

---

Tesi doctoral

## Desarrollo de nuevos métodos para el análisis del polifosfato en células humanas

Ana Sarrias Giménez

---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Tesis Doctoral  
Universitat Internacional de Catalunya, 2023  
Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

# **Desarrollo de nuevos métodos para el análisis del polifosfato en células humanas**

Ana Sarrias Giménez

Trabajo dirigido por el Dr. Samuel Bru Rullo, del  
departamento de Ciencias Básicas de la Universitat  
Internacional de Catalunya.





“Por cada cosa que sé, hay otras cien que ignoro”

Stephen King. La Torre Oscura.



# *Agradecimientos*

---



A mis jefes y a mi tutor de tesis, por toda su ayuda y todas las correcciones (que no han sido pocas) y, sobre todo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en la UIC y conocer a toda esta gente maravillosa.

A todo el equipo del laboratorio de ciencias básicas. A Marta, Andrea y Meritxell porque sin ellas habría ido por el laboratorio como pollo sin cabeza.

A todo el grupo de Mayka: Lidia, Dani, Laura, Xènia, Gonzalo y Vero. Personas maravillosas siempre dispuestas a ayudar y a invitarte a fragolino y quesos. A Sebas, María, David, Anna M, Anna F, Cris y Xavi. Compañeros de dramas, cervezas y risas y proveedores de neuronas y cachitos de ratón. A Eva R, nuestro sindicato, que siempre vela por nuestros derechos. Lleva “poco” tiempo y ya le debemos mucho. A las ciclineras Ainhoa, Sara, Núria y Eva Q. A Sara H por toda su ayuda con las clases y por toda su energía. Y a Bob, que debe estar viendo alguna película mientras lee esto.

Al club de cine Mayhem y su co-presidente Jesús. Queríamos culturizar al mundo y hemos conseguido lo contrario, pero creo que es maravilloso. Gracias por toda tu ayuda como co-presi. No sé cómo lo haría sin ti (enciende y apaga la ironía donde quieras en esa frase :D).

Al equipo polyP: Blanca y Tadeo. El mejor equipo que uno puede desear. Gracias por aguantarme y ayudarme todos los días. Con compañeros tan buenos, el doctorado parece menos malo. Meteré en el equipo polyP a Bárbara. Gracias por hacerme de supervisora durante un tiempo y por enseñarme tanto.

A Pau y a Marta Pera, porque siempre tendré en mi corazoncito los cafés de después de comer y todas las cervecitas de después. Siempre me habéis animado y apoyado <3

A los trabajadores de montaña: Joan, Alessandro, Rocío y Ferrán. Habéis sido un apoyo incontable. Todas esas fiestas y todas las

## *Agradecimientos*

---

cervecitas estarán en mi corazoncito siempre. Y Roma. Y ahora Lisboa. Y lo que sea en un futuro. Se os quiere.

Y a los de fuera, que han aguantado el doctorado y encima, sin entender nada. Ana, no sé ni cómo agradecerte todo. ¿Una cerveza te va bien? Incluso dos si quieres. Gerard, sobra todo lo que pueda escribirte aquí. Termina esta etapa y empezamos una nueva. No sé dónde acabaremos, pero mientras sea juntos será perfecto. A Lucy, que me ha acompañado (y chafado) durante todos los días de escritura de la tesis. Si escribir la tesis es difícil, prueba a hacerlo con un cachorro de 10 kg encima. Y por supuesto, a mis padres, porque siempre han creído en mí. Estoy segura de que media Valencia sabe cuándo presento el doctorado porque mis padres se lo habrán contado a to quisqui.

Perdón si me he olvidado de nombrarte, porque seguro que me he olvidado de alguien. Y gracias a todos, de verdad.

Este doctorado no habría sido posible sin todos vosotros ♥

## *Resumen*

---



Resumen:

**Desarrollo de nuevos métodos para el análisis del polifosfato en células humanas**

El polifosfato (polyP) es una molécula lineal compuesta por cientos de residuos de fosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. Se encuentra presente en un amplio rango de organismos, y, en humanos, posee gran variedad de funciones relacionadas con la coagulación sanguínea, la osteogénesis, el Alzheimer o el cáncer. A pesar de su importancia biológica, el estudio del polyP en humanos se enfrenta a varias barreras. En primer lugar, su concentración en mamíferos es considerablemente baja, aproximadamente mil veces inferior que en organismos unicelulares. Además, la falta de información acerca de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de esta molécula en células humanas dificulta su estudio. Por último, se desconoce la cantidad y localización del polyP en células humanas y los pocos estudios que hay a menudo son contradictorios, mostrando diferentes localizaciones del polyP dentro de la célula. Para poder estudiar y analizar el metabolismo del polyP en células humanas es necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan su estudio y cuantificación. En esta tesis doctoral se presentan 3 métodos de detección: la visualización por inmunofluorescencia, la visualización *in vivo* mediante *live cell imaging* y la purificación bioquímica de la molécula. La detección por inmunofluorescencia se realizó mediante el uso del PPBD y se pudo validar la señal tanto *in vitro*, mediante la incubación con Ppx1, como *in vivo*, mediante la sobreexpresión de NUDT3. La visualización *in vivo* se intentó validar con la misma estrategia, pero no se pudo probar que la señal obtenida fuera específica de polyP. Por último, se procedió a la validación de todos los pasos necesarios para la purificación bioquímica, y se realizó un estudio minucioso de varios factores que podrían influir en la cuantificación del polyP purificado. A través de esta técnica, se lograron obtener niveles de polyP celular más elevados que los descritos hasta ahora en la literatura científica. Siguiendo este protocolo, se logró purificar

polyP de varias líneas celulares humanas de diferentes tejidos (pulmón, cerebro, colon y mama) y se llevó a cabo un estudio de las diferentes cantidades de polyP en cada línea celular. Además, se pudo localizar el polyP mediante inmunofluorescencia, encontrando diferencias tanto en la concentración como en localización del polyP entre las diferentes líneas. Se observó que dichas diferencias correlacionan con los patrones de expresión de las polifosfatasas PRUNE1 y NUDT3. Tras esto, y para investigar las variaciones del polyP en diferentes condiciones adversas para la célula, se realizaron estudios en condiciones de privación de nutrientes, utilizando medios de cultivo con diferentes cantidades de glucosa, fosfato, y en hipoxia. Los resultados demostraron que la cantidad de polyP celular disminuye en condiciones de privación de nutrientes. Asimismo, se estudió la dinámica del polyP frente al daño al ADN, realizando estudios de viabilidad tras modificar los niveles de polyP celular y tratar las células con cisplatino. Se observó que cuando la célula tiene sus niveles de polyP reducidos, su supervivencia frente al daño al ADN se ve afectada. Finalmente, se intentó purificar polyP de tejidos de ratón mediante el protocolo previamente descrito en esta tesis, pero sin éxito. En conclusión, esta tesis presenta dos métodos para la detección de polyP en células humanas y aporta nueva información sobre el metabolismo de esta molécula en diferentes líneas celulares y diversas condiciones metabólicas.

## *Abstract*

---



Abstract:

**Development of new methods for the analysis of polyphosphate in human cells**

Polyphosphate (polyP) is a linear molecule composed of hundreds of phosphate residues linked by phosphoanhydride bonds. It is present in a wide range of organisms and, in humans, has a variety of functions related to blood coagulation, osteogenesis, Alzheimer's, and cancer. Despite its biological importance, the study of polyP in humans faces several barriers. First, its concentration in mammals is considerably low, approximately a thousand times lower than in unicellular organisms. Additionally, the lack of information about the enzymes involved in the synthesis and degradation of this molecule in human cells makes its study difficult. Finally, the quantity and location of polyP in human cells are unknown, and the few studies available often show contradictory results, displaying different locations of polyP within the cell. To study and analyze the metabolism of polyP in human cells, it is necessary to develop new techniques that allow its study and quantification. In this thesis, three detection methods are presented: immunofluorescence visualization, *in vivo* visualization through live cell imaging, and biochemical purification of the molecule. Immunofluorescence detection was performed using PPBD, and the signal was validated both *in vitro*, through incubation with Ppx1, and *in vivo*, through the overexpression of NUDT3. *In vivo* visualization was attempted to be validated with the same strategy, but it could not be proven that the obtained signal was specific to polyP. Finally, all the necessary steps for biochemical purification were validated, and a thorough study of several factors that could influence the quantification of purified polyP was carried out. Through this technique, higher cellular polyP levels than those described so far in the scientific literature were obtained. Following this protocol, polyP was purified from several human cell lines from different tissues (lung, brain, colon, and breast), and a study of the different amounts of polyP in each cell line was conducted. In

## *Abstract*

---

addition, polyP could be located through immunofluorescence, finding differences in both the concentration and location of polyP among the different lines. It was observed that these differences correlate with the expression patterns of the polyphosphatases PRUNE1 and NUDT3. After this, and to investigate variations in polyP under different adverse conditions for the cell, studies were conducted under nutrient deprivation conditions, using culture media with different amounts of glucose and phosphate, and under hypoxia. The results showed that the amount of cellular polyP decreases under nutrient deprivation conditions. Likewise, the dynamics of polyP in response to DNA damage were studied by conducting viability studies after modifying cellular polyP levels and treating cells with cisplatin. It was observed that when the cell has reduced polyP levels, its survival against DNA damage is affected. Finally, attempts were made to purify polyP from mouse tissues using the protocol described in this thesis, but without success. In conclusion, this thesis presents two methods for the detection of polyP in human cells and provides new information on the metabolism of this molecule in different cell lines and various metabolic conditions.

# *Índice*

---



Índice:

<b>1. Introducción .....</b>	<b>29</b>
1.1. Descripción de la molécula del polifosfato.....	29
1.2. Localización celular .....	30
1.3. Funciones .....	32
1.3.1. Tumorigenesis y supervivencia al daño al ADN .....	34
1.3.2. Nutrientes .....	36
1.4. Enzimas reguladoras del metabolismo del polyP .....	37
1.4.1. Síntesis de polyP.....	38
1.4.2. Degradación de polyP .....	39
1.5. Detección celular .....	41
1.6. Detección <i>in vivo</i> en organismos modelo .....	43
1.7. Purificación bioquímica.....	44
<b>2. Hipótesis .....</b>	<b>49</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>57</b>
4.3. Productos químicos, reactivos y kits.....	57
4.4. Anticuerpos y enzimas .....	59
4.5. <i>Buffers</i> .....	60
4.6. <i>Primers</i> .....	60
4.7. Plásmidos .....	62
4.8. Cepas de bacterias, levaduras, líneas celulares y tejidos de animales.....	63
4.8.1. Bacterias.....	63
4.8.2. Levaduras .....	63
4.8.3. Líneas celulares .....	63

4.8.4. Tejidos animales .....	65
4.9. Condiciones de cultivo .....	66
4.9.1. Condiciones estándar .....	66
4.9.2. Diferentes condiciones de cultivo .....	67
4.10. Transfección de células .....	67
4.11. Transformación de bacterias .....	67
4.12. Western blot .....	68
4.13. Obtención del Xpress-PPBD .....	69
4.14. Inmunofluorescencia .....	73
4.14.1. Inmunofluorescencia en levaduras .....	73
4.14.2. Inmunofluorescencia en células .....	73
4.15. Validación de la detección del polyP por inmunofluorescencia .....	74
4.15.1. Validación <i>in vitro</i> .....	74
4.15.2. Validación <i>in vivo</i> .....	75
4.16. Validación de la detección del polyP <i>in vivo</i> .....	75
4.16.1. Construcciones .....	75
4.16.2. Puesta a punto y validación de la detección <i>in vivo</i> ...	77
4.17. Purificación de polyP .....	78
4.18. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares. ....	81
4.19. Estudio de las variaciones de polyP en función de las condiciones de cultivo .....	82
4.19.1. Hipoxia .....	82
4.19.2. Diferentes confluencias y tiempo de cultivo .....	82
4.19.3. Diferentes concentraciones de glucosa .....	83
4.19.4. Cultivo en medio sin fosfato .....	83
4.20. Medidas en condiciones de estrés .....	84
4.21. Purificación de polyP de tejidos de ratón .....	85

<b>5. Resultados.....</b>	<b>89</b>
5.1. Puesta a punto y validación de técnicas de inmunofluorescencia. ....	89
5.2. Puesta a punto y validación de la detección <i>in vivo</i> . ....	95
5.2.1. Validación de la visualización <i>in vivo</i> .....	100
5.3. Puesta a punto y validación de la purificación por bioquímica .....	104
5.3.1. Cultivo y lisis celular. ....	105
5.3.2. Extracción.....	106
5.3.3. Purificación.....	108
5.3.4. Cuantificación.....	109
5.4. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares. ....	119
5.4.1. Líneas celulares modelo .....	120
5.4.2. Líneas celulares de pulmón .....	122
5.4.3. Líneas celulares de cerebro.....	124
5.4.4. Líneas celulares de colon .....	126
5.4.5. Líneas celulares de mama .....	127
5.5. Estudio de las variaciones de polyP en función de las condiciones de cultivo .....	128
5.5.1. Diferentes confluencias y tiempo de cultivo.....	129
5.5.2. Hipoxia.....	133
5.5.3. Diferentes concentraciones de glucosa. ....	135
5.5.4. Cultivo en medio sin fosfato .....	137
5.6. Medidas en condiciones de estrés.....	141
5.6.1. Dinámica del polyP frente al daño al ADN .....	141
5.6.2. Estudios de viabilidad tras daño al DNA. ....	144
5.7. Cuantificación del polyP en tejidos.....	147
<b>6. Discusión .....</b>	<b>151</b>

## Índice

---

6.1. Detección del polyP nuclear por inmunofluorescencia .....	151
6.2. Detección del polyP in vivo .....	152
6.3. Determinación bioquímica del polyP.....	153
6.3.1. Cuantificación del polyP .....	156
6.4. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares. ....	157
6.5. Variaciones del metabolismo del polyP según la disponibilidad de nutrientes. ....	161
6.6. El polyP como protector frente al daño al ADN.....	162
6.7. Determinación bioquímica del polyP procedente de tejidos .....	164
<b>7. Conclusiones: .....</b>	<b>167</b>
<b>8. Bibliografía: .....</b>	<b>171</b>

Lista de figuras:

Figura 1: Estructura química de la molécula de polyP. ....	29
Figura 2: Concentración polyP ( $\mu\text{M}$ ) en células de mamíferos. ....	32
Figura 3: Funciones del polyP en mamíferos.....	34
Figura 4: Papel del polyP en la supervivencia al daño al ADN y tumorogénesis.....	36
Figura 5: Esquema representativo del mecanismo de acción de las polifosfatasas.....	38
Figura 6: Ilustración esquemática de la técnica de detección mediante PPBD.....	43
Figura 7: Evaluación de la purificación por cromatografía del Xpress-PPBD. ....	72
Figura 8: Inmunofluorescencia realizada con el PPBD. ....	90
Figura 9: Validación del PPBD en levaduras. ....	91
Figura 10: Validación in vitro del PPBD en células HEK293T.....	92
Figura 11: Validación in vivo del PPBD en HEK293T transfectadas con pRetroX-Tight-Pur-NUDT3 .....	94
Figura 12: Representación gráfica de los plásmidos con PPBD usados para la visualización del polyP in vivo. ....	96
Figura 13: Expresión y visualización de las construcciones con eGFP y PPBD.....	98
Figura 14: Expresión y visualización de las construcciones con mCherry y PPBD.....	99
Figura 15: Validación del pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His mediante la sobreexpresión de NUDT3 en HEK293T. ....	101
Figura 16: Validación del pcDNA3.1-mCherry-PPBD mediante la sobreexpresión de NUDT3 en HEK293T. ....	103
Figura 17: Esquema del proceso de purificación de polyP por bioquímica. ....	104
Figura 18: Estudio del cultivo inicial de células HEK293T necesario para proceder con la purificación.....	106
Figura 19: Niveles de polyP obtenido en la purificación según diferentes métodos de extracción. ....	107

Figura 20: Niveles de polyP obtenido en la purificación según diferentes métodos de purificación y /o incubación con DNAsa/RNAsa o Benzonasa.....	109
Figura 21: Actividad polifosfatasa de Ppx1 con diferentes iones.	111
Figura 22: Determinación de la actividad polifosfatasa de Ppx1 con diferentes iones a diferentes pH. ....	112
Figura 23: Efecto de la espermina sobre la actividad de Ppx1.....	113
Figura 24: Determinación de la especificidad de sustrato de Ppx1. ....	115
Figura 25: Inhibición de la actividad polifosfatasa de Ppx1 por inhibidores de fosfatasas.....	117
Figura 26: Esquema representativo de la acción de las fosfatasas Ppx1, Ddp1 y pirofosfatasa.....	118
Figura 27: Estudio del uso de Ppx1 en la cuantificación del polyP purificado.....	119
Figura 28: Caracterización del polyP celular en HEK293, HEK293T y HeLa. ....	122
Figura 29: Caracterización del polyP celular en MRC-5, A549 y H1395.....	124
Figura 30: Caracterización del polyP celular en neuronas corticales, SH-SY5Y y U-87. ....	125
Figura 31: Caracterización del polyP celular en CCD-18Co, LoVo y HT-29. ....	127
Figura 32: Caracterización del polyP celular en MCF-7 y MDA-MB-231. ....	128
Figura 33: Medición de los niveles de polyP según la confluencia final del cultivo. ....	130
Figura 34: Medición de los niveles de polyP según el tiempo de cultivo. ....	133
Figura 35: Medición de los niveles de polyP según la concentración de O <sub>2</sub> durante el cultivo celular. ....	135
Figura 36: Dinámicas del polyP en según la concentración de glucosa en el medio de cultivo en células HEK293T.....	137
Figura 37: Dinámicas del polyP en según la cantidad de fosfato en el medio de cultivo en células HEK293T.....	140

Figura 38: Efecto del cisplatino sobre la dinámica del polyP celular. .....	143
Figura 39: Efecto del cisplatino sobre la supervivencia de células HEK293T medido por MTT.....	145
Figura 40: Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de células HEK293T medido por colony forming. ....	146
Figura 41: Cuantificación del polyP purificado de cerebro de ratón. .....	148

### Lista de tablas:

Tabla 1: Cantidades de polyP presentes en diferentes organismos .....	30
Tabla 2: Cantidades de polyP presente en diferentes tejidos de mamífero. ....	30
Tabla 3: Concentración polyP ( $\mu\text{M/g}$ biomasa) en <i>S. cerevisiae</i> ....	31
Tabla 4: Buffer y condiciones utilizados durante la purificación del 6xHis-Xpress-PPBD.....	71

# *Introducción*

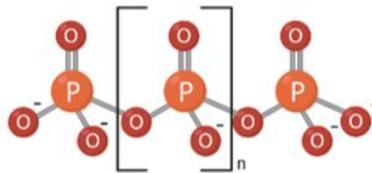
---



## 1. Introducción

### 1.1. Descripción de la molécula del polifosfato

El polifosfato (polyP) es una molécula lineal compuesta por entre decenas y centenares de residuos de fosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. Se encuentra presente en un amplio rango de organismos, desde procariotas a eucariotas, e incluso se ha propuesto que podría haber tenido un papel importante en el origen y la supervivencia de las especies (Kornberg, 1995).



**Figura 1: Estructura química de la molécula de polyP.** El valor de n puede variar entre decenas y cientos de residuos de fosfato ( $\text{PO}_3^-$ ).

La molécula de polyP puede encontrarse formando tres estructuras: polyP cíclico condensado, lineal o ramificado (Harold, 1966). Se mantiene estable en un alto rango de temperaturas, aunque es sensible a la presencia de cationes divalentes en soluciones básicas y es degradable por ácidos. No obstante, más adelante se verá que esta propiedad ha sido usada como método de extracción y cuantificación de esta molécula. La formación de sales de polyP y su asociación con aminas orgánicas hace que también sea soluble en disolventes orgánicos (Harold, 1966). Es un polianión, parecido a los ácidos nucleicos. Se puede encontrar asociado con diferentes cationes biológicamente importantes como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{2+}$  y puede verse unido a diferentes moléculas cargadas positivamente como la arginina, la espermidina o la lisina e incluso se ha visto unido al ARN y ADN, formando complejos difíciles de separar (I. S. Kulaev, V. M. Vagabov and T. V. Kulakovskaya, 2004).

## Introducción

---

Se encuentra evolutivamente conservado, presentándose en concentraciones del orden de mM en bacterias y levaduras (Lichko, L., Kulakovskaya, Pestov, & Kulaev, 2006). En animales, la concentración del polyP disminuye a órdenes de  $\mu\text{M}$  (Kornberg, 1999) (tabla 1).

Procariotas		Eucariotas	
Bacteria		Fungi	
E.coli	100 $\mu\text{M}$	S. cerevisiae	120mM
A.johnsonii	200mM	Animales	
		Citosol	12 $\mu\text{M}$
		Núcleo	89 $\mu\text{M}$

**Tabla 1: Cantidades de polyP presentes en diferentes organismos.** Los datos han sido extraídos de (Kornberg, 1999).

Además, en animales, en concreto en ratón y en rata, se ha demostrado que la concentración del polyP es diferente según el tejido, presentando el cerebro y el corazón la mayor concentración (Kumble & Kornberg, 1995) (tabla 2).

	Concentración PolyP ( $\mu\text{M}$ )				
	Cerebro	Corazón	Riñón	Pulmón	Hígado
Ratón	95 $\pm$ 24	114 $\pm$ 35	64 $\pm$ 9	91 $\pm$ 16	38 $\pm$ 4
Rata	54 $\pm$ 12	58 $\pm$ 20	34 $\pm$ 12	38 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4

**Tabla 2: Cantidades de polyP presente en diferentes tejidos de mamífero.** Los datos han sido extraídos de (Kumble & Kornberg, 1995).

### 1.2. Localización celular

El polyP se encuentra compartimentado en diferentes orgánulos. En bacterias, se encuentra en compartimentos con elevada carga negativa denominados gránulos de volutina. En estos gránulos, el polyP se encuentra asociado con iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  (Pallerla et al., 2005; Rao, Gomez-Garcia, & Kornberg, 2009). El

contenido de polyP en estos gránulos puede variar de 100  $\mu\text{M}$  en el caso de *E.coli* a 200 mM en el caso de *A.johnsonii* (Kornberg, 1999).

Los acidocalcisomas son compartimentos similares y fueron descritos inicialmente en trypanosomátidos, pero posteriormente se han encontrado en protozoos, algas y bacterias e incluso en células humanas, como gránulos densos en plaquetas (Ruiz, Felix A., Lea, Oldfield, & Docampo, 2004). Son vacuolas ricas en  $\text{Ca}^{2+}$  y polyP y, en algunos organismos, poseen diferentes enzimas que median la síntesis y degradación del polyP, además de varios transportadores de iones, participando así en la osmorregulación celular (Lander, Cordeiro, Huang, & Docampo, 2016).

En levaduras, se han purificado fracciones de citosol, vacuolas, núcleo y mitocondrias y se ha encontrado polyP de diferentes longitudes en cada una de las fracciones. Por ejemplo, se ha descrito que en mitocondrias se encuentra polyP de cadena corta (Pestov, Kulakovskaya, & Kulaev, 2004), mientras que en las vacuolas se ha purificado polyP de cadena más larga (>100 residuos de fosfato) (Trilisenko, Vagabov, & Kulaev, 2002). En cuanto a la concentración, el polyP se encuentra en mayor medida en las vacuolas, seguido de citosol, núcleo y mitocondria, con niveles mucho menores (Lichko, L. et al., 2006) (tabla 3). Además, existen estudios que apuntan a que el polyP citosólico podría ser tóxico para la célula (Gerasimaite, Sharma, Desfougeres, Schmidt, & Mayer, 2014).

Saccharomyces Cerevisiae			
Citosol	Núcleo	Vacuola	Mitocondria
4,6	3,4	10,3	0,4

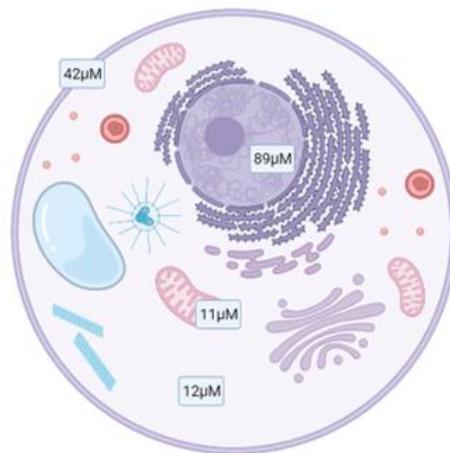
**Tabla 3: Concentración polyP ( $\mu\text{M}/\text{g}$  biomasa) en *S. cerevisiae*.** Los datos han sido obtenidos de (Lichko, L. et al., 2006).

En mamíferos, se ha conseguido aislar polyP de células y tejidos, estimando así su concentración, que varía desde 89  $\mu\text{M}$  en el caso del núcleo, a 12  $\mu\text{M}$  en el caso del citosol (Kumble & Kornberg, 1995)

## Introducción

---

(figura 2). También se ha extraído polyP de mitocondrias de mamíferos (Seidlmayer et al., 2019) y se sabe que es el componente mayoritario en los gránulos densos de las plaquetas humanas, ya comentadas anteriormente (Morrissey, 2012). Aun así, en células humanas su localización varía según la línea celular utilizada o el método de detección. De esta forma, se puede ver tanto una localización principalmente citoplasmática (Arredondo et al., 2022), mitocondrial (Solesio, Demirkhanyan, Zakharian, & Pavlov, 2016), o principalmente nuclear (Jimenez-Nunez et al., 2012; Samper-Martin et al., 2021).



**Figura 2: Concentración polyP (μM) en células de mamíferos.** Concentración de polyP (expresado en residuos de fosfato) en los diferentes compartimentos celulares. Los datos han sido obtenidos de (Kumble & Kornberg, 1995).

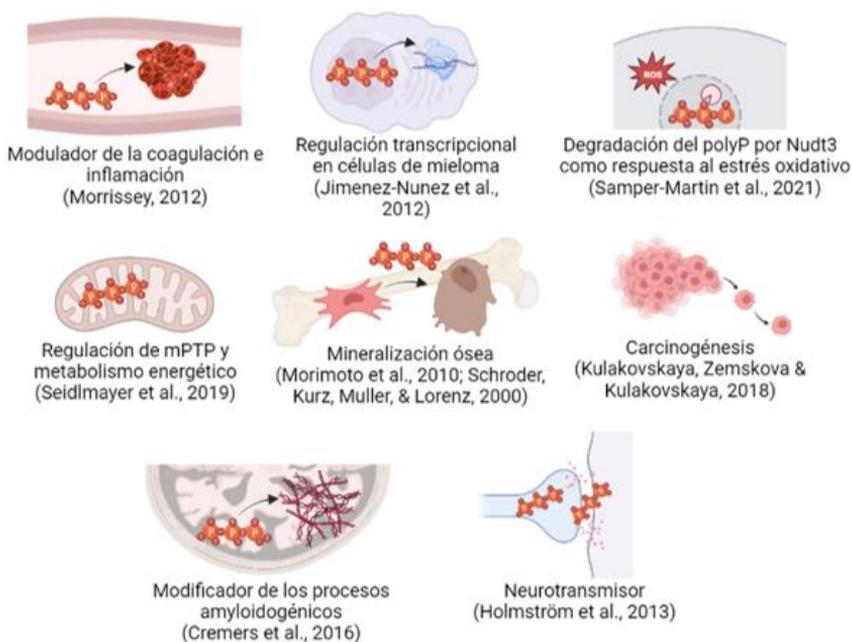
### 1.3. Funciones

El polyP, como se ha introducido anteriormente, es una molécula conservada evolutivamente y presente en un amplio rango de organismos. Esta presencia generalizada indica que esta molécula podría estar relacionada con funciones vitales importantes para los organismos. Se ha introducido que el polyP se encuentra en diferentes localizaciones celulares y esto puede estar relacionado con las numerosas funciones que posee. Por ejemplo, el polyP

vacuolar está relacionado con funciones como reserva energética o de fosfato (Harold, 1966; Rao, Liu, & Kornberg, 1998), mientras que el polyP nuclear está relacionado con funciones de regulación transcripcional (Azevedo, Livermore, & Saiardi, 2015; Jimenez-Nunez et al., 2012; Shiba et al., 1997).

También se ha visto que, en bacterias, el polyP se utiliza como un polianión y, de esta forma, la célula es capaz de almacenar grandes cantidades de metales pesados, conllevando a una reducción del estrés oxidativo. Esta función está conservada en levaduras (Gray, Michael J. & Jakob, 2015), y en células humanas, donde se produce la degradación del polyP en respuesta al estrés oxidativo (Samper-Martin et al., 2021).

En mamíferos, se ha visto que el polyP participa en la regulación del metabolismo energético en mitocondrias (Seidlmayer et al., 2019), en la mineralización ósea (Schroder, Kurz, Muller, & Lorenz, 2000), y en procesos de importancia clínica como la coagulación (Travers, Smith, & Morrissey, 2015), o los procesos amiloidogénicos involucrados en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer (Cremers et al., 2016; Lempart & Jakob, 2019) (figura 3).



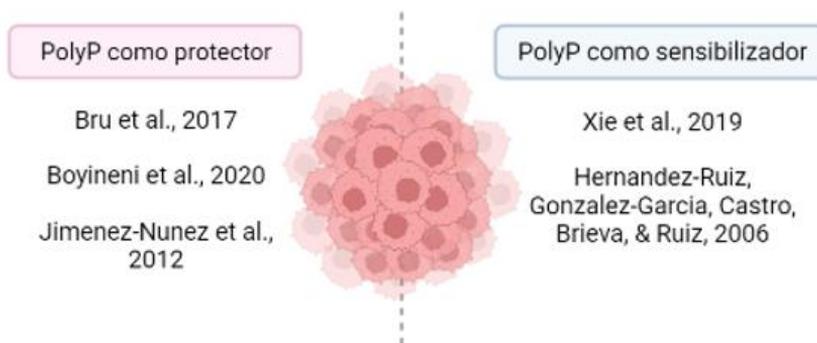
**Figura 3: Funciones del polyP en mamíferos.** En mamíferos, se ha visto que el polyP participa en procesos tan dispares como la coagulación e inflamación, la regulación transcripcional, la respuesta al estrés oxidativo, el metabolismo energético con la regulación de los mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), la mineralización ósea y diferenciación de osteoblastos, la carcinogénesis y metástasis y, en el cerebro, modifica la morfología de los procesos amyloidogénicos y mitiga su toxicidad y puede actuar como neurotransmisor.

### 1.3.1. Tumorigénesis y supervivencia al daño al ADN

Determinados procesos que provocan daño en el ADN conducen al desarrollo tumoral. En este escenario, el polyP se ha propuesto tanto como molécula protectora como sensibilizadora frente al daño al ADN (figura 4). En cuanto a su función protectora, en levaduras, se ha descrito que el polyP tiene una función importante en la replicación celular suministrando el fosfato necesario para la síntesis de dNTPs (Bru et al., 2016). Esta función se mantiene en el caso de daño al ADN, donde se produce la degradación del polyP como fuente de fosfato para la síntesis de dNTPs necesarios para la reparación (Bru et al., 2017). Por otro lado, el polyP también podría

estar actuando como fuente de energía en las células cancerosas puesto que, al deplecionar en células cancerosas los niveles de polyP mitocondrial, la viabilidad de estas células se vio reducida (Boyineni et al., 2020). Además, es bien sabido que las células cancerosas tienen grandes demandas de energía para mantener su crecimiento celular incontrolado. En este sentido, se ha observado que las células plasmáticas de mieloma contienen niveles más altos de polyP intracelular que las células plasmáticas normales y otras poblaciones de células B (Jimenez-Nunez et al., 2012).

En cuanto a su función sensibilizadora, se ha observado que las células tratadas con cisplatino acumulan polyP en el núcleo y que aumentar el nivel de polyP celular incrementa la toxicidad inducida por cisplatino. De esta forma se ha hipotetizado que el polyP podría usarse para sensibilizar a las células frente a los tratamientos quimioterapéuticos (Xie et al., 2019). También se ha observado que la adición de polyP a células plasmáticas humanas y de mieloma inhibe la secreción de inmunoglobulinas y estimula la apoptosis, por lo cual también se ha propuesto al polyP como diana para una posible terapia para el mieloma (Hernandez-Ruiz, Gonzalez-Garcia, Castro, Brieva, & Ruiz, 2006). Además, al inyectar células de melanoma con polyP en ratones, se vio que estos presentaban menos metástasis que los animales sin el tratamiento con polyP, demostrando que el polyP podía estar bloqueando la metástasis *in vivo* mediante la inhibición de la angiogénesis (Han, K. Y. et al., 2007).



**Figura 4: Papel del polyP en la supervivencia al daño al ADN y tumorigénesis.** El polyP presenta cierta dualidad pues ejerce funciones como protector frente al daño al ADN y supervivencia celular y también como sensibilizador frente al daño y potenciador de la apoptosis.

### 1.3.2. Nutrientes

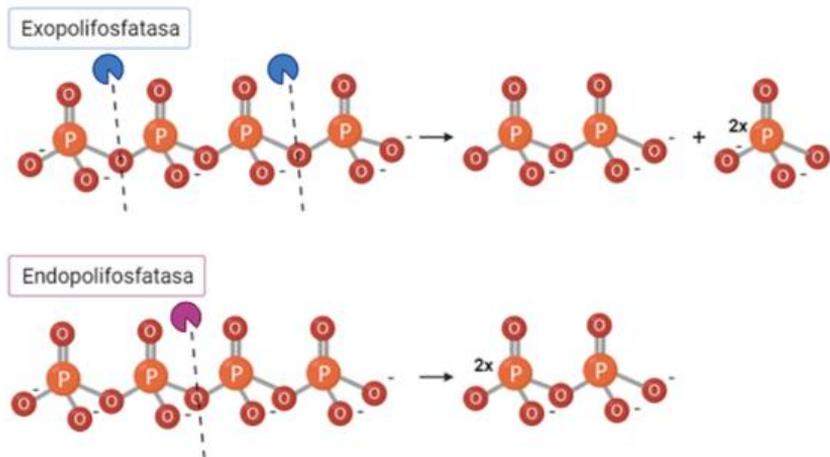
Se ha observado que las bacterias acumulan polyP de forma transitoria cuando crecen en medio deficiente de fosfato y aminoácidos (Rao et al., 1998). Lo mismo ocurre en *Chlamydomonas reinhardtii* al crecer en medio sin azufre (Aksoy, Pootakham, & Grossman, 2014) y en *S. cerevisiae* en ausencia de nitrógeno (Breus, Ryazanova, Dmitriev, Kulakovskaya, & Kulaev, 2012). En células de mamífero, en condiciones de privación de nutrientes, como es el caso de un medio sin glucosa, las células iniciadoras de tumor cerebral consumen el polyP mucho más que las células no cancerosas (Boyineni et al., 2020), indicando que el polyP pasaba a ser la fuente de energía de dichas células. Este resultado también se vio en células humanas de cáncer de mama, dónde las células a las que se les había deplecionado el polyP celular reducían su crecimiento en medio sin suero y no eran capaces de activar mTOR (Wang, Fraley, Faridi, Kornberg, & Roth, 2003). Esta acumulación de polyP frente a condiciones adversas, como la falta de nutrientes o el daño al ADN, y su posterior consumo, es necesaria para la supervivencia de la célula, para poder obtener energía y continuar

con sus funciones normales, hasta que las condiciones adversas desaparezcan.

#### 1.4. Enzimas reguladoras del metabolismo del polyP

Para estudiar el metabolismo del polyP es imprescindible conocer las enzimas que participan en su síntesis y su degradación. Los estudios de estas enzimas se han centrado en el estudio de organismos inferiores y, a lo largo del tiempo, se han descubierto sus homólogos en otros grupos. Aun así, en muchos organismos superiores como los humanos aún faltan por descubrir gran parte de estas enzimas.

El metabolismo del polyP está compuesto por dos familias de enzimas: las sintetasas, que se encargarán de la síntesis del polyP, y las polifosfatasas, que se encargan de la degradación de la molécula. La familia de las polifosfatasas se puede dividir en dos tipos: exopolifosfatasas o endopolifosfatasas. Las enzimas con actividad exopolifosfatasa degradan los extremos de la molécula, produciendo fosfato libre (Pi) como producto final de la reacción y acortando la molécula de polyP. Las endopolifosfatasas hidrolizan la molécula por el interior, generando moléculas de polyP más cortas (figura 5).



**Figura 5: Esquema representativo del mecanismo de acción de las polifosfatasas.** Las exopolifosfatasas degradan el polyP por sus extremos, produciendo fosfato libre, y acortando la molécula de polyP. Las endopolifosfatasas hidrolizan el polyP por el interior, partiendo la molécula de polyP en moléculas más pequeñas.

### 1.4.1. Síntesis del polyP

En levaduras, el polyP está sintetizado por el complejo VTC (*vacuolar transport chaperone*), el cual consiste en la subunidad Vtc1, Vtc4 (con actividad enzimática) y Vtc2 o Vtc3. Tanto el subcomplejo Vtc1/Vtc2/Vtc4 como el Vtc1/Vtc3/Vtc4 son capaces de generar polyP. Se encuentra en la vacuola, pero también se puede encontrar de forma abundante en el retículo endoplasmático (Hothorn et al., 2009). VTC lleva a cabo su función de sintasa de polyP a partir de ATP y en presencia de  $Mg^{2+}$ , aunque presenta actividad con otros iones (Gerasimaite et al., 2014). Además de su función como transporte vacuolar y polyP sintasa, también está relacionada con otros procesos como fusión de la membrana vacuolar o microautofagia (Albi & Serrano, 2016).

Otras sintasas han sido descubiertas en otros organismos. En *Dictyostelium discoideum*, se han descubierto dos polyP quinasas:

PPK1 y PPK2. Ambas catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP al polyP, alargando la molécula de polyP y produciendo ADP, siendo esta una reacción reversible (Gomez-Garcia & Kornberg, 2004; Zhang, Gomez-Garcia, Shi, Rao, & Kornberg, 2007).

En eucariotas superiores, se han visto diferentes longitudes de cadenas de polyP en diferentes localizaciones, lo cual sugiere que deben existir enzimas acopladas de forma específica a estas localizaciones. En mitocondrias, por ejemplo, la  $F_0F_1$ -ATP sintasa puede producir e hidrolizar polyP (Baev, Angelova, & Abramov, 2020). Por otro lado, se ha propuesto a XPR1 (*Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1*) como un transportador de fosfato que regula los niveles de polyP en plaquetas (Mailer et al., 2021).

### 1.4.2. Degradación del polyP

Las polifosfatasas han sido ampliamente estudiadas en levaduras. Como se ha avanzado anteriormente, existen dos tipos de polifosfatasas, las exo y las endopolifosfatasas. Muchas de las enzimas relacionadas con el metabolismo del polyP se han encontrado localizadas en las vacuolas, como es el caso de Ppn1, Ppn2; pero hay dos enzimas que llevan a cabo su actividad fuera de la vacuola. Estas son Ddp1 y Ppx1.

Ddp1 (*diadenosine diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase*) se localiza principalmente en el citoplasma (Koh et al., 2015). Pertenece a la familia NUDIX y posee actividad inositol pirofosfatasa, aunque presenta actividad endopolifosfatasa, dependiente de  $Mg^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , con mayor afinidad (Lonetti et al., 2011).

Ppx1 es una exopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$ , aunque también tiene actividad con  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  (Wurst & Kornberg, 1994). Hidroliza el fosfato terminal de la molécula de polyP, liberando fosfato libre, con una gran afinidad y actividad. Se localiza en el citoplasma, dónde ejerce su función exopolifosfatasa. Ya se ha comentado que grandes

## Introducción

---

cantidades de polyP en el citosol podrían ser tóxicas para la célula y, por ello, Ppx1 podría proteger a la célula de esta toxicidad, degradando el polyP del citosol (Gerasimaite et al., 2014). Otra característica de Ppx1 es su incapacidad para degradar pirofosfato (PPi), ATP y trifosfato cíclico y, aunque es capaz de hidrolizar polyP de 3 a 500 residuos, presenta preferencia por polyP de cadena larga (>250 residuos de P) (Wurst & Kornberg, 1994).

Centrándonos en mamíferos se han descrito algunas enzimas que presentan actividad exopolifosfatasa *in vitro*, como la fosfatasa alcalina (FA) y PRUNE1. La FA degrada diferentes sustratos, como por ejemplo el PPi, y participa en diferentes mecanismos como la mineralización ósea, absorción intestinal y transporte de fosfato y calcio. El pH óptimo para su función como polifosfatasa es de pH 9,5 e, *in vitro*, ha mostrado capacidad para hidrolizar polyP de hasta 800 residuos, aunque su actividad disminuye conforme aumenta la longitud de la cadena de polyP. Al contrario que otras polifosfatasas, los iones divalentes estudiados ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ ) inhiben su acción. No se ha demostrado su actividad *in vivo* (Lorenz & Schroder, 2001).

