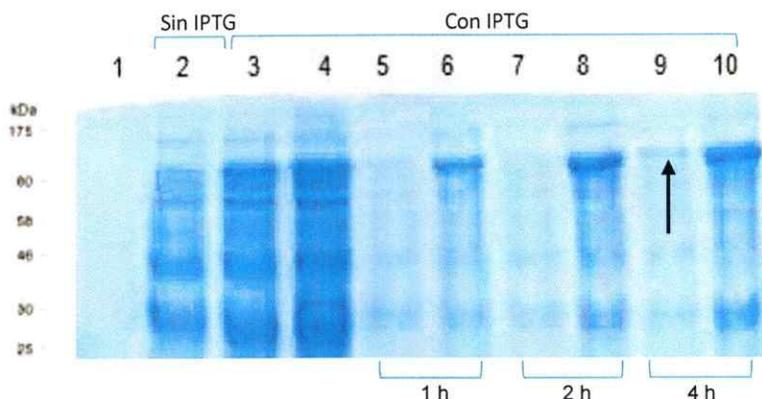


Figura 15. Ensayo de inducción a pequeña escala para definir las horas de inducción. Gel de poliacrilamida al 12,5%. Se sometió a inducción a 28°C, 1 mM de IPTG, hasta diferentes horas. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: extracto crudo sin inducir; 3: extracto crudo inducido con 1 mM de IPTG por 2 horas; 4: extracto crudo inducido con 1 mM de IPTG por 4 horas; 5, 7 y 9: fracción soluble de muestra inducida, carril 6, 8 y 10: fracción insoluble de muestra inducida.

- e. Cepas: La cepa elegida de *E. coli* fue la BL21-AI por la buena expresión de PaPPK1 tanto en la fracción insoluble como en la soluble de proteínas (Figura 16). Se observa que las cepas BL21 (DE3) pLysS, Origami 2 DE3 y BL21-AI son las que presentan una banda más intensa de la proteína PaPPK1 pero en la fracción insoluble inducida. Sin embargo, luego comprobamos que la cepa que expresó la enzima con mejor actividad fue la BL21-AI.

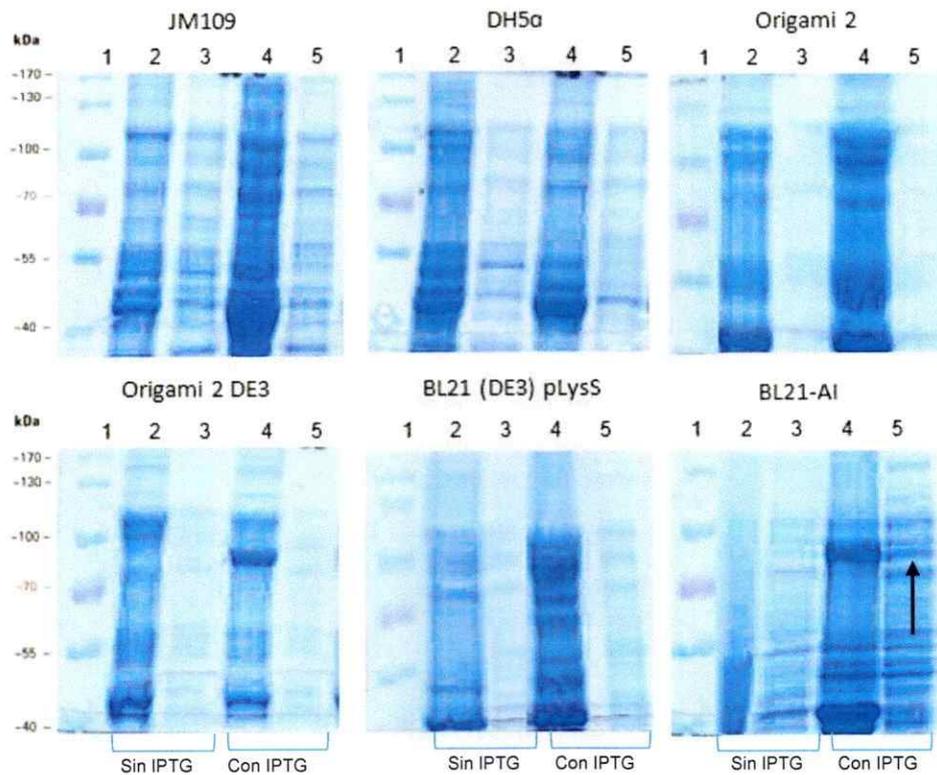


Figura 16. Ensayo de inducción a pequeña escala con diferentes cepas de *E. coli*. Geles de poliacrilamida al 8%. Cultivos de distintas cepas de *E. coli* transformadas se indujeron a 28°C, 1 mM de IPTG, durante 4 horas. Los geles se cargaron con los extractos crudos lisados con el reactivo B.PER. Carriles; 1: estándar de peso molecular; 2: fracción insoluble de muestra sin inducir; 3: fracción soluble de muestra sin inducir; 4: fracción insoluble de muestra inducida; 5: fracción soluble de muestra inducida.

Tres colonias de la cepa BL21-AI, que expresan la proteína PaPPK1, se seleccionaron al azar para observar cuál de ellas presenta mayores niveles de expresión frente a las mismas condiciones de inducción escogidas. Las células recolectadas por centrifugación de cada muestra (cultivo inducido y no inducido de cada colonia), se lisaron, se cuantificó la concentración de proteína de la fracción soluble y se cargaron 20 µg en un gel de poliacrilamida. Con esto se cumple el objetivo específico 1.

Se aprecia una banda más intensa en las muestras inducidas (Figura 17). El clon 3 no muestra una expresión significativa. Los clones 1 y 2 tienen una expresión similar según lo observado en el gel. Se escogió el clon 2 para la inducción a gran escala.

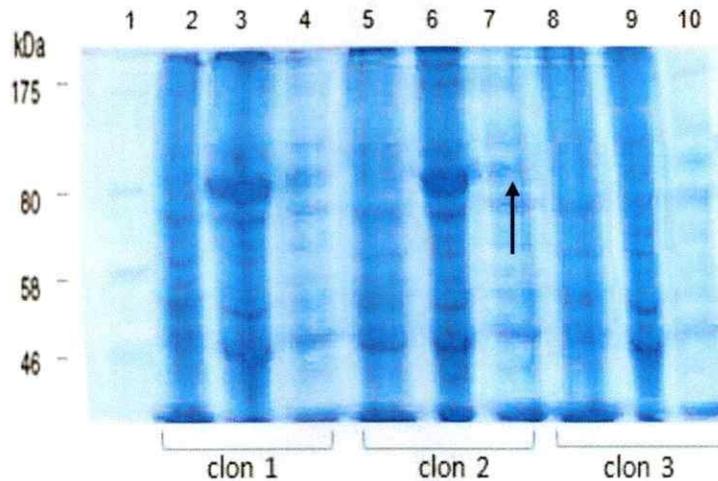


Figura 17. Ensayo de inducción a pequeña escala de clones. Gel de poliacrilamida al 8%. Las colonias escogidas (clones) se indujeron a 28°C, 1 mM de IPTG por 4 horas. El gel se cargó con los extractos crudos lisados con B.PER. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2, 5 y 8: fracción insoluble de muestra sin inducir; 3, 6 y 9: fracción insoluble de muestra inducida; 4, 7 y 10: fracción soluble de muestra inducida.

5.3.2. Inducción de la proteína *PaPPK1* a gran escala

Para obtener cantidades suficientes de proteína recombinante, se utilizaron 500 mL de cultivo celular para una mayor expresión a gran escala. Las condiciones óptimas escogidas para la inducción de *PaPPK1* fueron: incubación previo a la inducción a 28°C, 0,4% p/v final de L-arabinosa (condición fija), 28°C, 1 mM de IPTG y 4 horas de inducción en la cepa de *E. coli* BL21 AI. Luego de la centrifugación del cultivo, se almacenó el precipitado celular a -20°C para la posterior lisis y purificación de la proteína *PaPPK1*.

Para lisar el precipitado celular se utilizó el reactivo B-PER ya que se obtuvieron mejores resultados al medir la actividad *PaPPK1* que los obtenidos por sonicación. Tanto por su

sencillez y por los resultados obtenidos, la ruptura celular con el reactivo B-PER fue la utilizado en el resto de los ensayos de expresión a gran escala.

5.4. Purificación de la proteína PaPPK1

La proteína PaPPK1 sobre-expresada y fusionada con una cola de histidinas se purificó con IMAC mediante una columna HisTrap impregnada con iones de níquel (II).

Las fracciones de proteínas eluidas de la columna se analizaron en un gel de poliacrilamida (Figura 18). En la fracción eluida con 200 mM de imidazol (carril 6) se observa claramente una banda pura de proteína con un peso molecular de ~83 kDa de acuerdo al estándar de proteínas, lo cual es consistente con el peso molecular teórico de la proteína PaPPK1 (Ishige y cols, 1998).



Figura 18. Purificación de la proteína PaPPK1. Gel de poliacrilamida al 8%. Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: fracción insoluble; 3: fracción soluble; 4: frente de purificación de la fracción soluble; 5: fracción de PaPPK1 pura eluida con 80 mM de imidazol; 6: fracción de PaPPK1 pura eluida con 200 mM de imidazol; 7: fracción de PaPPK1 pura eluida con 600 mM de imidazol.

El análisis del SDS-PAGE demostró que la purificación de la proteína PaPPK1 fue exitosa. La concentración de las fracciones de PaPPK1 purificada resultaron adecuadas luego de concentrar y dializar la proteína en AMICON y bolsas de diálisis,

respectivamente. Generalmente, se obtuvieron 2 mL de la proteína a una concentración de aproximadamente 2 µg/µL. Por lo tanto, después de este procedimiento, la proteína se utilizó directamente para los ensayos de actividad.

Finalmente se realizó un Western-Blot, usando níquel como método de revelado de la cola de histidina, con los extractos crudos y las distintas fracciones de la proteína purificada. Como se aprecia en la Figura 19, tanto en los extractos crudos como en las fracciones purificadas fue identificada una proteína del tamaño esperado. Con esto se cumple parte del objetivo específico 2, ya que se dispondrá de la proteína *PaPPK1* con cola de histidina para estudiar su actividad *in vitro*.

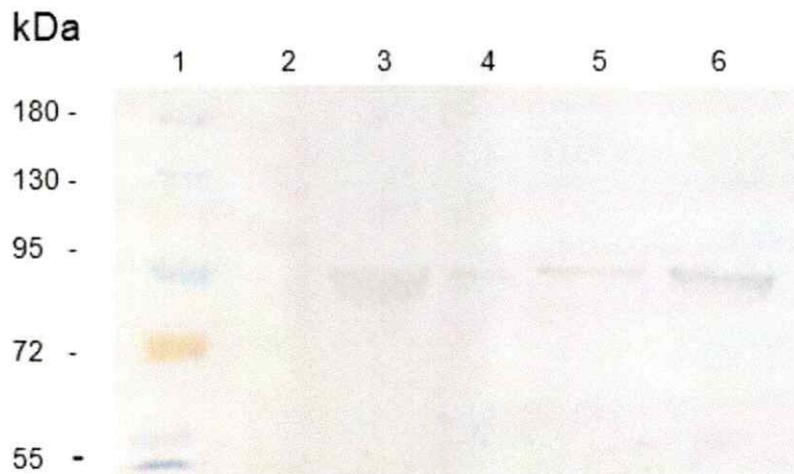


Figura 19. Western Blot. La enzima *PaPPK1* se visualizó usando HisDetector Nickel-HRP conjugates (KPL). Carriles: 1: estándar de peso molecular; 2: fracción insoluble de cultivo sin inducir; 3: fracción insoluble de cultivo inducido; 4: fracción soluble de cultivo inducido; 5: frente de purificación; 6: proteína pura *PaPPK1*. El tamaño de la banda mostrada es de ~83 KDa correspondiente al tamaño de *PaPPK1*.

5.5. Medición de la actividad enzimática PaPPK1

5.5.1. Condiciones óptimas para la cuantificación de poliP mediante DAPI

Primero establecimos las condiciones óptimas para la cuantificación de los poliP. Utilizamos diferentes buffers de reacción (Figura 20), variadas concentraciones de DAPI (Figura 21), se midió la fluorescencia emitida con distintas sensibilidades de equipo utilizado (Figura 22) y se determinó el rango lineal para la medición de poliP con DAPI (Figura 23). En todas las condiciones escogidas se observa un comportamiento lineal y una mayor pendiente en la curva, dando un rango mayor en la escala de valores de fluorescencia. La ganancia indica la sensibilidad usada por el equipo Sinergy HT (Biotek), a mayor ganancia, mayor sensibilidad. Los gráficos muestran los resultados de la medición en unidades de fluorescencia [UF], esta fluorescencia es emitida por el producto de las interacciones entre el poliP y el DAPI.

- a) Buffer de reacción: La mejor condición para cuantificar el poliP unido a DAPI 50 μM fue con el buffer HEPES-KOH 20mM más KCl 150 mM.

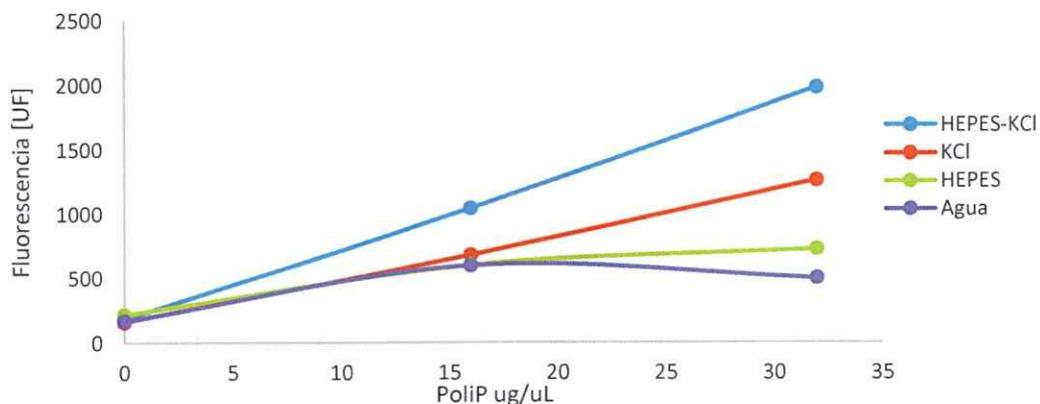


Figura 20. Efectos de los componentes de la solución amortiguadora sobre la dependencia de la fluorescencia con la concentración de DAPI. Este ensayo se realizó midiendo 3 concentraciones distintas de poliP (0, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$) en 4 condiciones distintas de solución detalladas en la leyenda del gráfico. La ganancia usada para la medición fue de 150 (la menor ganancia).

b) Concentración de DAPI: De todas las concentraciones analizadas escogimos 50 mM por presentar el mejor ajuste de los datos.

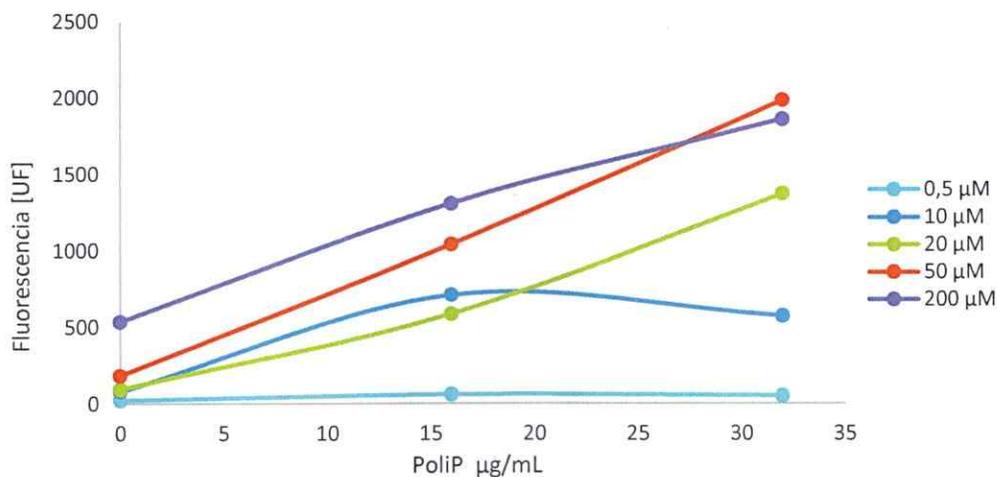


Figura 21. Dependencia de la fluorescencia con la concentración de poliP en diferentes concentraciones de DAPI. Este ensayo se realizó midiendo 3 concentraciones distintas de poliP (0, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$) en 5 distintas concentración de DAPI detalladas en la leyenda del gráfico, en todas las condiciones se usó como buffer Hepes-KCl. La ganancia usada para la medición fue de 150 (la menor ganancia).

c) Sensibilidad del equipo: La ganancia seleccionada que permitió obtener un mayor número de Unidades de fluorescencia fue la de 230.

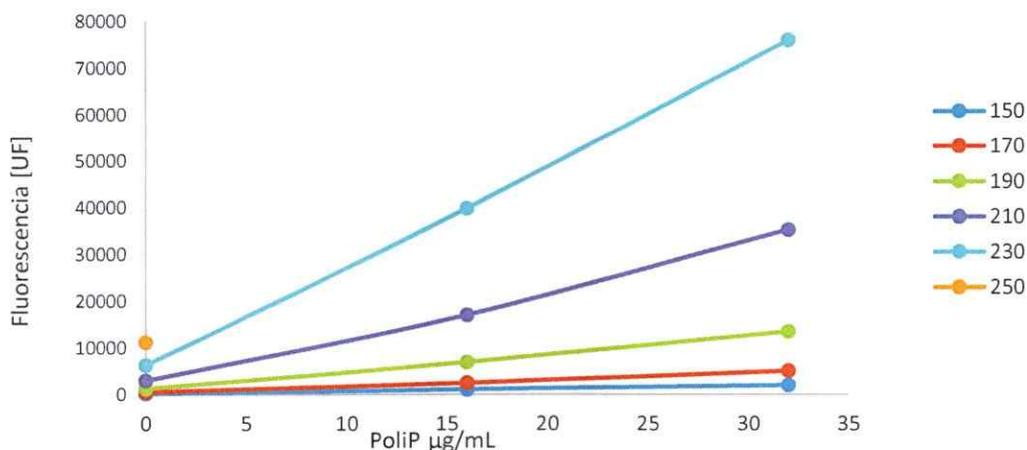


Figura 22. Efecto del parámetro Ganancia sobre la dependencia de la fluorescencia con la concentración de poliP. Este ensayo se realizó midiendo 3 concentraciones distintas de poliP (0, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$) ajustando la ganancia del equipo a 6 distintas sensibilidades detalladas en la leyenda del gráfico, en la medición se usó como buffer Hepes-KCl y DAPI 50 μM . La ganancia 250 tiene over flow, es decir, la medición se satura.

d) Rango lineal: El rango lineal de concentración de poliP se muestra entre 0 y 32 $\mu\text{g/mL}$ de poliP al medir con 50 μM de DAPI

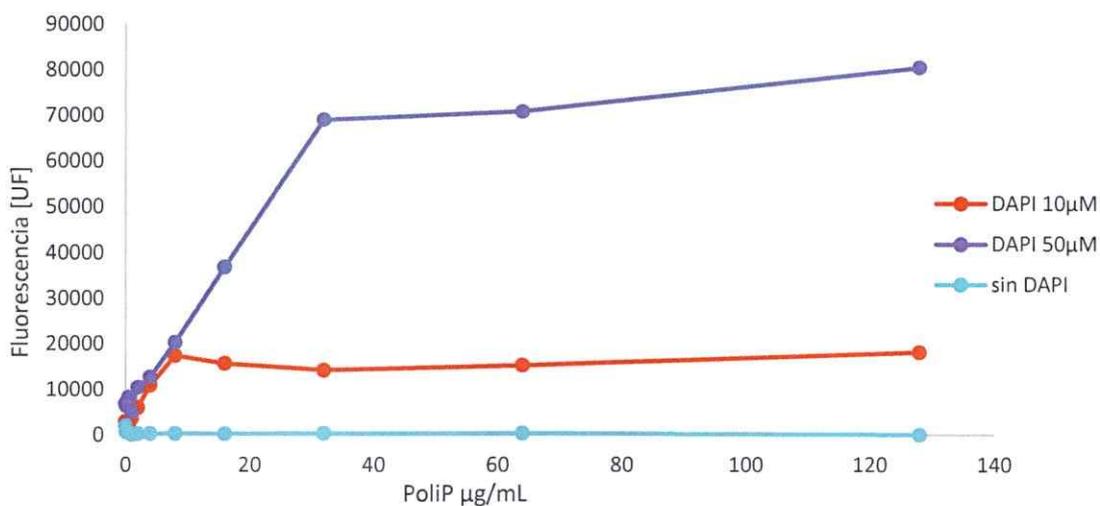


Figura 23. Determinación del rango lineal para la medición de poliP con DAPI. Este ensayo se realizó midiendo concentraciones distintas de poliP 0 a 128 $\mu\text{g/mL}$ con la ganancia 230 y con concentraciones de DAPI detalladas en la leyenda de los gráficos, en la medición se usó como buffer HEPES-KCl.