PRUNE1 es un ortólogo de la Ppx1, y realiza la misma función, actuando como exopolifosfatasa. En su caso, tiene gran actividad con cadenas cortas de polyP, se ve inhibida por cadenas largas de polyP y pirofosfato, funciona en presencia de iones  $Mg^{2+}$  y  $Co^{2+}$  y no tiene actividad con ATP, GTP o cAMP. Su sobreexpresión está asociada con la progresión de diferentes cánceres y participa en diferentes procesos, como el ciclo celular o la motilidad (Tammenkoski et al., 2008). A día de hoy, tampoco se ha demostrado su actividad *in vivo*.

Por otro lado, están la familia NUDIX, ya comentada con anterioridad por su homología con Ddp1. Hidrolizan inositol fosfatos y otros compuestos con enlace fosfodiéster como nucleósidos-fosfato. Dentro de esta familia de enzimas se encuentra la subfamilia DIPP (difosfoinositol pirofosfato polifosfatasas), conformada por DIPP1, DIPP2, DIPP3A y DIPP3B, también llamadas

NUDT3, NUDT4, NUDT10 Y NUDT11. Entre ellas, se ha demostrado que NUDT3 posee actividad endopolifosfatasa *in vivo*. Actúa como endopolifosfatasa en presencia de  $Zn^{2+}$ , aunque su especificidad de sustrato varía según el catión divalente, y está relacionada con la supervivencia frente a estrés oxidativo (Samper-Martin et al., 2021).

### 1.5. Detección celular

Otro pilar fundamental para estudiar el metabolismo del polyP es su detección. Este apartado se centra en su detección celular, sobre todo en organismos superiores. A lo largo del tiempo, se han desarrollado distintos métodos para marcar el polyP celular. Uno de ellos ha sido el uso de DAPI, el cual se usa normalmente para la detección de ADN, pero, por su afinidad por las moléculas con cargas negativas, también puede ser utilizado para marcar polyP. Excitando a 350 nm, la unión DAPI-ADN exhibe su máxima fluorescencia alrededor de los 450 nm, mientras que, si excitamos a una longitud de onda mayor, la unión de DAPI-polyP cambia el patrón de emisión y emite a 550 nm (Aschar-Sobbi et al., 2008). Este cambio de patrón de emisión hace que sea posible discernir entre la fluorescencia provocada por el ADN y la fluorescencia provocada por el polyP. La unión DAPI-polyP ha resultado eficaz para observar el polyP en acidocalcisomas de *Trypanosoma cruzi* y tejidos (Gomes et al., 2013) y en mitocondrias de cultivos neuronales (Aschar-Sobbi et al., 2008).

La tinción por DAPI también posee algunos problemas técnicos. Puede unirse a otras moléculas con carga negativa, como es el caso del ARN, la heparina o los inositoles fosfato (Kolozsvari, Parisi, & Saiardi, 2014; Omelon, Georgiou, & Habraken, 2016). También presenta problemas al detectar cantidades grandes de polyP (hasta 2  $\mu$ g) por la saturación de señal. Además, se ha visto que, en presencia de polianiones, el DAPI puede formar estructuras condensadas, aumentando la señal de fluorescencia que podría interferir en la cuantificación (Omelon et al., 2016).

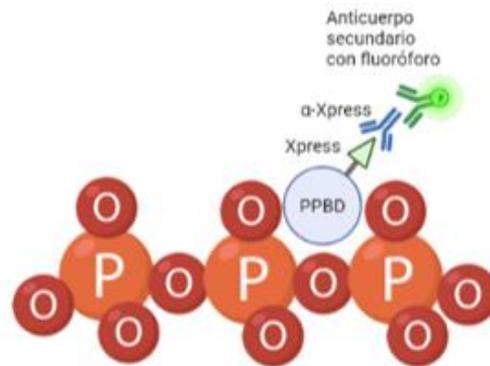
## Introducción

---

Debido a los problemas que conlleva la tinción con DAPI, era necesario encontrar un método de detección del polyP más específico. Para ello, algunos equipos se han centrado en estudiar los colorantes de bezimidazolio, usados anteriormente para teñir otras moléculas cargadas negativamente como es el caso de la heparina o GTP. Los compuestos que mejor detectaron el polyP fueron el JC-D7 y el JC-D8. Estas sondas pueden detectar hasta 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polyP, respectivamente (Angelova et al., 2014). La sonda JC-D7 se ha utilizado para detectar gránulos ricos en polyP en *Arabidopsis* (Zhu et al., 2020) y para detectar polyP en astrocitos de ratón, estudiando su localización junto con otras tinciones (Arredondo et al., 2022).

Aunque la señal no se ve afectada por ADN ni ARN, la presencia de heparina sí que interfiere en su señal y en soluciones salinas no se detecta fluorescencia. Esto puede ser debido a que la alta fuerza iónica impida las uniones sonda-polyP. También se ha visto que emite mayor fluorescencia con cadenas de polyP largas comparando con polyP de cadena corta, lo que podría dar problemas a la hora de la cuantificación o detección de diferentes poblaciones de polyP (Angelova et al., 2014).

Por último, se ha usado Ppx1 y su dominio C-terminal, que contiene el sitio de unión al polyP, como método de detección del polyP. Saito y colaboradores utilizaron por primera vez este dominio, llamado PPBD (*polyphosphate binding domain*), para detectar el polyP, creando un PPBD recombinante el cual se le añade un epítipo Xpress que podía ser detectado por inmunocitoquímica (Saito, Ohtomo, Kuga-Uetake, Aono, & Saito, 2005) (figura 6). El PPBD ha sido ampliamente utilizado para detectar polyP en células humanas (Arredondo et al., 2022; Samper-Martin et al., 2021). Se ha desarrollado una variante de este método, creando un PPBD unido a mCherry y eGFP. Con esta variante, se ha detectado polyP en células fijadas (Xie et al., 2019).



**Figura 6: Ilustración esquemática de la técnica de detección mediante PPBD.** El dominio PPBD conjugado con un epítipo Xpress es reconocido mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario ( $\alpha$ -Xpress) y un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo.

Este método de detección posee una elevada sensibilidad y resolución, sin embargo, también presenta ciertas limitaciones. Se ha descrito que el PPBD presenta gran afinidad por el polyP de cadena larga, pero no es capaz de unirse al polyP de cadena corta (Saito et al., 2005).

### 1.6. Detección *in vivo* en organismos modelo

La detección del polyP celular es imprescindible para el estudio de su metabolismo y sus posibles funciones, pero más interesante sería poder detectar esta molécula *in vivo* y poder estudiar sus variaciones en tiempo real. Algunos de los métodos de detección introducidos en el apartado anterior han sido probados para la detección del polyP *in vivo*, pero desgraciadamente no hay un método que carezca de limitaciones y que permita esta detección de forma eficiente. Por ejemplo, el DAPI se ha usado en algunos organismos como *E.gracilis* o *C. albicans* para detectar polyP *in vivo*, pero la concentración y tiempo de incubación necesario para teñir el polyP sin requerir una permeabilización o fijación previa son

bastante elevados, lo cual no convierte a este método en el mejor para estudiar las dinámicas del polyP *in vivo* (Gomes et al., 2013).

El resultado más prometedor lo ha obtenido la sonda JC-D7, que se ha utilizado para visualizar polyP en células vivas, sin afectar a los niveles de viabilidad de las células (Angelova et al., 2014).

### 1.7. Purificación bioquímica

La purificación de la molécula de polyP puede presentar ciertos problemas debido a su ya comentada similitud con otras moléculas como los ácidos nucleicos. En el caso de células de mamíferos, la complejidad es aún mayor puesto que, además, se encuentra en bajas concentraciones.

Los métodos más usados en la actualidad para la extracción del polyP celular son la extracción con ácido perclórico (Lichko, L. P., Eldarov, Dumina, & Kulakovskaya, 2014), con ácido sulfúrico (Hurlimann, Stadler-Waibel, Werner, & Freimoser, 2007) o por fenol-cloroformo, ya sea a pH neutro (Bru et al., 2016), o ácido (Neef & Kladde, 2003). Se ha demostrado que los pasos que incluyen soluciones alcalinas, ácidos fuertes o altas temperaturas, producen la degradación parcial de la molécula y la consecuente subestimación de la cantidad del polyP celular (Bru, Jimenez, Canadell, Arino, & Clotet, 2016). Por lo tanto, el mejor método sería el menos agresivo: la extracción mediante fenol cloroformo a pH neutro.

Tras esta extracción, se han desarrollado dos métodos para la purificación del polyP: cromatografía de afinidad (mediante *glassmilk* o columnas de sílice) o la precipitación con etanol. En bacterias, se ha comprobado que las cadenas cortas de polyP (< 60 residuos de fosfato) se unen con menos eficiencia al *glassmilk* y pueden perderse durante la extracción (Dahl, Xie, & Jakob, 2018). Esto también ocurre en levaduras, dónde se compararon ambos métodos y se demostró que la cromatografía de afinidad conllevaba

un fraccionamiento de tamaño porque las moléculas menores de 80 residuos no se quedaban retenidas en la columna y aparecían en el eluído, mientras que, con la precipitación con etanol, se solventaba este problema (Bru et al., 2016).

Por último, tras extraer y purificar el polyP, se puede cuantificar mediante métodos enzimáticos. Entre los métodos enzimáticos para la cuantificación, el uso de Ppx1 es el más extendido. Cómo ya se ha introducido, Ppx1 es una exopolifosfatasa que degrada los extremos de la molécula de polyP, produciendo fosfato libre. Este fosfato libre puede ser cuantificado mediante molibdato y verde de malaquita (Baykov, Evtushenko, & Avaeva, 1988). También se han desarrollado otros métodos enzimáticos para su cuantificación como el uso de PPK para transformar el polyP a ATP cuantificable mediante ensayos de luminiscencia (Ault-Riche, Fraley, Tzeng, & Kornberg, 1998), o su detección mediante fluorescencia por DAPI (Aschar-Sobbi et al., 2008).

Hay que tener en cuenta que durante la extracción y purificación del polyP celular de células de mamífero se pueden arrastrar ácidos nucleicos que afecten al proceso de cuantificación (Bru et al., 2016). También hay otras moléculas, como la heparina y la espermina que pueden afectar a la actividad de Ppx1 (Wurst & Kornberg, 1994), es por ello necesario poner a punto y validar estos métodos de extracción, purificación y cuantificación del polyP en células humanas.



## *Hipótesis*

---



## 2. Hipótesis

Diversas condiciones fisiológicas y/o adversas para la célula conllevarán cambios en el metabolismo del polyP a nivel celular. El desarrollo de nuevos métodos de detección del polyP celular permitirán evaluar estos cambios.



## *Objetivos*

---



### 3. Objetivos

Los objetivos planteados para poder confirmar o rechazar la hipótesis son los siguientes:

**Objetivo 1:** Desarrollar y poner a punto nuevos métodos de detección del polyP. Este punto lo podemos dividir en 3 según la técnica a desarrollar:

- Poner a punto y validar la detección del polyP intracelular *in vitro* mediante técnicas de inmunofluorescencia y el uso del PPBD.
- Poner a punto y validar la detección del polyP celular mediante microscopía *in vivo*
- Poner a punto y validar la purificación bioquímica del polyP celular

**Objetivo 2:** Mediante el uso de las técnicas desarrolladas, estudiar el metabolismo del polyP en diferentes líneas celulares humanas.

**Objetivo 3:** Mediante el uso de las técnicas desarrolladas, estudiar las variaciones en el metabolismo del polyP celular en diferentes condiciones fisiológicas y/o adversas como falta de nutrientes o daño al ADN.



## *Material y métodos*

---



## 4. Material y métodos

### 4.1. Productos químicos, reactivos y kits

<b>Reactivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>μ-Slide 8 well</b>	Ibidi #80806
<b>B27</b>	ThermoFisher #17504044
<b>Benzamidina</b>	Merck #B6506
<b>Benzonasa</b>	Sigma Aldrich #E1014-5KU
<b>Bovine Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma Aldrich #10735076001
<b>Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent)</b>	Bio-Rad #5000006
<b>Cloroformo</b>	PanReac #131252
<b>Coctel inhibidor de fosfatasas Pierce™</b>	Thermo Scientific #A32957
<b>Deoxynucleotides mix (dNTPs)</b>	ThermoFisher #R0192
<b>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)</b>	Sigma Aldrich #D5671
<b>DMEM low glucose</b>	Sigma-Aldrich #D6046
<b>DMEM sin fosfato</b>	Gibco #11971025
<b>DMEM sin glucosa, sin glutamina, sin rojo fenol</b>	Gibco #A1443001
<b>DMSO (Dimethyl Sulfoxide)</b>	Merck #1029521011
<b>Doxiciclina (Doxycycline monohydrate)</b>	Sigma #D1822
<b>Espermina</b>	Thermofisher #11385325
<b>Etanol absoluto</b>	VWR #20821310
<b>Ethidium bromide</b>	Sigma Aldrich #E1510
<b>Fenol</b>	Sigma Aldrich #P4682
<b>Fenol-Cloroformo-IAA (125:24:1) (Sigma)</b>	Sigma Aldrich #77619
<b>Fenol-Cloroformo-IAA (125:24:1) (Thermofisher)</b>	Thermofisher #AM9720
<b>Fluoromount-GTM</b>	Southern Biotech #0100-01
<b>Formaldehído</b>	Sigma Aldrich #104002
<b>FuGENE®</b>	Promega #E2311
<b>Gel Loading Dye, Purple (6X)</b>	NEB #B7024S

## Material y métodos

---

<b>Glicerol</b>	VWR #24388295
<b>HEPES</b>	VWR #CAS 7365-45-9
<b>Heptamolibdato de amonio</b>	ThermoFisher #205851000
<b>Hoechst</b>	ThermoFisher #33342
<b>Ibidi <math>\mu</math>-Dish 35 mm</b>	Ibidi #81156
<b>Imidazol</b>	Sigma Aldrich #I5513
<b>Immobilon Forte Western HRP substrate</b>	Sigma Aldrich #WBLUF0500
<b>In-Fusion HD Cloning kit</b>	TakaraBio #638920
<b>Inhibidor de proteasas (EDTA-free Pierce™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets)</b>	ThermoFisher #A32955
<b>Isopropil <math>\beta</math>-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)</b>	Panreac #A4773
<b>Leupeptina</b>	Sigma Aldrich #108976
<b>L-glutamina (GLUTAMAX™)</b>	ThermoFisher #35050061
<b>Lisozima</b>	Merck #L6876
<b>MTT</b>	Sigma Aldrich #M2128
<b>NaF</b>	ThermoFisher #447351000
<b>NaPPi</b>	Sigma Aldrich #S6422
<b>Neurobasal</b>	ThermoFisher #21103049
<b>NucleoSpin® Plasmid EasyPure</b>	Macherey-Nagel #740727
<b>NZYMidiprep</b>	nzytech #MB050
<b>Ortovanadato</b>	ThermoFisher #205332500
<b>PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 10X)</b>	Sigma Aldrich #D1408
<b>Penicilina-estreptomicina (P/S)</b>	Sigma Aldrich #P0781
<b>Pepstatina</b>	Merck #P4265
<b>Piruvato de sodio</b>	Sigma-Aldrich #P5280
<b>PMSF</b>	Sigma-Aldrich #P7626
<b>poli-D-lisina</b>	Sigma-Aldrich, P7886
<b>polyP100</b>	RegeneTiss #EU1005
<b>polyP130</b>	Preparado por RegeneTiss
<b>Ponceau S solution</b>	Sigma Aldrich #P7170
<b>Precision Plus Protein Dual Color Standards</b>	Bio-Rad #1610374
<b>Puromicina</b>	Sigma Aldrich #P8833

<b>rCutSmart™ Buffer 10X</b>	NEB #B6004
<b>Roswell Park Memorial Institute (RPMI)</b>	Sigma Aldrich #R8758
<b>Suero bovino fetal (FBS)</b>	Capricorn Scientific #FBS12A
<b>Suero de cabra (goat serum)</b>	Sigma Aldrich #G9023
<b>Tripsina</b>	ThermoFisher #25200072
<b>Tris/Glycine/SDS Running Buffer (10X)</b>	Bio-Rad #1610744
<b>Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (5X)</b>	ThermoFisher #LC6675
<b>Triton-X100</b>	Sigma Aldrich #X100
<b>TRIZOL™</b>	ThermoFisher #15596026
<b>Trypan blue solution</b>	DDbiolab #702630
<b>Tween® 20</b>	Sigma Aldrich #P1379
<b>Verde malaquita</b>	Sigma Aldrich #HT8028
<b>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</b>	Promega #A9282
<b>β-glicerolfosfato</b>	Sigma Aldrich #50020
<b>β-Mercaptoetanol</b>	Sigma Aldrich #M6250

#### 4.2. Anticuerpos y enzimas

<b>Anticuerpo</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución (uso)</b>
<b>α-Xpress</b>	Life Technologies #46-0528	5 µg/mL (IF)
<b>Alexa 488 α-mouse</b>	Invitrogen #A11001	1:1000 (IF)
<b>α-GFP</b>	Cell Signaling #29565	1:2000 (WB)
<b>α-HIS</b>	Qiagen #34660	1:1000 (WB)
<b>α-Nudt3</b>	Sigma-Aldrich #SAB2700523	1:2000 (WB)
<b>α-rabbit</b>	Inmuno Research Laboratory Ink #111-03-144	1:30000 (WB)
<b>α-mCherry</b>	ABCAM ab213511	1:1000 (WB)
<b>α-Prune1</b>	SANTA CRUZ sc-393318	1:1000 (WB)

## Material y métodos

---

Enzima	Referencia
PFU DNA polymerase	EMBL Heidelberg core facility
BamHI	NEB #R3136
EcoRI	NEB #R3101

### 4.3. Buffers

Buffer	Composición
PFU buffer 10X	200 mM Tris-HCl (pH 8.8) 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mM KCl 1% (v/v) Triton-X100 20 mM MgSO <sub>4</sub>
Sample buffer (SB) 5X	125 mM Tris 1M (pH 6.8) 10% SDS 25% glycerol 10% β-mercaptoethanol Azul bromofenol
Tampón de lisis (TLL)	20 mM Tris (pH 7.5) 5 mM EDTA 150 mM NaCl 1% NP40
Buffer Ppx1	20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM Acetato de amonio 5 mM Acetato de magnesio
Buffer AE	50 mM Acetato de sodio (pH 5.3) 10 mM EDTA

### 4.4. Primers

Todos los *primers* han sido comprados en IDT y diluidos a 100 μM con MilliQ H<sub>2</sub>O siguiendo las instrucciones del vendedor.

Nombre	Uso	Secuencia
--------	-----	-----------

---

---

<b>PPBD_F1</b>	Xpress-PPBD	GATAAGGATCGATGGGGATCCATGGAA GGACGTTTCCGTC
<b>PPBD_R1</b>	Xpress-PPBD	GCAGATCTCGAGCTCGGATCCTTAAGCG GCGATTTC
<b>PPBD_F2</b>	pcDNA3.1- eGFP-PPBD	CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGA TCCGAAGGACGTTTCCGTCATC
<b>PPBD_R2</b>	pcDNA3.1- eGFP-PPBD	GTGCTGGATATCTGCAGAATTCTTAAGC GGCGATTCTGGTGTAC
<b>GFP_F1</b>	pcDNA3.1- eGFP-PPBD	CTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTG
<b>GFP_R1</b>	pcDNA3.1- eGFP-PPBD	GATGACGGAAACGTCCTTCGGATCCCTT GTACAGCTCGTCCATGCCGAG
<b>PPBD_R3</b>	pcDNA3.1- eGFP-PPBD- His	GTGCTGGATATCTGCAGAATTCAGCGGC GATTCTGGTGTAC
<b>PPBD_F3</b>	pcDNA3.1- eGFP-His- PPBD	CGGCATGGACGAGCTGTACAAGCATCA TCATCATCATCATGGTATGG
<b>GFP_R2</b>	pcDNA3.1- eGFP-His- PPBD	CCATACCATGATGATGATGATGATGCTT GTACAGCTCGTCCATGCCGAG
<b>GFP_R3</b>	pcDNA3.1- eGFP	GTGCTGGATATCTGCAGAATTCCTTGTA CAGCTCGTCCATGCCGAG
<b>mCherry _F1</b>	pcDNA3.1- mCherry- PPBD	CTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGGAT

## Material y métodos

---

<b>mCherry _R1</b>	pcDNA3.1- mCherry- PPBD	GATGACGGAAACGTCCTTCGGATCCCTT GTACAGCTCGTCCATGCCGCCGG
<b>PPBD_F4</b>	pcDNA3.1- mCherry- PPBD	CCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG GATCCGAAGGACGTTTCCGTCATC
<b>PPBD_F5</b>	pcDNA3.1- mCherry-LK- PPBD	GGCATGGACGAGCTGTACAAGG AGGCGGCAGCGAAGATGGAAGG ACGTTTCCGTC
<b>mCherry _R2</b>	pcDNA3.1- mCherry-LK- PPBD	GACGGAAACGTCCTTCCATCTTC GCTGCCGCTCCTTGTACAGCTC GTCCATGCC
<b>mCherry _R3</b>	pcDNA3.1- mCherry	GTGCTGGATATCTGCAGAATTCT TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG CCGG

### 4.5. Plásmidos

<b>Plásmido</b>	<b>Origen</b>	<b>Uso</b>
<b>pRSET-A</b>	Thermo Fisher #V35120	Expresión del Xpress-PPBD
<b>pRetroX-Tight-Pur</b>	Takara Bio	Validación del Xpress-PPBD y el pcDNA3.1- eGFP-PPBD- His
<b>pAdvanced</b>	Takara Bio	Validación del Xpress-PPBD y el pcDNA3.1- eGFP-PPBD- His
<b>pcDNA3.1</b>		Construcciones detección del polyP in vivo

pWPI		Sobreexpresión NUdT3
<b>pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0</b>	Addgene (Plasmid #62988)	<i>Knockout</i> NUdT3

#### 4.6. Cepas de bacterias, levaduras, líneas celulares y tejidos de animales

##### 4.6.1. Bacterias

*E. coli* BL21 DE3 pLysS: Cepa de bacterias usada para la expresión del Xpress-PPBD. Obtenida de BioRad #1563003

*E. coli* DH5 $\alpha$ : Cepa de bacterias usada para la purificación de plásmidos. Obtenida de Thermo Scientific #EC0112

##### 4.6.2. Levaduras

BY4741: Cepa *wild-type* de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

*ppn1 $\Delta$ ,ppn2 $\Delta$ ,ppx1 $\Delta$* : Cepa de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, la cual no expresa enzimas con actividad polifosfatasa y, por lo tanto, no puede degradar el polyP.

*vtc4 $\Delta$* : Cepa de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, la cual no expresa el complejo Vtc4 con actividad sintasa y, por lo tanto, no posee polyP.

##### 4.6.3. Líneas celulares

HEK293T: línea celular derivada de riñón embrionario humano. Han sido utilizadas como modelo genético para poner a punto las

## *Material y métodos*

---

técnicas de detección del polyP y para el estudio de las dinámicas de su metabolismo. Se han obtenido del servicio de la Universitat Autònoma de Barcelona.

HEK293: línea celular derivada de riñón embrionario humano. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

HeLa P: línea celular humana derivada de adenocarcinoma de cérvix. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de Harald Stenmark Group.

Jurkat: línea celular humana derivada de un paciente con leucemia aguda de células T. Han sido utilizadas en los estudios del metabolismo del polyP en el ciclo celular. Se han obtenido del banco de células Eucellbank de la Universidad de Barcelona.

MRC-5: línea celular humana derivada de pulmón. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de ATCC ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)).

A549: línea celular epitelial humana derivada de carcinoma de pulmón. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de la ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*).

H1395: línea celular humana derivada de adenocarcinoma de pulmón. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de ATCC ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)).

SH-SY5Y: línea celular derivada de neuroblastoma humano. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de ATCC ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)).

U-87: línea celular humana derivada de glioblastoma. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

MCF-7: línea celular humana de mama, derivada de un paciente con adenocarcinoma metastásico. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de la ECACC.

MDA-MB-231: línea celular humana de adenocarcinoma mamario. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido del Instituto de Oncología CELLEX del Hospital Vall d'Hebron.

CCD-18Co: línea celular humana derivada de colon. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de ATCC ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)).

LoVo: línea celular humana de colon, derivada de metástasis. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido del Hospital Clinic de Barcelona.

HT-29: línea celular humana derivada de adenocarcinoma colorrectal. Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos. Se han obtenido de la ECACC.

Cultivos primarios de células corticales procedentes de embriones E15.5 de ratones C57BL/6J. El cultivo se ha realizado según el protocolo de (Parcerisas et al., 2020). Han sido utilizadas para el screening de polyP en diferentes líneas-tejidos.

HEK293T-pRetroX-Tight-Pur-NUDT3: línea estable creada a partir de transfectar HEK293T con pRetroX-Tight-Pur-NUDT3 y seleccionar las células transfectadas con 0,5µg/ml de puromicina.

#### 4.6.4. Tejidos animales

Los tejidos animales utilizados han sido extraídos de hembras de ratón B6-Tg(SF1-Cpt1c) que tenían programado su sacrificio. En ningún momento se sacrificaron para la realización de esta tesis ni se participó en el proceso de sacrificio. Se realizó la extracción del

cerebro y cerebelo, pulmones, corazón, hígado, bazo, riñones y músculo esquelético.

### 4.7. Condiciones de cultivo

#### 4.7.1. Condiciones estándar

En condiciones estándar, las levaduras han crecido en medio rico YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa).

En condiciones estándar, para las líneas HEK293T, HEK293, HeLa P, MRC-5, A549, SH-SY5Y, U-87, MCF-7, MDA-MB-231, CCD-18Co, LoVo y HT-29, las células han crecido en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina.

Para la línea celular Jurkat se ha utilizado RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1mM de piruvato de sodio y 10mM HEPES.

Para la línea celular H1395 se ha utilizado RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina/estreptomicina.

Para los cultivos primarios de células corticales se siguió el protocolo de (Parcerisas et al., 2020). Las células se contaron y sembraron en placas recubiertas con 50 µg/mL de poli-D-lisina disuelta en PBS, a confluencia de  $5 \times 10^6$  células/placa p10. Las células se cultivaron en medio neurobasal que contenía suplemento de B27 al 2%, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamax y 1/5 parte de medios acondicionados de cultivo de glía madura.

Todas las células han crecido en un ambiente húmedo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se han usado hasta un máximo de 15 pases después de la descongelación y se ha monitorizado la contaminación por micoplasma periódicamente.

#### 4.7.2. Diferentes condiciones de cultivo

##### **Medio sin fosfato**

Para los experimentos de depleción de fosfato en el medio se ha utilizado DMEM sin fosfato suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina/estreptomicina.

##### **Medio con diferentes concentraciones de glucosa**

Medio 25 mM glucosa: DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina.

Medio 5 mM glucosa: DMEM low glucose suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina/estreptomicina.

Medio 1 mM glucosa: DMEM sin glucosa, sin glutamina, sin rojo fenol suplementado con 10% de FBS, 1% glutamina, 1% penicilina/estreptomicina y 1 mM glucosa.

#### 4.8. Transfección de células

Para la transfección de células se usó FuGENE® HD utilizando la proporción 1:4 (ADN:FuGENE®) y siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

#### 4.9. Transformación de bacterias

##### **Transformación de bacterias BL21 (DE3) pLysS**

A partir de un cultivo ON, coger 50  $\mu$ L y diluir en 5 ml de medio LB. Tras 2 h, centrifugar durante a 4°C 5 minutos a 4000 rpm. Descartar sobrenadante y resuspender el pellet con 2,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío para hacerlas competentes. Incubar en hielo 20 minutos. Centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 4000 rpm y decantar sobrenadante. Resuspender en 500  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub>.

## *Material y métodos*

---

Tras hacerlas competentes, se debe incubar el plásmido de interés con estas bacterias en hielo durante 30 min. Tras esto, realizar un choque térmico a 42°C de 45 segundos. Incubar en medio rico SOC durante 1 h a 37°C. Plaquear en placas con medio LB suplementado con la resistencia adecuada.

### **Transformación de DH5 $\alpha$**

Incubar con el plásmido a transformar durante 30 minutos en hielo. Tras esto, realizar un choque térmico de 1 minuto 15 segundos a 42°C. Incubar con 500  $\mu$ L de SOC durante 1 h a 37°C. Plaquear en placas LB con la resistencia adecuada.

### **4.10. Western blot**

Se obtiene el extracto celular mediante su lisis con tampón de lisis con inhibidor de proteasas y se incuba en hielo durante 15 min. El lisado celular se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C y se determina su concentración con Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) usando una recta de BSA. Para la electroforesis se cargan 30  $\mu$ g de proteína con SB 5x en geles SDS-acrilamida comerciales de gradiente del 4-15% (BioRad) y se transfieren en membranas de PVDF (Millipore). Como marcador de tamaño se usa Precision Plus Protein Dual Color Standards. Como control de carga se tiñen con Ponceau. Las membranas se incuban con diferentes anticuerpos primarios y secundarios en función de las proteínas analizadas.

El revelado de las membranas se lleva a cabo con bioluminiscencia utilizando Luminata Forte Western HRP Substrate, la captura de la imagen se realiza mediante el ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) y la cuantificación de las imágenes con el programa ImageLab (BioRad).

#### 4.11. Obtención del Xpress-PPBD

La obtención del Xpress-PPBD, su uso para marcar polyP según el protocolo de inmunofluorescencia y la posterior cuantificación de la señal del Xpress-PPBD se ha publicado en (Jimenez et al., 2022).

##### **Construcciones**

Se realizó una amplificación por PCR del dominio PPBD de la exopolifosfatasa PPX1 de *E. coli*, desde el residuo 306 al 534, usando los *primers* PPBD\_F1 y PPBD\_R1. Se clonó el PPBD en el vector de expresión pRSET-A (con 6xHis que serán utilizadas en la purificación) utilizando la diana de restricción BamHI y usando el kit In-Fusion HD Cloning kit. Se comprobó la construcción mediante secuenciación.

##### **Transformación de bacterias**

Este plásmido se transformó en bacterias BL21 (DE3) pLysS, previamente tratadas con CaCl<sub>2</sub> para hacerlas competentes.

##### **Purificación del 6xHis-Xpress-PPBD**

Diluir el cultivo de pLysS transformadas (en 50 mL de medio LB suplementado con 50 µg/ml de ampicilina y 25 mg/mL de cloranfenicol) 1:10 en el mismo medio e incubar a 37°C en agitación durante 2 h. Tras esto, añadir el inductor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubar a 25°C. Tras 6 h, centrifugar a 3300 rcf durante 15 minutos a 4°C.

Resuspender el pellet de células con 40 mL de buffer de lisis frío (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM β-mercaptoetanol, 10 mM imidazol, lisozima (0,4 mg/mL), 50 U de benzonasa e inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), leupeptina (1 mg/mL), pepstatina (1 mg/mL), y 1 mM benzamidina).

## *Material y métodos*

---

Incubar durante 15 minutos a 4°C con agitación suave. Sonicar durante 30 segundos a 30 kHz (Dr. Hielscher, UP 50H). Centrifugar a 3300 rcf durante 10 minutos a 4°C.

Extraer el sobrenadante y centrifugar a 3300 rcf durante 10 minutos a 4°C. Extraer el sobrenadante y diluir a una concentración final de 2 mg/mL de proteína total.

La purificación del 6xHis-Xpress-PPBD se ha realizado usando una columna de afinidad HisTrap HP 5 mL (Cytiva #17524802) mediante el *ÄKTA start protein purification system*. Los materiales y buffer necesarios se pueden ver en la tabla 4.

Inyectar los 5 mL obtenidos en el paso de elución, los cuales contienen la mayor concentración de imidazol, en una columna de *desalting* ÄKTA HITrap™ 5 mL (Cytiva #17140801). Recoger alícuotas de 1mL de las fracciones 2 y 3 en eppendorf con 100 µL de glicerol. Repetir este paso en todas las inyecciones de desalting.

Tras esto, se debe concentrar el eluído usando una columna Amicon 10 KDa hasta obtener un volumen de 1 mL. Tras esto, se puede añadir glicerol a una concentración final del 50% (v/v) y mantener a -20°C. En la figura 7 se puede observar el perfil del cromatograma (figura 7A), los diferentes eluídos y la presencia de 6xHis-Xpress-PPDB en ellos mediante western blot con un anticuerpo α-HIS (figura 7B).

---

### **ÄKTA buffers y condiciones**

---

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
ÄKTA buffer (1 ml)	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoetanol

---

<i>Buffer lavado (3x volumen de la columna)</i>	ÄKTA <i>buffer</i> suplementado con 20 mM imidazol
<i>Buffer eluído (3 buffer con cantidades crecientes de imidazol, 2x volumen columna)</i>	ÄKTA <i>buffer</i> suplementado con 50, 200, y 500 mM imidazol
<i>Buffer de desalting</i>	50 mM Tris-HCl pH 9

---

**Tabla 4: Buffer y condiciones utilizados durante la purificación del 6xHis-Xpress-PPBD.**



## 4.12. Inmunofluorescencia

### 4.12.1. Inmunofluorescencia en levaduras

Realizar un cultivo ON en 5 mL YPD.

Al día siguiente, coger 0,7 OD en 5 ml YPD y cultivar durante 2 h. Tras esto, coger 1 OD y centrifugar 1 min a 14.000 rpm. Resuspender el pellet en 1 ml de Tris HCl 30 mM pH 8,9. Centrifugar durante 1 minuto a 14.000 rpm. Resuspender el pellet en 1 ml de Tris HCl 30 mM pH 8,9 + 10 mM DTT. Incubar durante 5 minutos a 30°C y centrifugar durante 5 minutos a 4.000 rpm. Resuspender el pellet en 200  $\mu$ L *sferoblasting buffer* con liticasa (0,5 M sorbitol; 0,05 M Kpi pH 7,5 en YPD con 0,2% glucosa + liticasa (1:1000)) e incubar durante 20 minutos a 30°C. Centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm. Resuspender el pellet en solución de fijación (2 ml Kpi 0,5 M pH 6,4 + 100  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM + 1 mL formaldehído al 37%) e incubar durante 15 minutos a 4°C.

Tras realizar 3 lavados con *sferoblasting buffer* (0,5 M sorbitol, 0,05 M Kpi pH 7,5 en YPD con 0,2% glucosa), colocar las levaduras en cubres tratados previamente con poly-L-Lisina dejar a 4°C durante 24h. A partir de aquí se procede con el protocolo de células.

### 4.12.2. Inmunofluorescencia en células

Colocar cubres de 12 mm de diámetro en placas p24 y tratarlos con poly-L-Lisina durante 1 h a 37°C. Tras esta incubación, realizar 3 lavados con PBS.

Sembrar las células en los cubres tratados. El número de células varía según la línea celular y los días que vayan a estar en cultivo. Para la puesta a punto del Xpress-PPBD se han sembrado 8x10<sup>4</sup> células/ml.

## *Material y métodos*

---

Fijar las células con paraformaldehído al 10% (PFA) durante 30 minutos a 4°C. Tras esto, incubar otros 30 minutos a TA. Retirar el PFA y añadir 500 µl de NH<sub>4</sub>Cl e incubar durante 20 minutos. Realizar 3 lavados con PBS. Tras este paso se pueden dejar las células a 4°C durante menos de una semana o continuar con el protocolo.

Permeabilizar 30 minutos con 0,25% de tritón. Tras esto, incubar las células con solución de bloqueo (suero de cabra al 2,5% y Tween®20 al 0,5% en PBS) durante 1h a TA. Mientras tanto, realizar la preincubación del 6xHis-Xpress-PPBD (concentración final 20 µg/ml) con el anticuerpo anti-Xpress (concentración final 5 µg/mL) en solución de bloqueo durante 1 h a 4°C en movimiento. Tras esto, incubar las células fijadas con el complejo 6xHis-Xpress-PPBD-α-Xpress ON a 4°C.

Tras 3 lavados con PBS, incubar las células durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario Alexa 488 α-mouse. Tras 3 lavados con PBS, incubar las células con Hoechst 33342 (1:1000) durante 5 minutos a TA. Posteriormente, montar las preparaciones en portaobjetos utilizando como medio de montaje Fluoromount-G®.

Las imágenes han sido tomadas con un microscopio Leica SP8 63x y se cuantifican con el software Fiji ImageJ.

### 4.13. Validación de la detección del polyP por inmunofluorescencia

#### 4.13.1. Validación *in vitro*

Se sigue el protocolo de la inmunofluorescencia pero, tras la permeabilización, se incuban las células con 1 µg de Ppx1 en buffer de Ppx1 durante 1 h a 42°C. Tras 3 lavados con PBS se continúa con el protocolo de inmunofluorescencia. Se tomaron fotografías con el microscopio Leica SP8 a 63x y se cuantificaron mediante Fiji-ImageJ.

#### 4.13.2. Validación *in vivo*

Se utilizó el sistema de plásmidos inducibles por doxiciclina pRetroX-Tet-on-Advanced y pRteroX-Tight-Pur. Se sembraron 30.000 células/ml de la línea estable HEK293T-pRetroX-Tight-Pur-NUDT3 en una placa p24 con cubres tratados previamente con poly-L-Lisina. A las 24 h se transfectaron con el plásmido regulado por doxiciclina p-Advanced. 48 h después, se indujo la expresión incubando con 0,125; 0,25; 0,5 o 1 µg/ml de doxiciclina durante 72 h. Tras esto, se lisaron células para estudiar la expresión de NUDT3 y se tomaron fotografías con el microscopio Leica SP8 a 63x. Las imágenes se cuantificaron mediante Fiji-ImageJ.

#### 4.14. Validación de la detección del polyP *in vivo*

##### 4.14.1. Construcciones

Todas las construcciones se insertaron en un plásmido de sobreexpresión pcDNA3.1 entre las dianas BamHI y EcoRI usando el kit In-Fusion HD Cloning kit y se comprobó la construcción mediante secuenciación. Se transformaron bacterias DH5α y se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit NZYMidiprep.

##### **pcDNA3.1-eGFP-PPBD**

Se realizó una amplificación por PCR del dominio PPBD usando los primers PPBD\_F2 y PPBD\_R2. Se fusionó con eGFP, amplificado con los primers GFP\_F1 y GFP\_R1.

##### **pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His**

Se realizó la amplificación del dominio PPBD con los primers PPBD\_F2 y PPBD\_R3. Se fusionó con eGFP, amplificado con los primers GFP\_F1 y GFP\_R1.

##### **pcDNA3.1-eGFP-His-PPBD**

## *Material y métodos*

---

Se realizó una amplificación por PCR del dominio 6xHis-Xpress-PPBD del plásmido usado para expresar el 6xHis-Xpress-PPBD usando los primers PPBD\_F3 y PPBD\_R2. Se fusionó con eGFP, amplificado con los primers GFP\_F1 y GFP\_R2.

### **pcDNA3.1-eGFP**

Se realizó la amplificación del eGFP con los primers GFP\_F1 y GFP\_R3.

### **pcDNA3.1-mCherry-PPBD**

Se realizó una amplificación por PCR del dominio PPBD usando los primers PPBD\_F4 y PPBD\_R2. Se fusionó con mCherry, amplificado con los primers mCherry\_F1 y mCherry\_R1.

### **pcDNA3.1-mCherry-PPBD-His**

Se realizó la amplificación del dominio PPBD con los primers PPBD\_F2 y PPBD\_R3. Se fusionó con mCherry, amplificado con los primers GFP\_F1 y GFP\_R1 puesto que los extremos de eGFP coinciden con los de mCherry.

### **pcDNA3.1-mCherry-LK-PPBD**

En este caso también se probó si el uso de un *linker* entre la proteína m-Cherry y el PPBD podría mejorar la visualización y se optó por el *linker* (Glu-Ala-Ala-Ala-Lys). Se realizó una amplificación del dominio PPBD usando los primers PPBD\_F5 y PPBD\_R2. Se fusionó con mCherry, amplificado con los primers mCherry\_F1 y mCherry\_R2.

### **pcDNA3.1-mCherry**

Se realizó la amplificación del mCherry con los primers mCherry\_F1 y mCherry\_R3.

#### 4.14.2. Puesta a punto y validación de la detección in vivo

Se sembraron 55.000 células/ml HEK293T en placas Ibidi  $\mu$ -Slide 8 Well high en medio DMEM sin glucosa, sin glutamina, sin rojo fenol suplementado (25 mM glucosa, 10% de FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina) y, a las 24 h, se transfectaron con las diferentes construcciones con FuGENE®. A las 48 h, se lisaron células para estudiar la expresión mediante western-blot y se tomaron fotografías con el Leica SP8 a 63x.

##### 4.14.2.1. Validación del pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His

Se partió de una línea estable de células HEK293T transfectadas con pRetroX-Tight-Pur-NUDT3 y seleccionadas con puromicina. De estas se sembraron 35.000 células/ml en placas Ibidi  $\mu$ -Dish 35 mm en medio DMEM sin glucosa, sin glutamina, sin rojo fenol suplementado (25 mM glucosa, 10% de FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina) y, a las 24 h, se transfectaron con pAdvanced. A las 24 h se añadió doxiciclina (0,5  $\mu$ g/ml) y a las 24 h se transfectaron con pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His. Tras 48 h se incubaron con NucSpot® Live 650 +25 mM verapamil según el protocolo de la casa comercial para la tinción de núcleos, se lisaron células para estudiar la expresión de eGFP-PPBD-His y NUDT3 y se tomaron fotografías con el microscopio Leica SP8 a 63x. Las imágenes se cuantificaron mediante Fiji-ImageJ. Se cuantificó la intensidad de la señal eGFP-PPBD por campo y se dividió por el número de células.