5.5.2. Condiciones óptimas para la actividad *Pa*PPK1

Para realizar los primeros ensayos fue necesario establecer las condiciones óptimas de la actividad *Pa*PPK1. Todas las mediciones de poliP fueron realizadas con las condiciones obtenidas en la sección anterior. Cabe destacar que se compararon diferentes métodos de detención de la reacción, lo cuales no dieron resultados concluyentes (con frío (-20°C), frío + EDTA y con ácido perclórico al 3,5% concentración final) (datos no mostrados). Se ensayó la actividad con diferentes cationes divalentes para la enzima *Pa*PPK1 como ZnCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2 , dando mejor resultado con Mg^{2+} (Anexo 3). A continuación resumimos algunos de las condiciones esenciales para la actividad *Pa*PPK1

- a. Cola de Histidina: Al medir la actividad *PaPPK1* pura con o sin cola de histidina (Figura 24) no se observan resultados satisfactorios ya que la fluorescencia es muy baja, por lo tanto, las condiciones establecidas no son suficientemente favorables para la enzima. Sin embargo, se observó que luego de cortar la cola de histidina de *PaPPK1*, la actividad de ésta disminuía significativamente luego de un par de días, por lo tanto, la cola de histidina proporciona cierta estabilidad a la enzima (datos no mostrados).

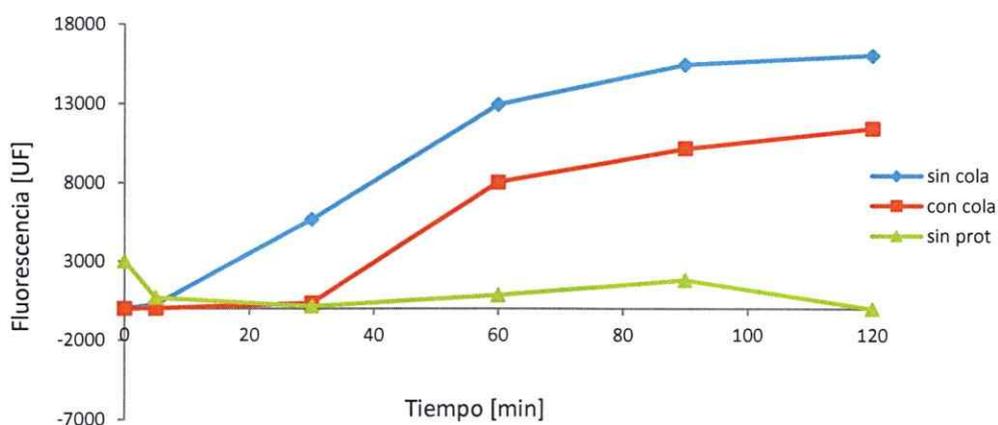


Figura 24. Efecto de la remoción de cola de His sobre la actividad *PaPPK1*. Las reacciones se ilustran en la leyenda del gráfico. Se observa que la reacción con la proteína sin cola tiene mejor actividad que la reacción de la proteína con cola, es importante destacar que la cola de histidina fue cortada el mismo día de la medición de actividad. Todas las reacciones tienen 1 mM de ATP.

- b. Sistema de regeneración de ATP: Adicionar el sistema regenerador de ATP junto con el cebador de PoliP resultó ser esencial ya que aumentó la actividad de la proteína significativamente. En la figura 25 se observa que la proteína sin cola no mejora su actividad aunque se le agregue sistema de regeneración de ATP. Todas las reacciones de la figura 25 llevan poliP como cebador.

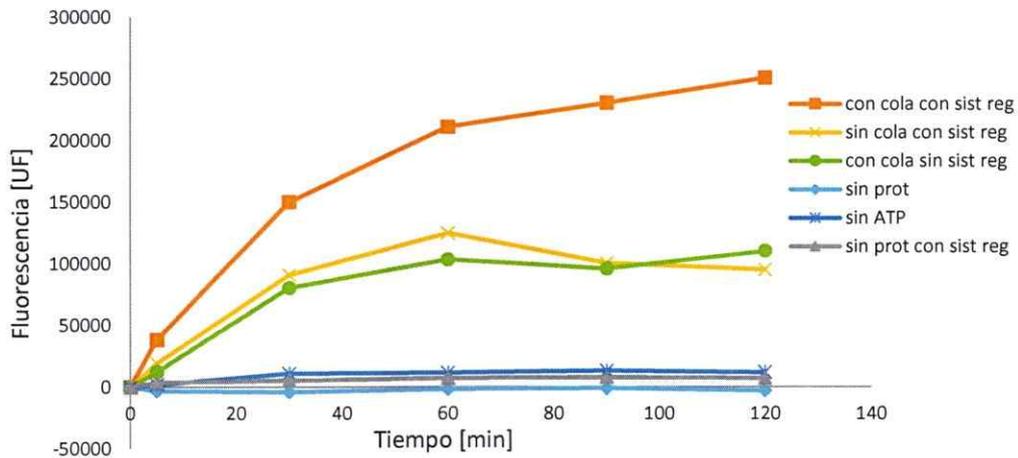


Figura 25. Ensayos con sistema de regeneración de ATP (sist reg) más cebador. Las reacciones se ilustran en la leyenda del gráfico. Se observa que la reacción de la proteína con cola de histidina y con sistema de regeneración de ATP tiene una actividad mayor en contraste con la reacción que no tiene sistema de regeneración de ATP. Los controles negativos (sin prot, sin ATP y sin prot con sist reg) no tienen actividad

- c. Cepas de *E. coli*: Expresar la enzima en otra cepa no dio buenos resultados. El uso del cebador hidrolizado no mostró diferencias significativas, por lo tanto, se descartó su uso. El medio de incubación de las células fue S.O.C. (Figura 26)

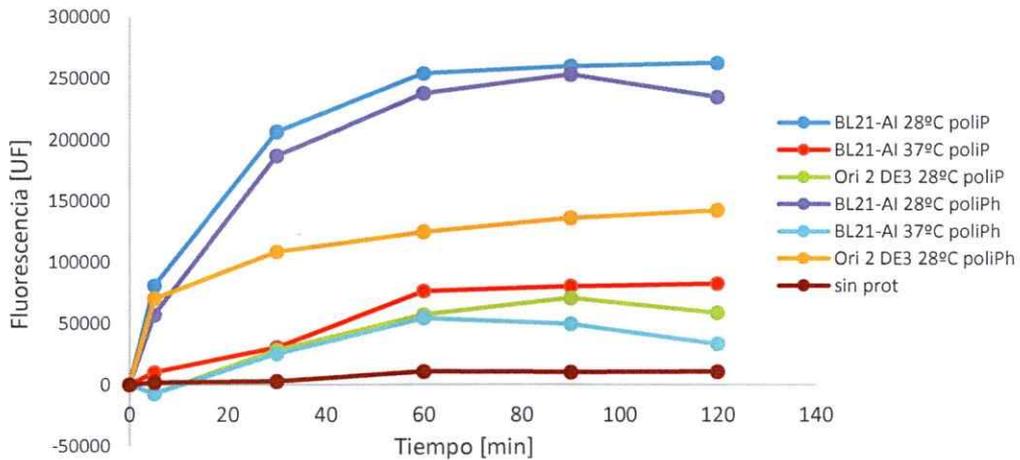


Figura 26. Actividad de extractos de cepas de *E. coli* inducidas para la expresión de PaPPK1. Las reacciones se ilustran en la leyenda del gráfico. La reacción con el extracto crudo obtenido de un precultivo crecido a 28°C de la cepa BL21 AI mostró mejor actividad que la de 37°C. El extracto crudo obtenido de la cepa Origami2 DE3 (Ori 2 DE3) tiene una menor actividad que el obtenido de la cepa BL21 AI. Al hidrolizar el poliP (poliPh) se observa un aumento en la actividad en la cepa Origami 2 DE3 (curva naranja versus curva verde). Sin embargo, en la cepa BL21 AI el poliP hidrolizado no da cambios. Ver detalles en Anexo 4.

- d. Concentración de ATP: Aumentar el ATP a 5 mM en el ensayo y crecer la bacteria en medio de cultivo LB producen los mejores niveles de actividad la proteína.

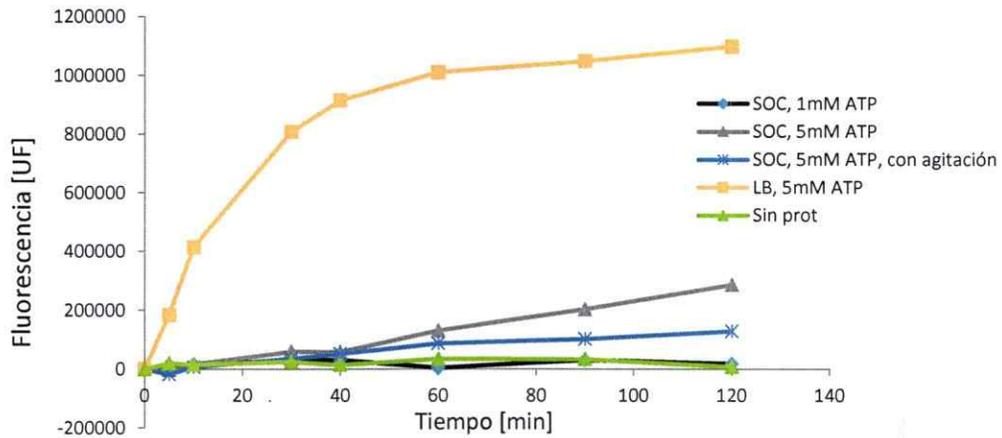


Figura 27. Efecto de la concentración de ATP en el ensayo de actividad y el tipo de medio de cultivo durante la inducción. Las reacciones se ilustran en la leyenda del gráfico. La enzima obtenida de un cultivo de LB mostró mejor actividad que la del cultivo crecido en S.O.C. (curva naranja versus curva gris). La reacción incubada en agitación mostró una leve menor actividad que la reacción sin agitación (curva azul versus curva gris). Se realizaron controles negativos (curvas verde) que no muestran actividad significativa, al igual que la reacción con 1 mM de ATP (curva negra). Ver más detalles en Anexo 5.

- e. Efecto de la presencia de imidazol en PaPPK1 purificada: La proteína eluída con el buffer de 200 mM de imidazol, concentrada y dializada sintetizó más poliP en las 2 horas de incubación (Figura 28). Ver más detalles en el Anexo 6.

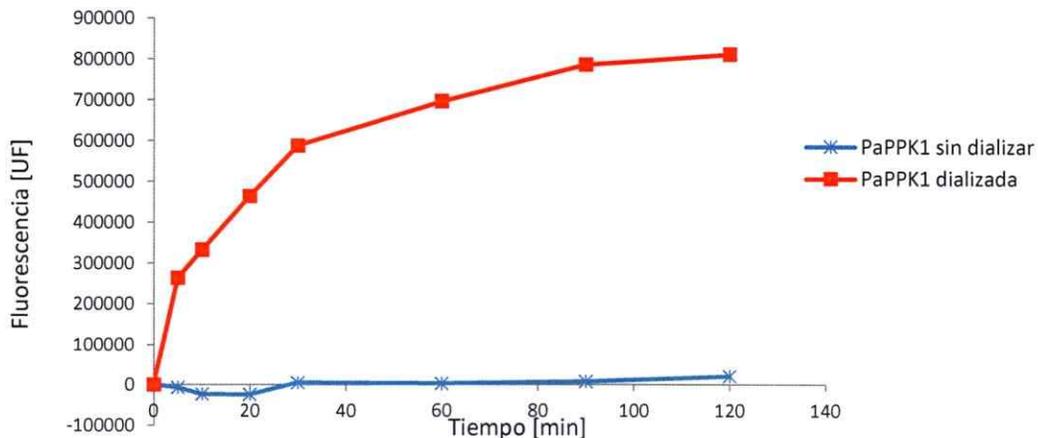


Figura 28. Prueba de actividad de la proteína pura. Se estudió la actividad de las fracciones de proteínas puras, concentradas, dializadas versus sin dializar. Las reacciones se ilustran en la leyenda del gráfico. Las proteínas sin concentrar no mostraron actividad (datos no mostrados).

El mix de reacción para las condiciones óptimas de actividad para *Pa*PPK1 resultó en: 50 mM de Hepes-KOH pH 7.2, 25 mM de MgCl₂, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 5 mM de ATP, 2 mM creatina fosfato, 20 µg/mL de creatina quinasa, 1 µg/mL de poliP₄₅ como cebador y 7 µg de *Pa*PPK1 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 2 h a 37°C sin agitación y la alícuota de 20 µL debe ser detenida con DAPI concentración final 50 µM. Con esto se cumple el objetivo específico 2 en su totalidad ya que se tiene la *Pa*PPK1 purificada en su forma activa.

5.5.3. Parámetros cinéticos de *Pa*PPK1

Con vistas a cumplir con el objetivo específico número 3, se estudió la actividad enzimática de la proteína PPK1 de *P. aeruginosa* para determinar sus parámetros cinéticos, gracias a las condiciones obtenidas en la sección anterior. Definimos la actividad enzimática como los nmoles de ortofosfato (Pi) agregados a la cadena de poliP en un minuto. En la Figura 29 se observa la cantidad de producto en nmoles de ortofosfato agregado a una cadena de poliP en el tiempo. El polifosfato se cuantificó a partir de la fluorescencia emitida al unirse a DAPI, extrapolando la ecuación de la recta de la curva ilustrada en el gráfico 1 de materiales y métodos.

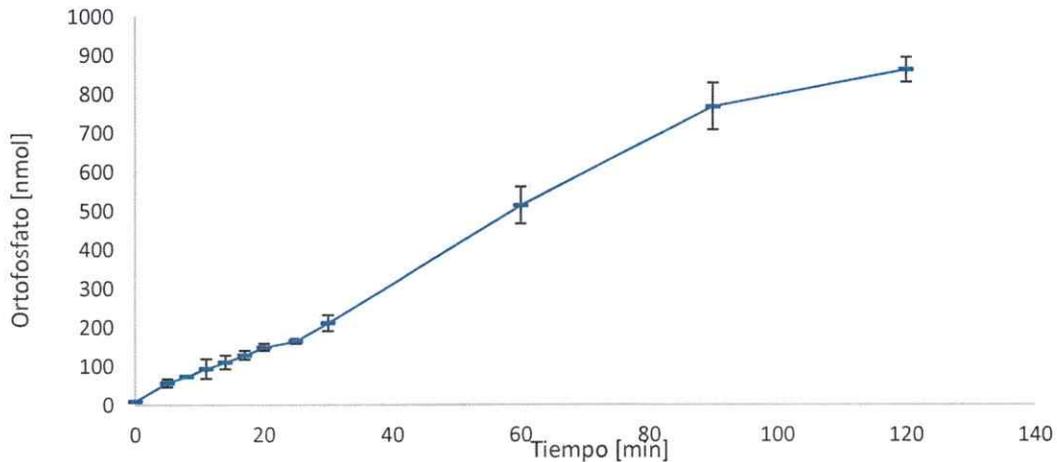


Figura 29. Actividad enzimática de la enzima PaPPK1. Se observa la cantidad de producto producido por la enzima a lo largo del tiempo desde el inicio de la reacción, donde se añadió 7 μ g de la proteína al mix de reacción con 5 mM de ATP. Las barras de error corresponden a 4 réplicas técnicas.

Se realizaron ensayos para medir la cinética enzimática de la PaPPK1 con distintas concentraciones de sustrato (ATP) y con las mismas condiciones del experimento anterior. La reacción con 5 mM de ATP es la que tiene una mayor pendiente, al subir de esa concentración de ATP, la actividad va disminuyendo.

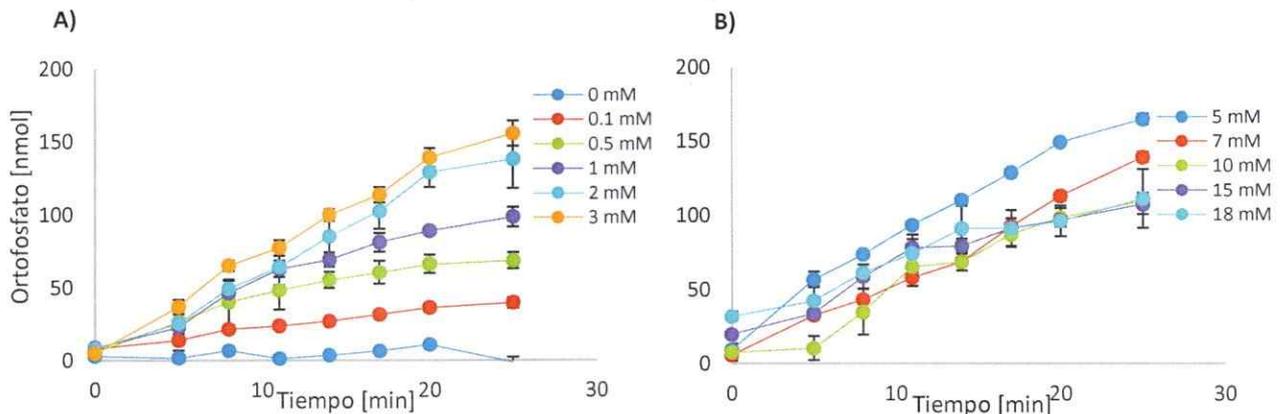


Figura 30. Curvas de tiempo de la actividad enzimática de la enzima PaPPK1 a distintas concentraciones de sustrato. El gráfico ilustra en la leyenda la concentración de ATP de cada curva. Todas las reacciones están bajo la misma condición, excepto por la concentración de sustrato. Se muestran los primeros 25 minutos de actividad. **A)** Reacciones con 0, 0,1, 0,5, 1, 2 y 3 mM de ATP; **B)** reacciones con 5, 7, 10, 15 y 18 mM de ATP. Cada experimento se realizó con 4 réplicas técnicas representadas con las barras de error. En el Anexo 7 se observan las curvas de tiempo de PaPPK1 durante 2 h de reacción y la actividad específica de la enzima para cada concentración de sustrato.

Del gráfico de la figura 30 se obtuvo la velocidad inicial, a partir de la pendiente de las curvas entre 0 y 25 minutos. Con este dato se pudo calcular la actividad específica de PaPPK1 para cada concentración de sustrato.

Posteriormente se midió el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_0) de la reacción, manteniendo la concentración de la enzima constante. En la Figura 31, se muestra el comportamiento cinético de PaPPK1 a diferentes concentraciones de sustrato (ATP). Se observa que PaPPK1 no muestra el comportamiento Michaeliano clásico de una curva hiperbólica, si no que por sobre 5 mM la actividad disminuye con la concentración de ATP, dando indicio de una inhibición por sustrato.

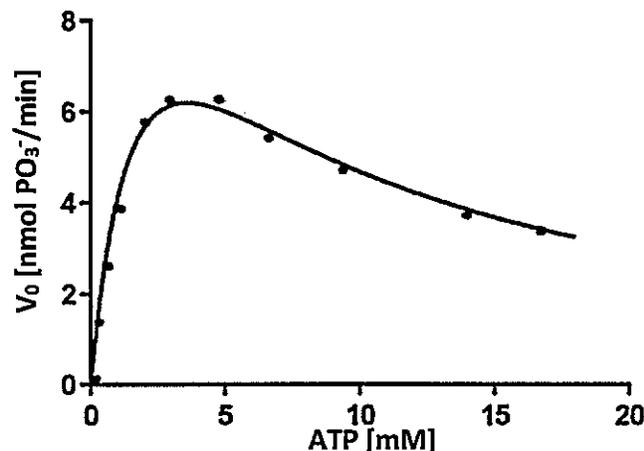


Figura 31. Cinética de PaPPK1 a distintas concentraciones de sustrato. Se observa la velocidad inicial obtenida en los primeros 25 minutos de reacción versus la concentración de ATP utilizada en dicha reacción. La enzima estudiada tiene un comportamiento de inhibición por sustrato (R^2 0,9839) y la ecuación de la curva es $Y=14,1X / (2,28 + (1 + X / 5,6) X)$.

Mediante el uso del programa GraphPad Prism 6 se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: V_{MAX} de $2,01 \times 10^6$ pmol/min*mg, K_M de 2,280 mM, k_{cat} de $0,17 \text{ min}^{-1}$ y k_i de 5,599 mM. Ver detalles del análisis entregado por el programa en el Anexo 7. Con estos resultados se cumple el objetivo específico 3.