Como controles se utilizaron 3 variantes: células con ambos plásmidos (pRetroX-Tight-Pur-NUDT3 y pAdvanced) pero sin incubar con doxiciclina (construcción llamada 2), solo con pAdvanced (construcción llamada 3), y con pAdvanced y pRetroX-Tight-Pur  $\emptyset$ , sin nuestro gen de interés, e induciendo con doxiciclina (construcción llamada 4).

### 4.14.2.2. Validación del pcDNA3.1-mCherry-PPBD

Se sembraron 70.000 células/ml HEK293T en placas Ibidi  $\mu$ -Dish 35 mm en medio DMEM sin glucosa, sin glutamina, sin rojo fenol suplementado (25 mM glucosa, 10% de FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina) y, a las 24 h, se transfectaron con pcDNA3.1-mCherry-PPBD y pWPI-NUDT3. Como control se utilizaron células transfectadas con pcDNA3.1-mCherry-PPBD y pWPI- $\emptyset$ . A las 48 h se incubaron con Hoechst (1:10.000) para la tinción de núcleos, se lisaron células para estudiar la expresión de mCherry-PPBD y NUDT3 y se tomaron fotografías con el Leica SP8 a 63x. Las imágenes se cuantificaron mediante Fiji-ImageJ, cuantificando la intensidad de la señal mCherry-PPBD por campo y dividiendo por el número de células transfectadas bien con pWPI  $\emptyset$  o con pWPI-NUDT3.

### 4.15. Purificación de polyP

#### **Cultivo y lisis celular**

Sembrar  $4 \times 10^6$  células HEK293T en una placa p10.

A las 72 h, retirar el medio de las placas y lisar las células con 500  $\mu$ L de buffer AE.

#### **Extracción**

Añadir el lisado en un eppendorf de rosca con 40  $\mu$ L SDS 10% + 500  $\mu$ L fenol-cloroformo-IAA (Thermofisher). Se han probado diferentes casas comerciales cuyas referencias vienen especificadas en la tabla de materiales. Poner en termoblock a 65°C durante 10 minutos con agitación.

Incubar 5 minutos en hielo. Añadir 350  $\mu$ L de cloroformo y realizar un vortex 5 segundos. Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm.

Coger el sobrenadante y añadirlo a otro eppendorf con 400  $\mu$ L de cloroformo. Realizar un vortex de 5 segundos y centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm. Coger la fase acuosa.

### **Purificación**

En este momento se ha probado realizar una incubación con 10  $\mu$ g de DNAsa/RNAsa o 10  $\mu$ g de benzonasa a 37°C durante 2 h. Si no se realiza la incubación, se añade la fase acuosa a un eppendorf con 1 ml de etanol 100%. Realizar un vortex y dejar ON a -20°C.

También se ha probado realizar la purificación por columna mediante el kit PCR Clean-Up System de Promega siguiendo el protocolo de la casa comercial.

A día siguiente, centrifugar 20 minutos a 14.000 rpm 4°C. Descartar sobrenadante. Añadir 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm. Descartar sobrenadante y dejar secar el pellet. Resuspender en 100  $\mu$ L de agua bidestilada. Se puede congelar a -20°C o continuar directamente con la cuantificación.

### **Cuantificación del polyP purificado**

Se realiza una incubación con 10  $\mu$ L del polyP purificado, junto con 3  $\mu$ g de Ppx1 en buffer Ppx1 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM acetato de amonio, 5 mM acetato de magnesio) en un volumen final de 20  $\mu$ L. El ensayo se realiza a 37°C durante 3 h. Como control negativo se realiza el mismo ensayo, pero sin Ppx1.

El fosfato libre producto de la reacción se cuantifica cada media hora cogiendo 3  $\mu$ L de esta reacción y añadiéndolos a un pocillo de p96 con 97  $\mu$ L agua millipore. A esto se añaden 86  $\mu$ L de heptamolibdato de amonio 28 mM / ácido sulfúrico 2,1 M y 64  $\mu$ L de solución de verde de malaquita. La reacción se cuantifica mediante espectrofotometría (Synergy HT, Bio Tek Instruments) a 595 nm utilizando como estándar una recta patrón de fosfato (0-500  $\mu$ M Pi). Se toma como valor para la cuantificación del polyP la media de los dos valores más altos de las distintas mediciones.

### **Efecto de los iones divalentes sobre la actividad polifosfatasa de Ppx1**

Se realizó un ensayo con 2 ng de Ppx1 y 2 µg de polyP100 durante 90 minutos a 37°C en presencia de 5 mM de diferentes iones.

También se incubaron 2 µg de polyP100 durante 90 minutos a 37°C con 2 ng de Ppx1 en presencia de 5 mM de diferentes iones a diferentes pH (pH 5,5; pH 7,5 y pH 8,5).

### **Efecto de las poliaminas sobre la actividad polifosfatasa de Ppx1**

Se incubaron 2 µg de polyP100 con diferentes porcentajes en moles de espermina. Se realizó el ensayo en presencia de 2 ng de Ppx1 durante 90 minutos a 37°C.

### **Especificidad de sustrato de Ppx1**

Se incubaron 20 µg de RNA de HEK293T y 20 µg de htDNA con 3 µg de Ppx1 o 5U de fosfatasa alcalina (FA) durante 150 minutos a 37°C.

Por otro lado, se incubó 2 µg polyP130 con 3 µg de Ppx1, 3 µg Ppx1 inactiva 5U de FA, 0,5 U de pirofosfatasa y 10 µg de DNAsa/RNAsa durante 20 minutos a 37°C.

Por último, se incubó polyP purificado de HEK293T con 3 µg de Ppx1, 3 µg Ppx1 inactiva 5 U de FA, 0,5 U de pirofosfatasa y 10 µg de DNAsa/RNAsa durante 150 minutos a 37°C.

### **Efecto de los inhibidores de fosfatasas sobre la actividad polifosfatasa de Ppx1**

Se incubó 1 µg de polyP130 con 10 mM NaF, 100 µM ortovanadato, 25 mM β-glicerol, coctel inhibidor de fosfatasas Pierce™ (IP) o 10 mM NaPPI y se realizó el ensayo en presencia de 3 µg de Ppx1 durante 60 minutos a 37°C. Como control negativo no se añadió polyP130 ni Ppx1.

### **Uso conjunto de Ppx1 y otras fosfatasas**

Se incubaron 10  $\mu$ L de polyP purificado de HEK293T con 3  $\mu$ g Ppx1 +/- 3  $\mu$ g de Ddp1 durante 180 minutos a 37°C. El ensayo con Ppx1 y Ppx1 + Ddp1 se realizó con buffer de Ppx1 y el ensayo de Ddp1 se realizó con buffer de Ddp1.

Por otro lado, se incubaron 1,5  $\mu$ g polyP100 con 3  $\mu$ g Ppx1 +/- 0,2 U pirofosfatasa durante 60 minutos a 37°C.

#### 4.16. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares

##### **Líneas celulares modelo**

Para estimar las cantidades de polyP presentes en estas líneas, se ha partido de cultivos iniciales de 4 millones células en el caso de HEK293T y 5 millones de células en el caso de HEK293 y HeLa y se procedió a la purificación 72 h después.

##### **Líneas celulares de pulmón**

Se partió de un cultivo de 5 millones de células en el caso de A549 y de 8 millones en el caso de MRC-5 y H1395 y se purificó polyP 72 h después.

##### **Líneas celulares de cerebro**

Se partió de un cultivo de 5 millones de células tanto en el caso de las U-87 como en el caso de las SH-SY5Y y se procedió con la purificación bioquímica 72 h después.

En el caso de los cultivos primarios de neuronas corticales, para tener suficientes células de partida, se sembraron tres placas de 10 mm tratadas con 50  $\mu$ g/mL de poli-D-lisina disuelta en PBS con 5 millones de células en cada una de ellas. Cada 72 h se realizó un cambio de medio dónde se retira una quinta parte del medio y se reemplaza por medio fresco. Se procedió con la purificación del polyP tras 7 días de cultivo.

### **Líneas celulares de colon**

Se partió de 5 millones de células iniciales en el caso de HT-29 y LoVo y de 1,35 millones en el caso de las CCD-18Co y se purificó polyP 72 h después.

### **Líneas celulares de mama**

Se partió de un cultivo de 5 millones de células para ambas líneas y se purificó polyP 72 h después.

## **4.17. Estudio de las variaciones de polyP en función de las condiciones de cultivo**

### **4.17.1. Hipoxia**

Se sembraron  $4 \times 10^6$  células HEK293T iniciales y se cultivaron durante 24, 48 y 72 h bien en un incubador en condiciones estándar o en un incubador con hipoxia (1% de  $O_2$ ). Se contaron células y se purificó polyP bioquímicamente cada 24 h.

### **4.17.2. Diferentes confluencias y tiempo de cultivo**

#### **Efecto de la confluencia final del cultivo**

Se sembraron  $4 \times 10^6$  células HEK293T en 8 placas p10 para purificar polyP a 48, 72, 96 y 120 h. En cada punto de purificación, una placa era usada en la purificación y otra era usada para el conteo celular. En el momento de la siembra, del mismo flask de células confluyente, se purificó polyP de  $20 \times 10^6$  células.

Por otro lado, se sembraron 10 placas p10 con diferentes cantidades de células HEK293T según el momento de purificación del polyP: para purificar polyP a 24h se sembraron 2 placas con  $20 \times 10^6$  células;

para 48 h,  $10 \times 10^6$ ; para 72 h,  $5 \times 10^6$ ; para 96 h,  $2 \times 10^6$  y para 120 h,  $1 \times 10^6$  células. Como en el caso anterior, se usó una placa para purificar polyP y otra para contar células en cada punto final.

### **Efecto de las divisiones celulares**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml de células Jurkat en un flask 175 con 135 ml de medio. Cada 24-48 h se calculaba la viabilidad del cultivo usando *trypan blue* y se extraían 9 millones de células vivas para purificar polyP. Se mantuvo el cultivo y se fue purificando polyP mientras que el porcentaje de células muertas en el cultivo no fue superior al 20%

#### **4.17.3. Diferentes concentraciones de glucosa**

Se compararon 3 concentraciones diferentes de glucosa: 25 mM, 5 mM y 1 mM. Se sembraron varias placas p10 con 4 millones de células HEK293T iniciales en medio DMEM completo y, tras 24 h, se les cambió el medio de cultivo según la condición de concentración de glucosa. En este momento, antes del cambio de medio, se purificó polyP ( $t_0$ ). Tras 24, 48 o 72 h de cultivo se purificó polyP bioquímicamente de cada una de las condiciones, teniendo siempre una placa p10 para purificar polyP y una placa para contar células finales.

#### **4.17.4. Cultivo en medio sin fosfato**

Se sembraron varias placas p10 con  $4 \times 10^6$  células HEK293T en medio DMEM completo. Tras 24 h, se cambió el medio bien a DMEM completo o a DMEM sin fosfato. En este momento se purificó polyP ( $t_0$ ). Se purificó polyP y se contaron las células a 16, 24, 48, 72 y 96 h.

Paralelamente, para estudiar la recuperación del polyP, se sembraron  $4 \times 10^6$  de células HEK293T en medio DMEM completo. A las 24 h, se les cambio el medio a DMEM sin fosfato y, tras 48 h en este medio, se les volvió a cambiar a DMEM completo. Esta condición aparece como DMEM recuperación. Se purificó polyP y se contaron células 24 h después del cambio de medio (72 h desde el cambio de medio inicial) y tras 48 h (96 h desde el cambio de medio inicial).

### 4.18. Medidas en condiciones de estrés

#### **Dinámica del polyP frente al daño al ADN**

Se sembraron 90.000 células/ml de HEK293T en placas p24 con cubres previamente tratados con poly-L-lisina, como viene indicado en el protocolo de inmunofluorescencia, y, a las 24h, se trataron con diferentes dosis de cisplatino y se fijaron a diferentes tiempos. En el caso de las células fijadas a tiempos cortos, de  $t_0$  (cuando se administró el fármaco) a 8 h, se trataron con 20  $\mu\text{g/ml}$  de cisplatino. Las células que iban a estar más tiempo con el fármaco, de 24 a 48 h, se trataron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de cisplatino. Tras fijar las células al tiempo correspondiente, se realizó la inmunofluorescencia y se tomaron fotografías con un Leica SP8 a 63x.

Se han realizado 3 experimentos y cada valor independiente representa un campo con una media entre 20-100 células por campo. Como análisis estadístico se realizó un test ANOVA de dos vías comparando las células tratadas con las no tratadas.

#### **Estudios de viabilidad tras daño al DNA: ensayos MTT**

Se sembraron 30.000 células/ml de HEK293T y se transfectaron 24 h después, o bien con pWIPI-NUDT3 para los estudios de depleción del polyP, o bien se realizó un crispr con el vector pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 con un guide para NUDT3 para aumentar el polyP celular. Tras 72 h se trataban las células con cisplatino (20 o 30  $\mu\text{g/ml}$ ) y a las 48 h del tratamiento se realizaba el ensayo MTT. Para ello, se añadían 60  $\mu\text{l}$  de MTT por pocillo de p24. Tras 1 h en el

incubador, se retiraba el medio y se añadían 500 µl de DMSO. Como análisis estadístico se realizó un test ANOVA de dos vías con múltiples comparaciones.

**Estudios de viabilidad tras daño al DNA: ensayos *colony-forming unit***

Se sembraron 80.000 células/ml de HEK293T y se transfectaron al día siguiente con el vector pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 con un guide para NUDT3. A las 72 h se trataron con 1; 0,5 o 0,25 µg/ml de cisplatino y a las 24 h del tratamiento se sembraron para el ensayo del *colony-forming unit*.

Para ello, se tripsinizan las células, se cuentan y se hace la media de dos contajes independientes. Se siembran 500 células/ml en placas de p6. En este punto es importante mover mucho las placas para que las células queden bien repartidas. A los 7 días, se procede a la tinción de las colonias. Para la tinción hay que retirar el medio. Fijar con 1 ml de metanol frío e incubar 5 minutos a -20°C. Tras esto, se retira el metanol y se añade 1 ml de cristal violeta. Tapar e incubar 30 minutos a TA.

Recoger el cristal violeta. Lavar con 2 ml de PBS. Retirar y hacer fotografías. Para cuantificar con cristal violeta: Añadir 1 ml de ácido acético 10%. Poner en el balancín 30 minutos. Medir la absorbancia a  $A_{595nm}$ .

#### 4.19. Purificación de polyP de tejidos de ratón

Para purificar polyP de tejidos el protocolo se ha basado en el protocolo de Kumble y Kornberg (Kumble & Kornberg, 1995) con algunas modificaciones.

Se coloca el tejido con bolas de porcelana y 2,5 volúmenes (g/ml) de buffer de lisis (50 mM Tris HCl pH 7,5; 1 M urea; 0,1% SDS; 10 mM EDTA; 0,25 M sacarosa). Se disgrega con FastPrep-24™ 5G (MP

## *Material y métodos*

---

Biomedicals™ 116005500) realizando 6 ciclos de 30 segundos a 6,5 m/s. Tras cada ciclo se enfrían en hielo.

Centrifugar 2 minutos a 2000 rpm. Extraer el sobrenadante y sonicar 6 ciclos de 30 segundos a 30 kHz.

Incubar con 750 µg/ml de proteinasa K durante 1 h a 50°C. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm. Recoger la fase acuosa y continuar con la purificación de polyP con el método de fenol-clorofomo explicado con anterioridad.

Para la realización de la diálisis, se utilizaron columnas Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Devices de 2K MWCO (ThermoFisher # 69580).

## *Resultados*

---



## 5. Resultados

### 5.1. Puesta a punto y validación de técnicas de inmunofluorescencia

Como se ha introducido anteriormente, el polyP es una molécula presente en todos los organismos vivos, aunque está descrito que en mamíferos su concentración es mil veces inferior que en unicelulares (Kumble & Kornberg, 1995). Numerosos grupos de investigación están trabajando en encontrar métodos más sensibles de detección y cuantificación de esta molécula que los utilizados para organismos unicelulares. Durante mi tesis he desarrollado tres métodos diferentes tanto para su detección y visualización *in vivo* como para su purificación y cuantificación *in vitro*. El primer método que se describe es la utilización del domino PPBD como herramienta para detectar polyP mediante inmunofluorescencia en líneas celulares humanas.

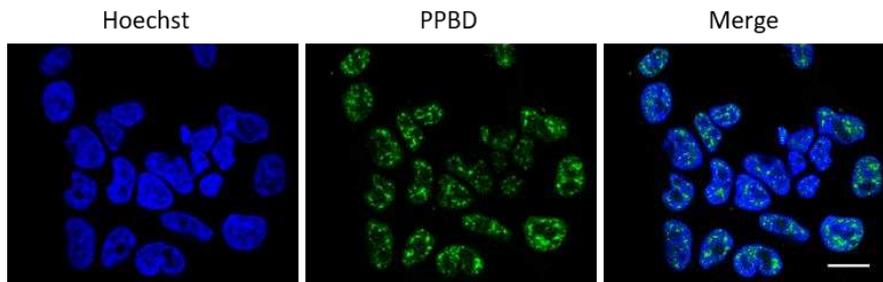
Esta herramienta fue descrita previamente para la detección específica de polyP en levaduras (Saito et al., 2005). Desde entonces, muchos han sido los grupos que han intentado utilizar esta herramienta para detectar polyP en células humanas, aunque la señal conseguida dista bastante de algo específico y localizado (Arredondo et al., 2022; Boyineni et al., 2020). Teniendo en cuenta este escenario previo, lo primero que se decidió fue intentar demostrar que la señal obtenida con el PPBD por inmunofluorescencia en células humanas es específica de polyP.

Para la puesta a punto de este método se ha seleccionado la línea celular HEK293T, al ser una de las líneas estudiadas a priori con más polyP (Kumble & Kornberg, 1995). Como se puede observar en la figura 8, la señal del PPBD es una señal mayoritariamente nuclear y con un patrón punteado que curiosamente coincide con aquellas regiones con ausencia de señal por marcaje de ADN. Esto concuerda con datos anteriores que argumentaban que la mayor parte del

## Resultados

---

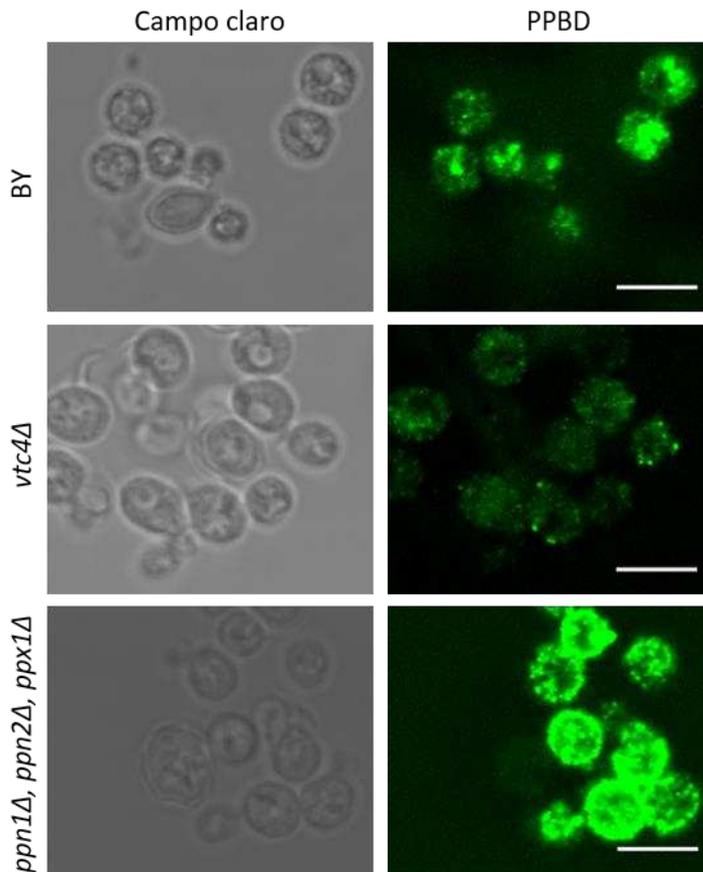
polyP intracelular se encuentra en el núcleo de la célula (Kumble & Kornberg, 1995).



**Figura 8: Inmunofluorescencia realizada con el PPBD.** Inmunofluorescencia realizada con el PPBD en células HEK293T. En el primer panel se observa la señal nuclear del Hoechst como marcaje de ADN. En el segundo panel se puede ver la señal del His-Xpress-PPBD. Imágenes representativas tomadas en un Leica SP8 63x. Barra de escala: 15  $\mu$ m

A continuación, para poder validar la especificidad de la señal obtenida se decidió repetir la inmunofluorescencia con células que tuvieran alterados los niveles de polyP, tanto en levaduras como en líneas celulares humanas.

Para la validación en levaduras se realizó la inmunofluorescencia en 3 cepas diferentes que difieren en sus niveles de polyP intravacuolares. Se comparó la cepa salvaje BY4741 con una cepa *vtc4 $\Delta$* , la cual no puede sintetizar polyP, y una *ppn1 $\Delta$* , *ppn2 $\Delta$* , *ppx1 $\Delta$* , la cual no puede degradarlo. En la figura 9 se observa como la señal es más intensa en la cepa *ppn1 $\Delta$* , *ppn2 $\Delta$* , *ppx1 $\Delta$*  puesto que no posee polifosfatasas y, por tanto, acumula más polyP. Esta señal decae progresivamente según la cantidad de polyP presente en la levadura, siendo menor en la cepa *wild-type* (BY) y casi ausente en la cepa *vtc4 $\Delta$*  que no puede sintetizar polyP, demostrando así que, al menos en levaduras, la señal obtenida utilizando el PPBD es específica de polyP.



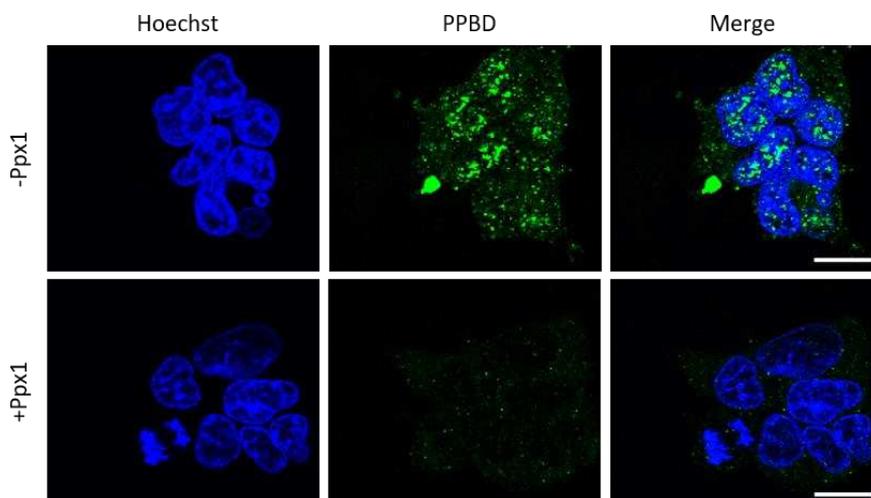
**Figura 9: Validación del PPBD en levaduras.** Inmunofluorescencia realizada con Xpress-PPBD en las cepas de levaduras BY (*wild-type*), *vtc4Δ* (sin polyP) y *ppn1Δ*, *ppn2Δ*, *ppx1Δ* (sin polifosfatasa y, por ello, con más polyP). Primer panel: campo claro. Segundo panel: señal del His-Xpress-PPBD. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

Una vez validado el PPBD en levaduras, se pasó a validar su señal en células HEK293T. Se siguió el mismo razonamiento anterior: para poder validar la señal debíamos ser capaces de modificar los niveles de polyP. Para ello se llevaron a cabo dos aproximaciones. La primera aproximación fue *in vitro*, mediante el uso de la exopolifosfatasa Ppx1 de levaduras, la cual está ampliamente demostrado que degrada polyP de forma específica (Wurst, Shiba, & Kornberg, 1995). La segunda aproximación fue *in vivo*, mediante

## Resultados

la sobreexpresión de la endopolifosfatasa humana NUDT3 en las células HEK293T (Samper-Martin et al., 2021).

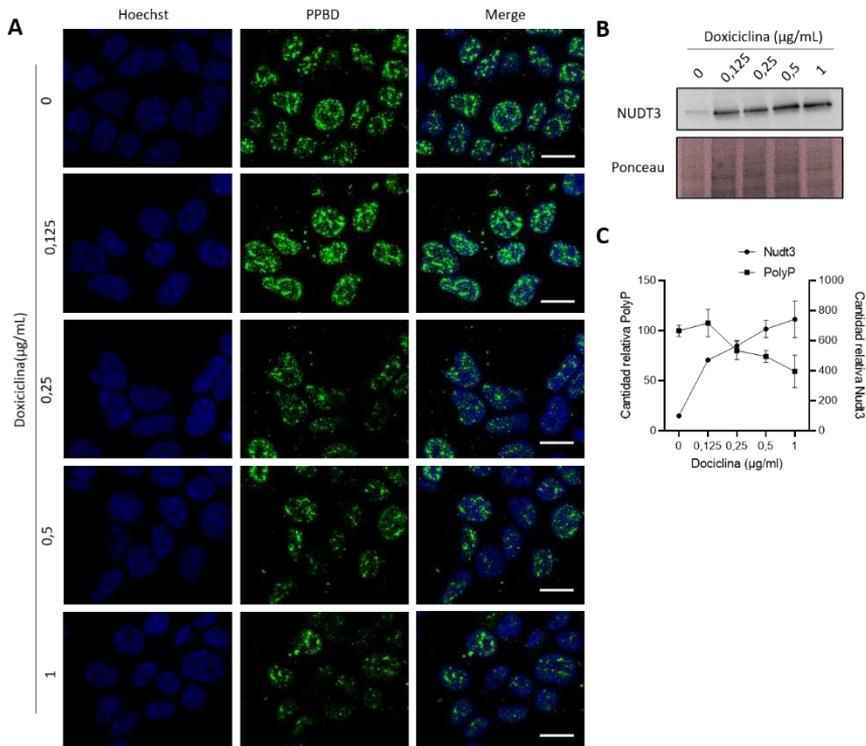
Para la validación *in vitro* se han incubado las células fijadas con scPpx1 recombinante. Tal y como se observa en la figura 10, en las células que se han incubado con Ppx1, la señal disminuye significativamente, probablemente debido a que el polyP presente en las células ha sido degradado por Ppx1. Esto sugiere que la detección con PPBD es específica de polyP.



**Figura 10: Validación *in vitro* del PPBD en células HEK293T.** Imágenes representativas tomadas en un Leica SP8 63x de células HEK293T, previamente permeabilizadas con 0,25% de tritón, mediante la incubación con scPpx1 durante 1 h a 42°C. En el primer panel vemos la señal del ADN mediante tinción Hoechst. En el segundo panel vemos la señal del His-Xpress-PPBD. Barra de escala: 15  $\mu$ m.

Para acabar de demostrar la especificidad del método, se pasó a validar la señal variando los niveles de polyP *in vivo* con la sobreexpresión de la endopolifosfatasa humana NUDT3 en las células HEK293T. Para ello, se usó un sistema de expresión inducible para intentar correlacionar la actividad enzimática de NUDT3 con la cantidad de polyP en la célula. La sobreexpresión de NUDT3 se indujo mediante la exposición de las células a concentraciones crecientes de doxiciclina durante 72 h.

Como se puede observar en la figura 11A, la señal de PPBD disminuye significativamente a medida que aumenta la concentración de doxiciclina. Además, este aumento en la concentración de doxiciclina deriva en un aumento progresivo de la cantidad de NUDT3 celular (Figura 11B). Cuando se cuantificó tanto la señal de PPBD por inmunofluorescencia como la señal de NUDT3 por Western-blot, se pudo ver como el aumento de NUDT3 está perfectamente correlacionado con la disminución de la señal por PPBD (Figura 11C). En conjunto, estos resultados demuestran que el dominio PPBD es específico contra polyP y es una herramienta válida para detectar polyP en líneas celulares humanas.



**Figura 11: Validación in vivo del PPBD en HEK293T transfectadas con pRetroX-Tight-Pur-NUDT3. A:** Inmunofluorescencia realizada con Xpress-PPBD. Imágenes representativas tomadas en un Leica SP8 63x. Las sucesivas imágenes muestran cantidades crecientes de doxiciclina que se traducen en mayor expresión de NUDT3. En el primer panel vemos la señal del ADN mediante tinción Hoechst. En el segundo panel vemos la señal del His-Xpress-PPBD. Barra de escala: 15 µm. **B:** Evaluación por western blot de la inducción de NUDT3 tras 72 h de incubar con diferentes cantidades de doxiciclina. **C:** Representación de la cuantificación de la caída de señal vista por inmunofluorescencia y la presencia de NUDT3. Se han cuantificado mediante Fiji-ImageJ 5 campos de 3 experimentos independientes, con unas 200 células por condición.

Las técnicas de inmunofluorescencia presentan muchas ventajas y la validación del uso del PPBD en inmunofluorescencia es una herramienta importante para poder estudiar cantidad y localización del polyP a punto final, pero no es la mejor herramienta para ver

dinámicas y hacer experimentos de *time-lapse*. El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de nuevos métodos de detección del polyP y es por ello que, una vez validado el uso del PPBD por inmunofluorescencia, se quiso poner a punto y validar su uso para la detección del polyP *in vivo*.

### 5.2. Puesta a punto y validación de la detección *in vivo*

En bacterias se ha visto que el metabolismo del polyP juega un papel importante, en respuesta a la falta de nutrientes en el medio y otro tipo de estrés (Beaufay et al., 2020; Gray, M. J. et al., 2014). En levaduras se mantienen estas funciones y se observan otras, como su relación con el ciclo celular (Bru et al., 2016). Estas dinámicas en el metabolismo del polyP podrían estar conservadas evolutivamente y mantenerse en células humanas. La visualización del polyP *in vivo* nos permitiría su estudio de una forma precisa y continuada.

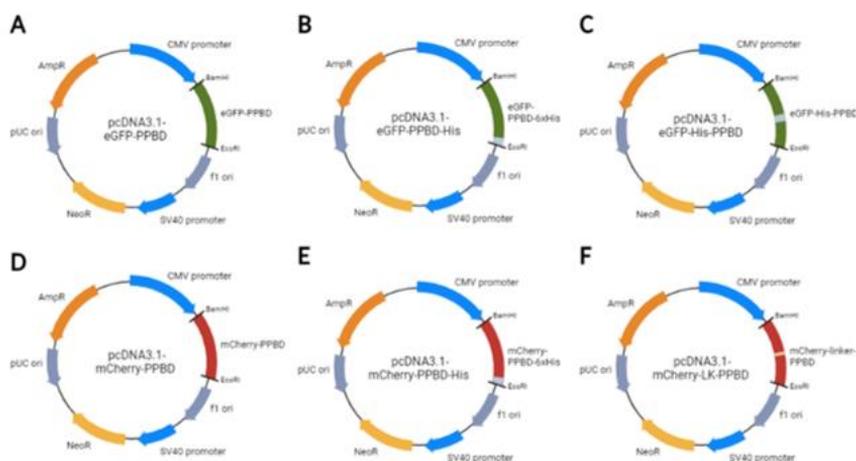
Para poder visualizar el polyP *in vivo* se pensó en fusionar el dominio PPBD con una proteína fluorescente. La recomendación general para la puesta a punto de la detección *in vivo* mediante fluorescencia es que se debe probar un gran abanico de construcciones, abarcando tanto diferentes proteínas fluorescentes, como en varias posiciones dentro de la construcción. Esto es debido a que las proteínas fluorescentes suelen tener un tamaño importante comparándolo con la proteína que quieres marcar e incluso algunas pueden formar agregados y pueden llegar a interferir en funcionamiento natural y/o localización de tu proteína marcada (Ettinger & Wittmann, 2014).

Siguiendo este razonamiento, primero se fusionó el PPBD a la proteína fluorescente eGFP (figura 12A). Una construcción similar ha sido antes utilizada para la detección de polyP en células previamente fijadas (Xie et al., 2019). Como alternativas a esta construcción y viendo que las histidinas, por su carácter básico,

## Resultados

podrían ayudar a la unión con el polyP (Truong et al., 2022), se añadieron dos construcciones más (figura 12B y C).

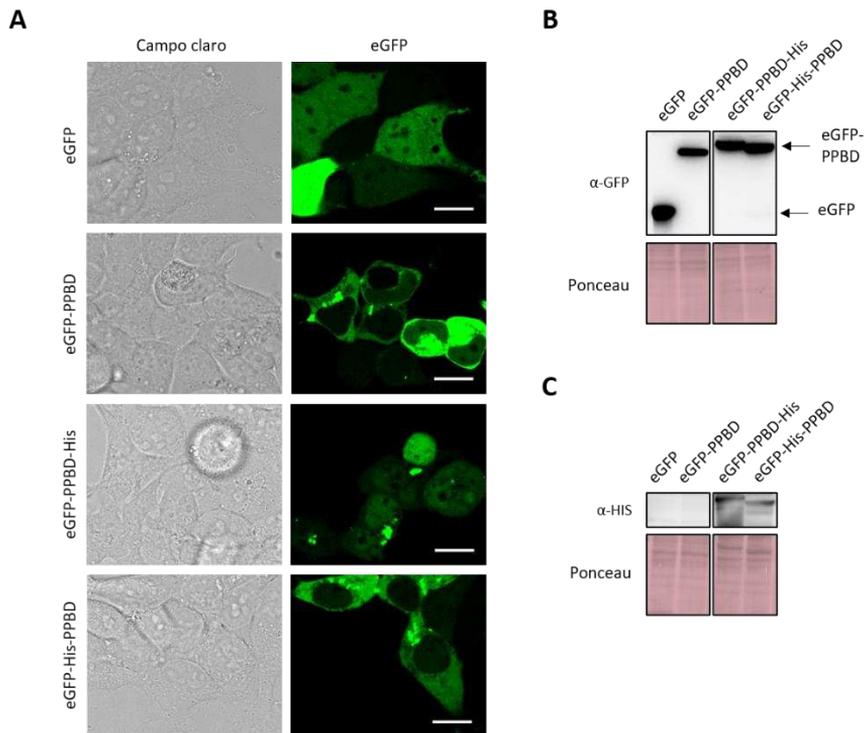
La proteína eGFP, entre otras características, puede formar agregados, mientras que hay otras proteínas, como es el caso de mCherry, que son monoméricas. Es por ello que se creó otro conjunto de construcciones fusionando el PPBD con la proteína fluorescente mCherry. El esquema de las construcciones fue el mismo que el de las construcciones con eGFP (figura 12D y E). En este caso también se probó si el uso de un *linker* entre la proteína mCherry y el PPBD podría mejorar la visualización (figura 12F).



**Figura 12: Representación gráfica de los plásmidos con PPBD usados para la visualización del polyP in vivo. A, B y C: Construcciones eGFP-PPBD. A:** plásmido pcDNA3.1-eGFP-PPBD dónde el PPBD se ha fusionado a eGFP. **B:** plásmido pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His dónde el PPBD se ha fusionado a eGFP y se le han añadido 6xHis en el C terminal. **C:** plásmido pcDNA3.1-eGFP-His-PPBD dónde el PPBD se ha fusionado a eGFP y se le han añadido 6xHis entre el eGFP y el PPBD. **D, E y F: Construcciones mCherry-PPBD. D:** plásmido pcDNA3.1-mCherry-PPBD dónde el PPBD se ha fusionado a mCherry. **E:** plásmido pcDNA3.1-mCherry-PPBD-His dónde el PPBD se ha fusionado a mCherry y se le han añadido 6xHis. **F:** plásmido pcDNA3.1-mCherry-LK-PPBD dónde el PPBD se ha fusionado a mCherry usando el *linker* 2x(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser). En todos los casos se han insertado las construcciones en un pcDNA3.1 por las dianas de restricción BamHI/EcoRI.

Primero, se han estudiado las construcciones basadas en eGFP-PPBD. Se transfectaron células HEK293T con los diferentes plásmidos y, a las 48 h, se tomaron imágenes de la señal del eGFP (figura 13A). Paralelamente se comprobó tanto la expresión del eGFP como la expresión de las histidinas por Western blot (figura 13B y C). En la figura 13A se puede ver como la señal de las tres construcciones con PPBD (eGFP-PPBD, eGFP-PPBD-His y eGFP-His-PPBD) es similar entre ellas, mostrando una señal definida y localizada alrededor del núcleo, mientras que, en el caso del control, con células transfectadas con el plásmido solo con eGFP, se trata de una señal difusa por toda la célula. Este resultado, que muestra un marcaje definido y localizado producido por las construcciones con PPBD, sugiere que esta señal podría ser marcaje específico de polyP.

## Resultados

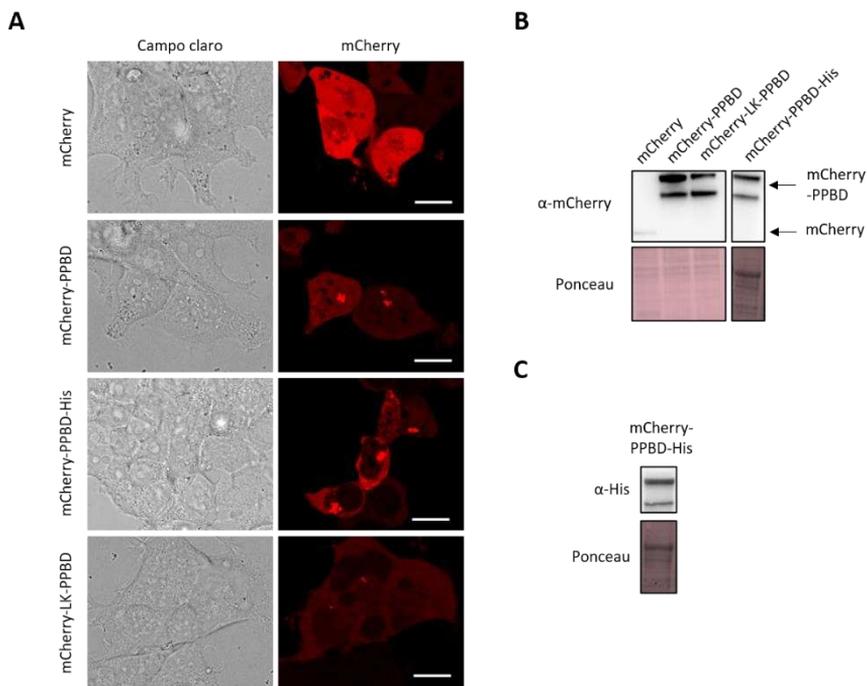


**Figura 13: Expresión y visualización de las construcciones con eGFP fusionado a PPBD. A:** Imágenes representativas de las construcciones con eGFP tomadas en un Leica SP8 a 63x. En el primer panel se muestra el campo claro. En el segundo panel se muestra la señal del eGFP. Barra de escala: 15  $\mu$ m. **B:** Western Blot comprobatorio de la expresión de eGFP. **C:** Western blot comprobatorio de la expresión de las histidinas. Como control de carga se ha utilizado la tinción ponceau.

A continuación, se comprobó la señal de las construcciones basadas en mCherry-PPBD. Se transfectaron HEK293T con los plásmidos de las construcciones con mCherry-PPBD y, a las 48 h, se tomaron imágenes (Figura 14A). Como en el caso del estudio de las construcciones con eGFP, se comprobó la expresión tanto de la proteína mCherry como de las histidinas por Western blot (Figura 14B y C). En la figura 14A se observa que en el caso de las células transfectadas solo con mCherry, la señal es una señal difusa por toda la célula, mientras que en las construcciones con PPBD se aprecia

una señal más localizada, igual que ocurría con las construcciones de eGFP.

Ambas construcciones, tanto con eGFP como con mCherry, dan un marcaje muy similar. Este resultado refuerza la idea de que el PPBD podría utilizarse para marcar polyP *in vivo*. En el caso de la visualización por inmunofluorescencia, se visualizaba el polyP nuclear. En este caso, nuestra señal está localizada alrededor del núcleo, por lo que podría estar marcando otras posibles localizaciones y/o poblaciones del polyP.



**Figura 14: Expresión y visualización de las construcciones con mCherry y PPBD.**  
**A:** Imágenes representativas de las construcciones con mCherry tomadas en un Leica SP8 a 63x. En el primer panel se muestra el campo claro. En el segundo panel se muestra la señal del mCherry. Barra de escala: 15  $\mu$ m. **B:** Western blot comprobatorio de la expresión de mCherry. **C:** Western blot comprobatorio de la expresión de las histidinas. Como control de carga se ha utilizado la tinción ponceau.

Tras obtener estos resultados, era necesario validar ambas señales y demostrar si este marcaje era específico de polyP o no.