5.6. Inhibición de la actividad PaPPK1

Con vistas a determinar la capacidad inhibitoria de 39 compuestos previamente analizados *in silico* en relación con su capacidad de unirse al sitio activo de la PaPPK1, se ensayó la incubación de dichos compuestos con la enzima purificada para cumplir el objetivo específico 4. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

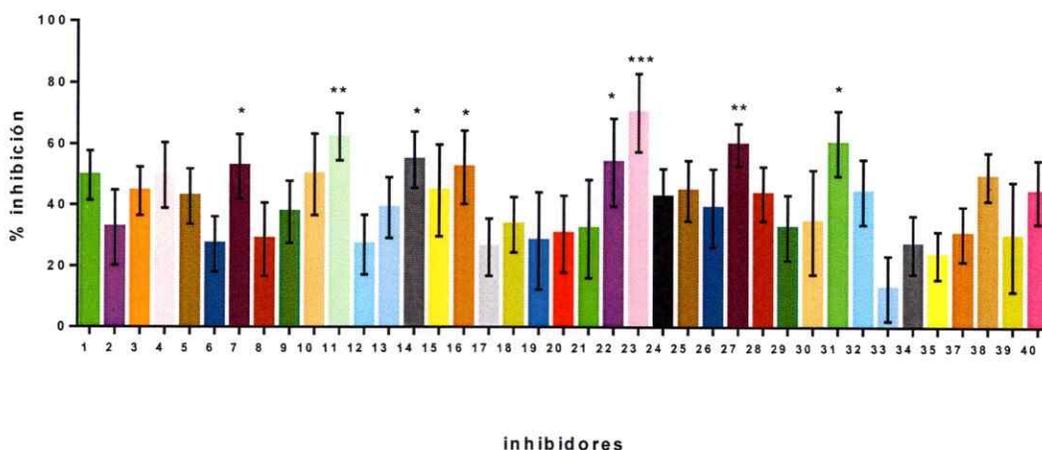


Figura 32. Actividad inhibitoria de 39 compuestos en la enzima PaPPK1. En el gráfico se muestran los resultados con 10 réplicas biológicas para cada uno de los inhibidores, transformados a porcentaje de inhibición calculado en función a la reacción sin inhibidor (0% de inhibición o 100% de actividad). Los compuestos con 1 asterisco (*) tienen más de un 50% de inhibición; los con 2 asteriscos (**) tienen más de un 60% de inhibición; y el compuesto 23, con 3 asteriscos (***) tiene más de un 70% de inhibición. La reacción control, sin inhibidor, se realizó con 5 mM de ATP. El compuesto 36 no se envió, por lo tanto, no se muestra en el gráfico.

Para comparar la potencia entre las moléculas candidatas se utilizó el IC_{50} de cada inhibidor. El IC_{50} es una medida de eficacia de la droga pues indica la concentración del compuesto inhibidor que es necesario para inhibir un 50% de la actividad enzimática. Según la FDA, el IC_{50} representa la concentración de droga que se requiere para la inhibición del 50% *in vitro*. El IC_{50} de una droga se puede determinar construyendo una curva de dosis-respuesta, examinando el efecto de diversas concentraciones del inhibidor sobre la actividad de la proteína. Los siguientes gráficos muestran la curva

dosis-respuesta para cada inhibidor con más de un 50% de inhibición sobre la proteína PaPPK1. Los compuestos 11 y 23 tuvieron un mal ajuste a la curva, es por esto que se descartó su uso, sin embargo para este ensayo no se realizó duplicado, por lo tanto, estos resultados son muy preliminares.

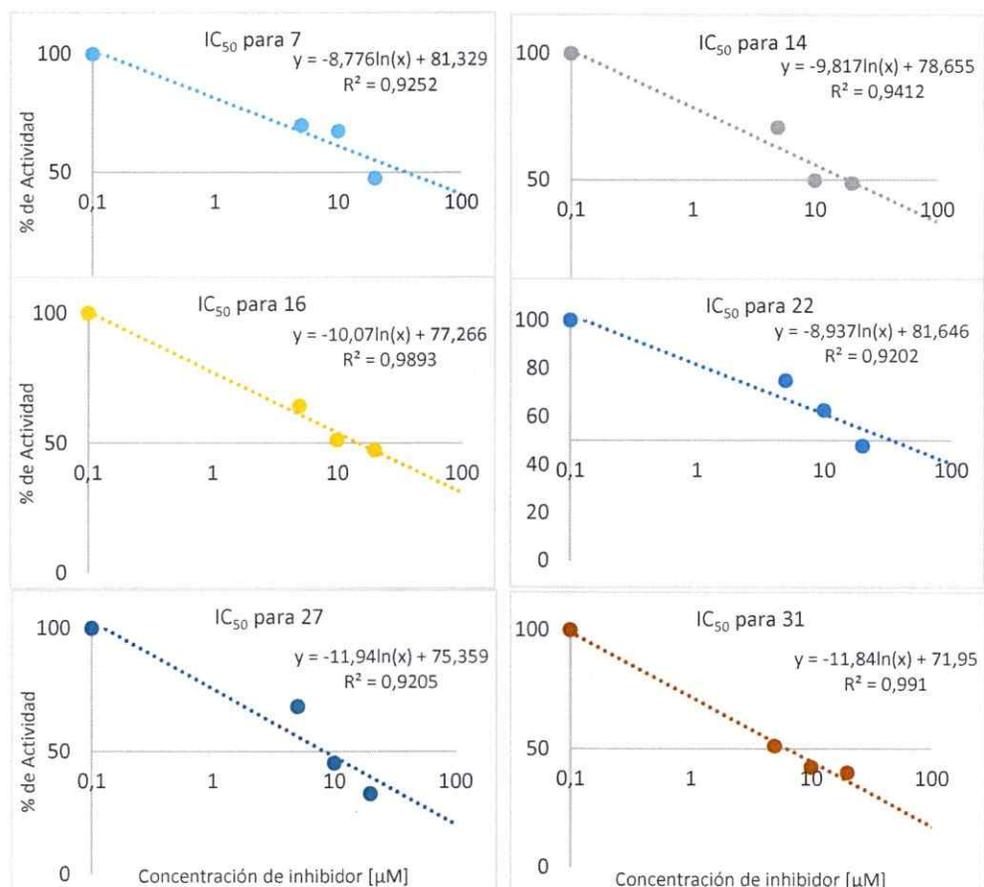


Figura 33. Efecto del inhibidor según la dosis. Cada inhibidor se midió en 4 concentraciones distintas (0,1, 5, 10 y 20 µM). La reacción se detuvo a las 2 horas. En el título de cada gráfico se indica el inhibidor correspondiente, y en la leyenda la ecuación logarítmica para cada curva, con estas ecuaciones se calcula el IC₅₀ para cada compuesto (Tabla 5).

En la Tabla 5 se muestran los valores de IC₅₀ de los inhibidores ensayados.

Tabla 5. IC₅₀ para cada compuesto candidato (inhibidor).

Inhibidor	7	14	16	22	27	31
IC ₅₀ (µM)	35,5	18,5	15,0	34,5	8,0	6,0

6. DISCUSIÓN

6.1. Síntesis del gen *Pappk1* para optimizar el uso de codones en *E. coli*

La información de un genoma es fundamentalmente un catálogo codificado de polipéptidos que el organismo debe ser capaz de sintetizar o traducir; pero cada organismo lleva su propio sesgo en el uso de los 61 codones.

La población tRNA refleja estrechamente el sesgo de codones más utilizados por el organismo (Ikemura, 1981; Dong y cols., 1996). Esta condición, denominada selección traduccional, permite una mayor eficiencia en la traducción de proteínas.

La adaptación del uso de codones es fundamental para la expresión heteróloga de proteínas. Cuando se expresa un gen en un hospedero que no es el propio, su uso de codones puede ser muy distinto; lo que puede disminuir la expresión del gen, estancar la traducción, terminar la traducción de forma prematura, desplazar el ORF y/o incorporar aminoácidos erróneamente (Kurland y Gallant, 1996), todo debido a la demanda de uno o más tRNAs que pueden ser raros o carentes en la cepa hospedero (Kane, 1995; Goldman y cols., 1995). Es fundamental el hecho de que el uso de codones de *E. coli* difiere con el uso de codones de *P. aeruginosa*. *Pseudomonas* utiliza preferentemente aquellos codones que forman interacciones codón-anticodón de gran energía de enlace. Esto coincide con el uso de codones de organismos con alto contenido de GC en su genoma (alrededor de un 67% en *P. aeruginosa*). En cambio, *E. coli* utiliza preferentemente aquellos codones que forman interacciones codón-anticodón de energía de enlace intermedio (West y Iglewski, 1988).

En varios intentos previos en el laboratorio, la sobreexpresión del gen *ppk1* de *P. aeruginosa* había resultado infructífera. Teniendo en cuenta que la expresión de otros genes *ppk1* no es tóxico en *E. coli*, (Ruiz y cols., 2011; Lee y cols., 2003; Pan-Hou y cols., 2002), una causa muy probable de la falta de expresión podría ser que el uso de codones del gen *Pappk1* no fuera eficientemente utilizado por *E. coli*.

En la práctica con el Sistema pET y otros sistemas de alto nivel de expresión en *E. coli*, la presencia de un pequeño número de codones raros a menudo no deprime severamente la síntesis de la proteína. Sin embargo, la expresión de proteínas heterólogas puede ser muy baja cuando un gen codifica numerosos codones raros para *E. coli*. Se han observado los efectos más graves sobre la expresión cuando múltiples codones raros consecutivos están cerca del N-terminal (Nakamura y cols., 2000).

Existen diversos métodos para optimizar el uso de codones de un gen, entre ellos el denominado "one amino acid, one codon" (un aminoácido, un codón), que consiste en sustituir todos los codones de un gen por el codón sinónimo óptimo (Puigbó y cols., 2007). Otro método, es incrementar el tRNA carente dentro del hospedero. Los niveles de tRNA pueden ser aumentados incrementando el número de copias del gen del tRNA respectivo (Brinkmann y cols., 1989; Seidel y cols., 1992; Rosenberg y cols., 1993). Esto se realiza típicamente insertando el gen silvestre del tRNA en un plásmido multicopia. Sin embargo, los codones raros son usados como un mecanismo para mantener la expresión de un gen de baja expresión en bajos niveles; por lo tanto, agregar uno de estos plásmidos a la célula hospedera rompería este mecanismo de regulación, ya que no habría un equilibrio entre codones abundantes y tRNAs abundantes, pues todos los tRNAs estarían en la misma proporción. Esto llevaría un

desbalance en la expresión basal del hospedero, causando una competencia en la traducción de los genes, lo que podría significar una disminución en la expresión de la proteína heteróloga.

Por todo lo anteriormente expuesto y para superar la nula expresión de PaPPK1 en *E. coli*, se optimizó el uso de codones con el método "one amino acid, one codon", y se sintetizó el gen *Pappk1* con codones adaptados para el uso en *E. coli*. Este método resultó muy adecuado pues a diferencia de los intentos anteriores fue posible expresar el gen *ppk1* silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 en *E. coli*. Este procedimiento nos permitió expresar activamente PaPPK1 en *E. coli* para su posterior purificación sin afectar el proceso de traducción general en la célula hospedero.

6.2. Elección del vector y de la cepa de *E. coli* para la expresión de PaPPK1

Los sistemas de expresión están diseñados para producir muchas copias de una proteína deseada dentro de una célula hospedero. Con el fin de lograr esto, un vector de expresión se inserta en una célula hospedero. Este vector contiene toda la codificación genética necesaria para producir la proteína, incluyendo un promotor apropiado para la célula hospedero, una secuencia que termina la transcripción y una secuencia que codifica para la unión al ribosoma (Purves y cols., 2001).

La elección del vector de expresión de PaPPK1 resultó no ser trivial, ya que el vector original donde se encontraba el gen *Pappk1* era el pUC57. Este vector es comúnmente usado para el clonamiento en *E. coli* y es de alto número de copias (500-700). La sobreexpresión de proteínas recombinantes a partir de plásmidos de múltiples copias puede resultar en niveles de expresión de hasta el 40% de la proteína celular total (Rosano y cols., 2014). Sin embargo, en la mayoría de los casos, esto resulta en la

formación de agregados de proteínas insolubles conocidos como cuerpos de inclusión, que pueden afectar la actividad de las proteínas expresadas (Worrall, 1996; McGettrick y Worrall, 2004). Esto fue lo que sucedió con el vector pUC57-*Pappk1*, ya que su expresión resultó ser poco regulada, ya que incluso sin inducir la expresión con IPTG había una expresión basal de la proteína y la mayor parte de ésta apareció en la fracción insoluble de proteínas, lo que pudo causar un plegamiento defectuoso, formando cuerpos de inclusión.

Un sistema de expresión desarrollado por Studier y Moffatt (1986), es el de la RNA polimerasa altamente selectiva por el bacteriófago T7 RNA polimerasa. Este sistema se ha conocido como el sistema de expresión pET, y actualmente es ampliamente utilizado debido a su capacidad para producir grandes cantidades de proteínas, por la especificidad involucrada en que la T7 RNA polimerasa sólo se une al promotor T7 y también por el diseño del sistema que permite una fácil manipulación para expresar la cantidad de proteína deseada y elegir cuándo se produce dicha expresión (Unger, 1997; Novagen, 2003).

Una de las partes más importantes del sistema de expresión pET implica el hecho de que la proteína no se transcribe a menos que la T7 RNA polimerasa esté presente. Las células procariontas no poseen esta polimerasa, por lo tanto, la célula hospedero debe haber sido manipulada genéticamente para incorporar el gen de la T7 RNA polimerasa en su genoma.

El gen de interés se clona en el sitio de múltiple clonamiento en la dirección adecuada del vector pET, tanto el promotor T7 como el operador *lac* se encuentran al extremo 5' del gen. Cuando la T7 RNA polimerasa está presente -gracias a la inducción por L-arabinosa en la célula hospedero- y el operador *lac* no es reprimido -gracias al IPTG

añadido-, la transcripción del gen transcurre rápidamente. Debido a que T7 es un promotor viral, se transcribe rápida y profusamente durante el tiempo en que la T7 RNA polimerasa esté presente. La expresión de la proteína aumenta rápidamente. En unas pocas horas, la proteína es uno de los componentes más abundantes de la célula (Unger, 1997).

Por estas razones y para superar el problema producido al expresar *PaPPK1* en pUC57, se utilizó el vector pET-TEV (15-20 copias). Además, este vector tiene la ventaja de añadir una cola de histidina al ORF de la proteína, lo que permite seguir fácilmente la expresión de PPK1 y purificarla rápidamente mediante cromatografía de afinidad. También el plásmido pET-TEV permite incluir el sitio de corte de la proteasa TEV entre la cola de 6 His y la secuencia aminoacídica de la proteína, lo que posibilita cortar la cola de histidina si ésta afecta en la actividad enzimática de la proteína expresada. Con este sistema de expresión se superó el problema de expresar la proteína en forma insoluble y la purificación de ésta pudo realizarse de manera más simple y rápida.

Otro aspecto importante es el hospedero donde se expresa la proteína heteróloga. En este estudio se utilizaron diferentes cepas de *E. coli* para encontrar en cuál se expresaba mejor y de manera soluble la *PaPPK1*. Se escogió la cepa EcBL21 AI™, ya que en esta cepa la expresión es finamente regulada sin expresión basal del plásmido. Además, esta cepa no contiene la proteasa *lon* y es deficiente en la proteasa de membrana externa, *OmpT*. La falta de estas proteasas reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en esta cepa. Otro aspecto fundamental es que lleva una inserción cromosómica de un cassette que contiene el gen de la T7 RNA polimerasa en el locus *araB*, lo que permite que la expresión de esta polimerasa sea

regulada por el promotor *araBAD* (inducido por L-arabinosa) (Lee, 1980; Lee y cols., 1987). El gen *araB* es eliminado de la cepa. También codifica el gen *tetA* que confiere resistencia a tetraciclina y permite la verificación de la identidad de la cepa.

La cepa BL21 AI es adecuada para una alta expresión de proteínas recombinantes que se encuentren en cualquier vector de expresión basado en el promotor T7. El rendimiento de la proteína recombinante obtenida a partir de BL21 AI es generalmente similar a la obtenida por otras cepas BL21 según lo indicado en el catálogo de la cepas de Invitrogen.

6.3. Purificación de PaPPK1

Para estudiar detalladamente las propiedades de cualquier proteína es preciso contar con una muestra homogénea que sólo contenga dicha proteína. Las técnicas de separación se concentran en el tamaño, la carga y la polaridad, que es donde residen las diferencias de las moléculas. Para estudiar las proteínas es necesario extraerlas de las células, por lo tanto, la purificación de PaPPK1 se toma en cuenta desde la lisis celular hasta la homogeneidad de la proteína.

Para lisar las células se usaron dos métodos, el detergente B-PER y la clásica sonicación. No se encontró en la literatura estudios que purificaran PPK1 mediante el método B-PER, en todos los estudios reportados en donde purificaban PPK1 siempre se utilizó la sonicación para la lisis celular. En este estudio se compararon estas dos metodologías, dando mejor resultado el B-PER, tanto al visualizar los geles de poliacrilamida, como al comparar la actividad de las proteínas puras provenientes de extractos tratados con B-PER versus sonicación (datos no mostrados). Es importante evitar la proteólisis de la proteína durante la lisis celular, para esto se utilizó un cóctel

de inhibidores de proteasas libre de EDTA, también se añadió DNasa I y lisozima para destruir los componentes celulares que puedan interferir con la purificación.

Intentos anteriores de nuestro laboratorio, usando el vector pUC57, no fueron efectivos para purificar la proteína (datos no mostrados), ya que resultaron ser muy aparatosos y consistían en muchas etapas con distintas columnas de purificación, por lo tanto, era un proceso muy lento. Por ejemplo, se purificó la PPK1 de *E. coli* hasta la homogeneidad (Kornberg y col, 1990); este procedimiento incluyó cinco etapas distintas: desde la lisis celular por sonicación, la precipitación de las proteínas con sulfato de amonio, y el paso del extracto protéico por 3 columnas diferentes (fosfocelulosa, DEAE-celulosa y Mono S^r). Para evitar estos procedimientos se decidió utilizar el vector pET-TEV que fusionaba la cola de histidina a la proteína, además de los beneficios anteriormente mencionados.

Para la purificación se utilizó la columna HisTrap™ HP (Ge Healthcare Life Sciences). Este método de purificación es muy eficaz, por lo que se ha utilizado incluso para purificar la PPK1 de *E. coli* (Zago y cols., 1999; Kornberg y cols., 2000).

Luego de la purificación se evaluó cortar la cola de histidina. Este paso previo a la concentración y diálisis se realizó porque se reportó que la cola podría disminuir o afectar la actividad de la enzima en *E. coli* (Bornhorst y Falke, 2000; Panek y cols., 2013). Sin embargo, al medir la actividad de la proteína con y sin cola se observó que, aunque en un inicio la proteína sin cola tenía una mayor actividad, ésta perdía la estabilidad muy pronto y luego de aproximadamente una semana se inactivaba. Por el contrario, la proteína con cola tenía una menor actividad pero ésta permanecía estable en el tiempo. Además, la diferencia de actividad no era significativa entre las proteínas con o sin cola, ya que a las dos horas de actividad la proteína sin cola agrega a las

cadenas de poliP aproximadamente 1 nmol de ortofosfato más que la proteína con cola de histidina, esto es despreciable considerando que luego de dos horas de reacción *PaPPK1* agrega alrededor de 900 nmoles de ortofosfato a las cadenas de poliP. Es por esto que se eligió mantener la cola de histidina y evitar perturbaciones en la *PaPPK1* que pudieran inactivarla. Efectos similares se han obtenido en otros estudios usando una proteína con cola de histidina (Mateo y cols., 2001), es decir, la cola puede otorgar cierta estabilidad a algunas enzimas en el tiempo.

Otro paso importante fue la diálisis de la proteína. Para este procedimiento se utilizaron dos métodos: con bolsas de diálisis y con filtros de ultra centrífuga para concentrar proteínas (cambio de solvente en la proteína). Con ambos métodos se obtuvo el mismo resultado y sólo resultaban exitosos si se hacían en frío (4°C), de otra forma la proteína perdía su actividad. Por otra parte, este paso resultó ser esencial ya que sin dializar, la *PaPPK1* no tenía actividad, aunque la proteína control, *EcPPK1*, mantenía actividad durante aproximadamente dos semanas sin dializar.