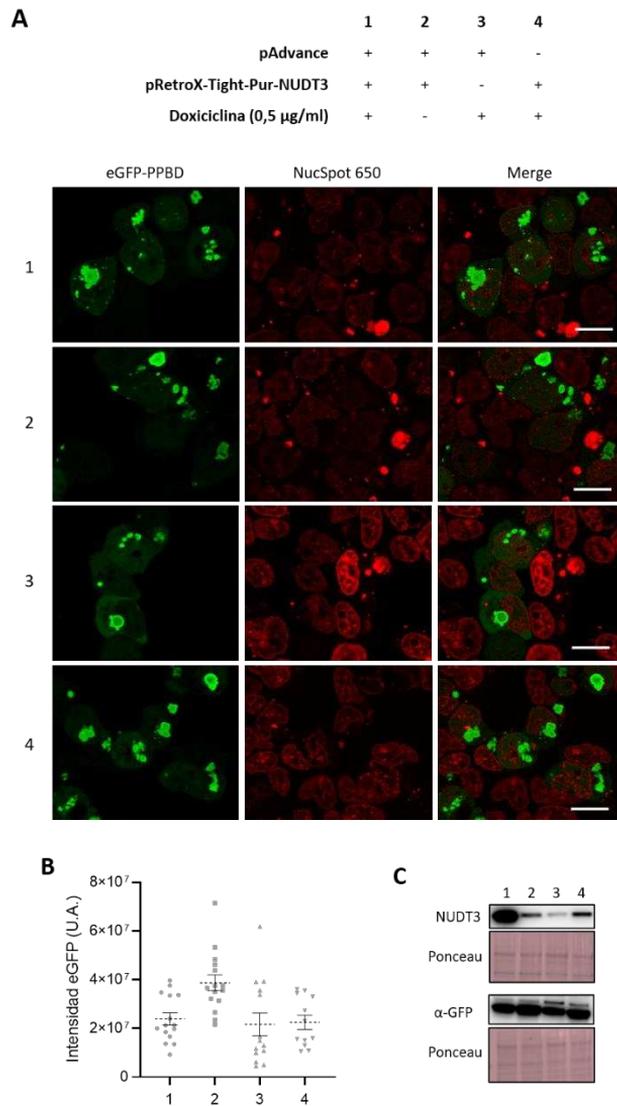
### 5.2.1. Validación de la visualización *in vivo*

Para poder validar esta señal, se prosiguió con el mismo razonamiento del capítulo anterior y se utilizó la sobreexpresión de la polifosfatasa humana NUDT3 para disminuir los niveles de polyP celular.

#### 5.2.1.1. Validación del pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His

En el caso de las construcciones basadas en eGFP y viendo que la señal era similar en todas las construcciones, se pasó a validar la señal del pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His y, para sobreexpresar NUDT3, se utilizó el sistema de plásmidos inducibles. Primero, se sobreexpresó NUDT3 durante 24 h. En ese punto, se transfectaron las células con pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His y, a las 48 h de sobreexpresión de eGFP-PPBD-His, se tomaron fotografías (Figura 15A). En todo momento se siguió tanto la expresión de NUDT3 como la expresión de eGFP-PPBD-His mediante Western blot (figura 15C).

En la figura 15A se observa que la intensidad de señal entre las células que sobreexpresan NUDT3 y los controles dónde se ha incubado con doxiciclina es muy similar. Por otro lado, el control sin doxiciclina presenta una intensidad de señal mayor. Una vez cuantificadas las señales, se ha obtenido una media de intensidad de señal de  $2,38 \times 10^7$  U.A. en el caso de las células que sobreexpresan NUDT3, y medias de  $3,87 \times 10^7$ ;  $2,16 \times 10^7$  y  $2,25 \times 10^7$  U.A. en el caso de los controles (figura 15B). Después de realizar 3 experimentos independientes, y viendo las diferencias de intensidad entre los propios controles y la sobreexpresión de NUDT3, los resultados no han sido concluyentes y no se ha podido dar por validada esta señal.



**Figura 15: Validación del pcDNA3.1-eGFP-PPBD-His mediante la sobreexpresión de NUDT3 en HEK293T.** **A:** Imágenes representativas tomadas in vivo en un Leica SP8 63x de la señal eGFP-PPBD-His en HEK293T donde se ha sobreexpresado NUDT3 transfectando con el sistema de plásmidos inducibles. En la tabla podemos observar un resumen de los plásmidos transfectados en cada condición. Primer panel: señal del eGFP. Segundo panel: marcaje del ADN mediante NucSpot 650. Barra de escala: 15 µm. **B:** Cuantificación de la señal eGFP-PPBD mediante Fiji-ImageJ. Se han realizado 3 experimentos y cada símbolo representa un campo con una media de entre 60 a 130 células por campo. **C:** Western blot comprobatorio de la expresión de eGFP-PPBD-His y de la sobreexpresión de NUDT3 utilizando en ambos casos la tinción ponceau como control de carga.

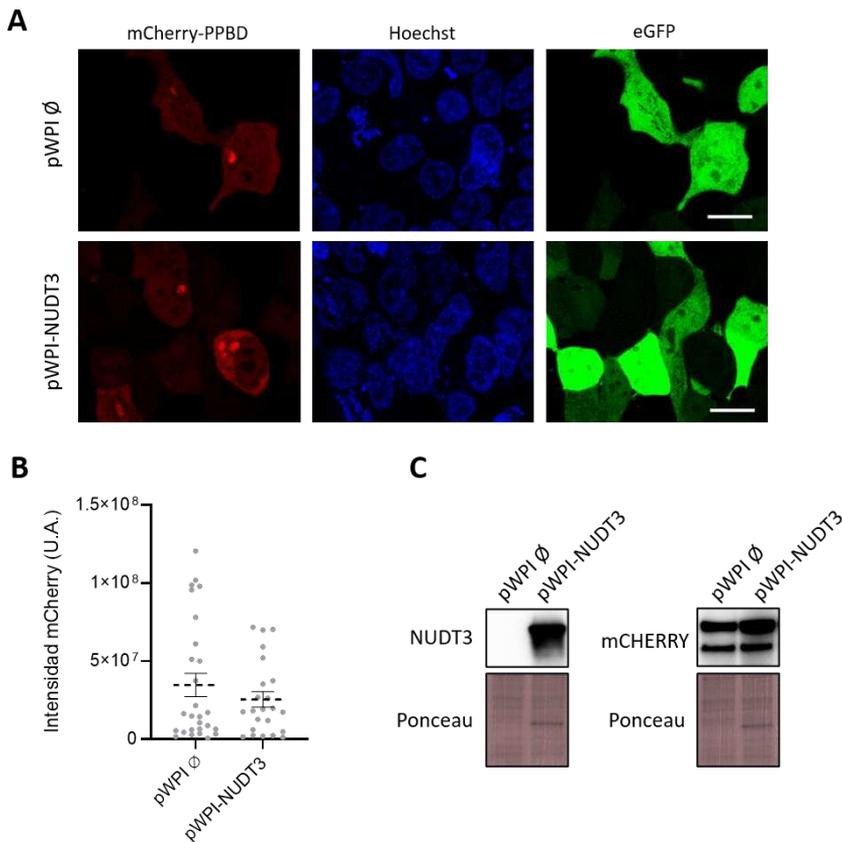
### 5.2.1.2. Validación del pcDNA3.1-mCherry-PPBD

En el caso de las construcciones basadas en mCherry, se decidió validar la señal del pcDNA3.1-mCherry-PPBD usando el plásmido de sobreexpresión pWPI-NUDT3, que permite por un lado la sobreexpresión de la proteína mediante un promotor constitutivo y, por otro, discriminar las células transfectadas por microscopía mediante la expresión de eGFP.

Se transfectaron HEK293T a la vez con pcDNA3.1-mCherry-PPBD y pWPI-NUDT3 y a las 48 h se tomaron fotografías (figura 16A). En todo momento se siguió la expresión tanto de mCherry como la sobreexpresión de NUDT3 por Western blot (figura 16C).

Tras cuantificar 3 experimentos independientes, al sobreexpresar NUDT3 se observó una disminución en la intensidad de la señal del mCherry-PPBD, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p$ value=0,81) (figura 16B). Ambas condiciones mostraron el mismo patrón de señal y la sobreexpresión de ambos plásmidos fue correcta.

Estos resultados podrían indicar que, aunque a priori la sobreexpresión de NUDT3 es el método más adecuado para validar la señal, sería necesario buscar algún método alternativo ya que la unión del PPBD al polyP podría estar interfiriendo con la unión o actividad catalítica de NUDT3.



**Figura 16: Validación del pcDNA3.1-mCherry-PPBD mediante la sobreexpresión de NUDT3 en HEK293T. A:** Imágenes representativas tomadas in vivo en un Leica SP8 63x de la señal mCherry-PPBD en HEK293T donde se ha sobreexpresado NUDT3 (pWPI-NUDT3). Como control negativo se han transfectado HEK293T con pWPI ∅. En el primer panel se muestra la señal del mCherry. En el segundo panel se muestra el marcaje de ADN mediante tinción Hoechst. En el tercer panel se observa la transfección del plásmido pWPI por la expresión del eGFP. Barra de escala: 15µm. **B:** Cuantificación de la señal mCherry-PPBD mediante Fiji-ImageJ. Se han realizado 3 experimentos y cada símbolo representa un campo con una media entre 5-40 células por campo. **C:** Western blot comprobatorio de la expresión de mCherry-PPBD y de la sobreexpresión de NUDT3 utilizando en ambos casos la tinción ponceau como control de carga.

Tras estos resultados, se quiso abordar la cuantificación del polyP mediante otra aproximación: la purificación del polyP por métodos bioquímicos.

### 5.3. Puesta a punto y validación de la purificación por bioquímica

La purificación bioquímica del polyP es un método ampliamente usado en otros organismos como bacterias o levaduras, pero presenta ciertas dificultades al extrapolar estos protocolos a células humanas (Christ & Blank, 2018; Dahl et al., 2018). Durante mi tesis, he puesto a punto y optimizado la purificación bioquímica de polyP procedente de células humanas. Para proceder con la puesta a punto, se ha dividido el proceso de la purificación bioquímica en 4 pasos (figura 17). Se ha comenzado poniendo a punto el cultivo celular y el número de células iniciales necesarias para purificar polyP. Tras esto, se realiza la extracción mediante fenol-cloroformo y, para ello, se han estudiado diferentes factores que podrían estar afectando a la cantidad de polyP purificado. A continuación, se han comparado dos métodos de purificación: la precipitación con etanol o la purificación mediante columna. Para la cuantificación, se mide la cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 recombinante mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$ . Por ello, se han estudiado los posibles inhibidores de Ppx1 y su especificidad para determinar si su uso como método de cuantificación es adecuado.

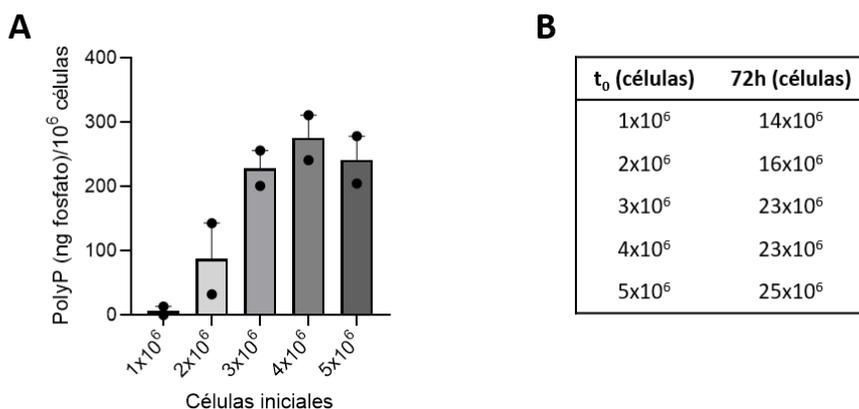


**Figura 17: Esquema del proceso de purificación de polyP por bioquímica.** Podemos ver los diferentes pasos del proceso, que se corresponden con los siguientes apartados.

### 5.3.1. Cultivo y lisis celular

El primer paso a poner a punto fue el cultivo celular. Puesto que en células humanas se han estimado cantidades de polyP muy inferiores a las encontradas en otros organismos (Kumble & Kornberg, 1995), lo primero que se estudió fue la cantidad inicial de células HEK293T de la que se debía partir para poder purificar polyP. Para ello, se sembraron diferentes cantidades de células y, a las 72 h, se purificó polyP. Los niveles de polyP se han estimado incubando el purificado con Ppx1 y cuantificando el fosfato libre producido mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$  (Baykov et al., 1988). El resultado se normaliza según el número de células finales recogidas

En la figura 18A se puede observar que, para obtener polyP al purificar a las 72 h de cultivo, se debe comenzar con un cultivo celular de entre 3 y 5 millones. Sembrando dichas cantidades, a las 72 h se obtiene un cultivo con una confluencia del 80-90% (figura 18B) y se obtienen cantidades de polyP similares. Por el contrario, parece que para purificar polyP a las 72 h de cultivo, sembrar 1 o 2 millones de células no son suficientes puesto que el número final de células no es el adecuado. Debido a este resultado, se decidió continuar sembrando 4 millones de células iniciales.



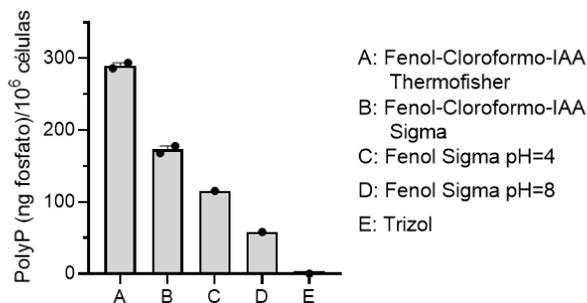
**Figura 18: Estudio del cultivo inicial de células HEK293T necesario para proceder con la purificación.** **A:** Niveles de polyP obtenido según la cantidad de células iniciales sembradas tras purificar a las 72 h de cultivo. En la gráfica se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$  y se normaliza según el número de células finales recogidas. **B:** Recuento de células finales tras 72 h de cultivo según las células iniciales sembradas ( $t_0$ ).

### 5.3.2. Extracción

Una vez lisadas las células, se procede a la extracción del polyP. Esta se realiza mediante fenol-cloroformo puesto que nuestro grupo ha visto con anterioridad que es el mejor método para purificar polyP de levaduras (Bru et al., 2016). Debido a la inestabilidad del polyP frente a medios ácidos (Harold, 1966), se ha comprobado si determinados factores como el pH del fenol, la mezcla comercial del fenol con el cloroformo y el alcohol isoamílico o incluso la casa comercial podían influir en el proceso de purificación. Lo que se hizo fue comparar los niveles de polyP obtenidos tras realizar la extracción de un cultivo de células HEK293T tras 72 h de cultivo utilizando fenol pH 4,5, fenol pH 8, fenol-cloroformo-IAA de *ThermoFisher* y fenol-cloroformo-IAA de *Sigma*. Otro método de purificación que se quiso poner a prueba fue la purificación

mediante trizol, usado típicamente para purificar ARN, el cual es semejante al polyP.

Como se puede observar en la figura 19, existen diferencias respecto al pH del fenol e incluso la casa comercial. El más adecuado para la purificación es el fenol-cloroformo-IAA de *Thermofisher*. Sorprendentemente, al utilizar el mismo compuesto, pero de otra casa comercial, obtenemos un 43% menos de polyP. Este resultado pone de manifiesto la dificultad que puede acarrear la purificación de polyP a partir de células humanas, ya que sutiles diferencias como cambiar de casa comercial afectan significativamente al procedimiento. Esta pérdida de polyP es aún mayor al purificar sólo con fenol y se acentúa al utilizar fenol con pH básico. La presencia de iones divalentes en el lisado celular a pH básico podría ser una de las causas de hidrólisis inespecífica del polyP (Harold, 1966). También se puede observar que, al contrario de lo que uno podría esperar debido al parecido entre polyP y ARN, el trizol no permite purificar polyP. Tras estas pruebas, se continuó utilizando el fenol-cloroformo-IAA de la casa comercial *Thermofisher*.



**Figura 19: Niveles de polyP obtenido en la purificación según diferentes métodos de extracción.** Diferentes cantidades de polyP obtenido según el método de extracción y diferente fenol-cloroformo usado en la purificación. En la gráfica se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a A<sub>595nm</sub> y se normaliza según el número de células finales recogidas.

### 5.3.3. Purificación

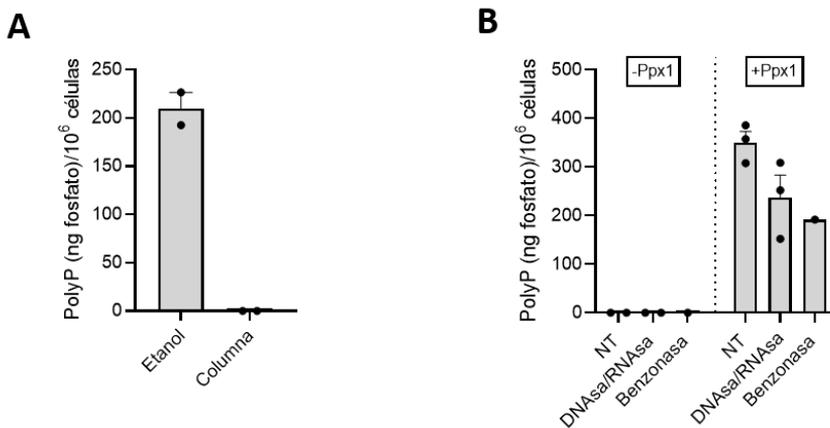
Tras realizar la extracción por fenol-cloroformo, se procedió a estudiar como diferentes métodos de purificación pueden afectar a los niveles de polyP obtenidos. Los dos métodos más utilizados para la purificación del polyP son la precipitación por etanol y la purificación por columna (Ault-Riche et al., 1998; Seidlmayer, Gomez-Garcia, Blatter, Pavlov, & Dedkova, 2012). En levaduras, la purificación por columna conlleva una menor recuperación de polyP por la pérdida en el *flow-through* de las cadenas de menos de 60-80 residuos de fosfato (Bru et al., 2016). Para poner a punto mi método de purificación era necesario comprobar si podía ocurrir algo similar al purificar polyP de células humanas. Para ello, se procedió a purificar polyP de un cultivo confluyente de células HEK293T mediante ambos métodos.

Como podemos observar en la figura 20A, al purificar por columna no se recupera polyP. Este resultado sugiere que, al igual que ocurre en levaduras, se podría estar perdiendo la mayor parte del polyP en el *flow-through*. Tras este resultado se continuó utilizando la precipitación con etanol.

Uno de los principales problemas que conlleva la técnica del fenol-cloroformo es la posible contaminación por ácidos nucleicos que podrían interferir tanto en la actividad enzimática de Ppx1 como en la detección de fosfato por verde de malaquita. Para solucionar este inconveniente, tras la precipitación con etanol se ha considerado realizar una incubación con DNAsa/RNAsa o benzonasa. En la figura 20B se observa que, en contra de lo esperado, cuando se realiza dicha incubación los niveles de polyP detectados son menores que cuando no añadimos DNAsa/RNAsa y esta pérdida de polyP es aún mayor en el caso de la benzonasa. Este resultado sugiere que la incubación con DNAsa/RNAsa puede llevar a error y provocar una subestimación de la cantidad de polyP purificada. Esta diferencia en la detección de polyP podría estar provocada por la interacción de la DNAsa/RNAsa y la benzonasa con el polyP, interfiriendo de esta forma con la actividad de Ppx1. Además, se observa que, en

cualquiera de las condiciones, al no añadir Ppx1 a la reacción no obtenemos fosfato libre. Este resultado demuestra que no se arrastra fosfato libre contaminante durante la purificación ni la DNAsa/RNAsa o la benzonasa liberan fosfato al degradar los ácidos nucleicos que pueda haber en la muestra.

Tras observar estos resultados se decidió continuar sin incubar con DNAsa/RNAsa ni benzonasa.



**Figura 20: Niveles de polyP obtenido en la purificación según diferentes métodos de purificación y/o incubación con DNAsa/RNAsa o Benzonasa.** En las gráficas se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a A<sub>595nm</sub>. **A:** Comparación de los niveles de polyP obtenido al realizar una precipitación con etanol frente a pasar la fase acuosa obtenida tras la extracción por fenol-clorofomo por columna. **B:** Efecto de la incubación de la fase acuosa con DNAsa/RNAsa o Benzonasa sobre la cantidad de polyP obtenida. Se muestran 3 purificaciones: una sin tratar (NT), otra con 10 µg de DNAsa-RNAsa, y otra con 10 µg de Benzonasa. Tanto la incubación con DNAsa/RNAsa como la Benzonasa se han realizado a 37°C durante 2 h.

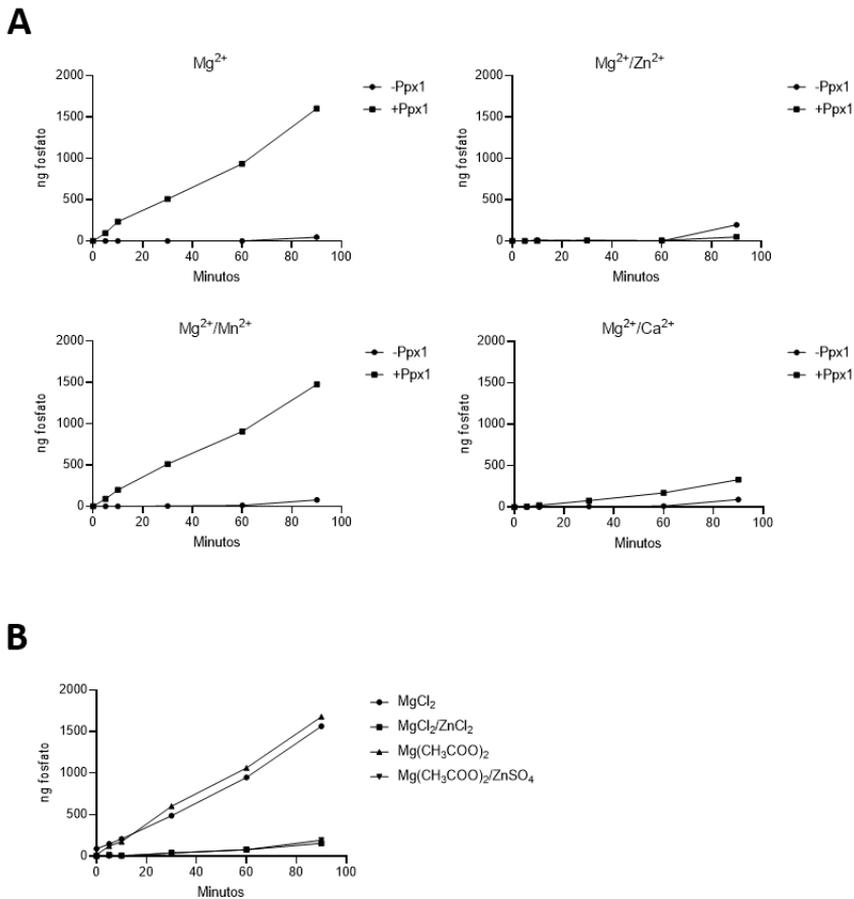
### 5.3.4. Cuantificación

Finalmente, se procedió a optimizar el método de cuantificación. Para cuantificar el polyP obtenido, tal y como se ha introducido anteriormente, se digiere el polyP purificado con Ppx1 y, mediante

un ensayo de verde malaquita, se cuantifica la cantidad de fosfato libre que se ha producido. Para poner a punto este ensayo, primero era necesario comprobar qué condiciones de ensayo son las óptimas para la actividad exopolifosfatasa de Ppx1. Por otra parte, se analizó cómo puede afectar la presencia de otras moléculas susceptibles de liberar fosfato, como el ARN o el ADN, y si podrían estar afectando a nuestra cuantificación, provocando una sobreestimación del polyP purificado.

### 5.3.4.1. Efecto de los iones divalentes sobre la actividad exopolifosfatasa de Ppx1

Se ha visto con anterioridad que la concentración de diferentes cationes divalentes afecta a la actividad de Ppx1 (Wurst & Kornberg, 1994). Es por ello que se ha realizado una prueba incubando polyP comercial con diferentes iones divalentes como el magnesio ( $Mg^{2+}$ ), el zinc ( $Zn^{2+}$ ), el calcio ( $Ca^{2+}$ ) y el manganeso ( $Mn^{2+}$ ). En la figura 21 se observa que tanto el  $Zn^{2+}$  como el  $Ca^{2+}$  inhiben total o parcialmente la acción de Ppx1, incluso en presencia de Mg (figura 21A). Esta inhibición, en el caso del  $Zn^{2+}$ , se produce sin importar el anión con el que se encuentre ( $ZnCl_2$  o  $ZnSO_4$ ) (figura 21B), demostrando que la actividad de Ppx1 es específica de catión, independientemente del anión con el que se encuentre.

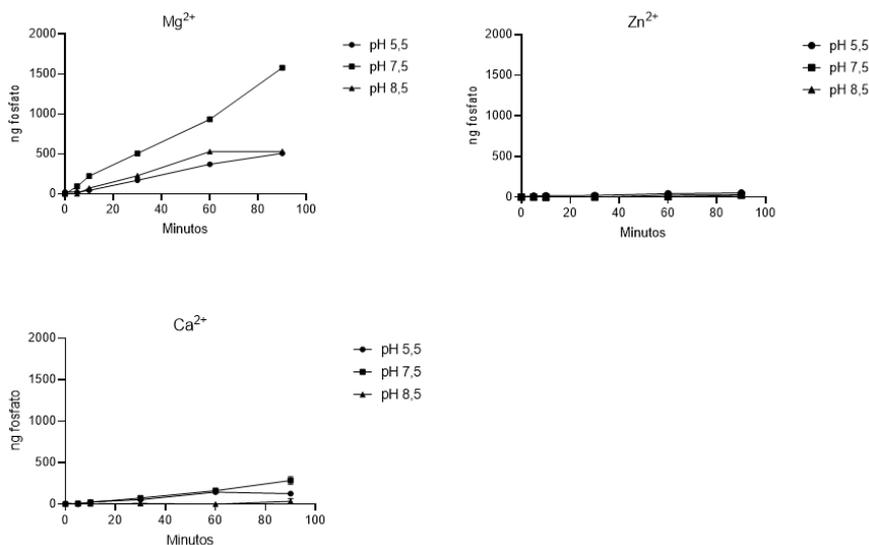


**Figura 21: Actividad polifosfatasa de Ppx1 con diferentes iones.** En las gráficas se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 2 ng de Ppx1 durante 90 minutos a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$ . **A:** Comparación de los niveles de fosfato obtenido al realizar el ensayo con 2  $\mu$ g polyP100 comercial en presencia de 5 mM de  $Mg^{2+}$  solo o con 5 mM de  $Zn^{2+}$ , 5 mM de  $Mn^{2+}$  o 5 mM de  $Ca^{2+}$ . **B:** Determinación del efecto del catión sobre Ppx1, independientemente de su anión.

Por último, y para encontrar las condiciones óptimas para la actividad exopolifosfatasa de Ppx1, se realizó el mismo ensayo, pero a diferentes pH. En la figura 22 se observa como la actividad de Ppx1 con  $Mg^{2+}$  es mayor a pH 7,5 respecto a los pH 5,5 y 8,5. En cuanto a

## Resultados

la actividad con  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , estos inhiben Ppx1 a cualquier pH. Este resultado corrobora la inhibición de la actividad polifosfatasa de Ppx1 por parte del  $Zn^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$ , posiblemente porque interaccionen con el polyP, y demuestra que las condiciones óptimas para realizar el ensayo es pH 7,5 en presencia de  $Mg^{2+}$ .

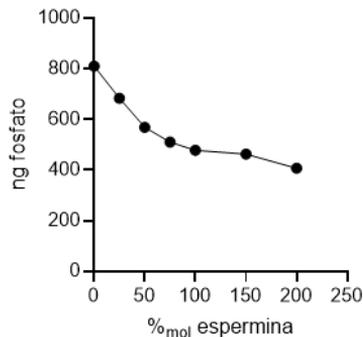


**Figura 22: Determinación de la actividad polifosfatasa de Ppx1 con diferentes iones a diferentes pH.** Se incubaron 2 $\mu$ g polyP100 comercial con 5 mM de  $Mg^{2+}$ , 5 mM de  $Zn^{2+}$  y 5 mM de  $Ca^{2+}$ , cada uno a diferentes pH (pH 5,5; pH 7,5 y pH 8,5). En las gráficas se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 2 ng Ppx1 durante 90 minutos a 37 $^{\circ}$ C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a A<sub>595nm</sub>.

### 5.3.4.2. Efecto de las poliaminas sobre la actividad exopolifosfatasa de Ppx1

Además de ciertos iones divalentes, diversas moléculas podrían estar interfiriendo en la actividad de Ppx1. Se ha descrito con anterioridad que, las poliaminas como la espermidina, interfieren con Ppx1 (Wurst & Kornberg, 1994). Este hecho es muy importante ya que las células de mamíferos son capaces de sintetizar estas moléculas y, por su naturaleza de polication, podrían interaccionar

con el polyP y ser arrastradas durante el proceso de la purificación. Es por ello que se ha realizado un ensayo incubando polyP comercial con diferentes cantidades de espermina. En la figura 23 se puede ver que la cantidad de fosfato recuperada disminuye según la cantidad de espermina. Esto demuestra que las poliaminas, por su estructura de policatión, interfieren en la actividad polifosfatasa de Ppx1. Este resultado, junto con el del apartado anterior, sugiere que el polyP, al ser un polianión, tiende a verse recubierto por cationes, ya sean cationes divalentes o moléculas con estructura de policatión, y de esta forma se dificulta la unión de Ppx1 al mismo. Las poliaminas se encuentran distribuidas ampliamente en la mayoría de los tejidos humanos, sobre todo en tejidos de rápido crecimiento (Pegg, 2016). Este resultado nos indica que, si queremos purificar polyP de tejidos, debemos tomar la precaución de degradar estas moléculas previamente a la reacción enzimática con Ppx1.



**Figura 23: Efecto de la espermina sobre la actividad de Ppx1.** En la gráfica se puede ver el fosfato obtenido tras incubar 2  $\mu\text{g}$  de polyP100 comercial con diferentes cantidades de espermina, medida en % de moles de espermina respecto los moles de polyP100. El ensayo se realizó en presencia de 2 ng de Ppx1 durante 90 minutos a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595\text{nm}}$ .

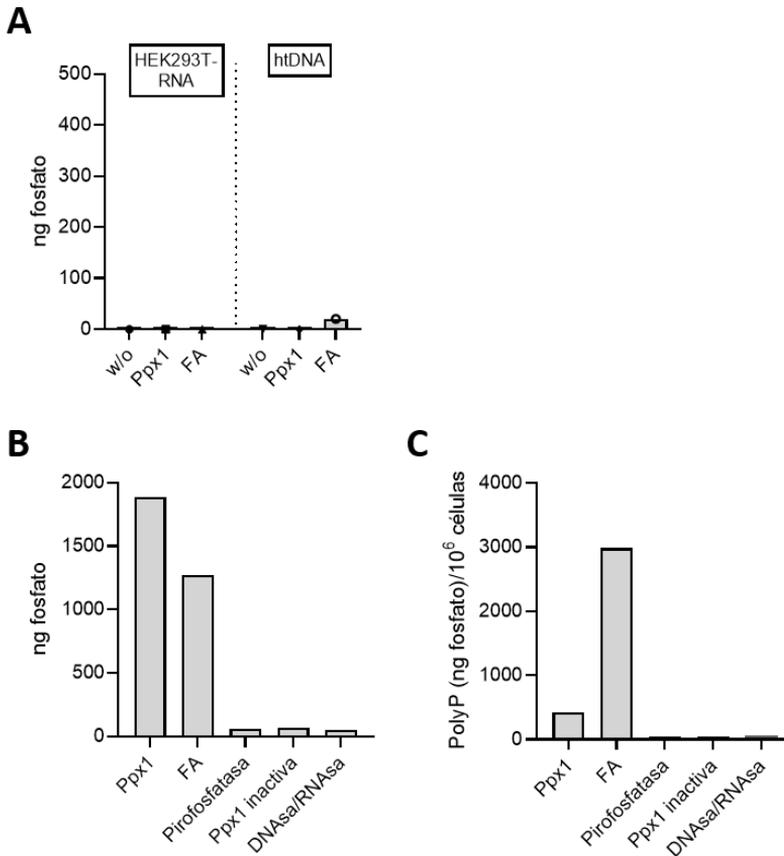
### 5.3.4.3. Especificidad de sustrato de Ppx1

Para determinar si este método de cuantificación es el adecuado es necesario comprobar la especificidad de sustrato de Ppx1. Al no realizar la incubación previa con DNAsa/RNAsa es necesario asegurar que el ADN y el ARN no son degradados por Ppx1. Para ello, se realizó el ensayo incubando, tanto ARN extraído de HEK293T, como htDNA con Ppx1 y con fosfatasa alcalina y se midió el fosfato libre producido mediante verde malaquita. En la figura 24A se puede observar cómo, tras incubar ARN o htDNA con Ppx1 no se produce fosfato libre. Este resultado demuestra que Ppx1 no es capaz de degradar dichas moléculas o que el fosfato liberado a partir de ellas es despreciable y, por lo tanto, no están interfiriendo en la cuantificación.

También se estudió la acción de otras enzimas con actividad fosfatasa sobre el polyP. Para ello se incubó polyP comercial o purificado de HEK293T con enzimas, como la fosfatasa alcalina o la pirofosfatasa, que degradan diferentes grupos de fosfato y podrían tener actividad frente al polyP.

En la figura 24B se puede ver que el polyP comercial solo es degradable por Ppx1 y, en menor medida, por la fosfatasa alcalina. Por último, se ha realizado el mismo ensayo, esta vez con polyP obtenido al purificar bioquímicamente de células HEK293T. En la figura 24C se puede observar cómo se produce fosfato libre al degradarse la muestra por Ppx1. También se produce fosfato libre por la acción de la fosfatasa alcalina. Esto podría ser debido a que en el proceso de la purificación arrastramos otras moléculas fosfatadas no degradables por Ppx1. Otra posible causa sería que estamos purificando fracciones o conformaciones de polyP no degradables por Ppx1. Además, se puede observar cómo, la degradación del ADN o ARN que se puede ver arrastrado durante la purificación, no libera fosfato que pueda interferir en la cuantificación. Estos resultados prueban que la actividad de Ppx1 es

específica de polyP y valida su uso para la cuantificación del polyP purificado.



**Figura 24: Determinación de la especificidad de sustrato de Ppx1.** **A:** Niveles de fosfato obtenidos realizar el ensayo de verde malaquita con 20  $\mu$ g de RNA de HEK293T o htDNA sin ninguna enzima (w/o), con Ppx1 o fosfatasa alcalina (FA) durante 150 minutos a 37°C. **B:** Niveles de fosfato obtenidos tras incubar 2  $\mu$ g polyP130 comercial con Ppx1, FA, pirofosfatasa, Ppx1 inactiva y DNAsa/RNAsa durante 20 minutos a 37°C. **C:** Niveles de fosfato obtenidos al incubar el resultado de la purificación bioquímica con Ppx1, fosfatasa alcalina (FA), y Ppx1 inactiva durante 150 minutos a 37°C. En todos los casos se ha incubado con 3  $\mu$ g de Ppx1, 5 U de FA, 0,5 U de pirofosfatasa y 10  $\mu$ g de DNAsa/RNAsa. La cantidad de fosfato libre se ha cuantificado mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$ .

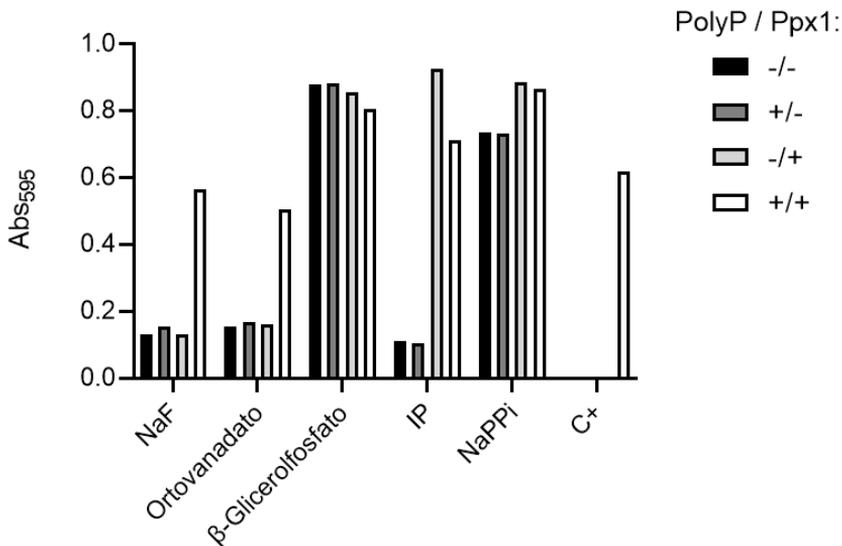
### 5.3.4.4. Efecto de los inhibidores de fosfatasas sobre la actividad polifosfatasa de Ppx1

Durante el proceso de purificación y ya en los primeros pasos como la lisis celular, además de polyP, podemos estar arrastrando otras moléculas como las fosfatasas presentes en las células. Para evitar que estas fosfatasas degraden el polyP, se pueden añadir inhibidores de fosfatasas, pero estos se podrían arrastrar en la precipitación con etanol, permanecer en el purificado y afectar a la actividad de Ppx1 interfiriendo en la cuantificación del polyP purificado.

Tras estudiar los diferentes factores que pueden afectar a la actividad de Ppx1, se quiso estudiar la posible interferencia de los inhibidores de fosfatasas más comunes con el ensayo enzimático y posterior cuantificación del fosfato libre.

En la figura 25 se puede ver, como era de esperar, que el  $\beta$ -glicerolfosfato y el NaPPi liberan fosfato por sí mismos, sin que se añada polyP ni Ppx1 a la reacción. Estos inhibidores no se pueden utilizar ya que provocarían contaminación por fosfato y no permitirían estimar la cantidad de polyP de forma fiable. Sorprendentemente, al incubar el coctel de inhibidores de fosfatasas (IP) junto con Ppx1 se produce fosfato libre, sin necesidad de añadir polyP a la reacción. Esto sugiere que alguno de los elementos que conforman a este coctel comercial es degradable por Ppx1 por sí mismo y tampoco podría ser usado durante la purificación.

Por otro lado, tanto el NaF como el ortovanato no producen fosfato libre y, además, al incubarlos junto con polyP y Ppx1, la cantidad de fosfato libre que se produce es similar a la obtenida al no añadir ningún inhibidor de fosfatasas. Este resultado demuestra que ambos inhibidores podrían ser usados para prevenir una degradación del polyP durante la lisis celular ya que ni contienen fosfato ni inhiben la actividad exopolifosfatasa de Ppx1.

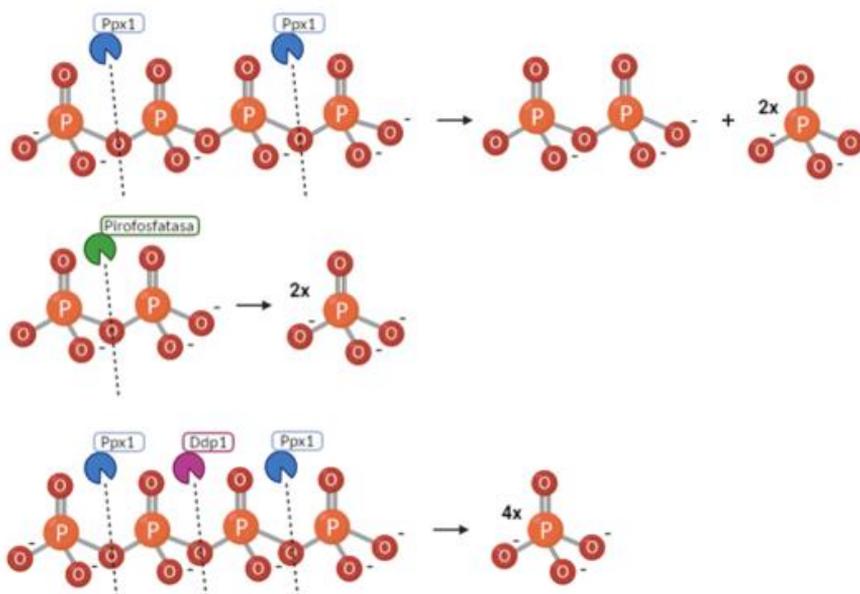


**Figura 25: Inhibición de la actividad polifosfatasa de Ppx1 por inhibidores de fosfatasa.** Niveles de absorbancia obtenidos al incubar +/- 1  $\mu$ g de polyP130 con 10 mM NaF, 100  $\mu$ m ortovanadato, 25 mM  $\beta$ -glicerol, coctel inhibidor de fosfatasa Pierce™ (IP), 10 mM NaPPi, sin incubar con ningún inhibidor (C+) y +/- 3  $\mu$ g de Ppx1 durante 60 minutos a 37°C. La cuantificación se ha realizado mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$ .