6.4. Medición de actividad *PaPPK1* y cuantificación de los poliP

La principal actividad de PPK1 es la síntesis de poliP. En *P. aeruginosa* PAO1 está asociada casi exclusivamente con la fracción de membrana, igual que en *E. coli*. Los niveles de poliP son similares en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Fraleley y cols., 2007), pero bajo condiciones adversas, en *P. aeruginosa* son considerablemente más altos (Kuroda y cols., 1997).

Para encontrar las condiciones favorables en que *PaPPK1* tuviera actividad fue necesario primero ensayar con la proteína control, *EcPPK1*, puesto que sus

condiciones ya han sido reportadas y en base a éstas se adaptó un nuevo protocolo que se ajustara a los requerimientos de la actividad *Pa*PPK1.

Uno de los cambios fue la adición de un cebador. Anteriormente se reportó (Kornberg y cols., 1990) que la adición de éste no es requerido en la reacción de síntesis de poliP; ni ATP ni ortofosfato inorgánico cumplen este rol (Kornberg y cols., 1990). Sin embargo, a niveles muy bajos de ATP (5 μ M), muy por debajo de su K_M , un pronunciado retardo se observa en la síntesis de poliP por *Ec*PPK1, este retardo puede ser evitado por la adición de tetrapolifosfato (poliP₄), pero no por Pi, PPI o tripolifosfato (poliP₃). Un efecto estimulante similar fue visto con poliPs heterogéneos, con longitudes entre 5 y 15 ortofosfatos. Sin embargo, al estudiar las condiciones óptimas para la actividad de *Pa*PPK1 no se observó actividad de la enzima si no se añadía a la reacción poliP como cebador. El poliP utilizado fue de un largo de 45 ortofosfatos (poliP₄₅), y aunque se ensayó hidrolizarlo para obtener un cebador más pequeño, no se vieron cambios significativos en este procedimiento, por lo tanto, se siguió utilizando poliP₄₅. Cabe destacar que en nuestros experimentos tampoco se evidenció actividad en *Ec*PPK1 sin añadir el cebador al mix de reacción que contenía 1 mM de ATP.

Otro cambio en las condiciones de actividad fue la concentración de sustrato utilizada. Para *Ec*PPK1 fue necesario 1 mM de ATP para observar suficiente actividad enzimática, en cambio para *Pa*PPK1 no fue suficiente esta concentración, por lo tanto, se aumentó a 5 mM de ATP para observar una actividad similar a *Ec*PPK1. Además fue estrictamente necesario agregar un sistema regenerador de ATP y el co-factor de la proteína, que resultó ser el mismo que para *Ec*PPK1, Mg^{2+} . Estudios anteriores concuerdan con este resultado, señalando que el cofactor de *Pa*PPK1 es Mg^{2+} , tanto para la reacción directa como reversa. En cambio, para *Pa*PPK2 el cofactor es Mg^{2+}

para la síntesis de poliP, pero cambia a Mn^{2+} para la síntesis de GTP o ATP (Zhang y cols., 2002).

Para medir la síntesis del poliP catalizada por PPK1, el método clásico usado es mediante el uso de ATP radioactivo como sustrato, [γ - ^{32}P] ATP. Luego el poliP se extrae y se cuantifica en un contador de centelleo. Como se mencionó anteriormente, éste método es complicado, ya que se trabaja con radioactividad, porque la extracción del poliP aumenta el error de la medición y porque se debe hacer con muchas muestras, lo cual lo vuelve dificultoso. Es por esto que en este estudio se utilizó un nuevo método para analizar la actividad de *Pa*PPK1, utilizando DAPI para medir el poliP sintetizado *in vitro* por la enzima, en un buffer compuesto por Hepes-KOH (20 mM) más KCl (150 mM) (buffer de cuantificación del poliP). Este método ha sido reportado en una ocasión para medir la actividad PPK1 en una tesis de doctorado que no ha sido publicada (Wang, 2009). Se intentó seguir el protocolo descrito en aquella tesis para medir la actividad *Pa*PPK1 con DAPI pero no dio resultado, por lo tanto, el procedimiento utilizado en este trabajo es diferente en cuanto a la concentración de DAPI usada, a la alícuota de la reacción stock medida, a la forma de detener la reacción, entre otros. También se ha reportado este método para la cuantificación y visualización del poliP en la célula (Kulakova y cols., 2011).

Como se describió en materiales y métodos, la medición de la actividad se hace de manera discontinua, sacando una alícuota del mix de reacción cada cierto tiempo y deteniendo la actividad de la proteína con la adición de DAPI (50 μ M concentración final). Esto se decidió luego de ensayar diversas formas de detener la reacción (con frío -la síntesis de poliP es insignificante a 0°C (Kornberg y cols., 1990)-, con frío más

EDTA –por ser un quelante de cationes divalentes- y con ácido perclórico), las cuales resultaron poco reproducibles.

La detención de la actividad con ácido perclórico es la más utilizada en los diversos estudios en donde ensayan la actividad PPK1, sin embargo, tras utilizar este procedimiento observamos un precipitado blanco que se formaba luego de un tiempo de incubada la reacción. Para corroborar esto se ensayó incubar las alícuotas de la curva de calibración con ácido perclórico durante una hora, los resultados fueron evidentes (datos no mostrados), la curva perdió su linealidad y todos los puntos de diferente concentración de poliP disminuyeron significativamente su fluorescencia. Por lo tanto, esto impidió una cuantificación fiable del poliP, ya que dependía del tiempo que la alícuota fuera incubada con el ácido. Luego corroboramos que este ácido es comúnmente utilizado también para extraer poliP (Ryazanova y cols., 2011), por lo tanto, debe actuar sobre éste, precipitándolo o alterando su integridad. Este aspecto podría explicar los distintos resultados reportados de los parámetros cinéticos de *EcPPK1* (Li y cols., 1973; Ahn y Kornberg, 1990 y Haeusler y cols., 1992).

Debido a los fallidos intentos de detener la reacción se intentó medir la actividad de forma continua (datos no mostrados), este procedimiento tampoco dio resultado, ya que la proteína no tenía actividad al ser incubada con DAPI y con el buffer de cuantificación del poliP, lo que indica que uno de estos componentes podría detener la actividad de *PaPPK1*. Se ensayó detener la actividad de la proteína con DAPI, lo que sí dio resultado. Sin embargo, el KCl inhibe la reacción de síntesis de poliP en ~50% a 50 mM o niveles más altos (Kornberg y cols., 1990), lo que indica que el buffer de cuantificación también ayuda a detener la reacción directa de PPK1.

6.5. Parámetros cinéticos de la enzima PaPPK1

Se han estudiado anteriormente las enzimas principales del metabolismo de los poliP y algunas de sus características. PPK1 es responsable de la síntesis de la mayor parte del poliP celular (Ahn y cols., 1990; Kumble y cols., 1996). Cepas mucoides de *P. aeruginosa* acumulan mucho poliP, en particular durante la fase estacionaria (Kim y cols., 1998) y bajo diversas condiciones de crecimiento (Ault-Riché, 1998). Se ha reportado que dependiendo del estado fisiológico de la bacteria, la concentración intracelular de poliP varía entre 0,1-200 mM (Boguslaw y cols., 2008). Sin embargo, poco se sabe acerca de la PaPPK1 y su regulación en la síntesis de poliP en *P. aeruginosa*.

Aunque ya varias enzimas que metabolizan poliP se han purificado, y sus genes han sido clonados y secuenciados -incluso la PPK1 de la cepa 8830 de *P. aeruginosa* (Ishige y cols., 1998; Zago y cols., 1999)-, en ningún estudio se han reportado los parámetros cinéticos de dicha enzima. Este trabajo aporta la primera aproximación de estos parámetros, lo que constituye un gran aporte a los próximos estudios realizados con esta enzima.

Por ejemplo, la PPK1 de la cepa mucoide 8830 de *P. aeruginosa* ya se clonó en *E. coli* BL21 (DE3) (pLysS) y purificó mediante cromatografía de afinidad usando Níquel para atrapar la cola de histidina (Zago y cols., 1999). Se midió su capacidad de sintetizar poliP *in vitro* con el método convencional, usando ATP radioactivo (γ - ^{32}P) y purificando el producto de la reacción con *glassmilk*, para finalmente visualizar el producto por medio de cromatografía en capa fina (TLC). Sin embargo, en ese estudio no se reportaron parámetros cinéticos de esta enzima, más bien se hizo un análisis de

las secuencias de *Pappk1*, *Pappx* y sus promotores, además de evaluar la actividad de los promotores bajo distintas condiciones de estrés.

Es interesante mencionar que hay más estudios realizados con la PPK2 de *P. aeruginosa* que con la PaPPK1 (Zhang y cols., 2002; Ishige y cols., 2002; Nocek y cols., 2008). Zhang y cols., (2002) muestran parámetros cinéticos obtenidos de la PaPPK2 de la cepa *P. aeruginosa* PAOM5, detallando el largo de cadena de poliP utilizado o sintetizado por la enzima en la reacción directa y reversa, respectivamente. Algunos de estos ensayos también los hacen con PPK1 de *P. aeruginosa* PAOM5, detallando sólo la velocidad máxima (V_{MAX}) y el largo de cadena de poliP sintetizado por la enzima, que fue de entre 500 y 800 unidades de ortofosfato.

Se sabe que la PPK2 es muy distinta a la PPK1; ya que utiliza poliP como sustrato para generar GTP desde GDP (Ishige y cols., 2002), no muestra similitud de secuencia con PPK1 y se distingue por una actividad mucho mayor para la síntesis de GTP (Zhang y cols., 2002). Además la PPK2 fosforila preferentemente GDP a GTP, mientras que su afinidad por el ADP es 2,5 veces menor (Ishige y cols., 2002; Zhang y cols., 2002).

Por lo mencionado aquí y en la introducción, es menester estudiar más en profundidad la PaPPK1 y sus parámetros cinéticos. Como la K_M , que bajo ciertas condiciones puede dar cuenta de la afinidad de una enzima por su sustrato (Cornish-Bowden, 1975), y la k_{cat} o V_{MAX} para obtener la eficiencia catalítica y poder comparar este parámetro con sustratos alternativos, como GTP u otro nucleótidos trifosfatos o difosfatos. En este trabajo se obtuvieron los parámetros cinéticos y sólo se estudió como sustrato el ATP; y aunque está reportado que el sustrato específico de *EcPPK1* es ATP, no hay estudios similares de PaPPK1.

Los parámetros cinéticos obtenidos en este estudio fueron: V_{max} de $2,01 \times 10^6$ pmol/min*mg, K_M de 2,3 mM y k_{cat} de $10,05 \text{ s}^{-1}$.

La velocidad máxima obtenida dio muy parecida al único reporte encontrado (Zhang y cols., 2002), perteneciente a PPK1 de *P. aeruginosa* PAOM5 que fue de $2,1 \times 10^6$ pmol/min*mg de proteína. Cabe mencionar que el método usado por Zhang y cols. (2002) es muy diferente al empleado en este trabajo, ya que en él se midió la actividad con ATP radioactivo, con el método clásico. El hecho de que los resultados obtenidos con procedimientos tan diferentes sean tan similares, valida la metodología usada en este seminario de título.

La K_M de PaPPK1 no se ha reportado, pero obtuvimos un valor similar a la reportada en EcPPK1, que también es 2 mM para ATP (Ahn y cols., 1990). En cuanto a la k_{cat} obtenida también se puede comparar con la de EcPPK1, que es de $23,6 \text{ s}^{-1}$ (Ahn y cols., 1990), esto significa que cada molécula de PPK1 puede catalizar la hidrólisis de 23,6 moléculas de ATP por segundo, para unir su fosfato terminal a una cadena de poliP. Este parámetro es el doble al obtenido en este estudio para PaPPK1 ($10,05 \text{ s}^{-1}$). A priori uno podría esperar que la k_{cat} fuese mayor para *Pseudomonas* por su capacidad de almacenar y acumular mayor poliP intracelular que *E. coli*, esta capacidad puede explicarse por la regulación de su metabolismo; como en *E. coli* los genes *ppk* y *ppx* están en un operón, su regulación es coordinada, por el contrario en *Pseudomonas* estos genes están adyacentes pero opuestos, por lo tanto, su regulación es diferente. Además, la k_{cat} puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y generalmente tiene un rango de valores considerable.

La curva de v_0 versus concentración de ATP se ajustó a un comportamiento de inhibición por sustrato con un R^2 de 0,9839 y con una K_i de 5,6 mM para ATP. Este

comportamiento ya se había reportado en la PPK1 de *Mycobacterium smegmatis* (Suzuki y cols., 1971), en donde se observó inhibición de la actividad de síntesis de poliP por PPK1 sobre 1 mM de ATP, lo cual indica que la K_i obtenida en este estudio es considerablemente más alta. Además en un estudio realizado en nuestro laboratorio con *EcPPK1*, también se obtuvo inhibición por sustrato (Seminario de título en desarrollo de Francisca Campos).

Generalmente, la actividad específica de una proteína es medida en unidades/mg de proteína. Una unidad (U) corresponde a un nmol de fosfato incorporado como producto, por minuto de reacción a 37°C. En este estudio se reporta una actividad específica de *PaPPK1* de *P. aeruginosa* PAO1 de 541,19 U/mg. El único reporte de este parámetro para PPK1 de *P. aeruginosa* 8830 fue de 0,344 U/mg (Ishige y cols., 1998). Estos resultados difieren en 3 órdenes de magnitud. Lo cual puede explicarse porque el método utilizado en ambos estudios es radicalmente diferente. En el trabajo de Ishige y cols. (1998) se mide la actividad de la enzima midiendo el poliP sintetizado de un lisado celular post sonicación, sin extraer el poliP (por lo tanto, tampoco detiene la actividad). El lisado celular se aplicó en la parte posterior de una placa TLC, luego el poliP se visualizó y cuantificó usando un sistema de análisis de imágenes BAS2000 (Fujix, Tokio, Japón). Por lo tanto, estos métodos mantienen a la enzima bajo condiciones totalmente distintas, lo cual hace que no sean comparables.

6.6. Inhibidores de la *PaPPK1*

P. aeruginosa es una bacteria encontrada comúnmente en el suelo, el agua y las plantas, y es un patógeno oportunista en humanos que causa infecciones graves en pacientes con diversas enfermedades, con quemaduras graves y heridas (Van Delden

y Iglewski, 1998). Se ha reportado que causa enfermedades en numerosos hospederos como plantas, insectos, gusanos y una variedad de vertebrados (Finlay, 1999; Bennett y cols., 2014). El éxito de *P. aeruginosa* en diversos ambientes se atribuye a su gran variedad de factores de virulencia, que incluyen factores asociados a la células, como alginato, lipopolisacárido, flagelos y pili; y factores de virulencia secretados, como toxinas, elastasas, proteasa, fosfolipasa, y pequeñas moléculas que incluyen fenazinas, ramnolípido y cianuro (Van Delden y Iglewski, 1998; Bennett y cols., 2014). La virulencia de *P. aeruginosa* y las funciones de los factores han sido examinados con el uso de diferentes animales, así como modelos de plantas e invertebrados (Rahme y cols., 1997; Tan y cols., 1999; Jander y cols., 2000). Debido a la formación de biofilms y su resistencia inherente a los agentes antimicrobianos, *P. aeruginosa* es capaz de generar infecciones persistentes y crónicas, como en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (Costerton y cols., 1999).

Como ya se mencionó en la introducción, el poliP es importante para muchas funciones y procesos en *P. aeruginosa* PAO1. Particularmente, el mutante nulo *PaPPK1* exhibe fenotipos pleiotrópicos que incluyen la disminución de la virulencia y la motilidad (Rashid y cols., 2000a), defectos en la formación de biopelículas (Ghafoor y cols., 2011) y problemas en la compactación del nucleóide, entre otras (Fraley y cols., 2007). En mutantes de *PPK1*, tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*, tales defectos son eliminados por complementación (Fraley y cols., 2007), indicando funciones similares de *PPK1* y/o poliP en estos dos organismos. Sin embargo, las diferencias entre los dos sugieren que *P. aeruginosa*, en su hábitat natural y en las infecciones, ha evolucionado con estrategias especiales para producir y utilizar poliP respondiendo y adaptándose al estrés ambiental y las limitaciones nutricionales.

Por ejemplo, la reacción reversa de *Pa*PPK1 es principalmente la síntesis de GTP a partir de poliP, actividad 10 veces más potente que en la *Ec*PPK1. Ya que el GTP es necesario para la mayor acumulación de alginato (May y cols., 1994), un exopolisacárido esencial para la virulencia de *P. aeruginosa* (Shankar y cols., 1995). La capacidad de *Pa*PPK1 para generar GTP a partir de poliP puede cumplir una importante función en la virulencia de esta cepa, ya que el alginato es un polímero esencial para la formación de biopelículas (May y cols., 1994). Por lo tanto, el poliP puede ser un sensor para la producción de alginato, la fuente de GTP requerido para su síntesis (Fraley y cols., 2007) o un regulador de la expresión de alginato (Kim y cols., 1998).

Diversos estudios están enfocados en buscar y/o diseñar nuevas drogas antimicrobianas que no apunten a erradicar al patógeno (Rao y cols., 2009; Chávez y cols., 2011; Starkey y cols., 2014), ya que conlleva al desarrollo de cepas resistentes a múltiples drogas. Es por esto que para enfrentar los fenómenos de resistencia y persistencia bacteriana, se han explorado varias estrategias anti-virulencia (Rasko y cols., 2008; Cheng y cols., 2014; McShan y De Guzman, 2015), una de éstas es interferir con la regulación de los genes relacionados con la producción de los factores de virulencia (Rasko y cols., 2010; El-Mowafi y cols., 2015). Por ejemplo, un blanco muy utilizado es el sistema de comunicación bacteriana (*quorum sensing*) debido a que esta vía regula la expresión y producción coordinada de un amplio rango de factores de virulencia en diversos patógenos, y son dispensables para la supervivencia bacteriana (Hentzer y cols., 2003; Rasko y cols., 2008; Rasko y Sperandio, 2010; Naik y Mahajan, 2013; Bhardwaj y cols., 2013; Starkey y cols., 2014). Sin embargo, aunque se ha reportado que mutantes de la comunicación bacteriana tienen su virulencia atenuada

(Rashid y cols., 2000b; Smith y Iglewski, 2003; Juhas y cols., 2005), no todos los factores de virulencia están controlados por el *quorum sensing*; además, las bacterias pueden desarrollar resistencia a estos inhibidores (Kalia y cols., 2014).

Por todo lo mencionado anteriormente, se ha postulado a la síntesis de los poliP y particularmente a la PPK1 como un blanco para la producción de nuevos compuestos antivirulencia en *Pseudomonas*. Es importante estudiar la PaPPK1, ya que constituye un “regulador global” de la virulencia debido a que numerosos genes de virulencia que son dependientes y otros independientes de la vía del *quorum sensing*, disminuyen su expresión en mutantes del gen *ppk1*, incluyendo el mismo *quorum sensing* (Rashid y cols., 2000b; Kim y cols., 2002; Fraley y cols., 2007; Rao y cols., 2009; Kassem y Rajashekara, 2011; Ortíz-Severin, 2013).

Debido a que la PaPPK1 está involucrada en el metabolismo celular en vez de en una función esencial, es altamente conservada en patógenos Gram-positivos y Gram-negativos (Tzeng y Kornberg, 1998; Kornberg y cols., 1999) y no se ha encontrado en mamíferos, lo que la califica como una diana terapéutica para el control de la virulencia. Consecuentemente, no se somete al patógeno a una presión selectiva letal como con los antibióticos sino a una desregulación de la producción de sus factores de virulencia. Por lo tanto, se estaría haciendo frente además, al fenómeno de persistencia bacteriana y a la resistencia adquirida por las bacterias a los fármacos (Maviglia y cols., 2009). A pesar de esto, no hay reportes de inhibidores de PaPPK1. Sin embargo, se han reportado inhibidores EcPPK *in vitro*; reportado por Arthur Kornberg (Chávez y cols., 2011), en particular compuestos seleccionados de la Biblioteca química ICOS'. Algunos mostraron inhibición de la enzima; sin embargo, en el ensayo *in vivo* con *E.*

coli, los resultados no fueron equivalentes; lo que evidencia la necesidad de evaluar *in vivo* el efecto de estas drogas.

Como el diseño de nuevas drogas debe considerar ciertos aspectos que tienen que ver no sólo con que sean efectivos contra la virulencia del patógeno, sino que sean inocuos frente al hospedero y a sus bacterias beneficiosas. Se verificaron tales requisitos con ensayos *in vivo*, en una tesis de Magister previamente realizada en nuestro laboratorio (Bravo-Toncio, 2015), donde se estudió la virulencia de *P. aeruginosa* en el modelo de la ameba social *D. discoideum*, poniendo a prueba la toxicidad de inhibidores hacia el patógeno, las bacterias beneficiosas y el hospedero. Entre los compuestos con mayor actividad antivirulencia destacó un derivado de triazina (NSC-696924); previamente otro derivado de triazinas se reportó por su actividad antivirulencia en *K. pneumoniae* en el protozoo *Tetrahymena pyriformis* (Benghezal y cols., 2007).