#### 5.3.4.5. Uso conjunto de Ppx1 y otras fosfatasa

Ppx1 es una exopolifosfatasa y por lo tanto degrada siempre el polyP por los extremos, produciendo fosfato libre, pero es incapaz de degradar pirofosfato (PPi) (Wurst & Kornberg, 1994) o de hidrolizar un polyP circular como por ejemplo lo haría una actividad endopolifosfatasa como Ddp1 (Lonetti et al., 2011) (Figura 26). Es por ello que se quiso comprobar si, incubar polyP purificado con otras fosfatasa además de con Ppx1, como es el caso de Ddp1 o de la pirofosfatasa, podría tener un efecto aditivo degradando estructuras inaccesibles a Ppx1. De esta forma se podría precisar más la cantidad de polyP celular.

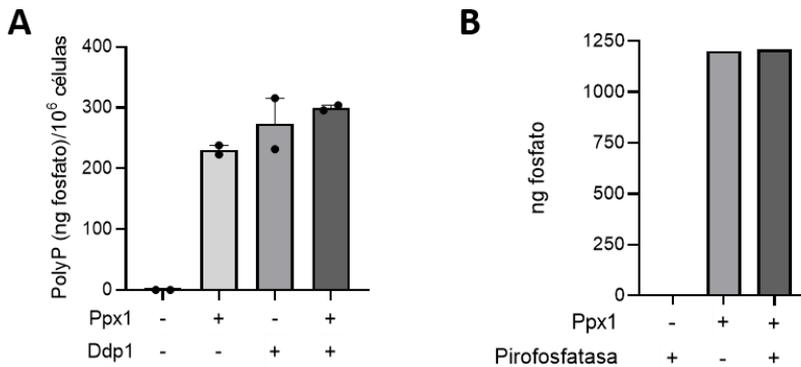
## Resultados



**Figura 26: Esquema representativo de la acción de las fosfatasas Ppx1, Ddp1 y pirofosfatasa.** Ppx1 ejercería su acción de polifosfatasa degradando el polyP por sus extremos, produciendo fosfato libre, pero dejando un bifosfato sin degradar en la primera reacción. La pirofosfatasa degrada las moléculas de pirofosfato produciendo dos fosfatos libres. Por último, Ddp1 puede ejercer su acción como endo o exopolifosfatasa. Junto con Ppx1 podría partir la molécula de polyP en moléculas más pequeñas, ayudando a Ppx1 a realizar su acción.

En la figura 27A se puede observar que los ng de fosfato que se obtuvieron fueron similares al incubar el polyP purificado de HEK293T tanto con Ppx1 como con Ddp1, siendo ligeramente superiores si se realizaba el ensayo con Ppx1 y Ddp1 conjuntamente. Estos resultados demuestran que la acción polifosfatasa de Ppx1 degrada por sí misma el polyP y que es suficiente para estimar el polyP que se obtiene mediante este método de purificación. Esto sugiere que el polyP purificado no presenta una complejidad elevada para la acción de Ppx1 y por ello una endopolifosfatasa no aumenta ni su velocidad de degradación ni los niveles detectados. Por otro lado, en la figura 27B se puede ver la acción conjunta de Ppx1 y la pirofosfatasa y se observa cómo no hay diferencias en los ng de fosfato recuperados tras incubar solo con Ppx1 o con Ppx1 y

pirofosfatasa. Esto demuestra que el pirofosfato generado debe ser despreciable comparado con la cantidad de fosfato liberada.



**Figura 27: Estudio del uso de Ppx1 en la cuantificación del polyP purificado. A:** Niveles de fosfato obtenidos realizar el ensayo de verde malaquita incubando polyP purificado de HEK293T con 3  $\mu$ g Ppx1 +/- 3  $\mu$ g de Ddp1 durante 180 minutos a 37°C. **B:** Niveles de fosfato obtenidos tras realizar el ensayo con 3  $\mu$ g Ppx1 +/- 0,2U pirofosfatasa con 1,5  $\mu$ g polyP100 comercial durante 60 minutos a 37°C. La cantidad de fosfato libre se ha cuantificado mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$ .

Tras poner a punto y validar el protocolo de la purificación bioquímica y la detección y visualización por inmunofluorescencia, ambas técnicas se comenzaron a utilizar para detectar y cuantificar las dinámicas y metabolismo del polyP en células humanas.

#### 5.4. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares

El metabolismo del polyP se sostiene sobre tres vértices principales que hasta hace poco eran prácticamente desconocidos. El primero hace referencia a las funciones del polyP en la célula. Como se ha comentado en la introducción, durante la última década se han hecho grandes avances que asocian al polyP con diferentes procesos fisiopatológicos como la coagulación sanguínea, la osteogénesis, el Alzheimer o el cáncer (Kulakovskaya, Zemskova, & Kulakovskaya, 2018; Lempart & Jakob, 2019; Morrissey, 2012).

El segundo vértice hace referencia a las enzimas que son capaces de sintetizar y degradar esta molécula en las células humanas. Hasta hace dos años no se conocía ninguna enzima capaz de regular los niveles de polyP intracelulares (Baev et al., 2020; Samper-Martin et al., 2021), hecho que dificultó los avances en el estudio de la biología de esta molécula en humanos.

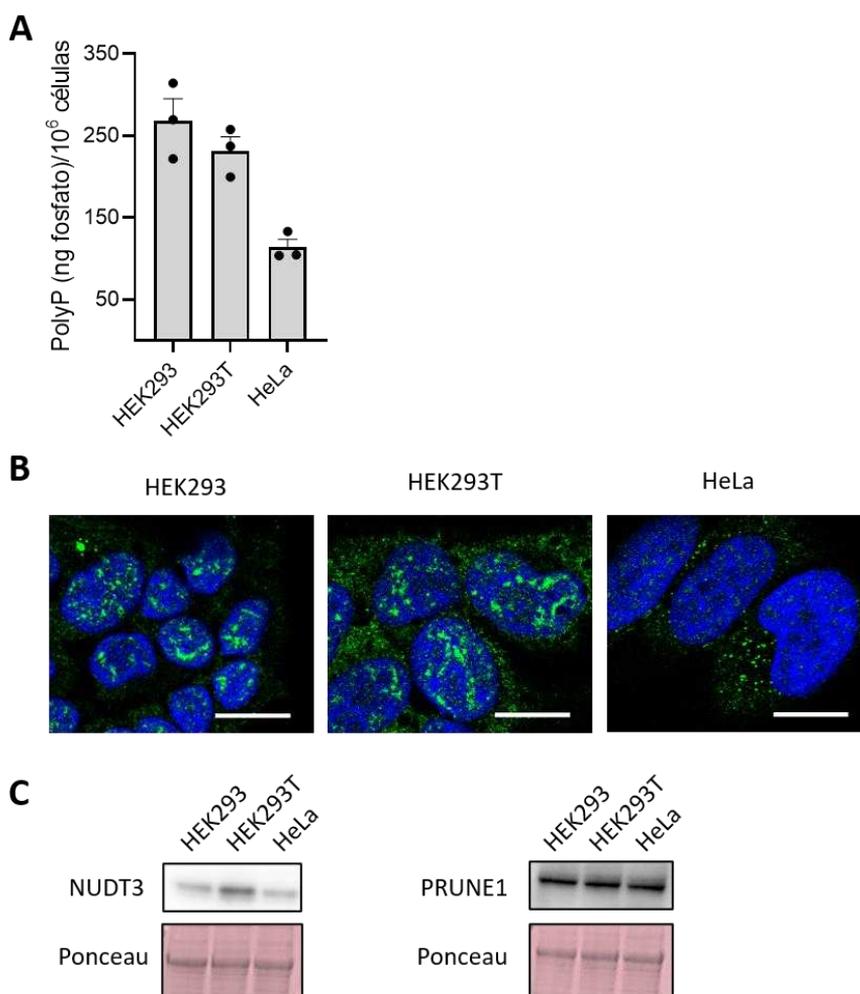
El tercer vértice que falta por resolver hace referencia a conocer los niveles y localización del polyP intracelular dependiendo del tipo celular y tejido estudiado. Teniendo en cuenta que hay muy pocos trabajos que aborden en parte esta cuestión (Kumble & Kornberg, 1995), y que en mi tesis se han desarrollado métodos tanto celulares como bioquímicos para cuantificar y estudiar el polyP celular, se decidió realizar un cribaje de diferentes líneas celulares humanas procedentes de diferentes tejidos.

En todas las líneas celulares se ha determinado su cantidad de polyP mediante purificación bioquímica, y por otra parte, en algunas de ellas se ha estudiado la localización de la molécula mediante inmunofluorescencia. Adicionalmente, se ha estudiado si estas diferencias en las concentraciones de polyP celular pueden estar relacionadas con una mayor o menor presencia de polifosfatasas. Para ello, se ha correlacionado la cantidad de polyP con la expresión de NUDT3, la única enzima con actividad polifosfatasa demostrada *in vivo* (Samper-Martin et al., 2021), y con otra posible exopolifosfata: PRUNE1 (Tammenkoski et al., 2008).

### 5.4.1. Líneas celulares modelo

Se comenzó realizando el estudio con líneas celulares modelo comúnmente usadas en nuestro laboratorio: HEK293T, HEK293 y HeLa. Tanto las HEK293T como las HEK293 son líneas de riñón, y las HeLa son células derivadas de adenocarcinoma de cérvix. En la figura 28A se puede ver como las HEK293 y HEK293T poseen cantidades similares de polyP por bioquímica (268 y 231 ng fosfato/10<sup>6</sup> células, respectivamente), mientras que las HeLa

poseen la mitad, alrededor de 113 ng de fosfato/ $10^6$  células. En la figura 28B se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia usando el PPBD. Se puede observar la localización principalmente nuclear en el caso de las HEK293 y HEK293T con una intensidad similar de señal, resultado que se correlaciona con la cantidad de polyP obtenido tras la purificación bioquímica. En el caso de la línea celular HeLa, el marcaje presenta puntos citoplasmáticos y en general la intensidad es menor comparando con las otras líneas, un resultado que también correlaciona con el obtenido por bioquímica. En cuanto a su cantidad de polifosfatasas, en la figura 28C se observa que, en el caso de NUDT3 la expresión basal es más elevada en las células HEK293T mientras que la expresión basal de PRUNE1 es muy parecida en las tres líneas. Este resultado sugiere que, al menos en estas líneas, no parece haber una relación entre la cantidad de polifosfatasas presentes en las células y la cantidad de polyP purificado.

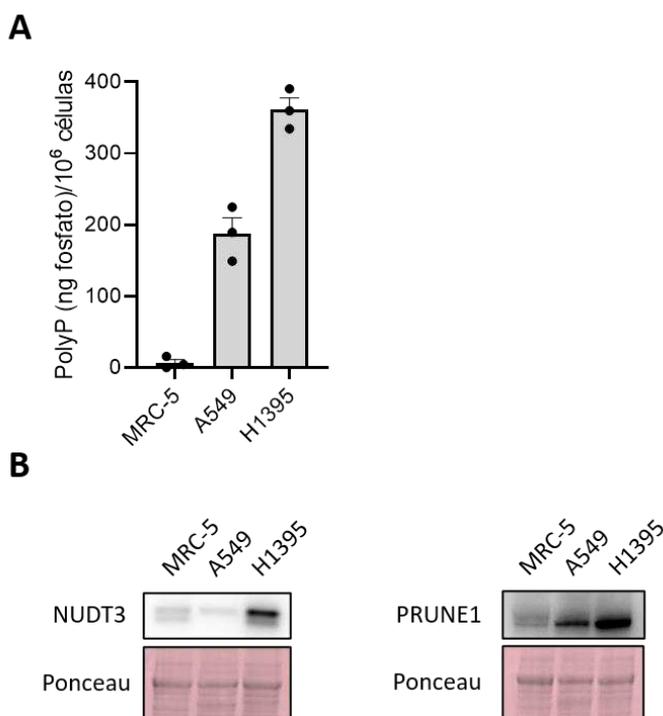


**Figura 28: Caracterización del polyP celular en HEK293, HEK293T y HeLa. A:** Cuantificación de la cantidad de polyP celular mediante purificación bioquímica. Se muestra la media y la SEM de 3 purificaciones independientes. **B:** Imágenes representativas tomadas en un Leica SP8 63x de inmunofluorescencia realizada con His-Xpress-PPBD en las distintas líneas celulares. Barra de escala: 15  $\mu$ m. **C:** Determinación de la expresión basal de NUDT3 y PRUNE1 por Western blot. En ambos casos se ha usado la tinción ponceau como control de carga.

#### 5.4.2. Líneas celulares de pulmón

Como líneas celulares de pulmón se estudiaron las líneas tumorales A549 (línea celular epitelial de carcinoma de pulmón) y H1395,

(derivada de adenocarcinoma de pulmón), y la línea no tumoral MRC-5. En la gráfica 29A se puede observar cómo las H1395 son las células que poseen más polyP por bioquímica, con niveles de 361 ng de fosfato/millón de células. Por debajo de ellas, las A549 muestran niveles alrededor de 189ng de fosfato/millón de células, mientras que las MRC-5 no contienen polyP o sus niveles están por debajo de nuestro límite de detección. En la figura 29B se puede observar que, las células H1395 que son las que poseen más polyP, también son las que poseen más expresión basal de las polifosfatasas NUDT3 y PRUNE1. Este resultado pone de manifiesto una idea muy interesante que es que puede existir una diferencia en cuanto a la cantidad de polyP entre líneas tumorales y no tumorales dentro de un mismo tejido. Además, la diferente expresión de polifosfatasas entre las líneas celulares apunta a que debe haber una regulación estricta de las enzimas que degradan el polyP puesto que la línea celular MRC-5, en la cual no se detecta polyP, también es la que menor expresión basal de las polifosfatasas NUDT3 y PRUNE1 presenta.

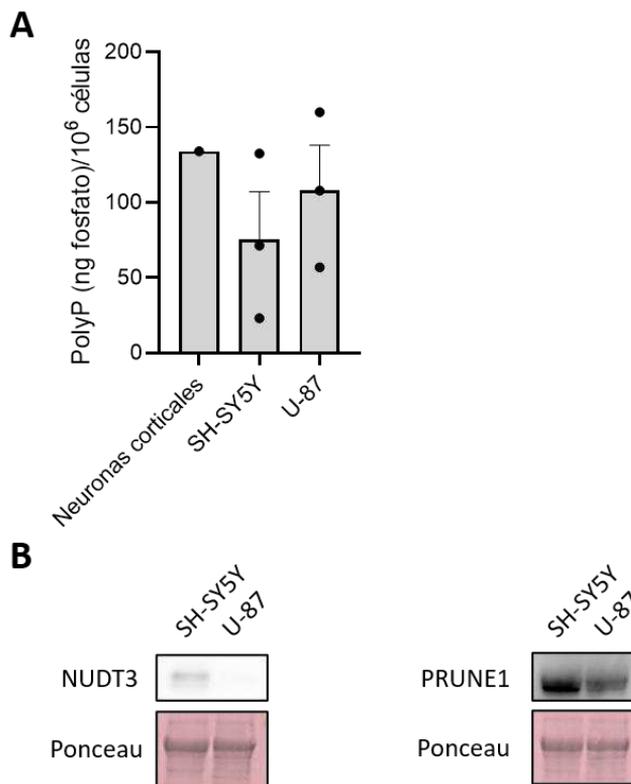


**Figura 29: Caracterización del polyP celular en MRC-5, A549 y H1395. A:** Cuantificación de la cantidad de polyP celular mediante purificación bioquímica. Se muestra la media con la SEM de 3 purificaciones independientes. **B:** Determinación de la expresión basal de NUDT3 y PRUNE1 por western-blot. En ambos casos se ha usado la tinción ponceau como control de carga.

### 5.4.3. Líneas celulares de cerebro

Para estudiar el tejido cerebral se utilizaron las líneas tumorales U-87 (línea celular humana derivada de glioblastoma) y SH-SY5Y (línea celular derivada de neuroblastoma humano). También se tuvo la oportunidad de trabajar con cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias de ratón y se procedió a purificar polyP de ellas. En la figura 30A se puede observar como, por bioquímica, las SH-SY5Y poseen 75 ng de fosfato/10<sup>6</sup> células de media y, en el caso de las U-87, 108 ng de fosfato/10<sup>6</sup> células. En el caso de los cultivos primarios se puede observar que se obtiene más polyP por bioquímica, purificando alrededor de 134 ng de fosfato/10<sup>6</sup> células.

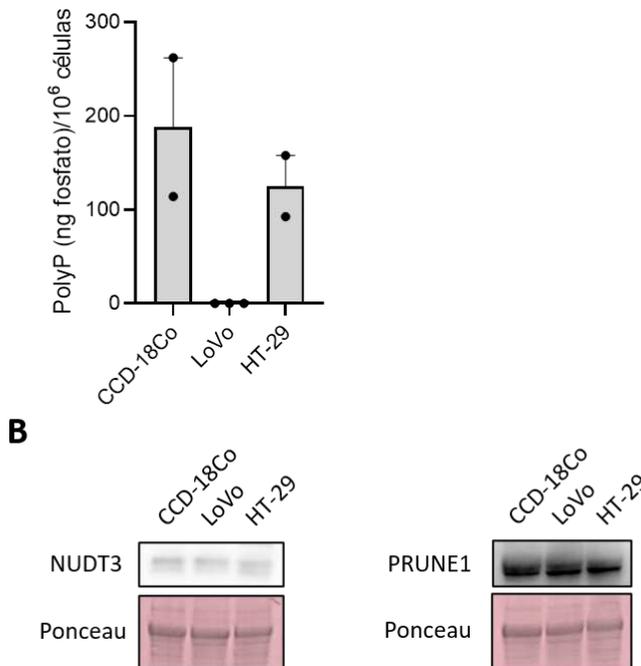
En cuanto a la presencia de polifosfatasas se observa que la línea de neuroblastoma SH-SY5Y posee más expresión basal de ambas fosfatasas (figura 30B). En este caso, también existen diferencias entre ambas líneas en cuanto a la expresión basal de las polifosfatasas, de forma que la línea celular que menos polyP presenta es la que mayor expresión basal de polifosfatasas presenta. Como hemos visto anteriormente en otros tejidos, parece haber relación entre la presencia de las polifosfatasas y la cantidad de polyP celular.



**Figura 30: Caracterización del polyP celular en neuronas corticales, SH-SY5Y y U-87. A:** Cuantificación de la cantidad de polyP celular mediante purificación bioquímica. Se muestra la media con la SEM de 1-3 purificaciones independientes. **B:** Determinación de la expresión basal de NUDT3 y PRUNE1 por Western blot. En ambos casos se ha usado la tinción ponceau como control de carga.

### 5.4.4. Líneas celulares de colon

Para este tejido, se usaron las líneas tumorales LoVo (derivadas de metástasis de un paciente de cáncer colorrectal), HT-29 (extraídas de tumor primario de un paciente con adenocarcinoma colorrectal) y la línea no tumoral CCD-18Co. Se partió de 5 millones de células iniciales en el caso de LoVo y HT-29 y de dos cultivos de 1,35 millones en el caso de las CCD-18Co y se purificó polyP 72 h después. En la figura 31A se puede observar que, al contrario que en otros tejidos, en el caso de las líneas celulares de colon la línea no tumoral CCD-18Co es la que más polyP posee, con una media de 188 ng de fosfato/ $10^6$  células. A continuación, estaría la línea HT-29, con 125 ng de fosfato/ $10^6$  células y por último tendríamos la línea LoVo, de las cuales no se ha conseguido purificar polyP. También se observó que la expresión basal de las polifosfatasas NUDT3 y PRUNE1 era muy similar entre estas 3 líneas (figura 31B).



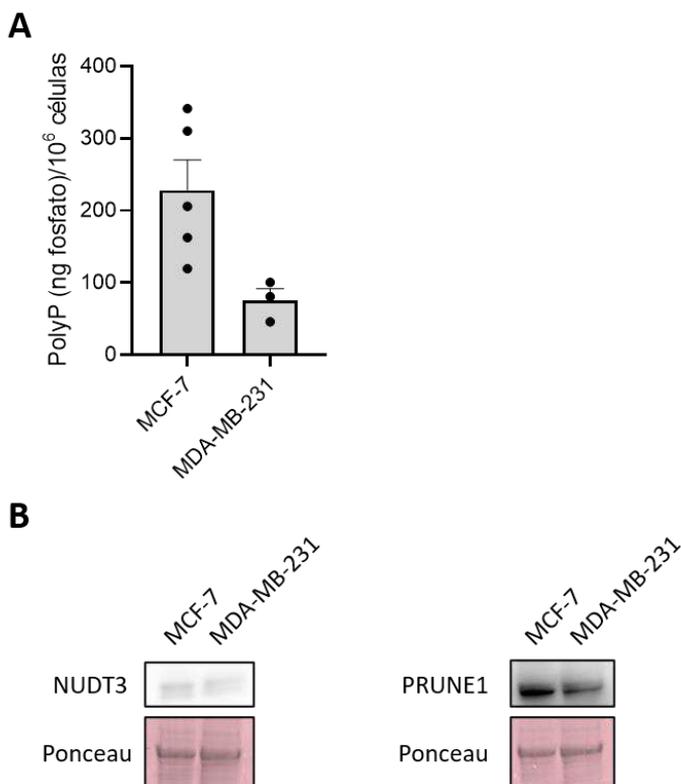
**Figura 31: Caracterización del polyP celular en CCD-18Co, LoVo y HT-29. A:** Cuantificación de la cantidad de polyP celular mediante purificación bioquímica. Se muestra la media  $\pm$  SEM de 2-3 purificaciones independientes. **B:** Determinación de la expresión basal de NUDT3 y PRUNE1 por Western blot. En ambos casos se ha utilizado la tinción ponceau como control de carga.

#### 5.4.5. Líneas celulares de mama

En este caso se estudiaron las líneas tumorales MCF-7 (línea celular derivada de adenocarcinoma que mantiene ciertas características del epitelio mamario diferenciado) y MDA-MB-231 (línea celular derivada de la glándula mamaria de una paciente con adenocarcinoma). En la figura 32A se puede ver cómo, en el caso del polyP purificado bioquímicamente, las MCF-7 poseen mayores cantidades, con una media de 227 ng de fosfato / 10<sup>6</sup> células respecto a 75 ng fosfato / 10<sup>6</sup> células. También se puede observar que la línea MCF-7 posee más expresión basal de la polifosfatasa NUDT3 y esta diferencia es mayor en la expresión de PRUNE1 (figura 32B). Como ya se ha observado con anterioridad en otras líneas,

## Resultados

este resultado apunta a una posible relación entre la cantidad de polifosfatasa y la concentración de polyP celular.



**Figura 32: Caracterización del polyP celular en MCF-7 y MDA-MB-231. A:** Cuantificación de la cantidad de polyP celular mediante purificación bioquímica. Se muestra la media +/- SEM de 3-5 purificaciones independientes. **B:** Determinación de la expresión basal de NUDT3 y PRUNE1 por Western blot. En ambos casos se ha utilizado la tinción ponceau como control de carga.

### 5.5. Estudio de las variaciones de polyP en función de las condiciones de cultivo

Es ampliamente conocido, en organismos unicelulares, que la concentración de polyP varía en función del estado metabólico de las células y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, en levaduras, el polyP presenta variaciones según la fase del ciclo celular (Bru et al., 2016), igual que en *Leishmania*, dónde además de estar relacionado

con el ciclo celular, también está relacionado con la supervivencia a temperaturas elevadas (Kohl et al., 2018). También en levaduras, se ha visto que el metabolismo del polyP está regulado por los niveles de fosfato en el medio (Ogawa, DeRisi, & Brown, 2000). En células humanas hay algunos trabajos que sugieren cambios en los niveles de polyP intracelulares dependiendo de la disponibilidad de nutrientes (Wang et al., 2003), del estrés oxidativo (Samper-Martin et al., 2021), o de la cantidad de glucosa en el medio (Boyineni et al., 2020), aunque la falta de técnicas de detección ha dificultado su estudio. Gracias a las técnicas de detección desarrolladas en esta tesis se han podido estudiar las variaciones de polyP en diversas condiciones de cultivo como diferentes confluencias, tiempo de cultivo, hipoxia y privación de nutrientes como la glucosa o el fosfato.

### 5.5.1. Diferentes confluencias y tiempo de cultivo

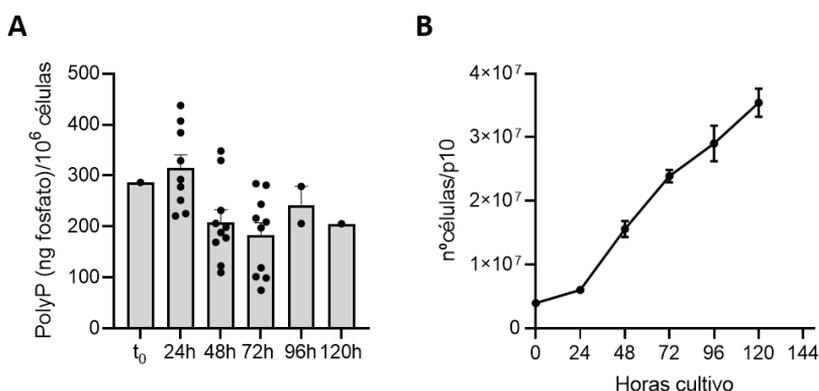
Mantener las células en cultivo siempre es una situación no fisiológica. El número de células, la confluencia a la que se encuentran o el tiempo que están en el medio de cultivo puede afectar a los resultados obtenidos, debido a que, por ejemplo, los nutrientes del medio se van agotando. Por ello se ha querido estudiar si estas variables podían estar relacionadas con la cantidad de polyP celular.

Primero, se quiso estudiar el efecto de la confluencia final del cultivo. Para ello se sembraron diferentes placas de 10 mm de 4 millones de HEK293T iniciales, y se mantuvieron en cultivo hasta 120 h. Además, se purificó polyP de  $20 \times 10^6$  células en el momento de la siembra ( $t_0$ ). De esta forma, a partir de 72 h se obtendría un cultivo confluyente con un número de células similar y se podría valorar el efecto del tiempo que están las células en confluencia sobre la cantidad de polyP celular. En la figura 33A se puede ver que, las células antes de la siembra, provenientes de un flask confluyente, parten de niveles de 286 ng de fosfato/ $10^6$  células. Tras sembrar las

## Resultados

células, el polyP va cayendo progresivamente conforme aumenta el tiempo que están las células en cultivo, pasando de 314 ng de fosfato/ $10^6$  células a las 24 h de cultivo a 182 ng de fosfato/ $10^6$  células. A partir de 72 h los niveles de polyP parecen estabilizarse.

También se puede observar en la figura 33B cómo, a partir de las 72 h de cultivo, el crecimiento celular continúa aumentando, pero a un ritmo menor que en las primeras 72 h. Esto puede deberse a la inhibición del crecimiento por contacto en la fase estacionaria del cultivo. Este resultado sugiere que la confluencia de cultivo a tiempos largos podría estar afectando a la cantidad de polyP celular. Una posible causa para esta caída del polyP podría ser que por la falta de nutrientes en el medio la célula está utilizando el polyP como fuente de energía y/o fosfato.



**Figura 33: Medición de los niveles de polyP según la confluencia final del cultivo.**

**A:** Niveles de polyP obtenidos a diferentes tiempos de cultivo. En la gráfica se comparan los resultados obtenidos tras diferentes ensayos en presencia de 3  $\mu\text{g}$  de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595\text{nm}}$  y se normaliza según el número de células finales recogidas. **B:** Curva de crecimiento de los cultivos celulares.

Se quiso hacer otra aproximación para estudiar estas variables, esta vez sembrando 5 cultivos independientes en placas de 10 mm con

diferentes cantidades de HEK293T iniciales y purificando polyP bioquímicamente de una placa cada 24 h, intentando purificar siempre de la misma cantidad de células finales (de 20 a 25 millones de células finales por placa, confluencia del 90%). Al sembrar diferente número de células iniciales se podría estudiar el polyP celular en función del número de divisiones que han llevado a cabo las células. Así, por ejemplo, el cultivo celular que ha pasado de  $1 \times 10^6$  a  $21 \times 10^6$  células ha llevado a cabo más divisiones que las otras condiciones. En la gráfica de la figura 34A se observa que en este caso también se pueden apreciar diferencias en la cantidad de polyP purificado. En el cultivo que solo está 24 h sembrado es del que purificamos más polyP y esta concentración de polyP celular va disminuyendo a lo largo del tiempo, pasando de 664 ng de fosfato/ $10^6$  células purificado en un cultivo de 24 h a 360 ng de fosfato/ $10^6$  células en un cultivo de 120 h, aunque las diferencias a partir de 72 h son menores. Estos resultados sugieren que el número de divisiones puede estar relacionado con la cantidad de polyP intracelular puesto que el cultivo en el que las células se han dividido más, es el que menos polyP posee.

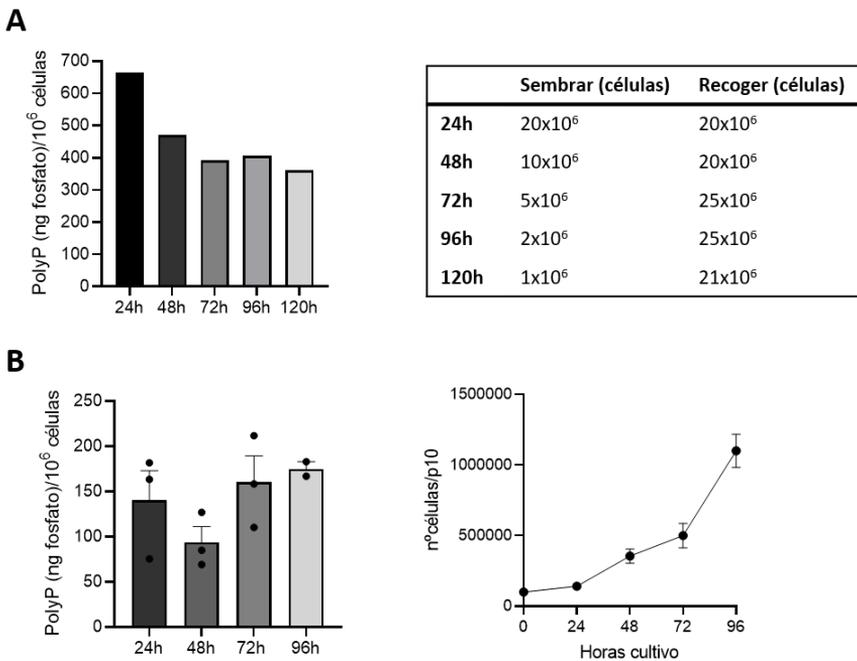
Para seguir estudiando esta posible relación entre la cantidad de polyP y el número de divisiones era necesario eliminar la variable de cultivo independiente y poder seguir la evolución del polyP en un mismo cultivo. Para ello, se optó por repetir el experimento utilizando células en suspensión, en concreto, las células Jurkat. Estas células son una línea celular humana derivada de un paciente con leucemia aguda de células T, y se ha visto que poseen polyP (Kumble & Kornberg, 1995). Estas células permitieron purificar polyP cada 24 h de un cultivo continuo durante 4 días.

En la figura 34B se puede observar la curva de crecimiento del cultivo. Se observa cómo, en los tiempos estudiados, no se alcanzó la fase estacionaria y que las células estuvieron dividiéndose continuamente. También se puede observar que las cantidades de polyP purificadas son siempre muy similares, independiente del tiempo que lleven las células en cultivo, mostrando niveles de 140

## *Resultados*

---

ng de fosfato/ $10^6$  células para 24 h, 94 ng de fosfato/ $10^6$  células para 48 h, 160 ng de fosfato/ $10^6$  células para 72 h y 174 ng de fosfato/ $10^6$  células para 96 h. Este resultado descarta la hipótesis de que los niveles de polyP caen a lo largo de las divisiones y el consumo del medio de cultivo y, por lo tanto, va en dirección opuesta al resultado anterior. Esto puede ser debido a que, tanto la línea celular como las condiciones de cultivo son diferentes entre ambos experimentos. En el caso de las células HEK293T sembradas en placa, tenemos mucha más confluencia y densidad de células por medio de cultivo, y esto puede hacer que tengamos mayor depleción de nutrientes que en el caso del cultivo de Jurkat en suspensión.



**Figura 34: Medición de los niveles de polyP según el tiempo de cultivo. A:** Niveles de polyP obtenido sembrando diferentes cantidades de células HEK293T iniciales según el tiempo de cultivo. **B:** Niveles de polyP obtenido a diferentes puntos de un cultivo celular de Jurkat en suspensión. En ambos casos se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 3  $\mu\text{g}$  de Ppx1 durante 3h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595\text{nm}}$  y se normaliza según el número de células finales recogidas.

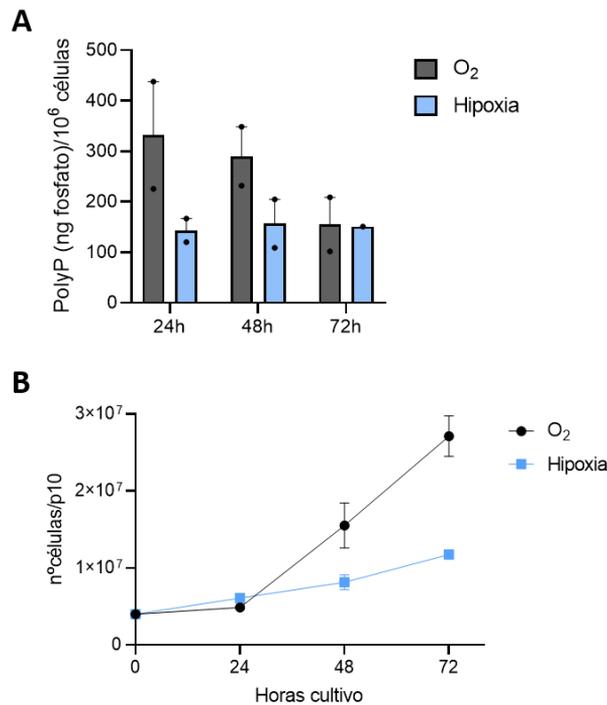
### 5.5.2. Hipoxia

Los cultivos celulares de rutina se mantienen con condiciones de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) que distan mucho de ser las encontradas en condiciones fisiológicas en los tejidos. Esta diferencia de concentración de  $\text{O}_2$  es aún más acuciante en situaciones de cáncer, dónde las células se encuentran en hipoxia. Como ya se ha comentado, el metabolismo del polyP está relacionado con la tumorigénesis y es por ello que se quisieron estudiar las posibles variaciones del polyP en condiciones de hipoxia.

## *Resultados*

---

Para ello se sembraron 6 placas de 10 mm con 4 millones de células HEK293T por placa para cada condición. Por un lado, dichas placas estarían en el incubador con un porcentaje de oxígeno de alrededor del 20% y, por otro lado, se mantuvieron las placas en un incubador de hipoxia con alrededor de 1% de O<sub>2</sub>. Cada 24 h se extraían 2 placas del incubador: una placa para purificar polyP y otra para contar las células. En la figura 35A se pueden observar los niveles de polyP purificados de ambas condiciones. Se puede ver cómo, tanto a 24 h como a 48 h la cantidad de polyP purificado de las células mantenidas en hipoxia es mucho menor que el purificado de las células crecidas en condiciones normales de cultivo. Además, se vuelve a poner de manifiesto que en condiciones normales los niveles de polyP se van consumiendo a medida que aumenta el tiempo de cultivo y el consumo de nutrientes, aunque sorprendentemente esto no ocurre bajo condiciones de hipoxia. En la figura 35B se muestra la curva de crecimiento para ambas condiciones y se puede observar cómo las células cultivadas en hipoxia muestran un crecimiento mucho menor que las cultivadas en condiciones normales. Este resultado sugiere que las células, en estas condiciones de hipoxia, podrían estar usando el polyP para formar ATP y por ello los niveles de polyP purificado serían menores.



**Figura 35: Medición de los niveles de polyP según la concentración de O<sub>2</sub> durante el cultivo celular.** A: Niveles de polyP purificados de células cultivadas en condiciones normales de O<sub>2</sub> y en hipoxia. En la gráfica se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 3 µg de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a A<sub>595nm</sub> y se normaliza según el número de células finales recogidas. B: Número de células por placa de 10 mm recogidas en cada punto.

### 5.5.3. Diferentes concentraciones de glucosa

Otra de las condiciones a estudiar en cuanto a la privación de nutrientes fue la falta de glucosa en el medio de cultivo. En otros organismos se ha visto que existe una relación entre el crecimiento en medio sin glucosa y la acumulación de polyP de cadena larga (Wood & Clark, 1988). Para estudiar la posible relación en células humanas, se sembraron varias placas de 10 mm con 4 millones de células HEK293T iniciales y, a las 24 h del cultivo, se les cambió el

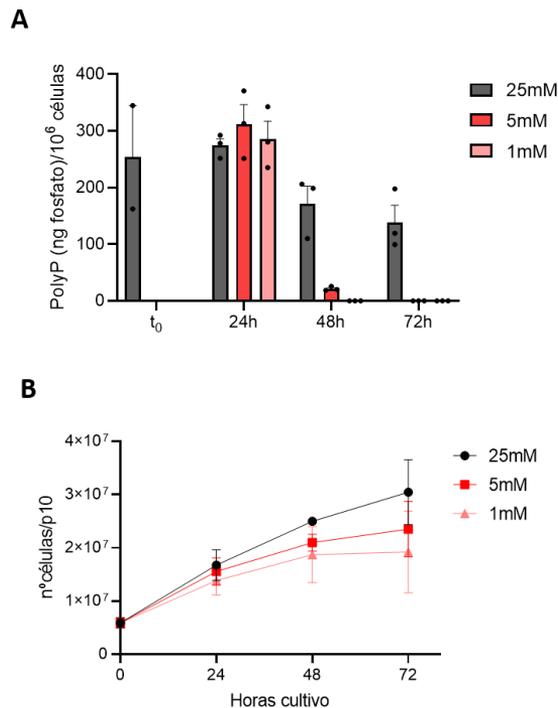
## *Resultados*

---

medio según la concentración de glucosa. Se estudiaron 3 condiciones diferentes de glucosa: 25 mM, 5 mM y 1 mM. Se purificó polyP y se contaron las células del cultivo en el momento del cambio de medio ( $t_0$ ) y cada 24 h de cultivo.

En la figura 36A se pueden ver los niveles de polyP obtenido y se observa como a las 48 h de cultivo en medio con 5 mM de glucosa se observa una caída muy importante del polyP purificado, pasando de 171 ng de fosfato/ $10^6$  células en el caso del cultivo a 25 mM de glucosa a 20 ng de fosfato/ $10^6$  células en el caso del cultivo a 5 mM. En el caso de las células cultivadas con 1 mM de glucosa esta caída es aún mayor puesto que no obtenemos polyP. En la figura 36B se puede ver la curva de crecimiento y se observa como las células, cuanto menor es su concentración de glucosa en el medio, menor es su ritmo de crecimiento.

Estos resultados apuntan a que la falta de nutrientes afecta al metabolismo del polyP y sugieren que el polyP podría estar siendo utilizado, como en el caso anterior, como fuente de energía. Sería interesante llevar más experimentos a cabo para poder estudiar más esta relación.



**Figura 36: Dinámicas del polyP en según la concentración de glucosa en el medio de cultivo en células HEK293T. A:** Comparación de los niveles de polyP obtenido a diferentes tiempos de cultivo de células cultivadas en medio DMEM con 25 mM, 5 mM o 1 mM de glucosa. Se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 3  $\mu$ g de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$  y se normaliza según el número de células finales recogidas. **B:** Curvas de crecimiento de las células cultivadas en DMEM con 25 mM, 5 mM o 1 mM de glucosa.

#### 5.5.4. Cultivo en medio sin fosfato

Continuando con el estudio de la privación de nutrientes en el medio, lo siguiente que se estudió fue la relación entre la concentración de fosfato en el medio y las variaciones del polyP intracelular. Esta relación está ampliamente estudiada en otros organismos como levaduras, donde se observa que las reservas de polyP son movilizadas rápidamente en respuesta a la falta de fosfato en el medio (Thomas & O'Shea, 2005). Para realizar el estudio en

## *Resultados*

---

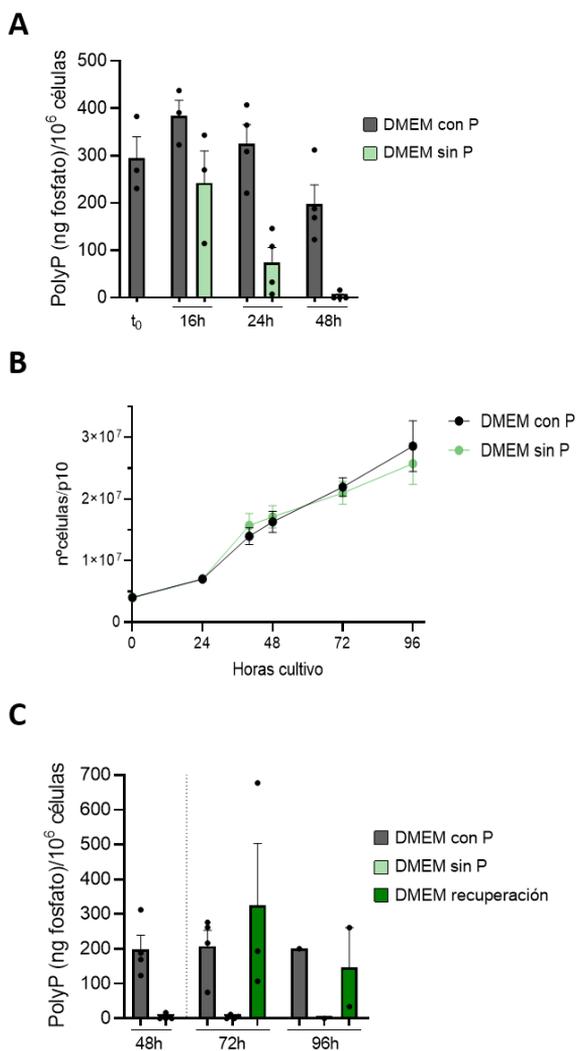
células humanas, se sembraron varias placas de 10 mm de células HEK293T en medio DMEM completo, a las 24 h se le cambió el medio a medio sin fosfato o a medio completo según la condición de cultivo, y se purificó polyP cada 24 h de cada condición. También se purificó polyP en el momento del cambio de medio ( $t_0$ ).

En la figura 37A se puede observar como a las 16 h de cultivo, las células en medio sin fosfato poseen menos polyP que las células que están creciendo en medio con fosfato, pasando de 383 ng de fosfato/ $10^6$  células a 242 ng de fosfato/ $10^6$  células. A las 24 h esta diferencia se acentúa todavía más y a las 48 h las células en medio sin fosfato ya no poseen polyP. Esto indica que las células están usando el polyP celular pero no están siendo capaces de mantener sus reservas, debido a que la falta de fosfato en el medio debe impedir en cierta medida su síntesis. Además, se observa como el cambio de medio (de  $t_0$  a 16 h), con la renovación de nutrientes que ello conlleva, provoca un pequeño aumento del polyP celular.

Paralelamente se estudió el crecimiento de dichas células para ver si la falta de fosfato podía afectar a su crecimiento y no se vieron diferencias entre ambas curvas de crecimiento a los tiempos estudiados (figura 37B), sugiriendo que la falta de polyP, o al menos de la población de polyP que se detecta mediante esta técnica, no afecta al ritmo de división celular en periodos cortos de tiempo.

Una particularidad de los organismos que acumulan polyP es que son capaces de acumular esta molécula cuando, pasado un tiempo sin fosfato, se les vuelve a exponer a este metabolito (Bru et al., 2017). Tras estos resultados, se procedió a estudiar si las células humanas también son capaces de recuperar los niveles de polyP iniciales añadiendo de nuevo fosfato en el medio. Para ello, a las células que habían estado 48 h en medio sin fosfato se les cambió el medio a DMEM completo (denominadas en la figura 36C como DMEM recuperación) y se procedió a purificar polyP cada 24 h. En la figura 37C se observa que, a las 72 h de cultivo, las células DMEM recuperación, que llevan 24 h con medio completo, recuperan el polyP celular, alcanzando los niveles iniciales (325 ng de fosfato/ $10^6$

células frente a 207 ng de fosfato/ $10^6$  células), para 24 h después, volver a niveles normales (147 ng de fosfato/ $10^6$  células frente a 200 ng de fosfato/ $10^6$  células). Estos resultados demuestran que, al igual que en eucariotas unicelulares, la cantidad de polyP celular está intrínsecamente relacionada con la concentración de fosfato en el medio.



**Figura 37: Dinámicas del polyP en según la cantidad de fosfato en el medio de cultivo en células HEK293T. A:** Comparación de los niveles de polyP obtenido a diferentes tiempos de cultivo en medio DMEM completo o en medio DMEM sin fosfato. **B:** Curvas de crecimiento de las células cultivadas en DMEM completo o DMEM sin fosfato. **C:** Comparación de los niveles de fosfato en células cultivadas en medio completo, medio sin fosfato y células que, tras 48 h de cultivo en medio sin fosfato, se cambian a medio completo (DMEM recuperación) (cambio de medio marcado con la línea de puntos). En ambos casos se comparan los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 3  $\mu\text{g}$  de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre producido por Ppx1 se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595\text{nm}}$  y se normaliza según el número de células finales recogidas.

## 5.6. Medidas en condiciones de estrés

Otra de las situaciones en las que el polyP puede tener relevancia es en condiciones de estrés celular. En bacterias se ha visto que el polyP actúa como inhibidor de la reacción de Fenton (Beaufay et al., 2020). Nuestro grupo ha descrito recientemente que la degradación del polyP celular es un evento clave en la supervivencia celular frente al estrés oxidativo (Samper-Martin et al., 2021). Por último, otros grupos han visto que parece haber una relación entre la cantidad de polyP celular y la administración de fármacos quimioterapéuticos como el cisplatino (Xie et al., 2019). Los métodos de detección desarrollados a lo largo de esta tesis han permitido ahondar en el estudio del metabolismo del polyP frente a condiciones de estrés, como por ejemplo el daño al ADN.

### 5.6.1. Dinámica del polyP frente al daño al ADN

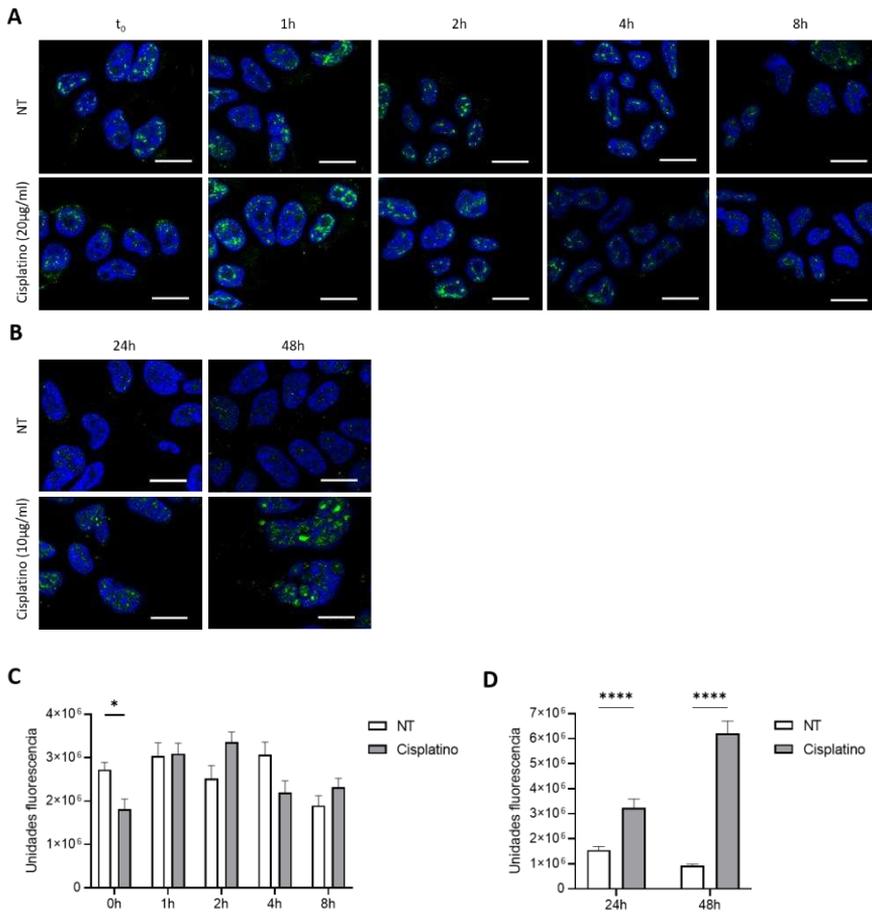
Para generar daño al ADN se ha utilizado el fármaco cisplatino. El cisplatino es un agente alquilante, usado como quimioterapéutico, en especial en casos de cáncer de pulmón u ovario. Su método de acción se ha relacionado con su capacidad de entrecruzarse con las purinas del ADN, causar daños en el ADN e interferir con los mecanismos de reparación y, por último, inducir apoptosis.

Para poder estudiar la posible relación del polyP con el daño al ADN, lo primero que se estudió fue la dinámica natural del polyP mediante ensayos de inmunofluorescencia al tratar las células con cisplatino. Para ello, se sembraron células HEK293T, se trataron con diferentes dosis de cisplatino y se estudió el polyP celular a diferentes tiempos. En el caso del estudio a tiempos cortos, de  $t_0$  (cuando se administró el fármaco) a 8h, se trataron con 20  $\mu\text{g/ml}$  de cisplatino. Las células que iban a estar más tiempo con el fármaco, de 24 a 48 h, se trataron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de cisplatino puesto que se vio que con una concentración mayor las células no eran viables.

## *Resultados*

---

En la figura 38 se pueden observar las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia de las células tratadas a tiempos cortos (figura 38A) y a tiempos largos (figura 38B). Se observa que, a tiempos cortos, el metabolismo del polyP no parece verse afectado por la administración de cisplatino, al menos a las dosis estudiadas, salvo a  $t_0$ , inmediatamente tras administrar el cisplatino (pvalue=0,013) (figura 38C). En la figura 38D se puede observar que, a las 24 h, las células tratadas con cisplatino poseen el doble de polyP que las células sin tratar. Estas diferencias se aprecian en las imágenes tomadas por inmunofluorescencia donde se observa como aparecen acumulaciones de polyP en el núcleo (figura 38B). A las 48 h estas diferencias se acentúan y se ve como los núcleos de las células tratadas presentan la morfología afectada y estas acumulaciones son aún mayores. Estos resultados demuestran que existe una relación entre el daño al ADN producido por cisplatino y la cantidad de polyP celular, de forma que el polyP parece acumularse frente al tratamiento, sugiriendo una posible función protectora.



**Figura 38: Efecto del cisplatino sobre la dinámica del polyP celular. A y B:** Imágenes representativas de inmunofluorescencia usando Xpress-PPBD tomadas en un Leica SP8 a 63x de células HEK293T. En **A** se puede ver la dinámica del polyP a tiempos cortos (máx 8h) en células tratadas con 20 µg/ml de cisplatino, mientras que en **B** se observan los efectos a tiempos largos (24-48h) tras tratar las células con 10 µg/ml de cisplatino. En todas las condiciones se muestra el merge de la tinción del ADN por Hoechst y la señal del Xpress-PPBD. Barra de escala: 15 µm. **C y D:** Cuantificación de la señal Xpress-PPBD mediante Fiji-ImageJ. **C:** Cuantificación de las variaciones a tiempos cortos, pvalue=0,013. **D:** Diferencias a 24-48 h de tratamiento con cisplatino, pvalue <0,001. Se han realizado 3 experimentos y cada valor independiente representa un campo con una media entre 20-100 células por campo.

Estos resultados sugerían que podía existir una relación entre la cantidad de polyP celular y la supervivencia al daño al ADN. Para

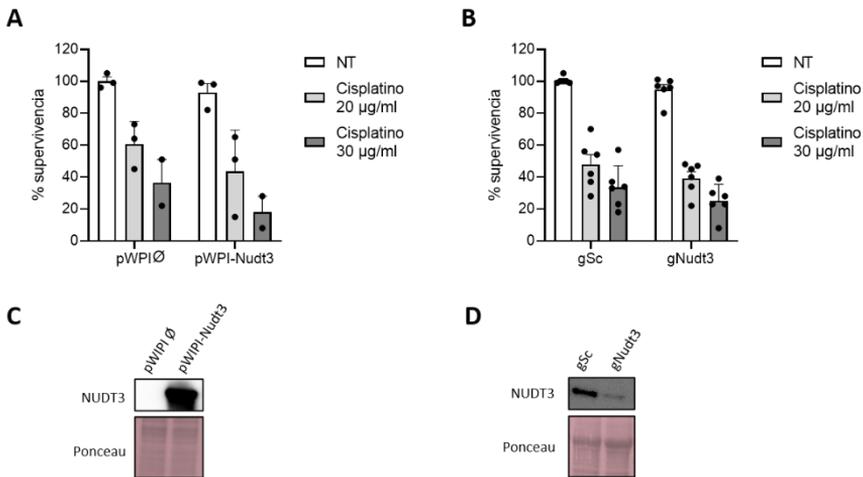
estudiar esta posible función del polyP en células humanas, se procedió a modificar los niveles de polyP celular y realizar estudios de viabilidad tras tratar las células con cisplatino.

### 5.6.2. Estudios de viabilidad tras daño al ADN

Para estudiar si estas acumulaciones de polyP que se habían observado anteriormente podían estar relacionadas con una mayor o menor supervivencia celular, se trataron con cisplatino células HEK293T a las que, o bien se les había deplecionado el polyP mediante la sobreexpresión de NUDT3, o bien se les había realizado un *knockout* de NUDT3, impidiendo de esta forma que la célula pueda utilizar el polyP. En estas condiciones se estudió la supervivencia mediante ensayos de MTT.

En la figura 39A podemos ver cómo, en las células tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino, las células que poseen menos polyP por la sobreexpresión de NUDT3 presentan una reducción del 20% en cuanto a su supervivencia frente al daño al ADN respecto de las células control. En la dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino, la supervivencia baja de un 36% a un 18% en el caso de las células con menor cantidad de polyP, lo cual supone una reducción de la supervivencia de un 50% frente al control. Este resultado demuestra que las células que poseen menos polyP ven reducida su supervivencia frente al daño al ADN, y concuerda con los resultados anteriores en los que se sugería un papel protector del polyP.

En la figura 39B se puede ver cómo, en el caso del impedimento de usar el polyP por el *knockout* de NUDT3, las diferencias son menores, pasando en células tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino, de un 47% de supervivencia en el caso de las células control, a un 39% de supervivencia. En el caso de las células tratadas con 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cisplatino, la supervivencia baja de un 33% a un 25% en las células que no expresan NUDT3. En todo momento se siguió la expresión de NUDT3 mediante Western blot (figura 39C y D).



**Figura 39: Efecto del cisplatino sobre la supervivencia de células HEK293T medido por MTT. A y B:** Supervivencia relativa medida por ensayo MTT en HEK293T donde se ha sobreexpresado **(A)** o realizado el *knockout* de NUDT3 **(B)**. Tras 72 h desde la transfección, se trataron las células con 20 o 30 µg/ml de cisplatino. 48 h después, se realizó el ensayo MTT. Datos normalizados al plásmido vacío en ambos casos. **C y D:** Western Blot comprobatorio de la expresión de NUDT3 utilizando en ambos casos la tinción ponceau como control de carga.

Estos resultados, en conjunto con los resultados anteriores, demuestran que el polyP puede tener una función protectora frente al daño al ADN y, por ello, cuando la célula ve disminuidos sus niveles de polyP, se ve afectada su supervivencia

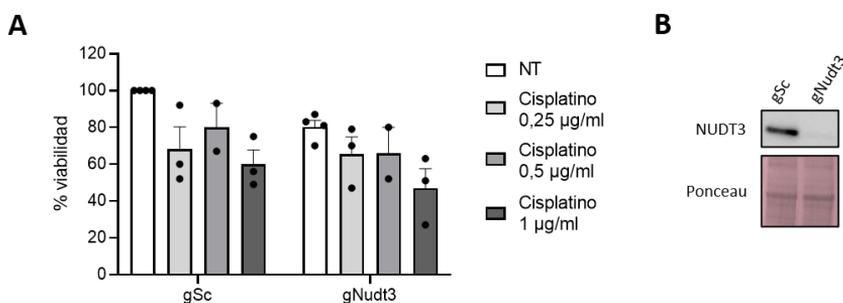
El ensayo MTT nos proporciona información sobre el estado de la célula frente a un daño al ADN agudo. También se quiso valorar el efecto a largo plazo, dónde la presión del tratamiento hará que las células más afectadas no sobrevivan. Para ello, se realizaron ensayos de *colony forming*, mediante los cuales se podría estudiar el papel del polyP en la respuesta al daño al ADN y la reparación a largo plazo. Para la realización del *colony forming* se transfectaron las células bien con el plásmido control o bien se les realizó el *knockout* de NUDT3. A las 72 h se trataron con diferentes dosis de cisplatino y, tras 24 h, se levantaron y se sembraron 500 células/ml en placas de

## Resultados

p6. Se mantuvieron en cultivo 7 días y se pasaron a estudiar las colonias resultantes.

En la figura 40A se puede observar que el *knockout* de NUDT3 por sí solo ya provoca una reducción de la viabilidad de las células, puesto que esta cae un 20% respecto del control. Aun así, tras 2-3 experimentos independientes, no se observaron diferencias entre las células transfectadas con el plásmido control y las que no expresaban NUDT3 en ninguna de las tres dosis estudiadas de cisplatino. En todo momento se siguió la expresión de NUDT3 por Western blot (figura 40B).

Estos resultados sugieren que, por una parte, las células se ven afectadas a largo plazo por la falta de expresión de NUDT3 y la imposibilidad de usar el polyP. Por otra parte, esta imposibilidad de utilizar el polyP no parece afectar a la supervivencia a largo plazo frente al daño al ADN. Este resultado sugiere, en concordancia con el resultado anterior, que acumular polyP puede tener un efecto protector frente al fármaco.



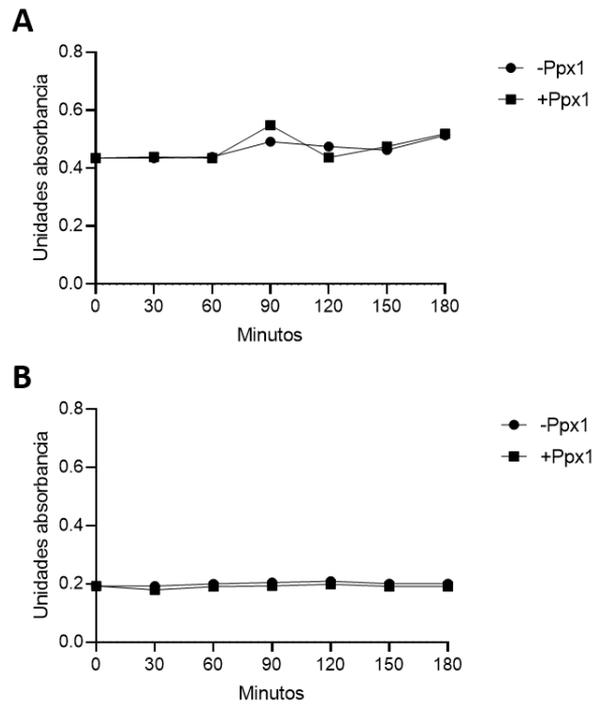
**Figura 40: Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de células HEK293T medido por colony forming.** **A:** Supervivencia relativa medida por ensayo *colony forming* en HEK293T donde se ha realizado el *knockout* de NUDT3. Tras 72 h desde la transfección, se sembraron las células para el ensayo y tras 24 h se trataron con 0,25, 0,5 o 1 µg/ml de cisplatino. El porcentaje de viabilidad se cuantifica por cristal violeta midiendo la absorbancia a  $A_{595nm}$  y normalizando al plásmido vacío en cada caso. Datos normalizados al gSc NT en todos los casos. **B:** Western Blot comprobatorio de la expresión de NUDT3 utilizando la tinción ponceau como control de carga.

## 5.7. Cuantificación del polyP en tejidos

Como se ha observado con anterioridad, las diferentes líneas celulares muestran diferentes cantidades de polyP purificado bioquímicamente, incluso dentro de un mismo tejido, y muchas variaciones en la cantidad de O<sub>2</sub> y nutrientes afectan enormemente a dichas cantidades. Por ello, era necesario poder hacer un estudio de las cantidades de polyP en tejidos de forma más realista, evitando todos estos factores.

Para purificar polyP de tejidos seguimos el protocolo publicado por Kumble y Kornberg (Kumble & Kornberg, 1995) con algunas modificaciones. Tras lisar el tejido, se procedió a purificar mediante el método de fenol-cloroformo usado en líneas celulares.

Se comenzó la purificación de cerebro de ratón, puesto que es uno de los tejidos con más polyP (Kumble & Kornberg, 1995). Se partió de un peso total de 1 g, y se procedió a la purificación. Tras la purificación se realizó el ensayo con Ppx1 para cuantificar el polyP obtenido. En la figura 41A se puede observar que los niveles de absorbancia obtenidos eran elevados y no mostraban diferencias al incubar con Ppx1. Esto es debido a que la muestra purificada contenía niveles muy altos de fosfato. Tras este inconveniente, se procedió a realizar una diálisis para intentar eliminar dicho fosfato. Se utilizaron columnas de diálisis y se mantuvo el purificado durante una noche a 4°C con 1 L de agua bidestilada. En la figura 41B se puede observar cómo se eliminó el fosfato de la muestra, puesto que los niveles de absorbancia son menores, pero, al incubar el purificado con Ppx1, no aumentaron, por lo que podemos concluir que no se había purificado polyP. También se realizó una purificación partiendo de tejido de corazón, puesto que es el tejido del que se ha purificado más polyP con anterioridad (Kumble & Kornberg, 1995; Seidlmayer et al., 2019), pero se obtuvieron los mismos resultados. Esta es una línea de investigación que se debe continuar estudiando y probando.



**Figura 41: Cuantificación del polyP purificado de cerebro de ratón. A:** Niveles de absorbancia obtenidos en el ensayo con Ppx1. **B:** Niveles de absorbancia obtenidos tras realizar la diálisis de la muestra. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos tras un ensayo en presencia de 3  $\mu\text{g}$  de Ppx1 durante 3 h a 37°C. La cantidad de fosfato libre se cuantifica mediante verde malaquita midiendo la absorbancia a  $A_{595\text{nm}}$ .

## *Discusión*

---



## 6. Discusión

### 6.1. Detección del polyP nuclear por inmunofluorescencia

En esta tesis se ha puesto a punto la detección del polyP por inmunofluorescencia mediante el uso del PPBD. Se ha demostrado que la señal obtenida es específica de polyP mediante el tratamiento de las células fijadas con Ppx1 o mediante la sobreexpresión de NUDT3. De ambas formas, al deplecionar el polyP, la señal del PPBD disminuyó, demostrando que esta señal era específica de polyP.

Las imágenes obtenidas indican que el polyP se localiza principalmente en el núcleo de las células HEK293T. Este resultado es consistente con trabajos anteriores, donde se determinó que la mayor concentración de polyP celular se encontraba en el núcleo (Kumble & Kornberg, 1995). Otros investigadores también han encontrado una distribución del polyP principalmente nuclear al detectarlo por inmunofluorescencia, en su caso detectándolo mediante DAPI (Jimenez-Nunez et al., 2012). Esta localización nuclear corresponde con las zonas excluidas de la tinción por Hoechst que se considera eucromatina (DNA transcripcionalmente activo). Esta localización podría estar relacionada con las funciones del polyP como regulador transcripcional (Jimenez-Nunez et al., 2012). El estudio de estos compartimentos nucleares podría revelar nuevas funciones del polyP nuclear y podría ser una posible línea de investigación en un futuro.

Sin embargo, como se ha introducido anteriormente, es importante destacar que la presencia de polyP en otros orgánulos ha sido reportada previamente. Algunos estudios han demostrado, también mediante ensayos de inmunofluorescencia, la presencia de polyP en regiones del citoplasma. Este es el caso de Arredondo et al., quienes detectan polyP tanto con la sonda JC-D8 como con PPBD y muestran una señal punteada citoplasmática con ambos métodos (Arredondo et al., 2022). Otros grupos han colocalizado la señal obtenida mediante PPBD con marcaje de mitocondrias (Solesio et al., 2016).

Estas diferencias podrían ser debidas a los diferentes tipos celulares usados. En esta tesis se ha comprobado que diferentes líneas celulares poseen diferentes patrones de señal de polyP. En el caso de las HEK293 y HEK293T se puede ver una localización del polyP principalmente nuclear, pero en cambio, en las células HeLa se observa que la señal de polyP predomina en la región citoplasmática. La variabilidad en localización puede deberse a que diferentes tipos celulares posean diferentes ratios de polyP nuclear/citoplasmático o diferentes conformaciones del mismo, provocando que el PPBD se una de forma diferente y dé patrones de localización distintos. Este fenómeno ya ha sido observado por otros grupos de investigación, en los cuales se ha observado que, utilizando la misma tinción, las células epiteliales presentaban señal citoplasmática mientras que las células plasmáticas mostraban señal tanto en el núcleo como en el citoplasma (Boyineni et al., 2020).

Comparando los diferentes métodos, estas discrepancias en la localización también podrían deberse a las diferencias en los pasos de los protocolos, puesto que, por ejemplo, cada equipo utiliza diferentes cantidades de PPBD, variando de 20-30  $\mu\text{g/ml}$  en el caso de otros grupos, a los 12  $\mu\text{g/ml}$  que se utilizan en el protocolo presentado en esta tesis. Con todo esto, estos resultados demuestran que este método de detección es totalmente válido para detectar el polyP nuclear. Se podría estudiar en un futuro si, aplicando este protocolo a otros tipos celulares o variando algunos pasos del protocolo, se podrían marcar otras localizaciones del polyP.

### 6.2. Detección del polyP *in vivo*

Un objetivo de esta tesis era desarrollar nuevos métodos para el análisis del polyP y la detección *in vivo* es uno de los métodos de detección que más información proporcionaría y en el que menos avances hay en la actualidad. Para lograr este objetivo, se utilizó el PPBD fusionado a dos proteínas fluorescentes diferentes, eGFP y mCherry, probando 6 construcciones diferentes. En todos los casos

se obtuvo una señal definida y localizada alrededor del núcleo. Esta señal presenta otra localización diferente de la señal obtenida mediante la detección por inmunofluorescencia, pero es similar a la obtenida por otros investigadores (Arredondo et al., 2022).

La diferencia de localización de la señal podría ser debida al diferente método de detección. El PPBD es una molécula pequeña, que al fusionarla con eGFP o mCherry dobla su tamaño hasta alcanzar aproximadamente los 52 kDa, aunque no llega al límite de 60 kDa de tamaño que permite el poro nuclear para difundir al interior del núcleo (Weis, 2003). Aun así, esta diferencia de tamaño podría estar impidiendo que el PPBD marque el polyP nuclear y solo muestre polyP citoplasmático. La única tinción del polyP in vivo que se ha conseguido a día de hoy ha sido usando la sonda JC-D7 y, mediante esta aproximación, también se obtuvo un marcaje similar a los resultados mostrados en esta tesis (Angelova et al., 2014).

Esta sonda JC-D7 mostró niveles mayores de intensidad de señal al transfectar las células con PPK dirigida a mitocondria y, mediante la aproximación contraria, disminuyó su intensidad al transfectar las células con PPX dirigida a mitocondria (Angelova et al., 2014). Por el contrario, en la realización de esta tesis, a pesar de que el PPBD muestra gran especificidad por el polyP, no se consiguió validar esta señal puesto que, al deplecionar los niveles de polyP celular mediante la sobreexpresión de NUDT3, no se disminuyó la intensidad de la señal.

### 6.3. Determinación bioquímica del polyP

En esta tesis se presenta un protocolo para la extracción, purificación y cuantificación de polyP de células humanas. Diversos equipos han utilizado a lo largo de tiempo diferentes métodos para la purificación de esta molécula, obteniendo cantidades diferentes a las obtenidas mediante este protocolo.

Siguiendo este protocolo, se ha conseguido purificar de células HEK293 alrededor de 2821 pmol Pi/ $10^6$  células (o 14215 pmol Pi/mg de proteína). Esta cantidad es muy superior a la purificada por otros equipos investigadores con otros métodos. Por ejemplo, Kumble y Kornberg, realizando una extracción con fenol-cloroformo, fueron capaces de purificar 310 pmol Pi/mg proteína de células HEK293, lo que son 6 veces menos de polyP obtenido. En el caso de las células Jurkat, Kumble y Kornberg consiguieron purificar 95 pmol Pi/mg proteína mientras que en esta tesis se han purificado 17900 pmol Pi/mg proteína (Kumble & Kornberg, 1995). También es el caso de Jimenez-Nuñez et al., que realizando el mismo protocolo purificando polyP de células U266 obtienen 91,8 pmol Pi/  $10^6$  células, aunque en este caso la línea celular es diferente (Jimenez-Nunez et al., 2012). Estas diferencias podrían ser debidas al método de extracción o al tipo de línea celular. Algunos de los protocolos de extracción usados en la literatura utilizan ácidos o bases fuertes y se ha observado que las extracciones con estos compuestos provocan la degradación del polyP (Bru et al., 2016). En los resultados de esta tesis, se han comparado varios reactivos para realizar la extracción mediante fenol-cloroformo y se han encontrado diferencias importantes. El fenol-cloroformo con el que se obtienen mejores resultados es la mezcla fenol-cloroformo-IAA (125:24:1) mientras que realizar la extracción con fenol solo y añadir cloroformo en un paso posterior disminuye el polyP purificado. Además, sorprendentemente, aunque la formula y proporciones del fenol-cloroformo sean iguales, existen diferencias entre casas comerciales. Esta es la debilidad que presenta este protocolo y un punto a mejorar en el futuro que sugiere que los excipientes del producto son claves a la hora de extraer el polyP.

El método de purificación (mediante precipitación con etanol o uso de columnas de afinidad) también se ha visto que influye en la cantidad de polyP recuperado y también es un factor que podría ser el causante de las diferencias en las concentraciones de polyP obtenidas entre diferentes grupos. Anteriormente ya se ha comprobado una pérdida de polyP de cadena corta al purificar polyP

mediante columna (Bru et al., 2016). Puede que, por su longitud o estructura, el polyP procedente de células humanas y purificable por fenol-cloroformo no se quede retenido en la columna utilizada. Además, la incubación con DNAsa/RNAsa ha sido utilizada ampliamente para eliminar posibles contaminaciones por ácidos nucleicos, y se ha demostrado en esta tesis que puede interferir en la cuantificación, conllevando a una subestimación del polyP purificado. Es posible que la DNAsa/RNAsa se una al polyP de forma inespecífica, recubriéndolo y haciéndolo inaccesible para Ppx1. De esta forma, la cuantificación del polyP purificado es menor. Esta capacidad del polyP de competir con el ADN o ARN por unirse a ciertas proteínas ya se ha visto que se produce al unirse a la ARN polimerasa o a histonas (I. S. Kulaev, V. M. Vagabov and T. V. Kulakovskaya, 2004). Además, esta incubación con DNAsa/RNAsa no sería necesaria puesto que, utilizando el método de detección basado en el ensayo con Ppx1, se ha demostrado que los ácidos nucleicos no interfieren en la cuantificación al no ser degradables por Ppx1 ni producir fosfato por sí mismos durante el proceso de cuantificación.

Con este método de purificación se ha podido analizar que los niveles de polyP presentan diferencias según las líneas estudiadas. Por ejemplo, se ha observado que las células tumorales de pulmón H1395 son las que poseen una concentración más alta de polyP entre todas las células estudiadas. Estos hallazgos coinciden con datos previos, donde se presenta el pulmón como uno de los tejidos de ratón que más polyP poseen, con cantidades muy similares al cerebro (Kumble & Kornberg, 1995). En concreto, si comparamos las líneas estudiadas según su cantidad de polyP, el orden sería el siguiente: H1395 (pulmón)> HEK293> HEK293T> MCF-7 (mama)> CCD-18Co (colon)> A549 (pulmón)> Neuronas corticales> HT-29 (colon)> HeLa> U-87 (cerebro)> MDA-MB-231 (mama)> SHSY-5Y (cerebro) y, por último, LoVo (colon) y MRC-5 (pulmón) de las cuales no se ha conseguido extraer polyP. Cabe destacar que las líneas que muestran 0 ng fosfato/10<sup>6</sup> células no quiere decir que no posean polyP. Se debe considerar que el polyP cuantificado es el purificable

por el método presentado y degradable por Ppx1. Posiblemente este no sea el polyP total de la célula y existan otras poblaciones que no se detectan mediante esta técnica.

### 6.3.1. Cuantificación del polyP

#### **Efecto de los iones y las poliaminas sobre la actividad polifosfatasa de Ppx1.**

La purificación con fenol cloroformo es una técnica utilizada ampliamente para purificar ADN o ARN y, en este caso, polyP. Este proceso, sin embargo, no está libre de posibles contaminantes. Durante la purificación con fenol cloroformo se pueden arrastrar sales, iones y algunas moléculas que podrían contaminar la muestra y afectar a la cuantificación, como sería el caso del  $Zn^{2+}$ , el  $Ca^{2+}$  o la espermina.

En otros organismos se han encontrado complejos de polyP unidos a poliaminas como la espermidina y a iones como el  $Ca^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  (Dunn, Gable, & Beeler, 1994; Ruiz, F. A., Rodrigues, & Docampo, 2001). Estos iones y poliaminas podrían recubrir el polyP y ser arrastradas en el momento de la purificación. Al recubrir el polyP, impedirían la unión de Ppx1, resultando en una menor degradación del polyP y una menor producción de fosfato. Debido a esto, al cuantificar el polyP de la muestra se subestimaría la cantidad de polyP.

#### **Especificidad de sustrato de Ppx1.**

A pesar de la gran especificidad de Ppx1 por el polyP, parece haber una población de polyP inaccesible a su degradación por esta enzima. Al incubar polyP comercial con diferentes enzimas, vemos como Ppx1 es la que más fosfato produce, pero, si incubamos polyP purificado de HEK293T vemos que la FA produce 10 veces más fosfato que Ppx1. Este fosfato no puede venir de la degradación de ácidos nucleicos, puesto que en la incubación del purificado con DNAsa/RNAsa no se observa la producción de fosfato libre. Es

posible que, al purificar polyP de células humanas, se purifique una fracción de polyP que, por su estructura, no sea degradable por Ppx1 y sí por la FA. Es importante recordar que Ppx1 presenta mayor afinidad por polyP de cadena larga, mientras que la actividad *in vitro* de la FA es mayor cuanto menor es la cadena de polyP (Lorenz & Schroder, 2001; Wurst & Kornberg, 1994). Anteriormente se ha demostrado que el polyP purificado de HEK293 mediante columna es de longitud corta-media, con menos de 200 residuos de fosfato (Smith, Gajsiewicz, & Morrissey, 2018). Sería interesante comprobar la longitud media del polyP purificado de células humanas mediante este método o incluso en un futuro, poder realizar este mismo estudio con una exopolifosfatasa humana y ver si esta produce más fosfato libre que Ppx1.

#### 6.4. Cuantificación de polyP en diferentes líneas celulares.

En la caracterización del polyP en las diferentes líneas celulares hemos podido estudiar las cantidades de dicha molécula de forma cuantitativa por bioquímica y, en el caso de las líneas modelo, también se ha podido realizar el estudio de la localización por inmunofluorescencia.

##### **Detección por técnicas de inmunofluorescencia vs bioquímica.**

En las líneas en las que se han realizado ambas técnicas, se observa una asociación entre la cantidad de polyP purificado bioquímicamente y la detección mediante la técnica de inmunofluorescencia, de forma que, la línea que exhibe mayor concentración de polyP a nivel bioquímico también es la que presenta mayor intensidad de señal por inmunofluorescencia. No obstante, se debe tener presente que esta correspondencia no es necesariamente obligatoria. Se podría estar purificando y cuantificando poblaciones de polyP diferentes a las que se visualizan utilizando la técnica de inmunofluorescencia. Mediante la purificación bioquímica se extrae el polyP total, tanto polyP nuclear como mitocondrial o citoplasmático (Arredondo et al., 2022;

Samper-Martin et al., 2021; Solesio et al., 2016), aunque tanto la longitud de la molécula como su conformación podrían estar afectando al proceso de purificación. Diferentes artículos fundacionales sugieren de la existencia de moléculas de polyP que se extraen bajo diferentes condiciones dependiendo de su longitud (Lorenz et al., 1997). Además, la conformación de estas cadenas de polyP también puede ser un factor clave a la hora de determinar la susceptibilidad del polyP a la hidrólisis inespecífica. Se ha determinado que el polyP ramificado se hidroliza a los pocos segundos de lisis de la célula y, por tanto, es una fracción muy difícil de analizar (Harold, 1966). Todo esto apunta a que, con este método, se podría estar purificando solamente una longitud de cadena de polyP concreta, o incluso una conformación estructural única del mismo.

Además, la purificación bioquímica requiere de un último paso de cuantificación mediante la actividad enzimática de la exopolifosfatasa Ppx1. Esto significa que solamente es está cuantificando aquella población de polyP con extremos libres susceptibles al ataque por esta enzima. Teniendo en cuenta que se han descrito diversas conformaciones del polyP, incluyendo la circular, la cual carece de extremos libres, no es posible saber hasta qué punto se podría estar subestimando los niveles de polyP celular (Harold, 1966).

En lo que respecta a la inmunofluorescencia, se deben considerar ciertos aspectos críticos que pueden ser fuentes de variabilidad. Entre ellos podemos destacar la fijación de la muestra, la permeabilización y la afinidad del PPBD por el polyP. En primer lugar, la fijación de la muestra es un aspecto relevante a tener en cuenta ya que el método utilizado (10% PFA) no permite la fijación de la molécula de polyP debido a que carece de grupos funcionales capaces de reaccionar con el paraformaldehído. Es una incógnita como el polyP permanece en la muestra después de todo el proceso de inmunofluorescencia considerando que se realizan lavados abundantes a lo largo del procedimiento. Es posible que únicamente permanezca en la célula el polyP que se encuentre asociado a proteínas. El siguiente aspecto a tener en cuenta es la permeabilización de la muestra, ya que dependiendo del detergente

utilizado se puede obtener una señal más citoplasmática o una más nuclear. Por ejemplo, tratar con tritón está indicado cuando se quiere analizar una proteína nuclear (Svistunova, Musinova, Polyakov, & Sheval, 2012). Por último, la afinidad del PPBD con el polyP depende de la longitud de la molécula, siendo mayor sobre moléculas de más de 100 residuos (Saito et al., 2005). En tejidos como el tejido cardiaco, por ejemplo, donde se ha descrito que la longitud media del polyP es de aproximadamente 25 residuos, la detección con el PPBD podría no ser la opción más adecuada para el análisis del contenido de polyP celular (Seidlmayer et al., 2012).

Todo esto en conjunto sugiere que las técnicas de detección por bioquímica e inmunofluorescencia son métodos complementarios, pero no equivalentes para analizar el metabolismo del polyP celular.

### **Los niveles de polyP celular correlacionan con los niveles de expresión de las polifosfatasas.**

En cuanto a los niveles de polifosfatasas estudiadas, se identificó que NUDT3 se expresa principalmente en las líneas celulares HEK293T y H1395, las cuales también presentan niveles elevados de polyP. Además, se observó que la línea H1395, que posee los niveles más altos de polyP, también presenta la mayor expresión de PRUNE1 dentro de las líneas celulares de pulmón estudiadas. En el tejido mamario, en la línea MCF-7 también se encontró dicha relación, siendo la línea que más polyP posee y la que más expresión de PRUNE1 presenta. Estos resultados sugieren que existe una regulación muy precisa entre los niveles de polifosfatasas y la cantidad de polyP celular y que estas polifosfatasas podrían modular los niveles de polyP según las necesidades de la célula.

Realizando una búsqueda en la base de datos *Human Protein Atlas* se puede comprobar que estos resultados coinciden parcialmente con los datos de expresión de NUDT3 y PRUNE1. En particular, en el tejido pulmonar, la línea H1395 presenta niveles más altos de expresión que la línea A549. Por el contrario, en mama, en la línea MDA-MB-231 hay más expresión de NUDT3 que en MCF-7 y en esta tesis no se han visto diferencias entre ambas líneas. En cuanto a la

expresión de PRUNE1, los datos obtenidos en la base de datos coinciden con los obtenidos en esta tesis, dónde la línea con más expresión es MCF-7. En las líneas estudiadas de colon, la línea HT-29 presenta más expresión de NUDT3 y PRUNE1 según la base de datos, aunque en esta tesis no se han visto diferencias. Sin embargo, cabe destacar que en todas estas líneas se han observado diferencias en la cantidad de polyP, siendo una vez más la línea con mayor expresión de polifosfatasas según *Human Protein Atlas* la que también posee mayor cantidad de polyP.

Todo esto sugiere a una posible conservación a nivel evolutivo del metabolismo del polyP. Se observa una relación estrecha entre la concentración de polyP celular y la presencia de polifosfatasas de forma que se produce una mayor expresión de estas en presencia de una concentración elevada de polyP. Las polifosfatasas estudiadas desempeñan una función crucial en la regulación de la cantidad de polyP celular, por lo que su necesidad sería mayor en aquellas líneas celulares que presentan mayor concentración de polyP.

También se han querido estudiar los niveles de expresión de XPR1 y otras proteínas de la familia NUDIX como son NUDT4, NUDT10 y NUDT11. Los niveles de expresión de XPR1 en las líneas comentadas anteriormente muestran tendencias contrarias a NUDT3 y PRUNE1, con niveles de expresión muy similares en las líneas de mama, más expresión en células LoVo que en HT-29 y mayor expresión en células A549 que en H1395. Los niveles de expresión de NUDT4 muestran la misma tendencia que en NUDT3 y en cuanto a la expresión de NUDT10 y NUDT11 no muestran niveles de expresión significativos en las líneas estudiadas.