Este estudio tuvo como objetivo específico evaluar el efecto *in vitro* de las moléculas antimicrobianas previamente diseñadas (Chávez y cols., 2011) y probadas en la tesis de Bravo-Toncio (2015), y encontrar compuestos que pudieran evidenciar una disminución en la síntesis de poliP por PaPPK1 o inhibir su actividad enzimática. Gracias a esto, descubrimos nuevos potenciales compuestos anti-virulencia que tienen como blanco la PaPPK1 mediante un ensayo sencillo, de bajo costo y a gran escala, previamente estandarizado. Nuestro trabajo, constituye el primer estudio que emplea PaPPK1 *in vitro* como blanco para la búsqueda de compuestos antimicrobianos.

En el ensayo para medir la inhibición de estos compuestos se utilizó una concentración de ATP mayor al valor de la K_M de PaPPK1, pero bajo el rango de inhibición por sustrato, por lo tanto, no se usó una concentración inhibitoria de ATP. En los ensayos

realizados destacaron 8 compuestos candidatos a inhibidores de *Pa*PPK1 de los cuales sólo 6 se ajustaron a una curva de inhibición para obtener el IC₅₀. Los dos compuestos descartados provocaron una gran inhibición a la actividad *Pa*PPK1, sin embargo, se ajustaron muy mal a la curva logarítmica obtenida del efecto del inhibidor según la dosis. A pesar de esto, los resultados obtenidos son muy preliminares y requiere de más investigación o más réplicas de los ensayos para poder realizar pruebas estadísticas que respalden fuertemente los resultados obtenidos.

En resumen, en este seminario de título pudimos sintetizar, expresar y purificar la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1. Luego con la enzima purificada se adaptó un método de cuantificación por fluorescencia de poliP mediante DAPI para desarrollar un método para determinar la actividad enzimática PPK1. Gracias a esta metodología logramos probar diversos posibles inhibidores de la enzima y demostrar la eficacia de inhibición de algunos de ellos sobre la *Pa*PPK1. El desarrollo de este seminario permite contar con nuevas moléculas que luego deben ser validadas en ensayos *in vivo* de virulencia para ver su potencial como nuevos compuestos antimicrobianos.

7. CONCLUSIONES

- El uso de codones adaptados para la expresión en *Escherichia coli* permitió la síntesis de una enzima con 100% de identidad respecto a la PPK1 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 silvestre.
- Mediante la expresión de la enzima PaPPK1 fusionada con una cola de 6 histidinas bajo el control del promotor de la T7 RNA polimerasa se logró la purificación a homogeneidad de la enzima desde la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad.
- El uso de un ensayo discontinuo mediante el uso de DAPI permitió establecer las condiciones óptimas para determinar la actividad de la enzima PaPPK1 mediante fluorescencia.
- La determinación de los principales parámetros cinéticos de la enzima PaPPK1, como K_M , V_{MAX} , k_i y k_{cat} , permite conocer la afinidad de la enzima por su sustrato y su eficiencia catalítica, los cuales podrían utilizarse en eventuales ensayos comparativos para probar distintos inhibidores de la actividad PaPPK1.
- Mediante un ensayo preliminar de inhibición de la actividad enzimática se detectaron seis compuestos inhibidores de la actividad PaPPK1 que podrían ser nuevos candidatos de agentes antimicrobianos.
- Teniendo en cuenta que la PPK1 está involucrado en el metabolismo celular y no en una función esencial celular, la convierte en un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos antibióticos que no apunten matar a la bacteria sino a afectar la producción de los factores de virulencia de la misma.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Achbergerová, L. & Nahálka, J. (2011). Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microb. Cell. Fact.*, 10:63.
2. Ahn, K. & Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265:11734-11739.
3. Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267:22556-22561.
4. Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633-639.
5. Alvarez, J., Ortiz-Severín, J., Guillani N. & Chávez F.P. (2011). Estudios fenotípicos a gran escala en mutantes de la síntesis de los polifosfatos (PPK1 y PPK2) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Poster presentado en SOMICH.
6. 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. *J. Fluoresce.*, 18(5), 859-866
7. Ault-Riché, D., Fraley, C.D., Tzeng, C.M. & Kornberg, A. (1998). A Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:1841-1847
8. Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.*, 36(4), 525.
9. Berrow, N. S., Büssov, K., Coutard, B., Diprose, J., Ekberg, M., Folkers, G. E. & Busso, D. (2006). Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 62(10), 1218-1226.
10. Benghezal, M., Adam, E., Lucas, A., Burn, C., Orchard, M., Deuschel, C., Valentino, E., Brailard, S., Paccaud, J. & Cosson, P. (2007). Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. *Cell Microbiol.* 9:1336-1342.
11. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2014). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Elsevier Health Sci.*
12. Bhardwaj, A., Vinothkumar, K. & Rajpara, N. (2013). Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 8: 68-83.
13. Bigger, J. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, 244: 497-500.
14. Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Method. Enzymol.* 326, 245-254.
15. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1), 248-254.
16. Bravo-Toncio G. (2015). Estudios fenotípicos de la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizando como modelo de infección la ameba *Dictyostelium discoideum*. Tesis de Magister.
17. Breidenstein, E., De la Fuente-Núñez, C. & Hancock, R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiol.* 19: 419-426.
18. Brinkmann, U., Mattes, R. E., & Buckel, P. (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, 85(1), 109-114.
19. Chávez, F. P., Mauriaca, C., & Jerez, C. A. (2009). Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Res. Notes.* 2:50
20. Chávez, F.P., Lagos, C.F., Reyes-Parada, M., Guillani N. & Jerez, C. (2011). Polyphosphate synthesis as a target for novel antibiotics. *Curr. Enzym. Inhib.*, 7, 163-168
21. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L. & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5:217.

22. Clatworthy, A.E., Lee, J.S., Leibman M., Kostun, Z., Davidson, A.J. & Hung, D.T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect. Immun.*, 77:1293-1303
23. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
24. Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N.N., & Kornberg, A. (1994). Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269:6290-6295.
25. Dong, H., Nilsson, L., & Kurland, C. G. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.*, 260(5), 649-663.
26. El-Mowafi, S., Sineva, E., Alumasa, J., Nicoloff, H., Tomsho, J., Ades, S. & Keiler, K. (2015). Identification of inhibitors of a bacterial sigma factor using a new high-throughput screening assay. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59: 193-205
27. Finlay, B. B. (1999). Bacterial disease in diverse hosts. *Cell*, 96(3), 315-318.
28. Fraley, C.D., Rashid, M.H., Lee, S.S.K., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P.J., Brown, M.R.W. & Kornberg, A. (2007). A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 104, 3526-3531.
29. Galván A., Tejada M., Camargo A., Higuera J.J. & Fernández E. (2013). *Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante*. Septiembre 20, 2015, de Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba Sitio web: <http://myslide.es/documents/48-transformacion-e-coli-con-plasmido-recombinante.html>
30. Geißdörfer, W., Raatajczak, A. & Hillen, W. (1998). Transcription of *ppk* from *Acinetobacter sp* strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:896-901.
31. Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *App Environ Microb*, 77(15), 5238-5246.
32. Goldman, E., Rosenberg, A. H., Zubay, G., & Studier, W. F. (1995). Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 245(5), 467-473.
33. Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87(12), 4645-4649.
34. Haeusler, P. A., Dieter, L., Rittle, K. J., Shepler, L. S., Paszkowski, A. L., & Moe, O. A. (1992). Catalytic properties of *Escherichia coli* polyphosphate kinase: an enzyme for ATP regeneration. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15(2), 125-133.
35. Hancock, R. (1986). Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 18: 653-656.
36. Hare, N. J., Solis, N., Harmer, C., Marzook, N. B., Rose, B., Harbour, C., ... & Cordwell, S. J. (2012). Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC Microbiol.*, 12(1), 16.
37. Heller, H.C., Orians, G.H., Purves, W.K. & Sadava, D. (2001). *Life: The science of biology*. 6th ed. Sunderland (MA): *Sinauer Associates, Inc.*, 251, 322-323
38. Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J., Riedel, K., Rasmussen, T., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. & Song, Z. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.*, 22: 3803–3815.
39. Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol*, 146(1), 1-21.
40. Ishige, K., Kameda, A., Noguchi, T., & Shiba, T. (1998). The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.*, 5(3), 157-162.
41. Ishige K., Zhang, H. & Kornberg, A. (2002). Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 99:16684-16688.
42. Jander, G., Rahme, L. & Ausubel, F. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.*, 182: 3843–3845.

43. Juhas, M., Eberl, L. & Tumbler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 7: 459-471.
44. Kaakoush, N.O. & Mendz, G.L. (2009). Inhibition of disulfide reductases as a therapeutic strategy. *Curr. Enzyme Inhib.* 5, 117-133.
45. Kalia, V., Wood, T. & Kumar, P. (2014). Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microb. Ecol.*, 68:13-23.
46. Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.*, 6(5), 494-500.
47. Kassem, I. & Rajashekara, G. (2011). An ancient molecule in a recalcitrant pathogen: the contributions of poly-P to the pathogenesis and stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiol.* 6: 1117-1120.
48. Keasling J.D. & Hupf, G.A. (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:743-746.
49. Keasling, J.D. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 829:242-249.
50. Kim, H.Y., Schlichtman, D., Shankar, S., Xie, Z., Chakrabarty, A.M. & Kornberg, A. (1998). Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis coregulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.*, 27:717-725.
51. 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.
52. Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177:491-496.
53. Kornberg, A., Rao, N.N., & Ault-Riché D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
54. Kornberg, A. (2003). Novel antimicrobial therapies. US Patent 2003/0162691 A1: 1-12.
55. 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 40-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). *American Chemical Society. Environ. Sci. Technol.*, 45, 7799-7803.
56. Kumble, K.D., Ahn, K. & Kornberg, A. (1996). Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14391-14395.
57. Kurland, C., & Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotech.* 7(5), 489-493.
58. Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. & Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:21240-21243.
59. Lee, N. (1980). Molecular aspects of ara regulation. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 7, 389-409.
60. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
61. Lee, N., Francklyn, C. & Hamilton, E. P. (1987). Arabinose-induced binding of *araC* protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8814-8818.
62. Lee, S. J., Song, O. R., Lee, Y. C., & Choi, Y. L. (2003). Molecular characterization of polyphosphate kinase (ppk) gene from *Serratia marcescens*. *Biotechnol. Lett.*, 25(3), 191-197.
63. Li, H. C., & Brown, G. G. (1973). Orthophosphate and histone dependent polyphosphate kinase from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53(3), 875-881.
64. Lu, Q., Zhang, X., Almaula, N., Mathews, C. K. & Inouye, M. (1995). The gene for nucleoside diphosphate kinase functions as a mutator Gene in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 254(3), 337-341.
65. Lyczak, J., Cannon, C. & Pier G. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes. Infect.* 1051-1060.
66. Mairhofer, J., Pfaffenweller, I., Merz, D., & Grabherr, R. (2008). A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy. *Biotechnol. J.*, 3(1), 83-89.

67. Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, 154: 1140-1150.
68. Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Cortés, E., Garcia, J. L., Fernández-Lafuente, R. & Guisan, J. M. (2001), One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnol. Bioeng.* 76: 269–276.
69. May, T. B. & Chakrabarty, A. M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.*, 2(5), 151-157.
70. Maviglia, R., Nestorini, R. & Pennisi, M. (2009). Role of old antibiotics in multidrug resistant bacterial infections. *Curr. Drug. Targets*, 10, 895-905.
71. McGettrick, A. & Worrall D. (2004) Extraction of recombinant protein from bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 244:29-35.
72. McShan, A. & De Guzman, R. (2015). The bacterial type III secretion system as a target for developing new antibiotics. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 85: 30-42.
73. Miyake, T., Shiba, T., Kameda, A., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K. & Noguchi, T. (1999). The gene for an exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.*, 6:103-108.
74. Moffatt, B.A. & Studier, F.W. (1986). Use of bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes [abstract]. *J. Mol. Biol.*, 189(1):113-130.
75. Naik, V. & Mahajan, G. (2013). Quorum sensing: a non-conventional target for antibiotic discovery. *Nat. Prod. Commun.* 8: 1455-1458.
76. Nakamura, Y., Gojobori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic acids Res.*, 28(1), 292-292.
77. Nocek, B., Kochinyan, S., Proudfoot, M., Brown, G., Evdokimova, E., Osipiuk, J., Edwards, A., Savchenko, A., Joachimiak A. & Yakunin, A. (2008). Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(46), 17730-17735.
78. Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda T., Takiguchi, N., Ohtake, H. y Kornberg A. (2001). Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* 293:705-708.
79. Novagen. (2003). Protein expression: prokaryotic expression: pETBlue and pET System overview. *Catalog*. 84-91.
80. Ortiz-Severin J. (2013). Análisis de los cambios proteómicos y fenotípicos de los mutantes de la síntesis de los polifosfatos en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Tesis de Magister*.
81. Ortiz-Severin, J, Varas, M, Bravo-Toncio, C, Guiliiani, N, & Chávez, FP. (2015). Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis. *Biol. Res.*, 48, 1-6.
82. Pan-Hou, H., Kiyono, M., Omura, H., Omura, T., & Endo, G. (2002). Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 207(2), 159-164
83. Panek, A., Pietrow, O., Filipkowski, P. & Synowiecki, J. (2013). Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Biochim. Pol.*, 60(2): 163—166.
84. PerkinElmer. (2011). Unmatched sensitivity to match any application. 2015, de PerkinElmer Sitio web: www.perkinelmer.com
85. Pfeffer, J., Rusnak, M., Hansen, C. E., Rhlid, R. B., Schmid, R. D., & Maurer, S. C. (2007). Functional expression of lipase A from *Candida antarctica* in *Escherichia coli*—a prerequisite for high-throughput screening and directed evolution. *J. Mol. Catal. B- Enzymat*, 45(1), 62-67.
86. Pournaras, S., Iosifidis, E. & Roilides, E. (2009). Advances in antibacterial therapy against emerging bacterial pathogens. *Sem. Hematol.*, 46, 198-211.
87. Puigbo, P., Guzman, E., Romeu, A., & Garcia-Vallve, S. (2007). OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic acids Res.*, 35(suppl 2), W126-W131.
88. Rahme, L., Tan, M., Le, L., Wong, S., Tompkins, R., Calderwood, S. & Ausubel, F. (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13245–13250.

89. Rao, N.N., Roberts, M.F., & Torriani, A. (1985). Amount and chain length of polyphosphate in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions. *J. Bacteriol.* 162:242-247.
90. Rao, N.N. & Kornberg, A. (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178:1394-1400
91. Rao, N.N., Liu, S. & Kornberg, A. (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* 180:2186-2193.
92. Rao, N.N. & Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, Vol. 23, 183-195.
93. Rao, N.N., Gómez-García, M.R., & Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* 78:605-647.
94. Rashid, M.H., Rao, N.N. & Kornberg, A. (2000a). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225-227.
95. Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. & Kornberg, A. (2000b). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9636-9641.
96. Rashid, M.H. & Kornberg, A. (2000c). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4885-4890.
97. Rasko, D., Moreira, C., Li, de R., Reading, N., Ritchie, J. & Waldor, M. (2008). Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, 321: 1078-1080.
98. Rasko, D. & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 9: 117-128.
99. Reusch, R.N. & Sadoff, H.L. (1988). Putative structures y functions of poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4176-4180.
100. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5.
101. Rosenberg, A. H., Goldman, E., Dunn, J. J., Studier, F. W., & Zubay, G. (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.*, 175(3), 716-722.
102. Rudnick, H., Hendrich, S., Pilatus, U. & Blotevogel, K.H. (1990). Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphate and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. *Arch. Microbiol.* 154:584-588.
103. Ruiz, O. N., Alvarez, D., Gonzalez-Ruiz, G., & Torres, C. (2011). Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. *BMC Biotechnol.*, 11(1), 82.
104. Ryazanova, L., Andreeva, N., Kulakovskaya, T., Valiakhmetov, A., Yashin, V., Vagabov, V. & Kulaev, I. (2011). The early stage of polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*: comparative study by extraction and DAPI staining. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2: 293-297.
105. Scherer, P.A. & Bochem, H.P. (1983). Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusion. *Can. J. Microbiol.* 29:1190-1199.
106. Seidel, H. M., Pompliano, D. L., & Knowles, J. R. (1992). Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31(9), 2598-2608.
107. Shankar S., Ye R. W., Schlichtman D. & Chakrabarty A. M. (1995). Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 20:221-255
108. Sintim, H.O., Smith, J.A., Wang, J., Nakayama, S. & Yan, L. (2010). Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Fut. Med. Chem.*, 2, 1005-1035.

109. Smith, R. & Iglewski, B. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 56–60.
110. Starkey, M., Lepine, F., Maura, D., Bandyopadhaya, A., Lesic, B., He, J., Kitao, T., Righi, V., Milot, S., Tzika, A. & Rahme, L. (2014). Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLOS Pathogens*, 10.
111. Suzuki, H., Kaneko, T., & Ikeda, Y. (1972). Properties of polyphosphate kinase prepared from *Mycobacterium smegmatis*. *BBA Enzymology*, 268(2), 381-390.
112. Swem, L.R., Swem, D.L., O'Loughlin, C.T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S.M. & Bassler, B.L. (2009). A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Mol. Cell*, 35, 143-153
113. Tan, M., Rahme, L., Sternberg, J., Tompkins, R. & Ausubel, F. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96:2408–2413.
114. Tzeng, C.M. & Kornberg, A. (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 29:381-382.
115. Tzeng, C. & Kornberg, A. (2000). The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. *J. Biol. Chem.*, 275:3977-3983.
116. Unger, T.F. (1997). Show me the money: prokaryotic vpxpression Vectors and purification systems. *The Scientist* 11(17).
117. Van Delden C. & Iglewski B. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 4 (3): 551-560
118. Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A., & Chávez F.P. (2009). New structural and fuctional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.*, 12:10-7
119. Wächtershäuser, G. (1992). Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog.biophys. Molec. Biol.*, 58(2), 85-201
120. Wang, Y. (2009). Comparative functional analysis of enzymes that metabolize polyphosphate and guanosine polyphosphate in bacteria. University of Hong Kong. *Tesis de doctorado*.
121. West, S. E., & Iglewski, B. H. (1988). Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acids Res.*, 16(19), 9323-9335.
122. Wood, H.G. & Clark, J.E. (1988). Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* 57:235-260.
123. Worrall, D. (1996). Extraction of recombinant protein from bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 59:31-37.
124. Yahr, T.L. & Wolfgang, M.C. (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62:631-640.
125. Zago, A., Chugani, S. & Chakrabarty, A.M. (1999). Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2065-2071.
126. Zhang, H., Ishige, K., & Kornberg, A. (2002). A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:16678-16683.
127. Zhang, H., Gomez-Garcia, M.R., Brown, M.R.W. & Kornberg, A. (2005). Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102, 2731-2735
128. Zhu, Y., Huang, W., Lee, S. & Xu, W. (2005). Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO report*, 6: 681-687.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo 1

Secuencia nucleotidica de *Pappk1* enviada por GenScript:

> optPAppk; Length: 2401, GC: 52,60%

```
GAATTCAAGCTTGGTACCCCATGGTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATA
ACAATCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATCATATGAATACG
CAGCAAGGCCTGGACGAAATCGAACGCATCGCAGCAGACGAAACGGTGGTGGCTAATGTT
GAATCAGAAGCAGAAGTTAAAATGGCGGAAACGATTCCGGTTGAAACCCCGCCGGCAGTG
GTTCCGAGCGTCGATGACAGCTCTCTGTATATTCATCGTGAACGTCTCAGCTGCAATTC
AACATCCGCGTGCTGGAACAGGCGCTGGACGAAAGCTACCCGCTGCTGGAACGTCTGAAA
TTTCTGCTGATCTTCAGTTCCAATCTGGATGAATTTTCGAAATTCGTATCGCAGGCCTG
AAAAAGCAGATTACGTTTGCTCGCGAACAAGCAGGTGCAGATGGTCTGCTGCCGCATCAG
GCACCTGGCTCGCATCAGTGAACCTGGTCCACGAACAGGTGTCCCGCCAATATCGTATTCTG
AACGAAACCCTGCTGCCGGAACCTGGCGAAACATCAGATTGTTTTATCCGTCGCCGTCAC
TGGACGCTGAAAATCAAGACCTGGGTTTCGTGTTTTCTTCGCGACGAAATTGCCCGATT
ATCACGCCGATCGGTCTGGATCCGACCCACCCGTTTTCCGCTGCTGGTTAACAAATCACTG
AATTTCAATTGTCGAACTGGAGGGTATGGACCGTTTTGGCCGTGATTGGGTCTGGCAATT
ATCCCGGCACCGCGTCTGCTGCCGCGCATTATCCGCTCTGCCGGAAGACGTGGGCGGTGAA
GGCGATAACTATGTTTTCTGTATCGATGATCCATGCGCACGCCGATGACCTGTTCCCG
GGCATGAAAGTGAAGGGTTGCTACCAGTTTCGCCTGACGCGTAATGCCGATCTGAGCGTC
GATACCGAAGACGTGGAAGATCTGGCACGCGCTCTGCGTGGCGAACTGTTTTCTCGCCGT
TATGGTGACGCAGTTCGTCTGGAAGTCGTGGATACGTGTCCGCAGAACCTGACCAATTAT
CTGCTGAAACAATTCGGCCCTGAGTGAATCCGAACGTACAAAAGTTAGCGGTCCGGTCAAT
CTGACGCGTCTGTTTAGTGTGACCGGTCTGGAATCCCATCCGGAACCTGCAGTACCCGCCG
TTACCCCGGCAATCCCGCGTCTGCTGCAGAAAAAAGAAAACCTGTTAACGTTCTGTCA
AAACTGGATGTCCTGATGCACCCGTTTGAATCGTTACGCGCGGTGATTGACCTGCTG
CGTCAGGCAGCCAAAGATCCGAACGTTCTGGCCATTAAGCAAACCCTGTATCGTTCAGGC
GCGAACTCGGAAATCGTGGATGCCCTGGTTGAAGCAGCTCGCAATGGTAAAGAAGTTACC
GCAGTCATTGAACTGCGCGCTCGTTTTCGATGAAGAATCAAATCTGCAGCTGGCATCGCGT
CTGCAGCAAGCAGGTGCCGTTGTCATCTACGGCGTGGTTGGTTTTAAACGCATGCAAAG
ATGATGCTGATTCTGCGCCGTGAAGATGGCGAACTGCGCCGTTATGCTCATCTGGGCACC
GGTAACTACCACGCCGGTAATGCTCGCCTGTATACGGATTACAGTCTGCTGACCGCAGAC
GTGGCACTGTGCGAAGATCTGCATAAACTGTTCAACCAGCTGATCGGCATGGGCAAGACG
CTGCGTATGAAAAAGCTGCTGCACGCACCGTTTACCCTGAAAAAGAACCTGCTGGAAATG
ATTAATCGCGAAGCAGCACAGGCAGCTCTGGGTCAACCGGCACATATTATGGCTAAAGTC
AACAGTCTGACCGACCCGAAAGTATCCGTGCCCTGTATAAGGCATCCCAGGCTGGCGTT
CGCATTGATCTGGTTCGTGCGTGGCATGTGCTGTCTGCGTCCGGGTATTCCGGGTGTGAGC
CATAATACCAGTTCGCTCTATTATCGGCCGTTTTCTGGAACACTCTCGCATTTATTAC
TTCTGAACGGCCGGTATGAAAAACTGTATCTGAGCTCTGCCGACTGGATGGAACGCAAT
CTGGATATGCGTGTGAAACCTGTTTTCCGGTGGAAAGTAAAAGCTGGTGCAGCGTGTT
AAAAAGGAACTGGAACCTATCTGACGGACAATACCCAGGCGTGGGTGCTGCAAGCCGAT
GGCAGCTACCAGCGCCTGTCTCCGACCGGTAACCAAATCCGCGCAATACGCAGGCGACG
CTGCTGGAAAAGCTGGCTGCTCCGGTTCTGACGGCACGCTGAGCGGCCGCTAGCATAACC
CCTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGGCATGGGGTACCAAGCTTGTGCGAC
```


Pseudomonas optPAppk; GCCCTGGCGGGATCAGCGAGCTGGTCCACGAGCAGGTATCGCGGCAGTACCGGATCCTC
GCACTGGCTCGCATCAGTGAAGTGGTCCACGAACAGGTGTCCCGCCAATATCGTATCTG
** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **

Pseudomonas optPAppk; AACGAGACCCTGTTGCCGGAGCTGGCCAAGCACCAGATCCGCTTCATCCGCCGGCCTCAC
AACGAAACCCTGCTGCCGGAAGTGGCGAAACATCAGATTCGTTTTATCCGTCGCCGCTCAC
***** ***** ***** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** *****

Pseudomonas optPAppk; TGGACGCTGAAGATCAAGACCTGGGTGCGGGCGCTTCTTCCGCGACGAGATCGCGCCGATC
TGGACGCTGAAATCAAGACCTGGGTGCGTCTTCTTTCGCGACGAAATGCCCCGATT
***** ***** ***** ** ** ***** ***** ** ** *****

Pseudomonas optPAppk; ATCACCCTGATCGGCCTCGACCCGACCCATCCGTTCCCGCTGCTGGTGAACAAGAGCCTC
ATCAGCCGATCGGTCTGGATCCGACCCACCCGTTTCCGCTGCTGGTAAACAATCACTG
***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** **

Pseudomonas optPAppk; AACTTCATCGTCGAGCTGGAGGGGATGGATGCCTTCGGCCGCGACTCCGGCCTGGCGATC
AATTCATTGTCGAACTGGAGGTATGGACGCGTTTGGCCGTGATTCGGGTCTGGCAATT
** ***** ***** ***** ***** ** ** ***** ** ** ***** **

Pseudomonas optPAppk; ATCCCGCGCCGCGCCTGCTGCCACGGATCATCAGGCTGCCGGAAGACGTTGGCGGGCAG
ATCCCGCACCCGCTCTGCTGCCGCGCATTATCCGCTCTGCCGGAAGACGTTGGCGGTGAA
***** ***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** **

Pseudomonas optPAppk; GGTGACAACCTACGTGTTCTGTCGTCGATGATCCACGCCACGCCGACGACCTGTTCCCC
GGCGATAACTATGTTTTCTGTCATCGATGATCCATGCGCACGCCGATGACCTGTTCCCG
** ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; GGCATGAAGGTGAAGGGTGTACCAGTTCGGCCTGACCCGCAACGCCGACCTGTCGGTG
GGCATGAAAGTGAAGGGTGTACCAGTTCGGCCTGACCGGTAATGCCGATCTGAGCGTC
***** ***** ***** ***** ***** ** ** ***** **

Pseudomonas optPAppk; GACACCGAGGATGTCGAGGACCTGGCCCGCGCTGCGCGGAGCTGTCTCGCTGCGC
GATACCGAAGACGTGGAAGATCTGGCACGCGCTCTGCGTGGCGAAGTGTCTTCTCGCGCT
** ***** ** ** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** **

Pseudomonas optPAppk; TACGGGGATGCGGTACGCTGGAGGTGGTGGATACCTGCCCGCAGAACCTGACCAACTAC
TATGGTGACGCAGTTCGCTGGAAGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; CTGCTCAAGCAGTTCGGCCTGTCCGAAAGCGAGTTGTACAAGGTGACGCGCCCGGTCAAC
CTGCTGAAACAATTCGGCCTGAGTGAATCCGAACTGTACAAGTTAGCGGTCCGGTCAAT
***** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; CTGACCCGCTGTTTACGCTCACCGCCTGGAAAGCCATCCGGAGCTGCAGTACCCGCC
CTGACGCTGTTTGTGTTAGTGTGACCGCTGGAATCCCATCCGGAAGTGCAGTACCCGCC
***** ** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; TTCACCCCGCGATCCCGCTCTTTTGCAGAGAAGGAAAACCTCTTCAACGTCCTCAGC
TTCACCCCGCAATCCCGCTCTGCTGCAGAAAAAGAAAACCTGTTTAACTGTTCTGTCA
***** ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** **

Pseudomonas optPAppk; AAGCTCGACGTGTTGCTGATGCACCCGTTTGAATCCTTCACCCCGGTGATCGACCTGCTG
AACTGGATGCTCTGCTGATGCACCCGTTTGAATCCTTCACCGCGGTGATGACCTGCTG
** ** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; CGCCAGGCCCAAGGATCCGAACTGCTGGCGATCAAGCAGACCTGTACCGCAGCGGC
CGTCAGGCAGCAAAGATCCGAACTGCTGGCCATTAAGCAAACCTGTATCGTTCAGGC
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; GCCAACTCTGAGATCGTCGACGCCCTGGTCGAGGCGGCACGCAACGGCAAGGAGGTCACC
GCGAACTCGGAAATCGTGGATGCCCTGGTTGAAGCAGCTCGCAATGGTAAAGAAGTACC
** ***** ** ***** ** ***** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** **

Pseudomonas optPAppk; GCGGTGATCGAGCTGCGCGCCCGCTTCGACGAAGAGTCCAACCTGCAACTGGCCAGCCGC
GCAGTCATTGAACTGCGCGCTCGTTTCGATGAAGAATCAATCTGCAGCTGGCATCGCGT
** * ** * ** ***** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** **

Pseudomonas optPAppk; CTGCAACAGGCCGCGCGGTGGTGTATCTACGGCGTGGTCGGCTTCAAGACCCACGCCAAG
CTGCAGCAAGCAGGTGCCGTTGTCATCTACGGCGTGGTTGGTTTTAAACGCATGCAAAG
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

Pseudomonas optPAppk; ATGATGCTGATCCTCCGTCGCGAGGACGGCGAACTGCGCCGCTACGCGCACCTGGGCACC
ATGATGCTGATCTGCGCCGTGAAGATGGCGAACTGCGCCGTTATGCTCATCTGGGCACC
***** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ***** ** ** *****

Pseudomonas optPAppk; GGCAACTACCATGCCGGCAACGCTCGCCTGTACACCGACTACAGCCTGCTGACCGCCGAC
GGTAACTACCAGCCGTAATGCTCGCCTGTATACGGATTACAGTCTGCTGACCGCAGAC
** ***** ***** ** ***** ** ** ***** ***** ** **

Pseudomonas optPAppk; GTGGCGCTCTGCGAGGACCTGCACAAGCTGTTCAACCAACTGATCGGGATGGGCAAGACG
GTGGCACTGTGCGAAGATCTGCATAAAGCTGTTCAACCAGCTGATCGGCATGGGCAAGACG
***** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; CTGCGCATGAAGAAGCTGTTGCATGCGCCGTTACCCCTGAAGAAGAACCTGCTGGAATG
CTGCGTATGAAAAGCTGCTGCACGACCCGTTTACCCTGAAAAGAACCTGCTGGAATG
***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; ATCAACCGCGAGGCGGCCAGGCGCGCTCGGCCAGCCTGCGCACATCATGGCCAAAGTC
ATTAATCGCGAAGCAGCACAGGCAGCTCTGGGTCAACCGGCACATATATGGCTAAAGTC
** * ** ***** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** **

Pseudomonas optPAppk; AACTCGCTGACCGATCCGAAGGTCAATCCGCGCCCTGTACAAGGCCAGCCAGGCCGGGGTC
AACAGTCTGACCGACCCGAAAGTGAATCCGTCGCCCTGTATAAGGCATCCAGGCTGGCGTT
*** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** **

Pseudomonas optPAppk; AGGATCGACCTGGTGGTGCCTGCGCATGTGCTGCTGCGGCCGGGCATCCCGGGGTCTCG
CGCATTGATCTGGTCTGCGTGGCATGTGCTGTCTGCGTCCGGGTATTCCGGGTGTGAGC
* ** * ** ***** ***** ***** ***** ***** ** ***** **

Pseudomonas optPAppk; CACAATATCCACGTGCGCTCGATCATCGGGCGCTTCTCGAGCACAGCCGATCTACTAC
CAFAATATCCACGTTCTGCTCTATTATCGGCCGTTTCTGGAACACTCTCGCATTTATAC
** ***** ***** ***** ** ***** ** ** ** * ** ***** ** **

Pseudomonas optPAppk; TTCCTCAACGGCGGCGACGAGAAGCTCTATCTCTCCAGCGCCGACTGGATGGAGCGCAAC
TTCCTGAACGGCGGTGATGAAAACCTGTATCTGAGCTCTGCGGACTGGATGGAACGCAAT
***** ***** ** ** ** * ** ***** * ** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; CTCGACATGCGCGTCGAGACCTGCTTCCCGGTGGAAGGCAAGAAGCTGGTGCAGCGGGTC
CTGGATATGCGTGTGCAAACCTGTTTCCGGTGAAGGTAAGAAGCTGGTGCAGCGTGT
** ** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** **

Pseudomonas optPAppk; AAGAAGGAACCTGGAACCTACCTGACCGACAACACCCAGGCCCTGGGTGTTGCAGGCCGAC
AAAAAGGAACCTGGAACCTATCTGACGGACAATACCCAGCGTGGGTGCTGCAAGCCGAT
** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Pseudomonas optPAppk; GGTAGCTACCAGCGGCTCAGTCCCACCGGTAACCAGAACCCCGCAATACCCAGGCCGACC
GGCAGCTACCAGCGCTGTCTCCGACCGGTAACCAAAATCCGCGCAATACCGAGGCCGACG
** ***** ** ** ***** ***** ** ** ***** *****

Pseudomonas CTGCTGGAGAAGCTGGCCGCGCCGGTGCTTACCGCACGTTGA-----
optPAppk; CTGCTGGAAAAGCTGGCTGCTCCGGTCTGACGGCACGCTGAGCGGCCGCTAGCATAACC
***** ***** ** ***** ** ** ***** **

Pseudomonas -----
optPAppk; CCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCCATGGGGTACCAAGCTTGTCGA

Pseudomonas -
optPAppk; C

Anexo 2

Secuencia nucleotídica consenso de *Pappk1* obtenida de la secuenciación analizada en el programa Geneious 4.8.4.:

```
1           10           20           30           40           50           60
|           |           |           |           |           |           |
GAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCAT
CATCACAGCAGCGGCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATATGAATACGCAGCAAGGCCTG
GACGAAATCGAACGCATCGCAGCAGACGAAACGGTGGTGGCTAATGTTGAATCAGAAGCA
GAAGTTAAAATGGCGGAAACGATTCCGGTTGAAACCCCGCCGGCAGTGGTTCGGAGCGTC
GATGACAGCT CTCTGTATATTCATCGTGAACGTGTCTCAGCTGCAATTCAACATCCGCGTG
CTGGAACAGGCGCTGGACGAAAGCTACCCGCTGCTGGAACGTCTGAAATTTCTGCTGATC
TTCAGTTCCAATCTGGATGAATTTTCGAAATTCGTATCGCAGGCCTGAAAAAGCAGATT
ACGTTTGTCTCGGAACAAGCAGGTGCAGATGGTCTGCTGCCGCATCAGGCACTGGCTCGC
ATCAGTGAACCTGGTCCACGAACAGGTGTCCCGCCAATATCGTATTCTGAACGAAACCCCTG
CTCCCGAACTGGCGAAACATCAGATTCCGTTTATCCGTCGCCGCTACTGGACGCTGAAA
ATCAAGACCTGGGTTCTCGTCTGTTTCTTCGCGACGAAATTGCCCGATTATCACGCCGATC
GGTCTGGATCCGACCCACCCGTTCCGCTGCTGGTTAACAAATCACTGAATTTTCATTGTC
GAACTGGAGGGTATGGACGCGTTTGGCCGTGATTCCGGTCTGGCAATTATCCCGGCACCG
CGTCTGCTGCCGCGCATTATCCGTCTGCCGGAAGACGTGGGCGGTGAAGGCGATAACTAT
GTTTTCTGTATCGATGATCCATGCGCACGCCGATGACCTGTTCCCGGGCATGAAAGTG
AAGGGTTGCTACCAGTTTCGCCTGACGCGTAATGCCGATCTGAGCGTCGATACCGAAGAC
GTGGAAGATCTGGCACGCGCTCTGCGTGGCGAACTGTTTTCTCGCCGTTATGGTGACGCA
GTTCTGCTGGAAGTCGTGGATACGTGTCCGCAGAACCTGACCAATTATCTGCTGAAACAA
TTCGGCCTGAGTGAATCCGAACTGTACAAAGTTAGCGGTCCGGTCAATCTGACGCGTCTG
TTTAGTGTGACCGGTCTGGAATCCCATCCGGAAGTGCAGTACCCGCGGTTACCCCGGCA
ATCCCGCGTCTGCTGCAGAAAAAGAAAACCTGTTTAAAGTTCTGTCAAAACTGGATGTC
CTGCTGATGCACCCGTTTGAATCGTTCACGCCGGTGATTGACCTGCTGCGTCAGGCAGCC
AAAGATCCGAACCTTCTGGCCATTAAGCAAACCCCTGTATCGTTCAGGCGCGAACTCGGAA
ATCGTGGATGCCCTGGTTGAAGCAGCTCGCAATGGTAAAGAAGTTACCGCAGTCATTGAA
CTGCGCGCTCGTTTTCGATGAAGAATCAAATCTGCAGCTGGCATCGCGTCTGCAGCAAGCA
GGTCCGTTGTATCTACGGCGTGGTTGGTTTTAAAACGCATGCAAAGATGATGCTGATT
CTGCGCCGTGAAGATGGCGAACTGCGCCGTTATGCTCATCTGGGCACCGGTAACCTACCAC
GCCGGTAATGCTCGCCTGTATACGGATTACAGTCTGCTGACCGCAGACGTGGCACTGTGC
GAAGATCTGCATAAACTGTTCAACCAGCTGATCGGCATGGGCAAGACGCTGCGTATGAAA
AAGCTGCTGCACGCACCGTTTACCCTGAAAAAGAACCTGCTGGAAATGATTAATCGCGAA
GCAGCACAGGCAGCTCTGGGTCAACCGGCACATATTATGGCTAAAGTCAACAGTCTGACC
GACCCGAAAGTGATCCGTGCCCTGTATAAGGCATCCAGGCTGGCGTTTCGATTGATCTG
GTCGTGCGTGGCATGTGCTGTCTGCGTCCGGGTATTCCGGGTGTGAGCCATAATCCAC
GTTCCGCTCTATTATCGGCCGTTTTCTGGAACACTCTCGCATTATTACTTCTGAACGGC
GGTGTGAAAAACTGTATCTGAGCTCTGCGGACTGGATGGAACGCAATCTGGATATGCGT
GTGAAACCTGTTTTCCGGTGAAGGTAAAAAGCTGGTGCAGCGTGTAAAAAGGAACTG
GAAACCTATCTGACGACAATACCCAGGCGTGGGTGCTGCAAGCCGATGAAAGGAGTACCAT
CGCCTGTCTCCGACCGGTAACCAAATCCGCGCAATACGCAGGCGACGCTGCTGAAAAAG
CTGGCTGCTCCGGTTCTGACGGCACGCTGAGCGGCCGCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTC
TAAACGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCCATGGGGTACCAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCA
CCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC
```

Secuencia aminoacídica consenso de *Pa*PPK1 obtenida de la secuenciación analizada en el programa Geneious 4.8.4.:

```

1          10          20          30          40          50          60
|          |          |          |          |          |          |
MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMNTQQGLDEIERIAAETVVANVESEAEVKMAETIPVET
PPAVVPSVDDSSLYIHRELSQLQFNIRVLEQALDESYPLLERLKFLLIFSSNLDEFFEIR
IAGLKKQITFAREQAGADGLLPHQALARISELVHEQVSRQYRILNETLLPELAKHQIRFI
RRRHWTWKIKTWVRRFFRDEIAPIITPIGLDPTHPPFLLVNKSLNFIVELEGMDAFGRDS
GLAIIPAPRL LPRIIRLPEDVGGEGDNYVFLSSMIHAHADDLFPGMKVKGICYQFRLTRNA
DLSVDTEDVEDLARALRGELFSRRYGDVAVRLEVVDTCPQNL TNYLLKQFGLSESELYKVS
GPVNLTRLFSVTGLESHPELQYPPFPAIPRLLQKKENLFNVLSKLDVLLMHPFESFTPV
IDLLRQAAKDPNVLAIKQTLYRSGANSEIVDALVEAARNGKEVTAVIELRARFDEESNLQ
LASRLQQAGAVVIYGVVGFKTHAKMMLILRREDGELRRYAHLGTGNYHAGNARLYTDYSL
LTADVALCEDLHKLFLNQLIGMGKTLRMKLLHAPFTLKKNLLEMINREAAQAALGQPAHI
MAKVNSLTDPKVIRALYKASQAGVRIDLVRGMCCLRPGIPGVSHNIHVRSIIIGRFLEHS
RIYYFLNGGDEKLYLSSADWMERNLDMRVETCFPVEGKLVQRVKKELETYLT DNTQAWW
LQADGSYQRLSPTGNQNPRNTQATLLEKLAAPVLTAR*