### **Diferencias entre células no tumorales y tumorales.**

Ya se ha introducido anteriormente que el polyP parece tener funciones importantes relacionadas con la carcinogénesis. Uno de los hechos sobre los que se apoya esta afirmación es que las células cancerígenas poseen niveles de polyP más elevados que las células normales (Boyineni et al., 2020; Jimenez-Nunez et al., 2012). Esta

mayor concentración de polyP celular podría estar relacionado con funciones importantes en carcinogénesis como serían la proliferación y la migración (Kulakovskaya et al., 2018), pero pocos estudios han podido comparar células cancerosas y no cancerosas, debido a que estas últimas son más difíciles de cultivar. Comparando los resultados obtenidos de células tumorales y no tumorales, sólo en el tejido pulmonar podemos observar que las células tumorales poseen más polyP que las no tumorales. En las líneas celulares de tejidos como el cerebro o el de colon, la dinámica parece ser la contraria.

Las diferencias entre células tumorales y no tumorales no solo están en la concentración de polyP. PRUNE1 se ha propuesto anteriormente como una diana terapéutica y un marcador de diagnóstico en cáncer no microcítico de pulmón (Carotenuto et al., 2014). En este tejido se puede observar una clara diferencia de expresión entre las células MRC-5 (no tumorales) y las A549 y H1395, presentando las líneas tumorales niveles mucho más elevados de expresión de PRUNE1 que la línea no tumoral. Por otro lado, esta tendencia tan clara no se observa en las líneas celulares estudiadas de colon. Es posible que estas diferencias entre células tumorales y no tumorales se den a nivel de tejido y no a nivel general en todos los tejidos del organismo.

### 6.5. Variaciones del metabolismo del polyP según la disponibilidad de nutrientes.

En esta tesis, se ha observado que las células HEK293T consumen el polyP a las pocas horas de ser cultivadas en medio carente de fosfato o en medio con baja concentración de glucosa, provocando una reducción significativa del crecimiento celular. Otros organismos, como bacterias y levaduras, acumulan de forma transitoria y posteriormente consumen polyP en condiciones de privación de nutrientes (Breus et al., 2012; Rao et al., 1998). De hecho, en levaduras, se ha sugerido que el polyP es esencial para realizar la glucólisis puesto que sería la fuente de fosfato necesaria para la segunda parte de la glucólisis (van Heerden et al., 2014). En

células, la sobreexpresión de PPX1 en MCF-7 provoca un descenso en el crecimiento celular cuando las células crecen en ausencia de FBS, indicando que el polyP es una fuente de reserva energética en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Wang et al., 2003).

En cuanto a la posible función del polyP como fuente de fosfato, en levaduras, los niveles de polyP siguen un comportamiento cíclico y sirven como fuente de fosfato para la síntesis de dNTPs durante la fase S de ciclo celular (Bru et al., 2016). Este fenómeno es esencial en condiciones de privación del fosfato externo. También se ha observado que pueden recuperar sus niveles de polyP tras administrar fosfato de nuevo (Bru et al., 2017). Esta misma dinámica se ha observado en los resultados de esta tesis en células HEK293T.

Por otro lado, en células tumorales se ha observado que la privación de glucosa en el medio provoca un consumo del polyP como fuente de energía (Boyineni et al., 2020). En este caso, el polyP puede actuar como fuente de energía al ser directamente convertido a ATP sin ningún intermediario y sin requerir oxígeno (Kornberg, 1999). Esto último podría ser de suma importancia en ambientes hipóxicos como los microambientes tumorales. Los resultados de esta tesis demuestran que, en condiciones de hipoxia, el polyP es consumido con mayor rapidez que en células cultivadas en condiciones normales. Posiblemente esto sea debido a la utilización de dicha molécula como fuente de energía.

Todo indica que en condiciones de privación de nutrientes el polyP podría ser la molécula que mantendría la síntesis de todas aquellas moléculas esenciales en la célula que requieren de fosfato para su síntesis como pueden ser los dNTPs, los fosfolípidos o el ATP. Una forma interesante de continuar en esta línea sería medir los niveles de dichas moléculas en estas condiciones de cultivo.

### **6.6. El polyP como protector frente al daño al ADN**

Los resultados de esta tesis demuestran que, al tratar las células HEK293T con cisplatino, estas acumulan polyP nuclear. Esta acumulación ya ha sido vista con anterioridad en células HeLa,

donde Xie y colaboradores ya señalaban que el experimento clave a realizar sería comprobar la sensibilidad al cisplatino en células que tuvieran deplecionado el polyP celular (Xie et al., 2019). En esta tesis se han realizado dichas comprobaciones y se ha demostrado como, las células con niveles menores de polyP presentan una reducción de su supervivencia del 50%. Teniendo en cuenta que el tratamiento con cisplatino produce estrés oxidativo en las células (Han, Y. K., Kim, Jang, & Park, 2021), estos resultados demuestran una vez más el papel protector del polyP en presencia de estrés oxidativo (Bru et al., 2017; Samper-Martin et al., 2021).

Anteriormente se ha introducido la controversia que existe en el papel del polyP bien como protector frente al daño al ADN (Boyineni et al., 2020; Bru et al., 2017; Jimenez-Nunez et al., 2012) o bien como sensibilizador frente al daño y potenciador de la apoptosis (Hernandez-Ruiz et al., 2006; Xie et al., 2019). Los resultados de esta tesis apuntan a que es más probable que el polyP actúe como protector frente al daño.

Sería interesante ver si esta dinámica y función del polyP como protector se mantiene en células tumorales. El cisplatino es uno de los fármacos más utilizados para tratar cánceres de pulmón (Romani, 2022), dónde también presenta problemas debido a la resistencia al tratamiento (Galluzzi et al., 2012; Prestayko, D'Aoust, Issell, & Crooke, 1979). En esta tesis se ha comprobado que, una línea celular tumoral de dicho tejido, las células H1395, son las que mayor expresión de polifosfatasas y mayor concentración de polyP presentan. Realizar la misma aproximación, deplecionando los niveles de polyP en estas células tumorales de pulmón podría dar más información sobre la actuación del polyP en este escenario. Por último, estudiar los mecanismos involucrados en esta función del polyP como protector frente al daño al ADN y la posible relación con la resistencia a fármacos quimioterapéuticos podría ser de gran utilidad e importancia clínica.

### 6.7. Determinación bioquímica del polyP procedente de tejidos

La detección del polyP en tejidos se ha realizado mediante técnicas de inmunohistoquímica, en muchos casos usando el PPBD (Arredondo et al., 2022; Boyineni et al., 2020) o usando la sonda JC-D7/D8 (Angelova et al., 2014). Como se ha comentado con anterioridad, la detección mediante diferentes técnicas puede dar información sobre diferentes poblaciones de polyP y por ello poder purificar polyP bioquímicamente de tejidos es de suma importancia. Desde que Kumble y Kornberg purificaran polyP de tejidos de ratón y de rata (Kumble & Kornberg, 1995), pocos equipos de investigación han continuado por este camino (Lee et al., 2018; Lorenz et al., 1997). En esta tesis se ha intentado purificar polyP de tejidos de ratón mediante el protocolo de Kumble y Kornberg con algunas modificaciones, pero sin éxito. La muestra purificada presentó elevadas concentraciones de fosfato libre, con unos 183  $\mu\text{g}$  de fosfato en 100  $\mu\text{L}$  de purificado procedente de un cerebro de ratón. Este fosfato podría venir de la degradación del mismo polyP, puesto que cuando se realizó una diálisis para eliminar la contaminación por fosfato, no se logró cuantificar polyP en la muestra purificada. Es posible que el polyP haya sido degradado durante la extracción y congelación del órgano o durante la purificación. Para evaluar si el proceso de purificación conduce a la degradación del polyP, sería necesario realizar un estudio que incluya la adición de diferentes muestras de polyP comercial, y determinar la ratio de recuperación del mismo al final del proceso. Esta es una línea de investigación que se continuará estudiando en un futuro.

## *Conclusiones*

---



## 7. Conclusiones

1. El método de detección del polyP celular por inmunofluorescencia mediante el uso del PPBD permite visualizar polyP de forma específica.
2. La señal obtenida mediante el método de visualización *in vivo* presentado en esta tesis no ha sido validada y, por lo tanto, no se puede confirmar su especificidad para el polyP.
3. El método de purificación bioquímica presentado en esta tesis permite purificar y cuantificar polyP de células humanas.
4. Diferentes líneas celulares, poseen diferentes cantidades y localizaciones de polyP, que correlacionan con los diferentes patrones de expresión de las polifosfatasas NUDT3 y PRUNE1.
5. Los niveles de polyP celular se ven disminuidos en condiciones de hipoxia, privación de glucosa y privación de fosfato, y se recuperan tras administrar de nuevo fosfato en el medio.
6. El polyP posee función protectora frente al daño al ADN. Las células acumulan polyP nuclear como respuesta al daño al ADN y ven reducida su supervivencia en su ausencia.
7. El protocolo de purificación bioquímica presentado en esta tesis no ha permitido la purificación de polyP de tejidos de ratón.



## *Bibliografía*

---



## 8. Bibliografía

Aksoy, M., Pootakham, W., & Grossman, A. R. (2014). Critical function of a chlamydomonas reinhardtii putative polyphosphate polymerase subunit during nutrient deprivation. *The Plant Cell*, 26(10), 4214-4229. doi:10.1105/tpc.114.129270

Albi, T., & Serrano, A. (2016). Inorganic polyphosphate in the microbial world. emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(2), 27-2. Epub 2016 Jan 9. doi:10.1007/s11274-015-1983-2

Angelova, P. R., Agrawalla, B. K., Elustondo, P. A., Gordon, J., Shiba, T., Abramov, A. Y., . . . Pavlov, E. V. (2014). In situ investigation of mammalian inorganic polyphosphate localization using novel selective fluorescent probes JC-D7 and JC-D8. *ACS Chemical Biology*, 9(9), 2101-2110. doi:10.1021/cb5000696

Arredondo, C., Cefaliello, C., Dyrda, A., Jury, N., Martinez, P., Diaz, I., . . . van Zundert, B. (2022). Excessive release of inorganic polyphosphate by ALS/FTD astrocytes causes non-cell-autonomous toxicity to motoneurons. *Neuron*, 110(10), 1656-1670.e12. doi:10.1016/j.neuron.2022.02.010

Aschar-Sobbi, R., Abramov, A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J., & Pavlov, E. (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of Fluorescence*, 18(5), 859-866. doi:10.1007/s10895-008-0315-4

Ault-Riche, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in escherichia coli.

## *Bibliografía*

---

*Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841-1847.  
doi:10.1128/JB.180.7.1841-1847.1998

Azevedo, C., Livermore, T., & Saiardi, A. (2015). Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. *Molecular Cell*, 58(1), 71-82. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.010

Baev, A. Y., Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2020). Inorganic polyphosphate is produced and hydrolyzed in F0F1-ATP synthase of mammalian mitochondria. *The Biochemical Journal*, 477(8), 1515-1524. doi:10.1042/BCJ20200042

Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., & Avaeva, S. M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 171(2), 266-270. doi:10.1016/0003-2697(88)90484-8

Beaufay, F., Quarles, E., Franz, A., Katamanin, O., Wholey, W., & Jakob, U. (2020). Polyphosphate functions in vivo as an iron chelator and fenton reaction inhibitor. *mBio*, 11(4), e01017-20. doi:10.1128/mBio.01017-20

Boyineni, J., Sredni, S. T., Margaryan, N. V., Demirkhanyan, L., Tye, M., Johnson, R., . . . Malchenko, S. (2020). Inorganic polyphosphate as an energy source in tumorigenesis. *Oncotarget*, 11(50), 4613-4624. doi:10.18632/oncotarget.27838

Breus, N. A., Ryazanova, L. P., Dmitriev, V. V., Kulakovskaya, T. V., & Kulaev, I. S. (2012). Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Research*, 12(6), 617-624. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00812.x

Bru, S., Jimenez, J., Canadell, D., Arino, J., & Clotet, J. (2016). Improvement of biochemical methods of polyP quantification. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 4(1), 6-15. doi:10.15698/mic2017.01.551

Bru, S., Martinez-Lainez, J. M., Hernandez-Ortega, S., Quandt, E., Torres-Torronteras, J., Marti, R., . . . Clotet, J. (2016). Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 101(3), 367-380. doi:10.1111/mmi.13396

Bru, S., Samper-Martin, B., Quandt, E., Hernandez-Ortega, S., Martinez-Lainez, J. M., Gari, E., . . . Clotet, J. (2017). Polyphosphate is a key factor for cell survival after DNA damage in eukaryotic cells. *DNA Repair*, 57, 171-178. doi:S1568-7864(17)30090-3 [pii]

Carotenuto, M., De Antonellis, P., Liguori, L., Benvenuto, G., Magliulo, D., Alonzi, A., . . . Zollo, M. (2014). H-prune through GSK-3 $\beta$  interaction sustains canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling enhancing cancer progression in NSCLC. *Oncotarget*, 5(14), 5736-5749. doi: 10.18632/oncotarget.2169

Christ, J. J., & Blank, L. M. (2018). Analytical polyphosphate extraction from *saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*, 563, 71-78. doi:10.1016/j.ab.2018.09.021

Cremers, C. M., Knoefler, D., Gates, S., Martin, N., Dahl, J. U., Lempart, J., . . . Jakob, U. (2016). Polyphosphate: A conserved modifier of amyloidogenic processes. *Molecular Cell*, 63(5), 768-780. doi:10.1016/j.molcel.2016.07.016

Dahl, J., Xie, L., & Jakob, U. (2018). Extraction and quantification of polyphosphate (polyP) from gram-negative bacteria. *Bio-Protocol*, 8(18), e3011. doi:10.21769/BioProtoc.3011

## Bibliografía

---

Dunn, T., Gable, K., & Beeler, T. (1994). Regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> by yeast vacuoles. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7273-7278.

Ettinger, A., & Wittmann, T. (2014). Fluorescence live cell imaging. *Methods in Cell Biology*, 123, 77-94. doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., . . . Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869-1883. doi:10.1038/onc.2011.384

Gerasimaite, R., Sharma, S., Desfougeres, Y., Schmidt, A., & Mayer, A. (2014). Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 23), 5093-5104. doi:10.1242/jcs.159772

Gomes, F. M., Ramos, I. B., Wendt, C., Girard-Dias, W., De Souza, W., Machado, E. A., & Miranda, K. (2013). New insights into the in situ microscopic visualization and quantification of inorganic polyphosphate stores by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 57(4), e34. doi:10.4081/ejh.2013.e34

Gomez-Garcia, M. R., & Kornberg, A. (2004). Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15876-15880. doi:10.1073/pnas.0406923101

Gray, M. J., Wholey, W. Y., Wagner, N. O., Cremers, C. M., Mueller-Schickert, A., Hock, N. T., . . . Jakob, U. (2014). Polyphosphate is a

primordial chaperone. *Molecular Cell*, 53(5), 689-699. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.012

Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Oxidative stress protection by polyphosphate--new roles for an old player. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 1-6. doi:10.1016/j.mib.2014.12.004

Han, K. Y., Hong, B. S., Yoon, Y. J., Yoon, C. M., Kim, Y. K., Kwon, Y. G., & Gho, Y. S. (2007). Polyphosphate blocks tumour metastasis via anti-angiogenic activity. *The Biochemical Journal*, 406(1), 49-55. doi:BJ20061542 [pii]

Han, Y. K., Kim, J. S., Jang, G., & Park, K. M. (2021). Cisplatin induces lung cell cilia disruption and lung damage via oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 177, 270-277. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.032

Harold, F. M. (1966). Inorganic polyphosphates in biology: Structure, metabolism, and function. *Bacteriological Reviews*, 30(4), 772-794. doi:10.1128/br.30.4.772-794.1966

Hernandez-Ruiz, L., Gonzalez-Garcia, I., Castro, C., Brieva, J. A., & Ruiz, F. A. (2006). Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. *Haematologica*, 91(9), 1180-1186.

Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E. D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P. O., . . . Mayer, A. (2009). Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5926), 513-516. doi:10.1126/science.1168120

Hurlimann, H. C., Stadler-Waibel, M., Werner, T. P., & Freimoser, F. M. (2007). Pho91 is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces*

## *Bibliografía*

---

cerevisiae. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), 4438-4445. doi:10.1091/mbc.e07-05-0457

I. S. Kulaev, V. M. Vagabov and T. V. Kulakovskaya. (2004). *The biochemistry of inorganic polyphosphates* John Wiley & Sons.

Jimenez, J., Lazaro, B., Sarrias, A., Tadeo, F. J., Perez-Montero, M., Clotet, J., & Bru, S. (2022). Protocol to quantify polyphosphate in human cell lines using a tagged PPBD peptide. *STAR Protocols*, 3(2), 101363. doi:10.1016/j.xpro.2022.101363

Jimenez-Nunez, M. D., Moreno-Sanchez, D., Hernandez-Ruiz, L., Benitez-Rondan, A., Ramos-Amaya, A., Rodriguez-Bayona, B., . . . Ruiz, F. A. (2012). Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription. *Haematologica*, 97(8), 1264-1271. doi:10.3324/haematol.2011.051409

Koh, J. L. Y., Chong, Y. T., Friesen, H., Moses, A., Boone, C., Andrews, B. J., & Moffat, J. (2015). CYCLOPs: A comprehensive database constructed from automated analysis of protein abundance and subcellular localization patterns in *saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 5(6), 1223-1232. doi:10.1534/g3.115.017830

Kohl, K., Zangger, H., Rossi, M., Isorce, N., Lye, L., Owens, K. L., . . . Fasel, N. (2018). Importance of polyphosphate in the leishmania life cycle. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 5(8), 371-384. doi:10.15698/mic2018.08.642

Kolozsvari, B., Parisi, F., & Saiardi, A. (2014). Inositol phosphates induce DAPI fluorescence shift. *The Biochemical Journal*, 460(3), 377-385. doi:10.1042/BJ20140237

Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: Toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 491-496. doi:10.1128/jb.177.3.491-496.1995

Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 23, 1-18. doi:10.1007/978-3-642-58444-2\_1

Kulakovskaya, E. V., Zemskova, M. Y., & Kulakovskaya, T. V. (2018). Inorganic polyphosphate and cancer. *Biochemistry.Biokhimiia*, 83(8), 961-968. doi:10.1134/S0006297918080072

Kumble, K. D., & Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5818-5822. doi:10.1074/jbc.270.11.5818

Lander, N., Cordeiro, C., Huang, G., & Docampo, R. (2016). Polyphosphate and acidocalcisomes. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 1-6. doi:10.1042/BST20150193

Lee, W. D., Gawri, R., Shiba, T., Ji, A., Stanford, W. L., & Kandel, R. A. (2018). Simple silica column-based method to quantify inorganic polyphosphates in cartilage and other tissues. *Cartilage*, 9(4), 417-427. doi:10.1177/1947603517690856

Lempart, J., & Jakob, U. (2019). Role of polyphosphate in amyloidogenic processes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(5), 10.1101/cshperspect.a034041. doi:a034041 [pii]

Lichko, L. P., Eldarov, M. A., Dumina, M. V., & Kulakovskaya, T. V. (2014). PPX1 gene overexpression has no influence on polyphosphates in *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.Biokhimiia*, 79(11), 1211-1215. doi:10.1134/S000629791411008X

## *Bibliografía*

---

Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., & Kulaev, I. (2006). Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes. *Bioscience Reports*, *26*(1), 45-54. doi:10.1007/s10540-006-9003-2

Lonetti, A., Szigyarto, Z., Bosch, D., Loss, O., Azevedo, C., & Saiardi, A. (2011). Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(37), 31966-31974. doi:10.1074/jbc.M111.266320

Lorenz, B., Munkner, J., Oliveira, M. P., Kuusksalu, A., Leitao, J. M., Muller, W. E., & Schroder, H. C. (1997). Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1335*(1-2), 51-60. doi:S0304-4165(96)00121-3 [pii]

Lorenz, B., & Schroder, H. C. (2001). Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1547*(2), 254-261. doi:10.1016/s0167-4838(01)00193-5

Mailer, R. K., Allende, M., Heestermans, M., Schweizer, M., Deppermann, C., Frye, M., . . . Renne, T. (2021). Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 regulates procoagulant platelet polyphosphate. *Blood*, *137*(10), 1392-1405. doi:10.1182/blood.2019004617

Morrissey, J. H. (2012). Polyphosphate: A link between platelets, coagulation and inflammation. *International Journal of Hematology*, *95*(4), 346-352. doi:10.1007/s12185-012-1054-5

Neef, D. W., & Kladde, M. P. (2003). Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3788-3797. doi:10.1128/mcb.23.11.3788-3797.2003

Ogawa, N., DeRisi, J., & Brown, P. O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4309-4321. doi:10.1091/mbc.11.12.4309

Omelon, S., Georgiou, J., & Habraken, W. (2016). A cautionary (spectral) tail: Red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 46-49. doi:10.1042/BST20150231

Pallerla, S. R., Knebel, S., Polen, T., Klauth, P., Hollender, J., Wendisch, V. F., & Schoberth, S. M. (2005). Formation of volutin granules in *corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 133-140. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.047

Parcerisas, A., Pujadas, L., Ortega-Gasco, A., Perello-Amoros, B., Viais, R., Hino, K., . . . Soriano, E. (2020). NCAM2 regulates dendritic and axonal differentiation through the cytoskeletal proteins MAP2 and 14-3-3. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 30(6), 3781-3799. doi:10.1093/cercor/bhz342

Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14904-14912. doi:10.1074/jbc.R116.731661

Pestov, N. A., Kulakovskaya, T. V., & Kulaev, I. S. (2004). Inorganic polyphosphate in mitochondria of *saccharomyces cerevisiae* at

## Bibliografía

---

phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 643-648. doi:10.1016/j.femsyr.2003.12.008

Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F., & Crooke, S. T. (1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treatment Reviews*, 6(1), 17-39. doi:10.1016/s0305-7372(79)80057-2

Rao, N. N., Gomez-Garcia, M. R., & Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 605-647. doi:10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039

Rao, N. N., Liu, S., & Kornberg, A. (1998). Inorganic polyphosphate in escherichia coli: The phosphate regulon and the stringent response. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2186-2193.

Romani, A. M. P. (2022). Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*, 206, 115323. doi:10.1016/j.bcp.2022.115323

Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., & Docampo, R. (2001). Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in trypanosoma cruzi. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26114-26121. doi:10.1074/jbc.M102402200

Ruiz, F. A., Lea, C. R., Oldfield, E., & Docampo, R. (2004). Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44250-44257. doi:10.1074/jbc.M406261200

Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., & Saito, M. (2005). Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in saccharomyces cerevisiae by using the affinity of the polyphosphate

binding domain of escherichia coli exopolyphosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5692-5701. doi:71/10/5692 [pii]

Samper-Martin, B., Sarrias, A., Lazaro, B., Perez-Montero, M., Rodriguez-Rodriguez, R., Ribeiro, M. P. C., . . . Bru, S. (2021). Polyphosphate degradation by Nudt3-zn(2+) mediates oxidative stress response. *Cell Reports*, 37(7), 110004. doi:10.1016/j.celrep.2021.110004

Schroder, H. C., Kurz, L., Muller, W. E., & Lorenz, B. (2000). Polyphosphate in bone. *Biochemistry.Biokhimiia*, 65(3), 296-303.

Seidlmayer, L. K., Gomez-Garcia, M. R., Blatter, L. A., Pavlov, E., & Dedkova, E. N. (2012). Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *The Journal of General Physiology*, 139(5), 321-331. doi:10.1085/jgp.201210788

Seidlmayer, L. K., Gomez-Garcia, M. R., Shiba, T., Porter, G. A., Jr, Pavlov, E. V., Bers, D. M., & Dedkova, E. N. (2019). Dual role of inorganic polyphosphate in cardiac myocytes: The importance of polyP chain length for energy metabolism and mPTP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 662, 177-189. doi:S0003-9861(18)30718-5 [pii]

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., . . . Kornberg, A. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11210-11215. doi:10.1073/pnas.94.21.11210

Smith, S. A., Gajsiewicz, J. M., & Morrissey, J. H. (2018). Ability of polyphosphate and nucleic acids to trigger blood clotting: Some

## *Bibliografía*

---

observations and caveats. *Frontiers in Medicine*, 5, 107. doi:10.3389/fmed.2018.00107

Solesio, M. E., Demirkhanyan, L., Zakharian, E., & Pavlov, E. V. (2016). Contribution of inorganic polyphosphate towards regulation of mitochondrial free calcium. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1860(6), 1317-1325. doi:10.1016/j.bbagen.2016.03.020

Svistunova, D. M., Musinova, Y. R., Polyakov, V. Y., & Sheval, E. V. (2012). A simple method for the immunocytochemical detection of proteins inside nuclear structures that are inaccessible to specific antibodies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 60(2), 152-158. doi:10.1369/0022155411429704

Tammenkoski, M., Koivula, K., Cusanelli, E., Zollo, M., Steegborn, C., Baykov, A. A., & Lahti, R. (2008). Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry*, 47(36), 9707-9713. doi:10.1021/bi8010847

Thomas, M. R., & O'Shea, E. K. (2005). An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9565-9570. doi:10.1073/pnas.0501122102

Travers, R. J., Smith, S. A., & Morrissey, J. H. (2015). Polyphosphate, platelets, and coagulation. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37 Suppl 1, 31-35. doi:10.1111/ijlh.12349

Trilisenko, L. V., Vagabov, V. M., & Kulaev, I. S. (2002). The content and chain length of polyphosphates from vacuoles of *saccharomyces cerevisiae* VKM Y-1173. *Biochemistry.Biokhimiia*, 67(5), 592-596. doi:BCM67050711 [pii]

Truong, T. K., Malik, R. A., Yao, X., Fredenburgh, J. C., Stafford, A. R., Madarati, H. M., . . . Weitz, J. I. (2022). Identification of the histidine-rich glycoprotein domains responsible for contact pathway inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 20(4), 821-832. doi:10.1111/jth.15631

van Heerden, J. H., Wortel, M. T., Bruggeman, F. J., Heijnen, J. J., Bollen, Y. J. M., Planque, R., . . . Teusink, B. (2014). Lost in transition: Start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6174), 1245114. doi:10.1126/science.1245114

Wang, L., Fraley, C. D., Faridi, J., Kornberg, A., & Roth, R. A. (2003). Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11249-11254. doi:10.1073/pnas.1534805100

Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112(4), 441-451. doi:10.1016/s0092-8674(03)00082-5

Wood, H. G., & Clark, J. E. (1988). Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 235-260. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.001315

Wurst, H., Shiba, T., & Kornberg, A. (1995). The gene for a major exopolyphosphatase of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(4), 898-906. doi:10.1128/jb.177.4.898-906.1995

Wurst, H., & Kornberg, A. (1994). A soluble exopolyphosphatase of *saccharomyces cerevisiae*. purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 10996-11001.

## *Bibliografía*

---

Xie, L., Rajpurkar, A., Quarles, E., Taube, N., Rai, A. S., Erba, J., . . . Knoefler, D. (2019). Accumulation of nucleolar inorganic polyphosphate is a cellular response to cisplatin-induced apoptosis. *Frontiers in Oncology*, *9*, 1410. doi:10.3389/fonc.2019.01410

Zhang, H., Gomez-Garcia, M. R., Shi, X., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2007). Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, dictyostelium discoideum, with a role in cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(42), 16486-16491. doi:10.1073/pnas.0706847104

Zhu, J., Loubery, S., Broger, L., Zhang, Y., Lorenzo-Orts, L., Utz-Pugin, A., . . . Hothorn, M. (2020). A genetically validated approach for detecting inorganic polyphosphates in plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *102*(3), 507-516. doi:10.1111/tpj.14642

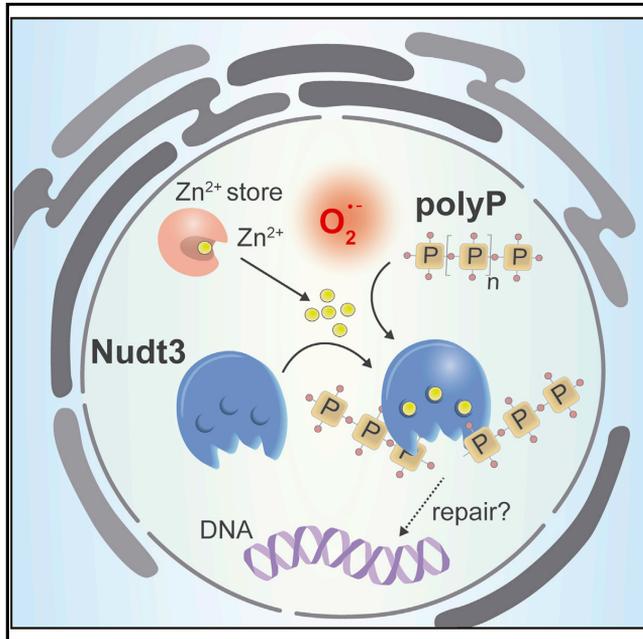
## *Anexos*

---



# Polyphosphate degradation by Nudt3-Zn<sup>2+</sup> mediates oxidative stress response

## Graphical abstract



## Authors

Bàrbara Samper-Martín, Ana Sarrias, Blanca Lázaro, ..., Adolfo Saiardi, Javier Jiménez, Samuel Bru

## Correspondence

jjimenez@uic.es (J.J.), sbru@uic.es (S.B.)

## In brief

Samper-Martín et al. show that polyphosphate, a chain of orthophosphates, plays an essential role in oxidative stress response in human cells. In addition, they identify the human Nudt3 as a polyphosphate hydrolase, opening the door to modifying polyphosphate content, a tool to advance understanding of mammalian polyphosphate metabolism.

## Highlights

- An unbiased screen reveals Nudt3 as a metazoan polyphosphate hydrolase
- Nudt3 is activated *in vitro* and *in vivo* by Zn<sup>2+</sup>
- Oxidative stress mobilizes Zn<sup>2+</sup>, which activates Nudt3 to degrade polyphosphate
- Polyphosphate degradation is essential for cell survival upon oxidative stress



## Article

# Polyphosphate degradation by Nudt3-Zn<sup>2+</sup> mediates oxidative stress response

Bàrbara Samper-Martín,<sup>1</sup> Ana Sarrias,<sup>1</sup> Blanca Lázaro,<sup>1</sup> Marta Pérez-Montero,<sup>1</sup> Rosalía Rodríguez-Rodríguez,<sup>1</sup> Mariana P.C. Ribeiro,<sup>1</sup> Aitor Bañón,<sup>2</sup> Don Wolfgeher,<sup>3</sup> Henning J. Jessen,<sup>4,5</sup> Berta Alsina,<sup>2</sup> Josep Clotet,<sup>1</sup> Stephen J. Kron,<sup>3</sup> Adolfo Saiardi,<sup>6</sup> Javier Jiménez,<sup>1,8,\*</sup> and Samuel Bru<sup>1,7,\*</sup><sup>1</sup>Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain<sup>2</sup>Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra-Parc de Recerca Biomèdica, 08003 Barcelona, Spain<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA<sup>4</sup>Institute of Organic Chemistry, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany<sup>5</sup>CIBSS – Centre for Integrative Biological Signalling Studies, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany<sup>6</sup>Medical Research Council Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, London WC1E6BT, UK<sup>7</sup>Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain<sup>8</sup>Lead contact\*Correspondence: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es) (J.J.), [sbru@uic.es](mailto:sbru@uic.es) (S.B.)<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110004>

## SUMMARY

Polyphosphate (polyP) is a polymer of hundreds of phosphate residues present in all organisms. In mammals, polyP is involved in crucial physiological processes, including coagulation, inflammation, and stress response. However, after decades of research, the metabolic enzymes are still unknown. Here, we purify and identify Nudt3, a NUDIX family member, as the enzyme responsible for polyP phosphatase activity in mammalian cells. We show that Nudt3 shifts its substrate specificity depending on the cation; specifically, Nudt3 is active on polyP when Zn<sup>2+</sup> is present. Nudt3 has *in vivo* polyP phosphatase activity in human cells, and importantly, we show that cells with altered polyP levels by modifying Nudt3 protein amount present reduced viability upon oxidative stress and increased DNA damage, suggesting that polyP and Nudt3 play a role in oxidative stress protection. Finally, we show that Nudt3 is involved in the early stages of embryo development in zebrafish.

## INTRODUCTION

Inorganic polyphosphate (polyP) is a molecule of heterogeneous size consisting of a few to several thousand ortho-phosphates (Pi) linked by phospho-anhydride bonds (Kornberg, 1999). PolyP was first described more than a century ago (Babes, 1895) and has been observed in microorganisms and metazoans (Brown and Kornberg, 2004; Kulaev and Vagabov, 1983; Kumble and Kornberg, 1995; Smith et al., 2006). In unicellular organisms, polyP displays several and diverse functions, including energy and/or phosphate reservoir, cation chelation, stress protection, cell-cycle progression, DNA repair, protein folding, and signaling (Albi and Serrano, 2016; Desfougerès et al., 2020; Jiménez et al., 2017). In metazoans, extracellular polyP has been reported to be involved in diverse functions, including inflammation (Hassanian et al., 2017), blood clotting (Nickel et al., 2015; Travers et al., 2015), and protein aggregation (Cremers et al., 2016). In addition, intracellular polyP has been implicated in cell differentiation (Moriyama et al., 2010), transcriptional regulation (Jimenez-Nuñez et al., 2012), cell signaling (Azevedo et al., 2015), and DNA repair (Bru et al., 2017). Nonetheless and importantly, dissecting the mechanisms of polyP in cell regulation has remained hampered by a poor understanding of the pathways and enzymes respon-

sible for synthesis and degradation (Bondy-Chorney et al., 2020; Desfougerès et al., 2020) despite concerted efforts.

Following their observations of polyP in the brain, Kumble and Kornberg (1996) also observed high levels of endo-polyP phosphatase (endo-polyPase; degrades polyP cleaving internal bounds) activity in rat brain homogenate that cleaved the long chains into smaller fragments. Most efforts at the discovery of metazoan polyPases have been based on exploiting homology to polyPases from prokaryotes and simple eukaryotes leading to h-prune and DIPPs (diphosphoinositol-pyrophosphate-polyphosphatases). The human protein phosphatase h-prune shares remarkable homology to the yeast Ppx1 exo-polyPase (degrades polyP from the molecule ends), but it has substrate-specificity constrictions that are difficult to reconcile with the polyPase activity; in fact, it is inhibited in the presence of medium to long polyP (Tammenkoski et al., 2008). DIPPs are a subfamily of NUDIX proteins (see below) that, despite sharing a remarkable homology with the yeast Ddp1 endo-polyPase, shows low *in vitro* activity and is restricted to pH 9.5 values far from physiological (Lonetti et al., 2011). In a similar scenario is *T. brucei* homolog (Cordeiro et al., 2019).

MutT/NUDIX (cleaves nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) is an evolutionarily conserved family of 22



**Table 1. Purification parameters**

Step	Protein (mg)	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ )	Total activity	Purification (-fold)	Yield (%)
Homogenate	226	27	6,116	1	100
Supernatant	120	28	3,382	1.04	55
Heparin	4.8	156	742	5.7	12.1
Superdex	0.1	1,984	223	73.3	3.7

Rat brain tissues were homogenized and cells lysed. Protein total amount and specific endo-polyPase activity were measured as described in STAR Methods. Enzymatic parameters for the purification steps are provided.

hydrolases, including divalent cation-regulated enzymes that hydrolyze diverse dinucleotides and inositol pyrophosphates (PP-InsPs), among a wide range of substrates. DIPPs subfamily, including Nudt3, Nudt4, Nudt10, and Nudt11, have previously been linked to the degradation of InsPs and di-adenosine-polyPs ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ) (Carreras-Puigvert et al., 2017). Remarkably DIPPs, and particularly Nudt3, present a strong substrate specificity according to the cation, and hydrolysis of PP-InsPs requires magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Kilari et al., 2013; Safrany and Shears, 1998) versus manganese ( $\text{Mn}^{2+}$ ) for  $\text{Ap}_n\text{A}$  (Safrany et al., 1999). Nudt3 has also been ascribed an important *in vivo* function in decapping mRNAs, also dependent on  $\text{Mn}^{2+}$  (Grudzien-Nogalska et al., 2016; Sahu et al., 2020). A similar scenario occurs in polyPases activity regulation; specifically, zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) and cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) are used by yeast endo-polyPase Ppn2 (Gerasimaitė and Mayer, 2017). In mammalian cells, most  $\text{Zn}^{2+}$  remains sequestered by metallothioneins (MTs) (Stankovic et al., 2007), small cysteine-rich metal-binding proteins that serve an important role in oxidative stress response. Free  $\text{Zn}^{2+}$  is normally kept low in cells, in large part via buffering by MTs. However, increased reactive oxygen species leads to oxidation of MTs thiols, releasing bound  $\text{Zn}^{2+}$  from coordination (Maret, 2011). Total  $\text{Zn}^{2+}$  abundance and, likely, activity is higher in the brain (Frederickson et al., 2005), where it has been implicated in signaling, differentiation, and synaptic function (Beyersmann and Haase, 2001).

Here, we reexamined the long-ago described endo-polyPase activity in the mammalian brain (Kumble and Kornberg, 1996) to discover a physiological endo-polyPase. Surprisingly, this work pointed back to Nudt3, but activated by  $\text{Zn}^{2+}$ , a cation of outstanding importance in the brain, maintained at low levels but released from MTs upon oxidative stress. Here, we establish this NUDIX protein as a  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent polyPase that plays a critical role *in vivo* in limiting DNA damage and maintaining cell survival upon oxidative stress.

## RESULTS

### Mammalian polyP phosphatase purification

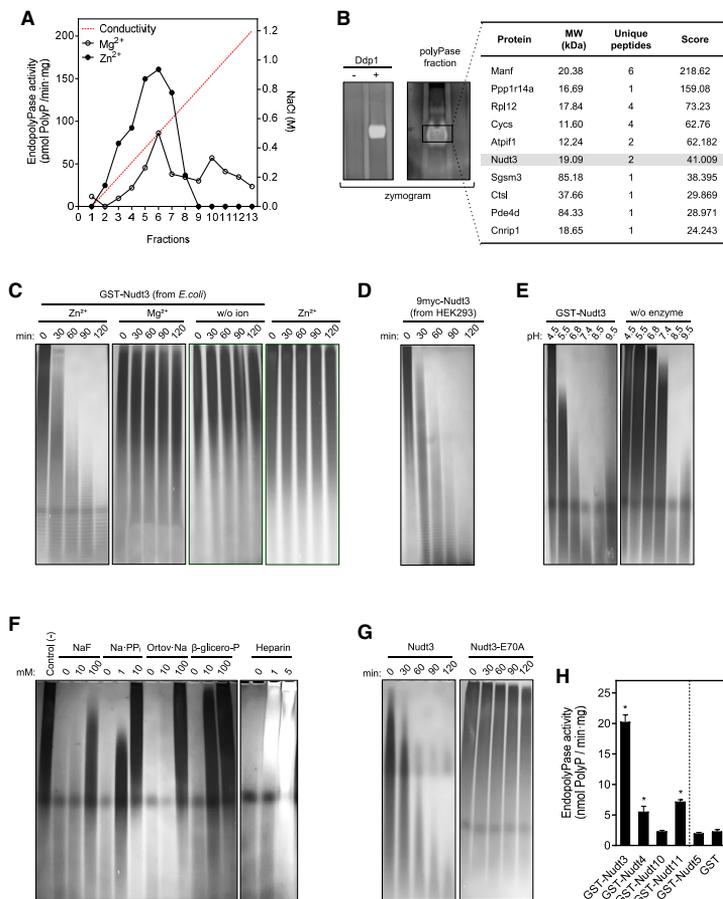
Consistent with prior studies (Lorenz et al., 1997), the adult rat brain is the organ that contains the highest levels of polyP, although with significant differences among major brain structures (Figure S1A). Toward identifying the polyP-degrading activity identified by Kumble and Kornberg (1996), we enriched an endo-polyPase activity from rat brain homogenates (Table 1). In brief, the resulting supernatant, retaining about half the activity and similar specific activity to homogenate, was applied to a heparin affinity column. Several yeast polyPases can be bound

by heparin (Andreeva et al., 2015; Lichko et al., 1998), reflecting the negative charge of the polyP. Indeed, TAP-tagged Ppx1 and Ppn1 were readily adsorbed onto the heparin column from yeast cell extracts and eluted with high salt (Figure S1B). Similarly, brain extract fractions were eluted with a NaCl gradient and assayed for endo-polyPase activity by detecting cleavage of high-molecular-weight polyP, using PAGE-urea gels. By performing assays with  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$ , we found a prominent endo-polyPase activity stimulated by  $\text{Zn}^{2+}$  that eluted at 0.5 M NaCl that also displayed residual activity by  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  (Figures 1A and S1C–S1E). When peak fractions were separated by size exclusion chromatography, the  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent activity was eluted at low molecular weight.