```

Se realizó un blast entre la secuencia proteica del gen secuenciado y la base de datos del sitio web www.pseudomonas.com dando como resultado la siguiente tabla resumen en donde se muestran las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que tuvieron 100% de identidad con la *Pa*PPK1 secuenciada:

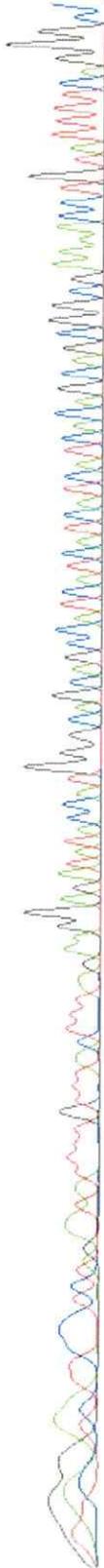
Tabla 6. Blast entre *Pa*PPK1 estudiada y la PPK1 de diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Strain	Product Name	Query Start	Query Stop	Subject Start	Subject Stop	Percent Identity	Alignment Length	Mismatches	Gaps	Bit Score	Expect Value
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RP73	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK2	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LES58	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, substrain PAO1-UW	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719	polyphosphate kinase	22	757	1	738	100.0	738	0	0	1510.0	0.0

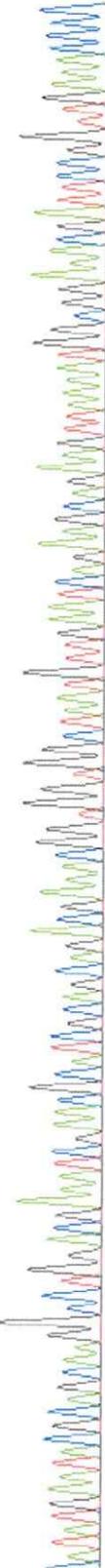
Cromatogramas de *Pappk1* enviado por Macrogen:

File: 1_PaPPK1a_I7promoter.ab1 Run Ended: 2015/4/17 16:6:22 Signal G: 2996 A: 5338 C: 6031 T: 5644
 Sample: 1_PaPPK1a_I7promoter Lane: 15 Base spacing: 15.363047 1463 bases in 17758 scans Page 1 of 2

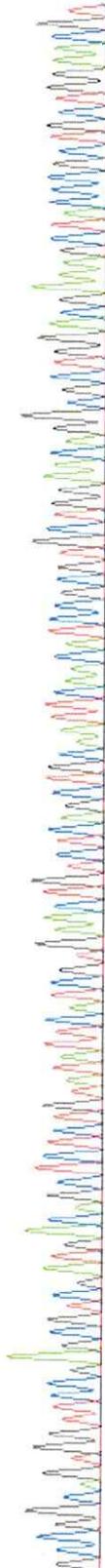
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 CCGT G G A G G T C C C T C T A G A A T A A T T T T G T T A A C T T T A A G A A G G A G A T A C C A T G G G C A G C A G C A T C A T C A T C A C A G C A G C G G C G A A A A C C T G T A T T T T C A G G G C



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



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



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

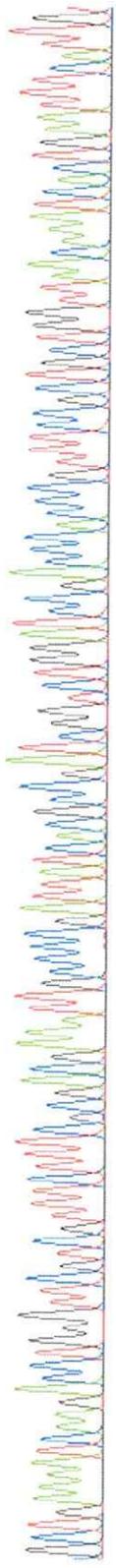


500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610
 G G C A C T G G C T G C A T C A G T G A A C T G G T C C A G A A C A G G T G T C C C G C C A A T A T C G T A T T C T G A A C G A A A C C T G C T G C C G G A A C T G G C G A A A C A T C A G A T T C G T T T T A T C C G T G C C G C T C A C T G G A C

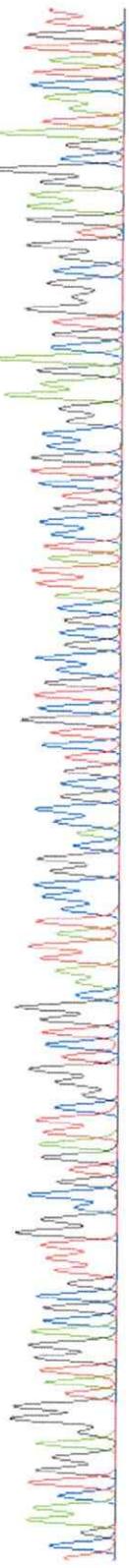


File: J_PaPPK1a_I1promoter.ab1 Run Ended: 2015/4/17 16:22 Signal G:2996 A:5538 C:6031 T:5644
 Sample: J_PaPPK1a_I1promoter Lane: 15 Base spacing: 15.365047 1463 bases in 17758 scans Page 2 of 2

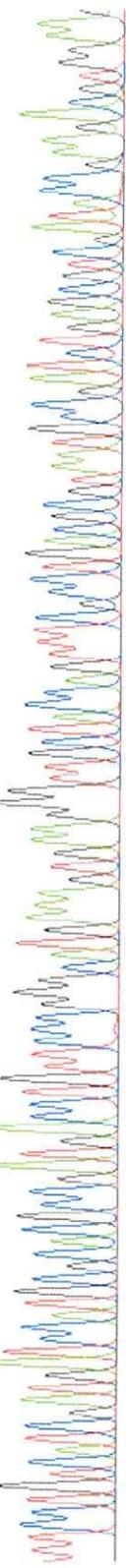
620 GCTGAAAAATC AAGACCTGGGTTCTGTCGTTTCCTTTCGGACGAAATTCGCCCCGATTATCACGCGGATCGGTCGGATCCGACCCACCCGTTTTCCGCTGC TGGTTAAACAAATCACTGAAATTTCAATTG 740



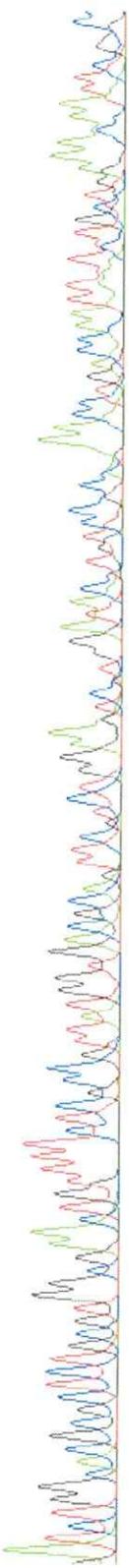
750 TCGAACGTGGAGGGTATGGACGCGTTTGGCCGTGATTCGGTCTGGCAATATCCCGGACCGCGCTCTGCTGCCGGCCATTATCCGCTCCCGGAAACACGTGGCGGTTGAAAGCGGATAACTATGTT 860



870 TTCCCTGTCATCGATGATCCCATGCGCACGCCGATGACCTGTTCCCGGCATGAAAATGAAAAGGTTGCTACCACTTCCCTGACCGCTAATGCCGATCTGACGGTCCGACCGAAACGACCGTGGAA 990



1000 GATCTGGCACCGCGCTCTGCGTGGCGAAACTGTTTTCTCGCCGTTATGGTGACGCAGTTCGTCTGGAAATCCTGGATACCTGTCCGCGCAAACTGACCAATATTTTTGCTGAAAACAATTCGGC 1110



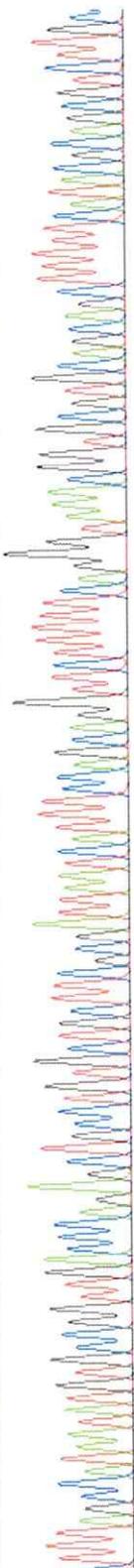
1120 CTGTGTAATCCAAACTGTACA AAGTTAACGGGCCCGCCGTC AATCTAACCCGCCTGTTTTATTGCGACCGCTTGGAAACCACTCCGAAATGGGGAAACCCGCC GTTTAACCCCGCGAAT 1230



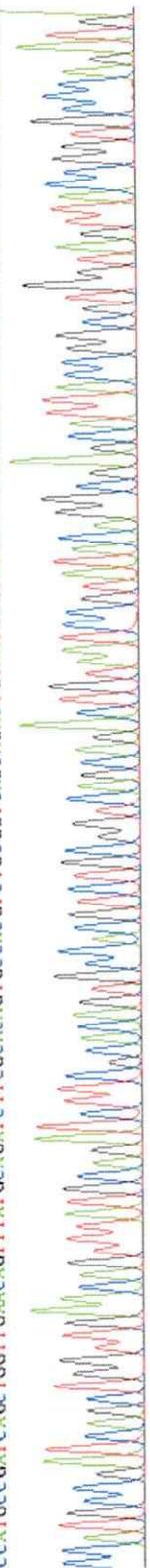
File: 2_PaPPK1a_T7terminator.ab1 Run Ended: 2015/4/17 16:6:22 Signal G:2787 A:4447 C:5479 T:4579

Sample: 2_PaPPK1a_T7terminator Lane: 13 Base spacing: 15.2716465 1350 bases in 16444 scans Page 2 of 2

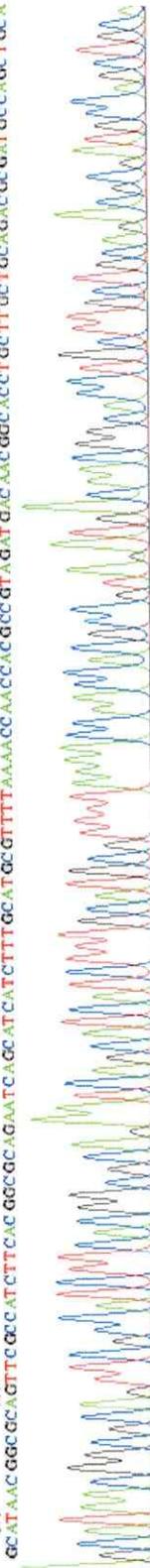
620 TTTAGCCATAAATATGTGCCGGTTGACCCAGAGCTGCCGTGCTGCTCGCGATTAAATCATTCCAGCAGGTTCTTTTTCAAGGTAACACGGTCCGTCGACAGCATTTTTCATACGCAGCGTCTTGGC 740



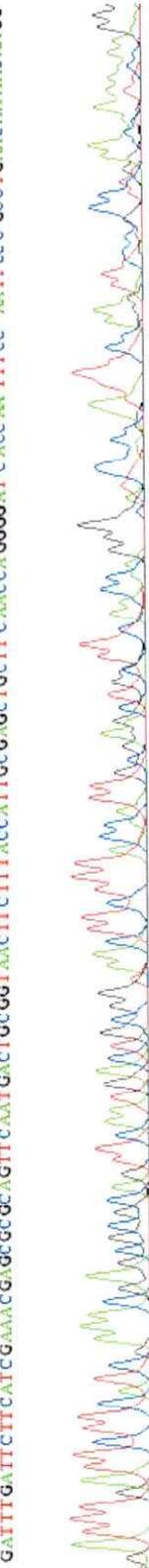
750 CCATGCCGATCAGCTGGTTGAAACAGTTTATGCAGATCTTCCACACAGTCCACGCTCTGCAGCTGTAATCCGTATACAGGCGAGCATTAACCGGCCTGGTAGTTAACCGGTGCCCAAGATGA 860



870 GCATAACGGCGCAATTCGCATCTTCAACGCCGCAGAAATCAGCATCTTTTGCATGCGTTTTAAAAAACCACCCAGCCGCTAGTAGACAAAGCCACCTGCTTGCAGACGCATGCCAGCTCCA 980

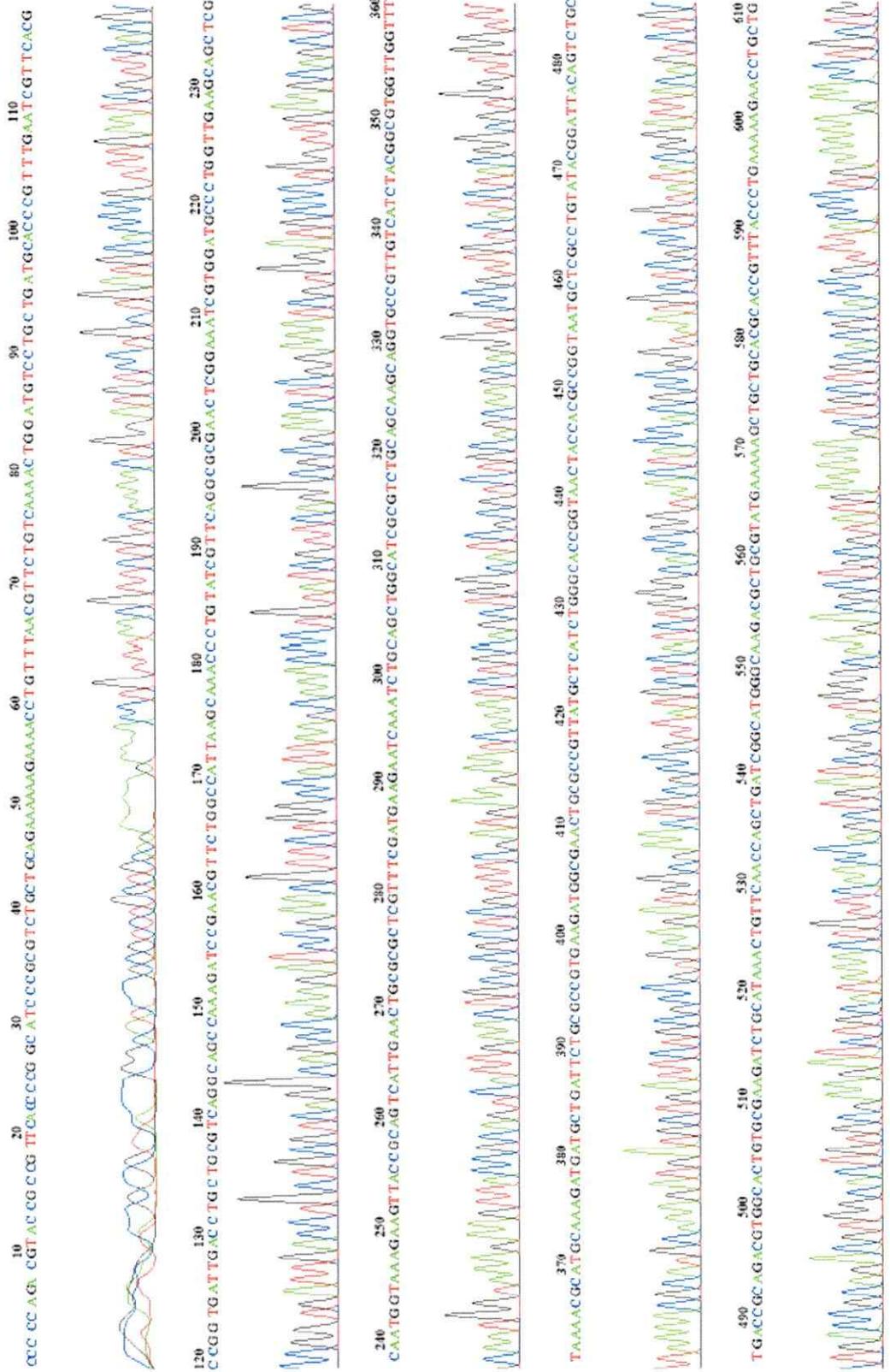


1000 GATTTGATTTTCATCGAAACGAGCGCCAGTTCAATGACTGCTGGTAACTTTCCATTTGGAGCTTCAAAACCAAGGGATCACCAGTTTTCCATTTCCC GCTGAACAAAACAAAGG 1110

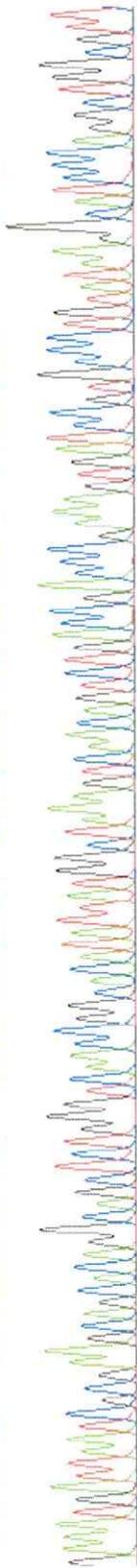


1120 GTTTGTTAATGCCAAAAAATTCGAATTTTTTGTTCCTTAAACCAAGGAAATTAACCGCGGAAAAAATTAAGAAAGGGGGTTCCCAGAAAAACCCATTTTTTCGAAAAGTT 1230

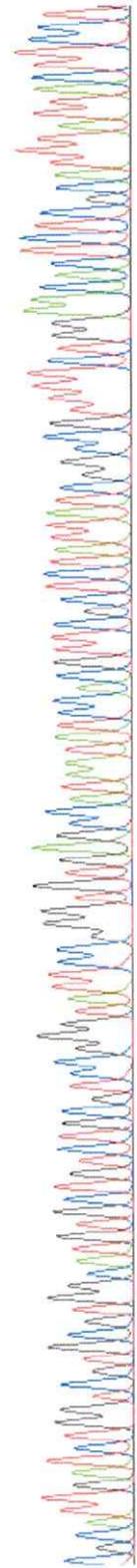




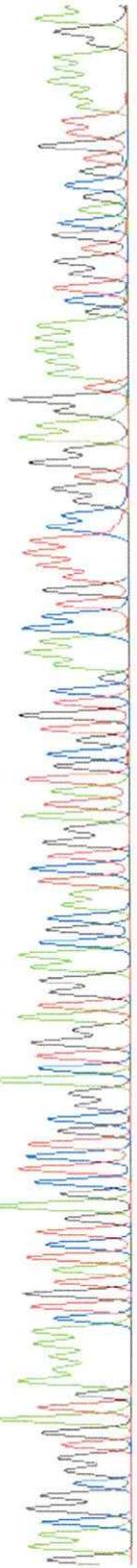
G A A A T G A T T A A T C G C G A A G G G C A C A G G C A G C T C T G G G T C A A C C C G G C A C A T A T T A T G G C T A A A G T C A A C A G T C T G A C C G A C C C G A A A G T G A T C C G T G C C C T G T A T A A G C G C A T C C C A G G C T G G C G T T



740 C G C A T T G A T C T G G T C G C T G G C A T G T G C T G T C T G C G T C C G G G T A T T C C G G T G T G A G C C A T A T A T C C A C G T T C G C T A T T A T C G G C C G T T T T C T G G A A C T C T C G C A T T T A T T A C T T C C T



870 G A A C G G C G G T G A T G A A A A A C T G T A T C T G A G C T C T G C G G A C T G G A T G G A A C G C A A T C T G G A T A T G C G T G T C G A A A C C T G T T T T C C G G T G G A A G T A A A A A G C T G G T G C A C C G T G T T A A A A A G G A A



990 C T G G A A A C C T A T C T G A C G G A C A A T A C C C A G G C G T G G G T G C T G C A A G C C G A T G G C A G C T A C C A A C G C C T G T T C C G A C C G G T A A C A A A A T C C C G C A T A A A C A A A G C T T C T T G G A A



1110 A G C T A G G T G G C T C C C G T T T T T A C A G G A C C C T T A A A C G G C C T A G A A A A A C A C C C T T G G G G C T C T A A C A A A G C T T T A A G G G G G T T T T T T C C T T G G G G A G A A A A T T T T G G C G C C



ANEXO 3

Los gráficos mostrados en los siguientes anexos enseñan los datos crudos obtenidos al medir la fluorescencia en el fluorímetro Sinergy HT de BIOTEK®.

En la figura suplementaria 1 no se observa actividad en ninguna de las reacciones del gráfico, sin embargo en literatura pudimos comprobar que el cofactor de PaPPK1 de *P. aeruginosa* PAOM5 es Mg^{2+} . Las condiciones de cada reacción de la figura suplementaria 1 no son favorables para la enzima, ya que no tienen sistema de regeneración de ATP ni cebador, por lo tanto, no hay un aumento de la fluorescencia en el tiempo ya que la enzima no sintetiza poliP, o lo hace en un rango no medido por el método utilizado.

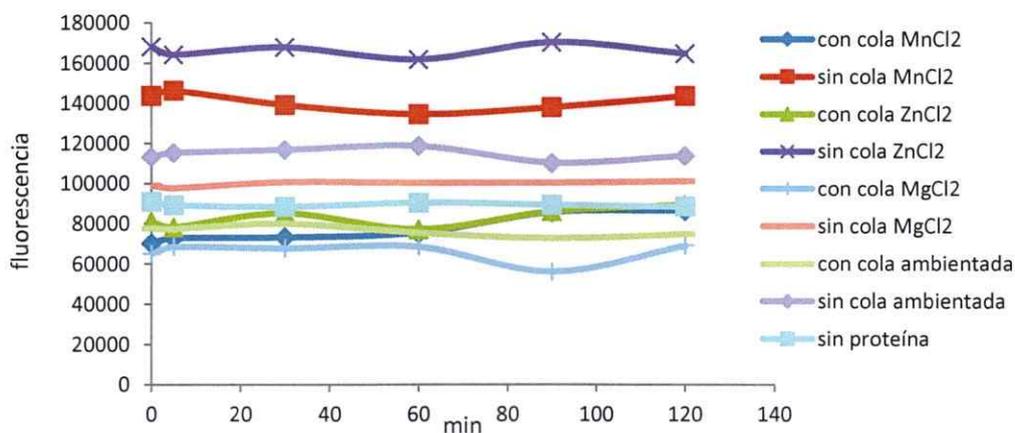


Figura suplementaria 1. Cambio de cofactor y ambientación de la proteína PaPPK1. La alícuotas fueron detenidas con ácido perclórico (3,5% concentración final). La proteína utilizada fue PaPPK1 purificada, concentrada y dializada contra un buffer sin imidazol. El mix de cada reacción fue 1 mM ATP, 5 mM de $MgCl_2$, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 40 mM. La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. En las reacciones "ambientadas" se incubó la enzima previo a al inicio de la reacción a 37°C durante 20 min.

Anexo 4

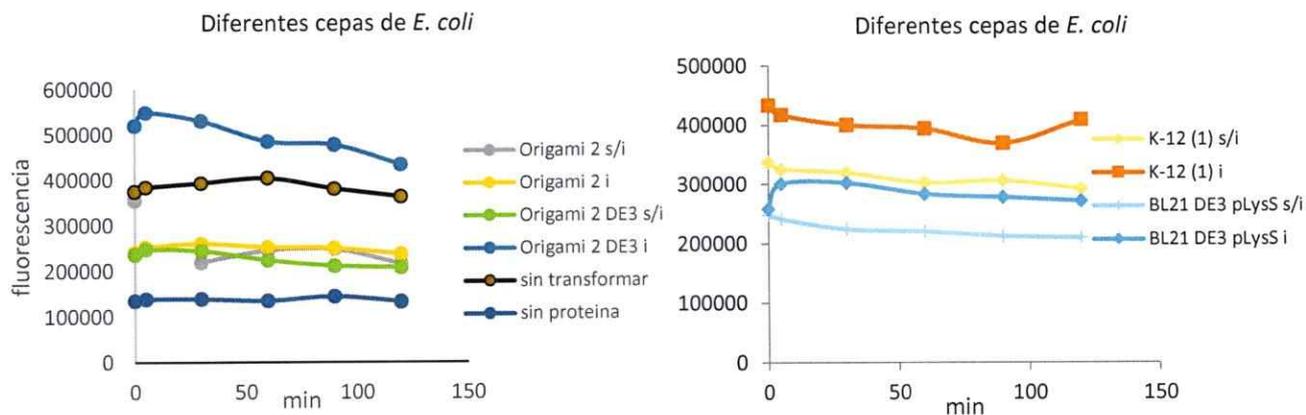


Figura suplementaria 2. Reacciones con fracción soluble de proteínas proveniente de diferentes cepas de *E. coli*, transformadas con el vector pET-TEV-PaPPK1, crecidas a 28°C en medio S.O.C. El mix de cada reacción fue 1 mM ATP, 5 mM de MgCl₂, Hepes-KOH pH 7,2 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 10 µg fracción soluble en 300 µL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 µL detenida con DAPI (50 µM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. La leyenda s/i se refiere a "cultivo sin inducir" e i se refiere a "cultivo inducido"

Anexo 5

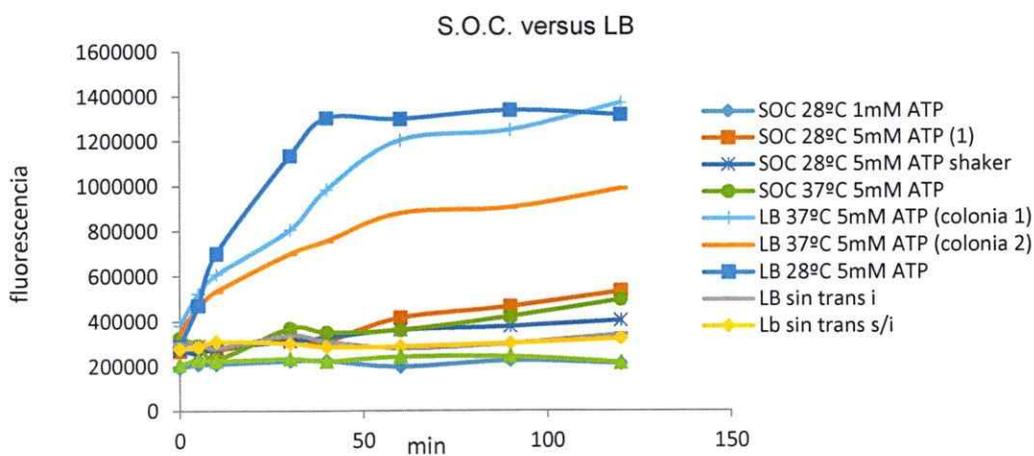


Figura suplementaria 3. Actividad de PaPPK1 purificada desde EcBL21 AI. El mix de cada reacción fue 5 mM de MgCl₂, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 7 µg de PaPPK1 en 300 µL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 µL detenida con DAPI (50 µM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. La leyenda "sin trans" se refiere a "células sin transformar" e "i" se refiere a "cultivo inducido". En cada reacción se detalla la temperatura a la que fue crecida el cultivo previo a la inducción.

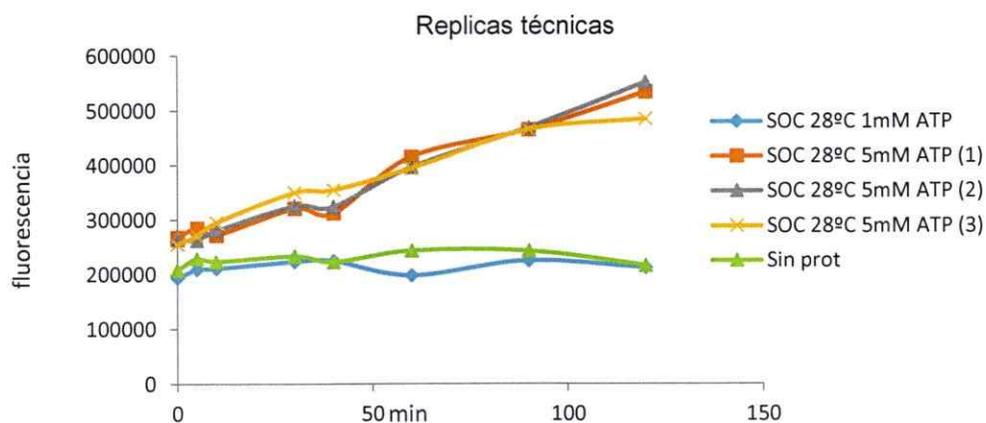


Figura suplementaria 4. Actividad de PaPPK1 purificada desde EcBL21 AI en triplicado. El mix de cada reacción fue 5 mM de MgCl₂, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 7 µg de PaPPK1 en 300 µL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 µL detenida con DAPI (50 µM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. El cultivo fue incubado en S.O.C. a 28°C previo a la inducción, como indica la leyenda del gráfico.

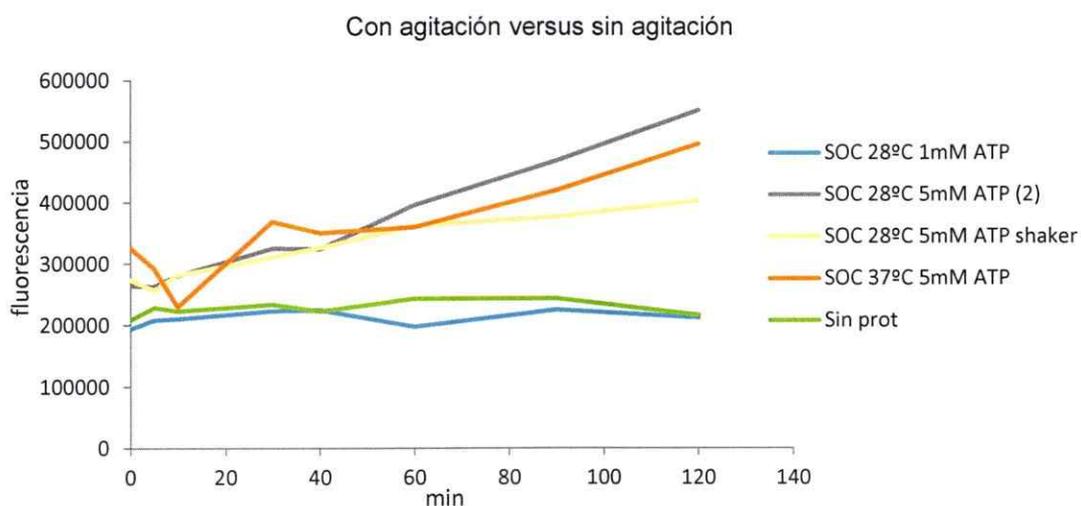


Figura suplementaria 5. Actividad de *Pa*PPK1 con agitación versus sin agitación (shaker). El mix de cada reacción fue 5 mM de $MgCl_2$, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 7 μg de *Pa*PPK1 en 300 μL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 μL detenida con DAPI (50 μM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. En cada reacción se detalla la temperatura a la que fue crecida el cultivo previo a la inducción.

Anexo 6

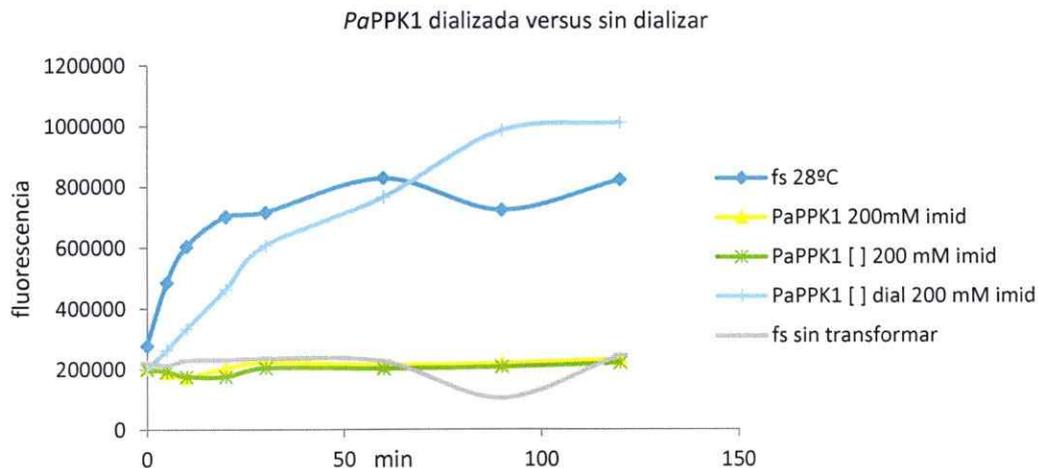


Figura suplementaria 6. Actividad de *Pa*PPK1 bajo diversas condiciones post purificación. El mix de cada reacción fue 5 mM de ATP, 25 mM de MgCl₂, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 7 µg de *Pa*PPK1 en 300 µL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 µL detenida con DAPI (50 µM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la particularidad de cada reacción. La leyenda "fs" se refiere a "fracción soluble de proteínas", "[]" se refiere a "enzima concentrada", "dial" se refiere a "enzima dializada" e "imid" se refiere a imidazol.

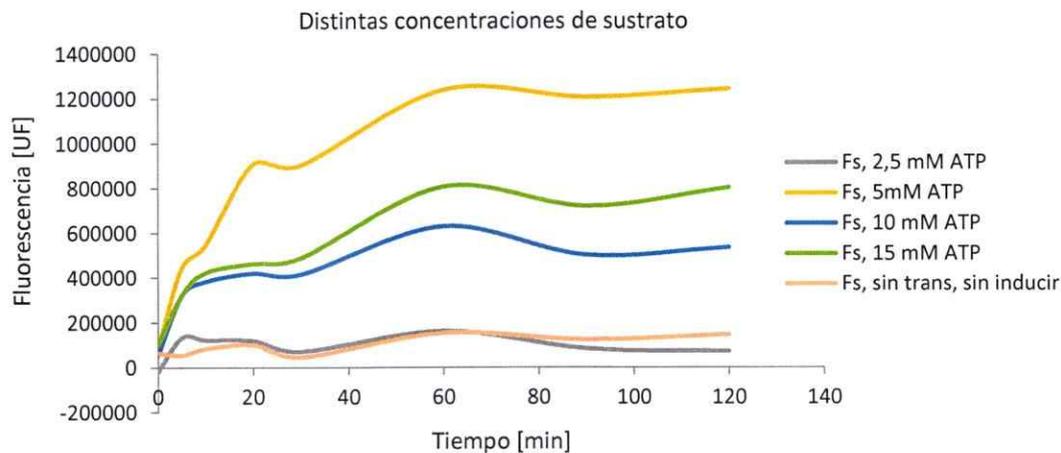


Figura suplementaria 7. Actividad de fracción soluble de proteínas (Fs) bajo distintas concentraciones de sustrato. El mix de cada reacción fue 25 mM de MgCl₂, HEPES-KOH pH 7,2 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, cebador, sistema de regeneración de ATP y 7 µg de *Pa*PPK1 en 300 µL finales de reacción. En cada tiempo se midió una alícuota de 20 µL detenida con DAPI (50 µM de concentración final). La leyenda del gráfico detalla la concentración de ATP para cada reacción.

Anexo 7

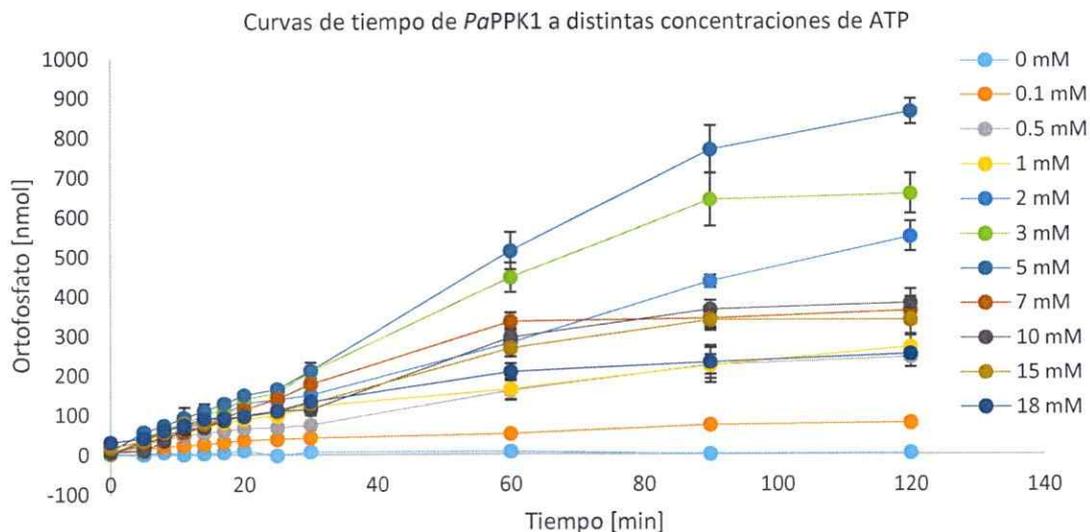


Figura suplementaria 8. Actividad enzimática de la enzima PaPPK1 a distintas concentraciones de sustrato. El gráfico ilustra en la leyenda la concentración de ATP de cada curva. Todas las reacciones están bajo la misma condición, excepto por la concentración de sustrato. La reacción con 5 mM de ATP es la que muestra una mayor actividad, al subir de esa concentración de ATP, la actividad va disminuyendo. Se observan las curvas de tiempo de PaPPK1 durante 2 horas.

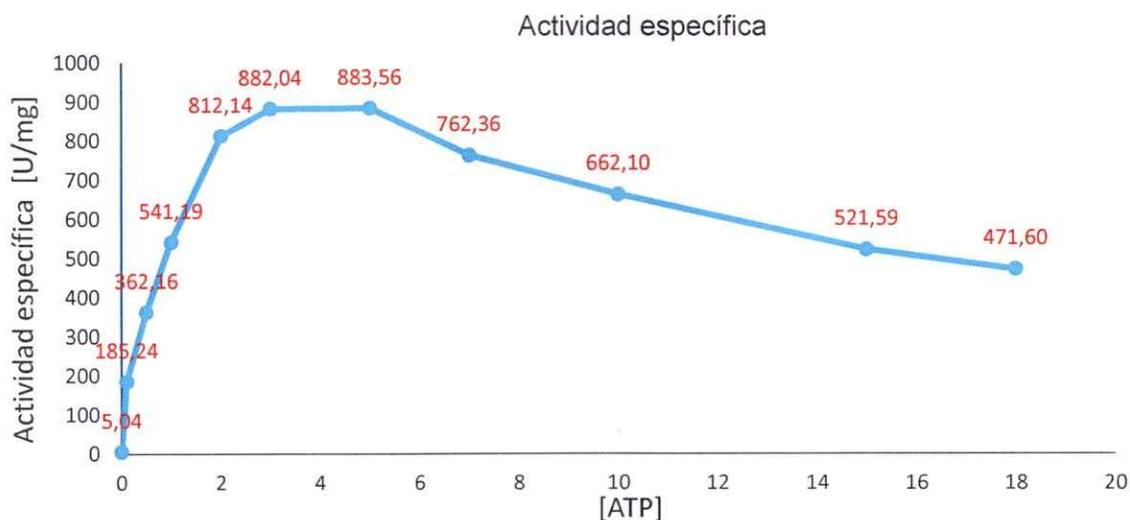


Figura Suplementaria 9. Actividad específica de PaPPK1 para distintas concentraciones de sustrato. En cada reacción se agregó 7 μ g de la enzima PaPPK1. La enzima incubada con 1 mM de ATP tiene una actividad específica de 541,19 U/mg de proteína. Una unidad de enzima se define como 1 nmol de fosfato incorporado a una cadena de poliP por minuto a 37°C.

Datos entregados por el programa GraphPad Prism 6, de acuerdo a la cinética de PaPPK1.

Substrate inhibition					
Best-fit values		Std. Error		95% Confidence Intervals	
Vmax	14.10	Vmax	2.450	Vmax	8.447 to 19.75
Km	2.280	Km	0.6425	Km	0.7985 to 3.762
Ki	5.599	Ki	1.533	Ki	2.064 to 9.135
Goodness of Fit		Constraints		Number of points	
Degrees of Freedom	8	Km	Km > 0.0	Analyzed	11
R square	0.9839	Ki	Ki > 0.0		
Absolute Sum of Squares	0.6473				
Sy x	0.2845				

Anexo 8

Tabla 7. Compuestos inhibidores utilizados

N° Compuesto	Código Compuesto	PM (g/mol)
1	166381 -I/2	384
2	33424 -N/1	722
3	293892 -H/1	403
4	369503 -R/1	322
5	205764 -P/1	341
6	102059 -R/1	370
7	65375 R/1	551
8	618160 -V/1	618
9	600448 -T/1	403
10	166366 -Q/2	369
11	240899 G/5	417
12	212468 -A/1	402
13	65376 -S/1	527
14	341082 -Y/1	579
15	292216 -K/1	472
16	292214 -I/1	486
17	291103 -Y/1	537
18	380323 -C/1	575
19	205574 -J/1	359
20	205572 -H/1	389
21	76431 -K/1	364
22	76430 -J/1	346
23	666767 -G/1	324
24	141672 -Y/2	347

25	108334 -N/1	368
26	210452 -L/1	488
27	172774 -H/1	653
28	696924 -K/1	327
29	607617 -M/1	344
30	618177 -P/1	479
31	137765 -C/4	461
32	172619 -N/1	315
33	623150 U/1	326
34	641999 -J/1	382
35	39912 -P/1	502
37	403447 -N/2	304
38	293891 G/1	426
39	180973 -S/203	563,65
40	77592 -V/1	296