The apparent purification of 70-fold was insufficient to point to a single protein band using PAGE. Thus, we developed an “in-gel” polyP degradation assay, which we dubbed the polyP-zymogram. In brief, protein fractions were separated on native polyacrylamide gels in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer containing embedded long-chain polyP. After incubating the gels in polyPase reaction buffer, in-gel cleavage was assessed by loss of DAPI staining. As a proof of concept, a sample of purified yeast endo-polyPase Ddp1 produced a completely cleared band (Figure 1B, left). Similarly, the peak fraction of brain endo-polyPase activity eluted from size exclusion chromatography led to a single band that was cut from the gel and analyzed by tandem mass spectrometry (Figure 1B, right). Among the 10 most confident protein identifications was the NUDIX family protein Nudt3, previously suggested as a candidate endo-polyPase (Lonetti et al., 2011). Nudt3 is broadly expressed in human tissues but at particularly high levels in multiple brain structures (Figure S1F).

### Nudt3 is a $\text{Zn}^{2+}$ -dependent human polyPase

To confirm human Nudt3 as polyPase, we assayed purified *E. coli*-expressed recombinant human GST-Nudt3 fusion protein for cleavage of polyP, revealing a requirement for  $\text{Zn}^{2+}$  (Figure 1C). Similarly, Nudt3 protein purified from HEK293T human embryonic kidney cells displayed a  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent polyPase with a similar specific activity (Figure 1D) suggesting no post-translational modifications. To further characterize the polyPase activity, we examined its pH dependence (Figure 1E). Taking into account that polyP is unstable at alkaline pH in the presence of divalent cations (Harold, 1966), GST-Nudt3 displayed strong polyPase activity at pH 6.8 and 7.4. The enzyme was fully inhibited by broad phosphatase inhibitors NaF, NaPPI, or  $\beta$ -glycerol phosphate, as well as by the polyPase inhibitor heparin (Figure 1F). Site-directed mutagenesis of the Nudt3 catalytic residue E70 to A (Safrany et al., 1999) and expression of GST-Nudt3<sup>E70A</sup>



**Figure 1. Nudt3 is a Zn<sup>2+</sup>-dependent endo-polyPase**

(A) Heparin affinity fractionation step. After tissue homogenization, cell lysis, and centrifugation, the supernatant was loaded into a heparin-based affinity chromatography column. Proteins were eluted by applying a NaCl-based ionic strength gradient (dashed line). Endo-polyPase activity was assayed using the indicated divalent cations (see STAR Methods section).

(B) PolyP-zymogram and mass spectrometry identification. The left panel shows a proof of concept for the polyP-zymogram: recombinant yeast Ddp1 was separated in a non-denaturing acrylamide gel containing polyP. polyPase activity was permitted by incubating the gel in the appropriate conditions. The gel was stained with DAPI. In the right panel, containing activity aliquot from the size exclusion column was analyzed in the polyP-zymogram as above. The area where the polyPase activity appeared was excised, and proteins were identified by tandem mass spectrometry analysis. A list of the proteins showing the higher score is provided.

(C and D) Human Nudt3 obtained from *E. coli* (C) and the HEK293T cell line (D) have Zn<sup>2+</sup>-dependent endo-polyPase activity. Nudt3 was incubated with 5 µg of polyP<sub>100</sub> for the indicated times in the presence of 5 mM of the noted cations, electrophoretically separated in PAGE-urea gels, and polyP was visualized using DAPI staining.

(E) Nudt3 is active at physiological pH. Nudt3 was incubated at different pH values with 5 µg of polyP<sub>100</sub>; polyP was separated in PAGE-urea gels and stained with DAPI.

(F) Nudt3 endo-polyPase activity is inhibited by phosphatase inhibitors. As in (C), using 5 mM Zn<sup>2+</sup> as a cation and the concentration of the noted inhibitors. Incubation time was 1 h.

(G) Nudt3<sup>E70A</sup> does not present endo-polyPase activity. As in (C) using 5 mM Zn<sup>2+</sup>.

(H) Endo-polyPase activity quantification of the different members of the human DIPP family purified from *E. coli*. As in (C) using 5 mM Zn<sup>2+</sup>. Incubation time was 1 h. Mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.

See also Figures S1 and S2.

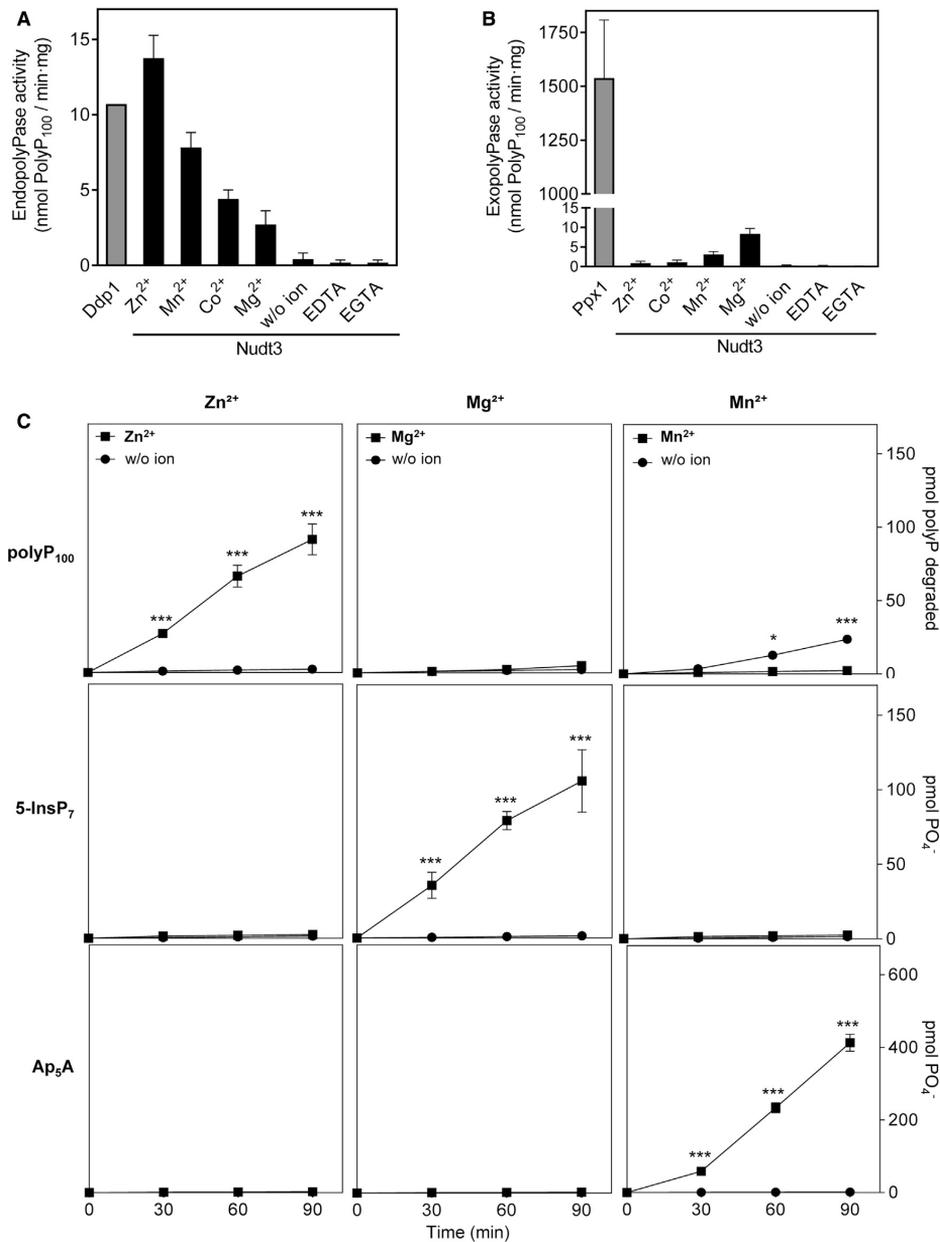
yielded no activity (Figure 1G). By comparison, GST fusions of other DIPP subfamily NUDIX proteins, Nudt4, Nudt10, and Nudt11, displayed only a fraction of the Zn<sup>2+</sup>-dependent activity of Nudt3 (Figures 1H and S2A). The distantly related NUDIX protein Nudt5 did not display endo-polyPase activity (Figures 1H and S2A).

### Nudt3 substrate specificity depends on the divalent cation

Based on the several cations usage by Nudt3, we wondered whether Nudt3 could use other divalent cations to degrade polyP. We examined endo-polyPase activity by PAGE-urea gel and exo-polyPase by the malachite green method, comparing with the yeast proteins Ddp1 and Ppx1, respectively, in the presence of Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> or without divalent cation (Figures

2A and 2B). GST-Nudt3 displayed robust endo-polyPase activity with Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> (Figure 2A), but little or no exo-polyPase with any cation (Figure 2B). PAGE-urea gels pattern, Ddp1 homology, and exo-polyPase assay strongly suggest an endo-polyPase activity for Nudt3, although we cannot totally exclude some exo-polyPase activity.

The 22 human NUDIX enzymes can hydrolyze a structurally diverse range of substrates but display distinct patterns of specificity (Caffrey et al., 2000; Carreras-Puigvert et al., 2017; Kilari et al., 2013). Our results raised the question of whether cations might determine substrate specificity for Nudt3. Thus, we compared hydrolysis of polyP and two well-described Nudt3 substrates, 5-diphosphoinositol pentakisphosphate (5-InsP7) (Safrahy et al., 1998) and P1, P5-Di(adenosine-5') pentaphosphate (Ap5A) (Safrahy et al., 1999) in the presence of Mg<sup>2+</sup>,



**Figure 2. Nudt3 substrate specificity is ion dependent**

(A) Divalent ion dependence of Nudt3 endo-polyPase activity. Quantification of DAPI-stained PAGE-urea gels as in Figure 1. Nudt3 (100 ng) and polyP<sub>100</sub> were incubated for 1 h in the presence of the mentioned ions (5 mM each), EDTA, or EGTA (10 mM). 100 ng of yeast recombinant endo-polyPase Ddp1 (Nudt3 homolog) is used as control. Mean ± SEM of three independent experiments.

(legend continued on next page)

Zn<sup>2+</sup>, or Mn<sup>2+</sup> (Figure 2C). Although polyP cleavage was dependent on Zn<sup>2+</sup>, we observed hydrolysis of 5-InsP7 by Nudt3 only in the presence of Mg<sup>2+</sup>. In turn, Nudt3 was able to cleave Ap5A, but only in the presence of Mn<sup>2+</sup>.

### Nudt3 is a polyPase *in vivo*

First, we confirmed the presence of Nudt3 in HEK293T cells by immunofluorescence using specific antibodies and revealed ubiquitous localization, including nucleus that was reduced by siRNA knockdown (Figure S2B). To examine polyPase activity, we tracked endogenous polyP levels by detecting binding of Xpress-tagged *E. coli* exo-polyPase polyP binding domain (PPBD) to cellular polyP (Saito et al., 2005). Immunodetection of PPBD revealed nuclear foci in HEK293T cells that were lost after treatment of the fixed and permeabilized cells with purified yeast exo-polyPase Ppx1, establishing specificity for polyP (Figure 3A). Knockdown of endogenous Nudt3 by siRNAs resulted in increased PPBD signal, indicating accumulation of polyP (Figures 3B and S2C). Overexpression of Ppx1 or Nudt3 reduced PPBD binding, consistent with decreased polyP levels (Figures 3C and S2D). In turn, expression from a doxycycline-inducible promoter led to regulated increased Nudt3 protein and a corresponding decrease in polyP content (Figures 3D, 3E, and S2E). According to these genetic approaches, we conclude that Nudt3 represents an *in vivo* regulator of polyP amount.

### Nudt3 *in vivo* polyPase activity is Zn<sup>2+</sup> dependent

Although Nudt3 displays robust polyPase activity, its cation dependence raises the question of whether this may not be relevant in cells where Zn<sup>2+</sup> is largely kept sequestered. Toward establishing the cation dependence of the endogenous Nudt3 activity, HEK293T cells were incubated for 48 h in media containing 0.1 mM Zn<sup>2+</sup> obtaining markedly decreased polyP nuclear foci (Figure 4A). PolyP was restored by adding the non-specific divalent ion chelator Na-EDTA or the Zn<sup>2+</sup> chelator sodium hydrosulfide (NaHS) without affecting cell viability (Figures 4A and S2F). Unlike Zn<sup>2+</sup>, adding 0.1 mM Mg<sup>2+</sup> did not reduce the polyP amount at 24 or 48 h (Figure 4B). Although HEK293 cells have been considered neuron-like cells (Stepanenko and Dmitrenko, 2015), we decided to confirm the Zn<sup>2+</sup>-dependent polyP amount in another neuron cell line. Similar behavior was observed upon treating SH-SY5Y cells with 0.1 mM Zn<sup>2+</sup> for 48 h (Figure 4C). Importantly, knockdown of Nudt3 suppressed the Zn<sup>2+</sup>-dependent loss of polyP in HEK293T cells (Figures 4D and S2G). Neither Zn<sup>2+</sup> nor Mg<sup>2+</sup> impacted levels of 5-InsP7 (Figure 4E), arguing against an indirect effect on polyP cleavage mediated by substrate competition (Sahu et al., 2020). Taken together, these results implicate human Nudt3 as a Zn<sup>2+</sup>-dependent endo-polyPase *in vivo*.

### Nudt3 plays a role in cell survival upon oxidative stress

Although Zn<sup>2+</sup> is normally sequestered by MTs, oxidative stress can induce Zn<sup>2+</sup> release, leading to a transient increase in intra-

cellular Zn<sup>2+</sup> (Maret, 2000). In such context, Nudt3 polyPase activity might then be activated by the free Zn<sup>2+</sup>, raising the question of whether polyP hydrolysis might be a component of the oxidative stress response (Figure 5A). As described previously (Aizenman et al., 2000), exposing HEK293T cells to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) led to a rapid increase in free Zn<sup>2+</sup>, as detected by the cell-permeable fluorogenic Zn<sup>2+</sup> probe Zinpyr-1 both by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Figure 5B) and by microscopy inspection (Figure S3A), and a concomitant decrease in cellular polyP (Figure 5C), polyP decrease that is Nudt3 dependent as far as it cannot be observed when Nudt3 is depleted (Figure 5D). Importantly, polyP decrease and Nudt3 dependency are also obtained by exposing the cells to 15 μM menadione, an alternative oxidative stress-inducing agent (Figures S3B and S3C). Suggesting a critical role for Zn<sup>2+</sup>/Nudt3 polyPase activity in oxidative stress response, siRNA knockdown of Nudt3 in both HEK293T and SH-SY5Y cells reduced cell survival after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as measured by MTT and colony-forming assays (Figures 5E and S3E). Interestingly, silencing or knocking down Nudt3 by specific CRISPR-Cas9 editing led to similar sensitivity to oxidative stress (Figure S3D). In turn, depleting polyP by overexpressing Nudt3 decreased HEK293T cell viability after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figures 5F and S3F). Note that overexpressing and depleting Nudt3 determine a similar effect in the cells: polyP reduction and inability to use it, respectively. Although polyP levels may affect cellular energy metabolism (Pavlov et al., 2010), we found no correlation between Nudt3 knockdown and cellular ATP levels after oxidative stress (Figure S4A).

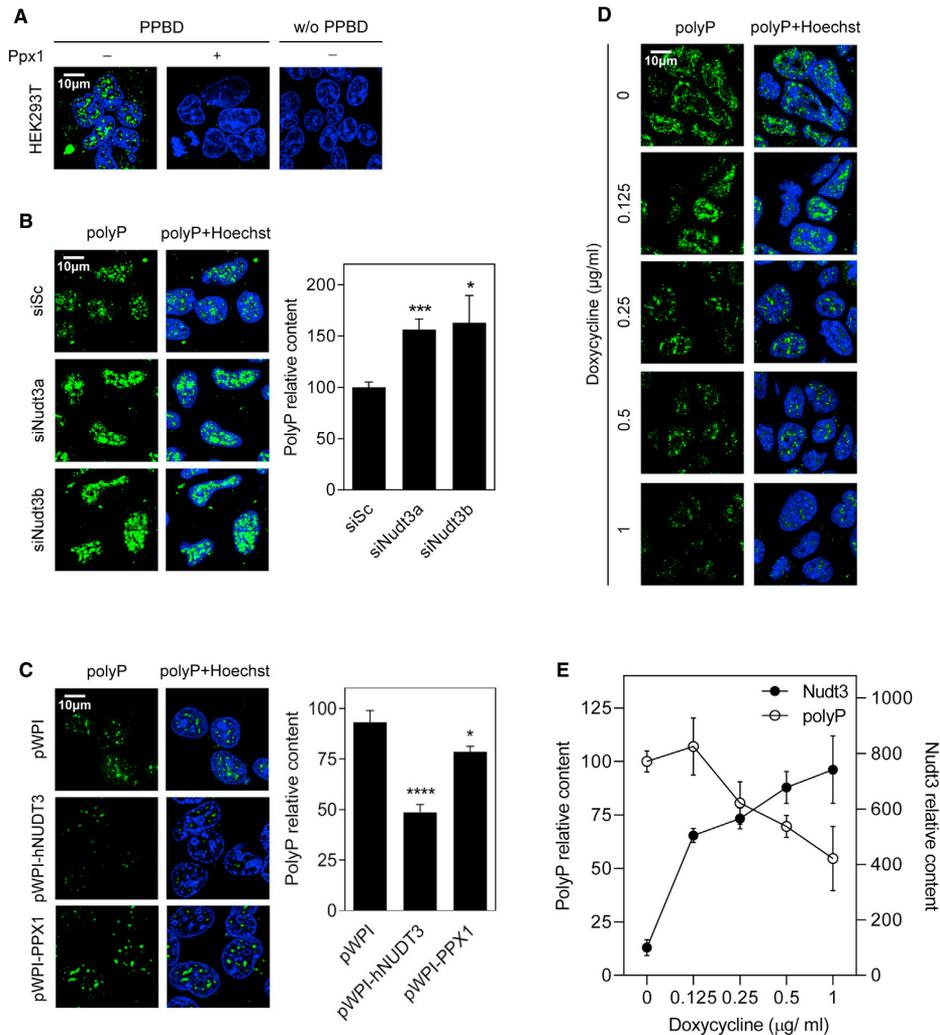
Oxygen free radicals released by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> target multiple cellular nucleophiles, including proteins, lipids, nucleic acids (including DNA double-strand breaks [DSBs]), and metabolites, leading to cellular damage. To assess a potential role for Nudt3 and its polyPase activity in DSB formation and repair, we examined the presence of the DSB marker γH2AX in cells after oxidative stress. In a time course, Nudt3 knockdown HEK293T cells displayed higher γH2AX levels than control cells at basal conditions, a difference that importantly increased after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figures 5G and S4B). In addition, we also detected the increase in γH2AX foci by immunofluorescence (Figure 5H). Finally, we obtained similar results silencing Nudt3 (Figure S4C). These experiments suggest that Nudt3 plays a role in DSB repair after oxidative stress in a time framework coherent with the Zn<sup>2+</sup> release and polyP degradation.

### Role of Nudt3 in early development

In zebrafish, Nudt3 is encoded by two genes, zNudt3a and zNudt3b. Recombinant zNudt3a displayed similar endo-polyPase activity to human Nudt3 (Figure S5A). Injection of a cocktail of eight guide RNAs complexed to Cas9 targeting the two genes was injected into one cell's embryos, yielding mosaics with incomplete disruption of the two genes (Figure S5B). At 8 days post-fertilization, massive morphological aberrations (Figure S5C)

(B) Exo-polyPase activity of Nudt3. The enzymatic reaction was as in (A). The activity was measured as free phosphate production using the malachite green method. Yeast recombinant exo-polyPase Ppx1 (1 ng) is used as a control. Mean ± SEM of three independent experiments.

(C) Enzymatic activity quantification of Nudt3 on the noted substrates (up to down: polyP<sub>100</sub>, 5-InsP<sub>7</sub>, and Ap5A) in the presence of the indicated cations (5 mM). Mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.



**Figure 3. Nudt3 is a polyPase *in vivo***

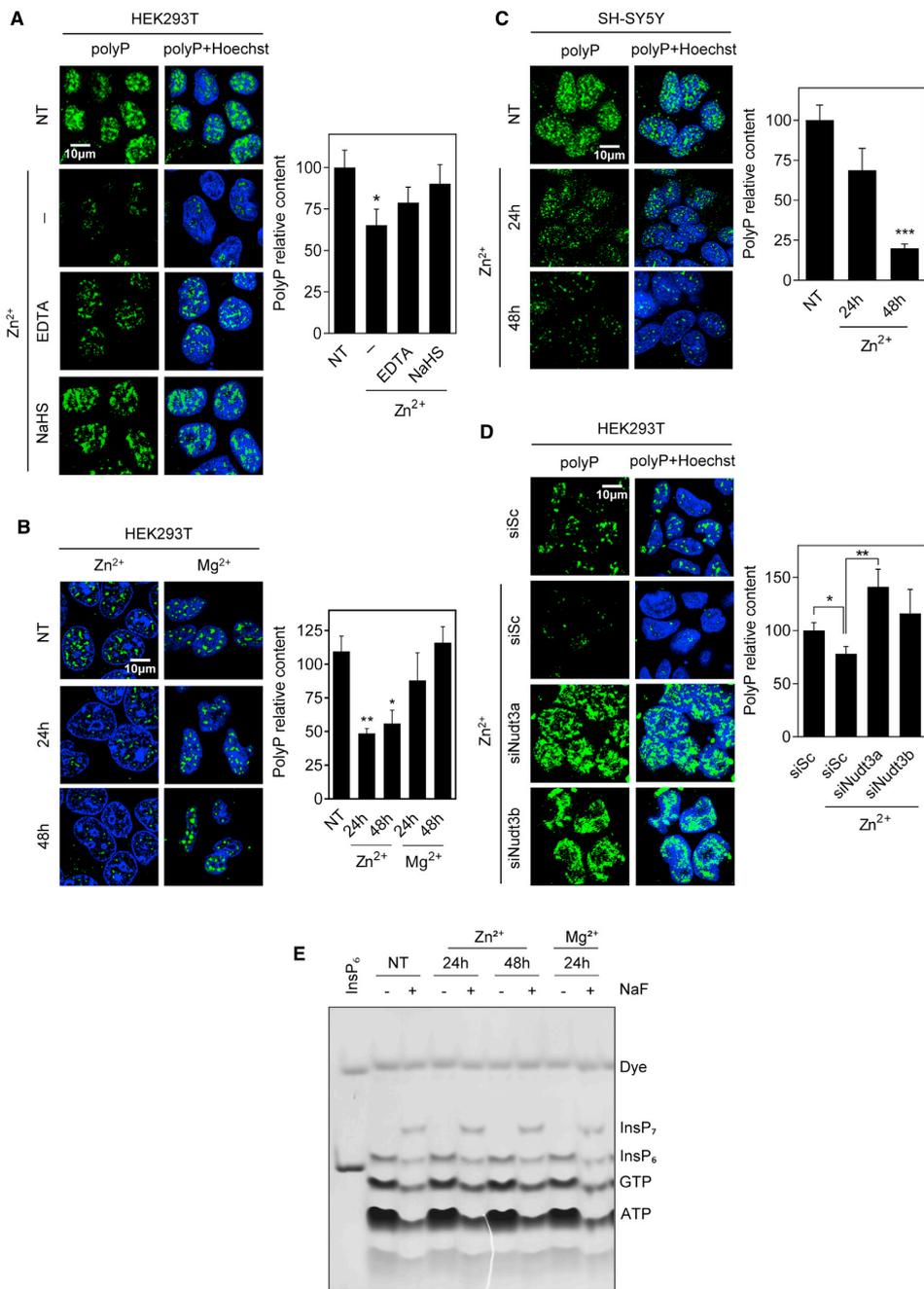
(A) Validation of polyP signal detection. Immunofluorescence images of HEK293T human cells where polyP was detected using Xpress-PPBD (Xpress-tagged version of *E. coli* polyP binding domain protein), coupled with anti-Xpress antibody and anti-goat Alexa488 conjugated secondary antibody. Cells were treated (or not) with 1 µg of yeast exo-polyPase to deplete polyP and show specificity for polyP signal. Nuclei were stained using Hoechst. Negative control was without Xpress-PPBD.

(B) Nudt3 silencing increases nuclear polyP content. HEK293T cells were transfected with scrambled (Sc) RNA (10 nM) or with two different Nudt3-targeting siRNA (siNudt3a and siNudt3b) at 10 nM. After 48 h, polyP was detected as in (A). Representative images are in the left panel. The graph is for quantification (see STAR Methods) representing the mean ± SEM of at least eight different pictures from four independent experiments. A minimum of 500 cells per condition were analyzed.

(C) Constitutive overexpression of human Nudt3 decreases nuclear polyP content. HEK293T human cells were transfected with empty pWPI, pWPI-hNUDT3, or pWPI-scPPX1 (*S. cerevisiae* exo-polyPase). Polyphosphate was detected as in (A). Representative images are in the left panel. Quantification of 20 pictures from three independent experiments with a minimum of 1,300 cells per condition is in the right panel. Mean ± SEM is presented.

(D and E) Nudt3 depletes nuclear polyP in a dose-dependent manner. HEK293T human cells were transfected with empty pAdvanced and pRetroX or pAdvanced and pRetroX-hNudt3 permitting the expression of the human Nudt3 gene by adding different amounts of doxycycline. 48 h after transfection, the indicated amount of doxycycline was added, and after 72 h polyP was detected as in (A). (D) Representative images. (E) Quantification of at least five pictures of three independent experiments. A minimum of 200 cells per condition were analyzed. Mean ± SEM is provided.

The scale bars represent 10 µm. See also Figure S2. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.



(legend on next page)

were observed in approximately half of the surviving animals. We decided thus to establish Nudt3 knockout lines for each gene; for this, we injected four guides targeting one gene in one-cell-stage embryos and crossed the surviving animals with wild-type (F1 generation). Heterozygous knockouts were backcrossed (F2 generation). Interestingly, none of the surviving F2 fish were homozygous knockouts for either gene (Figures S5D and S5E). The role of Nudt3 in brain development is supported by a peak of expression of human DIPP subfamily NUDIX proteins Nudt3, Nudt10, and Nudt11 before and following birth (Figure S1F), with Nudt3 being highly present in brain tissues (Figure S5F) where polyP and  $Zn^{2+}$  are especially abundant, a striking correlation that deserves further investigation.

## DISCUSSION

PolyP study runs at two velocities: in simple genetic models, it moves fast, whereas it is lagging in metazoans. The main reason for the extra difficulty in studying polyP in mammalian cells and organisms lies in our ignorance of the enzymes responsible for their synthesis and degradation, making difficult the manipulation of polyP levels; consequently, its functional roles are poorly defined in metazoans. This impediment has been addressed by using well-known polyPases from other organisms, such as bacteria (Bondy-Chorney et al., 2020) and yeast (Bru et al., 2017; Wang et al., 2003). Here, we have identified the NUDIX family hydrolase Nudt3 as responsible for an abundant  $Zn^{2+}$  cation-dependent polyP cleaving activity. We find that  $Zn^{2+}$ -activated Nudt3 functions as an endogenous polyPase in human cells, with roles in maintaining cell viability in the face of oxidative stress. When cells are treated with  $H_2O_2$ ,  $Zn^{2+}$  quick release from MTs activates Nudt3 to degrade the polyP and reduce oxidative stress-associated DNA damage. Nudt3 is broadly expressed in human tissues but particularly in the brain, a tissue with high levels of sequestered  $Zn^{2+}$ . Thus, we conclude that Nudt3 represents a physiological endo-polyPase that may serve important roles in brain stress tolerance.

### Ion requirements, structural considerations, and substrate specificity

That Nudt3 can be activated by multiple cations is an intriguing characteristic shared with other polyPases (Andreeva et al., 2015). Although this fact could represent a way of producing several enzymatic activities using very few genetic resources,

how the cation can confer the substrate specificity remains unknown. The crystal structure of Nudt3 suggests three  $Mg^{2+}$  binding sites (Thorsell et al., 2009) that might be alternatively bound by  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , or  $Zn^{2+}$  to alter substrate specificity forcing a specific orientation for each substrate. The binding of  $Zn^{2+}$  to polyP (Sanz-Luque et al., 2020) might bend the polyP molecule in a conformation that could make it more susceptible to be hydrolyzed by Nudt3.

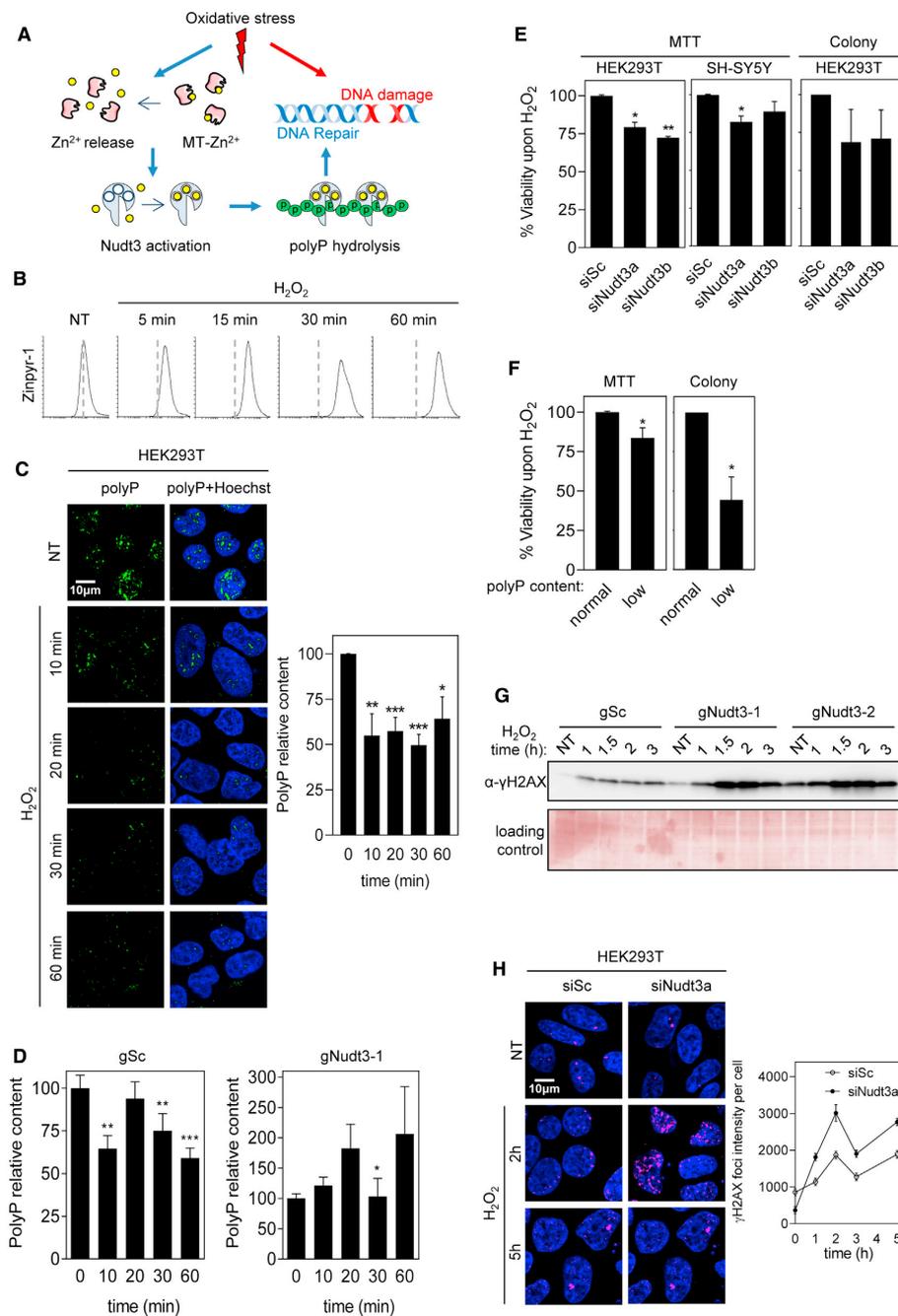
$Mg^{2+}$  is the most abundant divalent cation in the cells, with a concentration that remains close to 1 mM under many physiological cellular responses (de Baaij et al., 2015). By contrast, most other cations are kept sequestered via high-affinity binding and/or sequestration in membranous organelles. Although  $Zn^{2+}$  is an essential cofactor for many proteins, free  $Zn^{2+}$  is held in the low nanomolar range (Krezel and Maret, 2006), in part via buffering by MTs. However, bound  $Zn^{2+}$  can be released upon oxidation of MT cysteine thiols (Krezel and Maret, 2007; Li and Maret, 2008; Maret and Vallee, 1998) during oxidative stress, leading to an increase in cellular  $Zn^{2+}$  activity. Of note, a role for  $Zn^{2+}$  as an intracellular messenger in the brain is well known (Yamasaki et al., 2007), and some MTs, such as MT3, are specifically expressed in the brain (Genotype-Tissue Expression [GTEx] Portal), suggesting a relevant role for  $Zn^{2+}$  in this particular organ (Pearce et al., 2000; Spahl et al., 2003). Importantly, it should be considered that, in rats, the amount of brain polyP reduces progressively with aging (Lorenz et al., 1997), as it does in Alzheimer's mouse models (Cremers et al., 2016). It is also of great significance to note that polyP reduction correlates with a higher  $Zn^{2+}$  content in neurodegenerative diseases (Frederickson et al., 2005). All together, these results underline the importance of  $Zn^{2+}$ , Nudt3, and polyP in brain physiology.

Almost half of the cellular  $Zn^{2+}$  is nuclear (Vallee and Falchuk, 1993) where polyP is predominant, as shown in our results and by others (Jimenez-Nuñez et al., 2012; Negreiros et al., 2018; Xie et al., 2019). Nudt3 has been considered to be cytoplasmic (McLennan, 2006) mainly because of its decapping activity (Sheth and Parker, 2003). However, we present here immunolocalization evidence showing Nudt3's ubiquitous localization. Considering all this, it is very plausible that polyP,  $Zn^{2+}$ , and Nudt3 could be in the same compartment, giving spatial coherence to the Nudt3/ $Zn^{2+}$ -dependent polyPase activity.

Along with substrate switching by cations, competition between Nudt3 substrates has been demonstrated, raising the question of whether the reduction in polyP content is a direct

### Figure 4. Nudt3 is a $Zn^{2+}$ -dependent polyPase *in vivo*

- (A)  $Zn^{2+}$  decreases nuclear polyP content. HEK293T cells were grown with 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  in the medium and with the chelators EDTA or NaHS (200  $\mu M$ ) for 48 h. Polyphosphate was detected as in Figure 3A. Representative pictures are in the left panel. Quantification of at least 10 pictures from three independent experiments is in the right panel. A minimum of 500 cells per condition were analyzed. Mean  $\pm$  SEM is provided.
- (B)  $Mg^{2+}$  does not affect nuclear polyP content. HEK293T cells were grown in the presence of  $Zn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  (100  $\mu M$ ) for 24 and 48 h. Polyphosphate was detected, and representative pictures are in the left panel. Quantification of five pictures containing more than 200 cells per condition from one experiment is presented.
- (C)  $Zn^{2+}$  controls polyP content in the brain cell line SH-SY5Y. Cells were grown in the presence of 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  for 24 and 48 h. Polyphosphate was detected, and representative pictures are in the left panel. Quantification of three pictures containing a minimum of 100 cells from one experiment.
- (D)  $Zn^{2+}$  effect on polyP is dependent on Nudt3. Nudt3 was silenced in HEK293T cells and after 24 h, 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  was added. Polyphosphate was detected after 24 h. Representative pictures are in the left panel. Quantification of 15 pictures from three independent experiments is in the right panel. A minimum of 300 cells per condition were analyzed. Mean  $\pm$  SEM is provided.
- (E) Inositol pyrophosphate (InsP<sub>6</sub>) is not affected by  $Zn^{2+}$ . HEK293T cells were grown in the presence of 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  for 24 and 48 h. Cells were treated with 10 mM NaF for 1 h to raise the InsP<sub>6</sub> intracellular levels and ensure its visualization in a 35% PAGE gel. InsP<sub>6</sub> was included as a size marker at the left line. The scale bars represent 10  $\mu m$ . NT, not treated. See also Figure S2. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.



(legend on next page)

effect of its polyP activity or a consequence of its previously reported IP<sub>7</sub>/IP<sub>8</sub> hydrolase activity (Kilari et al., 2013; Safrany and Shears, 1998). Our polyP-zymogram analysis of the peak of *in vivo* activity and multiple *in vitro* enzyme assays on purified and recombinant Nudt3 each confirms Zn<sup>2+</sup>-inducible endo-polyPase activity by Nudt3. Further, Zn<sup>2+</sup> does not affect InsP7 levels under conditions where polyP becomes destabilized. Note that InsP7 is already comparatively low in HEK293T (Qiu et al., 2020), further arguing against a competitive inhibition or indirect action model. In summary, we propose that Nudt3 is a Zn<sup>2+</sup>-dependent endo-polyPase that directly regulates polyP levels in mammalian cells.

### PolyP and its role in oxidative stress protection, a working model

Among many other functions, polyP has been elegantly proposed to serve a chaperone-like function in bacteria to limit aggregation of damaged proteins during oxidative stress (Gray et al., 2014). Although chaperone function in polyP pools recalcitrant to Nudt3 degradation could be conserved in mammalian cells, our results point to polyP hydrolysis in response to oxidative stress in metazoan cells via Zn<sup>2+</sup> release and activation of Nudt3 polyPase activity. Different mechanistic possibilities could explain the role of polyP degradation in oxidative stress response. First, polyP hydrolysis might represent the source of ATP needed for cell repair mechanisms as established for Nudt5 (Wright et al., 2016) and in several microbial models where polyP is necessary for ADP-to-ATP turnover (Borden et al., 2021; McIntyre and Solesio, 2021). However, our results show that ATP levels do not change under conditions where polyP is degraded. Second, phospho-transfer from polyP might be critical for dNTP synthesis and DNA repair (Bru et al., 2017). Taking into account that foci of highly concentrated dNTPs are essential for DNA repair in mammalian cells (Niida et al., 2010), the possibility emerges that nuclear polyP degradation could

be needed for dealing with the DNA damage produced by oxidative stress. Third, polyP is a poly-anion able to bind proteins electrostatically (Creemers et al., 2016; Gray et al., 2014) and thereby may serve a role in sequestering specific nuclear proteins (Negreiros et al., 2018). PolyP complexed with cationic proteins can form a condensate and display liquid droplet phase separation both *in vitro* and in bacterial cells (Wang et al., 2020). The nuclear polyP foci observed here in human cells might represent analogous polyP-protein condensates, perhaps serving not only as a source of high-energy phosphates but also as a reservoir of proteins available to accelerate repair. Thereby, Zn<sup>2+</sup> release, activation of Nudt3, and polyP cleavage and depolymerization might release these proteins to participate in stress response.

### Limitations of this work

The polyP measurements and *in vivo* experiments were performed in cell lines growing in flat cultures. PolyP quantification in both PAGE gels and immuno-localization was performed by image analysis.

### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
  - Cell lines transfection
  - Plasmids and recombinant proteins

### Figure 5. Nudt3 Zn<sup>2+</sup>-dependent polyP degradation is needed for cell viability upon oxidative stress

(A) Working model. Oxidative stress leads to DNA damage and acts on the redox-sensitive metallothioneins (MTs) determining the release of intracellular Zn<sup>2+</sup>, which, in turn, activates the polyPase activity of Nudt3 and the depletion of polyP. The degradation of polyP protects DNA from oxidative damage and, as a result, cell viability is increased.

(B) Oxidative stress increases intracellular free Zn<sup>2+</sup> in HEK293T. Cells were exposed to 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the indicated times, treated with Zinpyr for 1 h, and the green fluorescence intensity was measured by FACS analysis. 10,000 events were recorded.

(C) Oxidative stress reduces polyP content. HEK293T cells were treated with 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the noted time and immediately fixed. Polyphosphate content was detected, and representative pictures are in the left panel. The quantification of three independent experiments is in the right panel. The mean ± SEM is provided. A minimum of 400 cells per condition were analyzed.

(D) PolyP reduction upon oxidative stress is Nudt3 dependent. HEK293T cells, in which Nudt3 has been depleted by CRISPR-Cas, were treated with 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the noted times and immediately fixed. Scrambled guide (gSc) is used as control and gNudt3-1 is the specific guide for targeting Nudt3 gen. Polyphosphate content was detected by immunofluorescence as in Figure 3A. The graph represents the quantification of three independent experiments. The mean ± SEM is provided. A minimum of 400 cells per condition were analyzed.

(E and F) Cell viability upon oxidative stress is dependent on Nudt3 polyPase activity. (E) Nudt3 was silenced in HEK293T and SH-SY5Y. After 48 h, 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added, and 24 h later, MTT was performed. In the case of colony formation assays, cells were treated with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. Mean ± SEM from three independent experiments is shown. (F) Nudt3 was overexpressed as in Figure 3C (note that overproduction of Nudt3 leads to polyP depletion, noted as low polyP content. This effect is similar to being unable to use polyP as a result of Nudt3 silencing). Viability was measured as MTT and colony-forming in HEK293T cells were grown in the absence or presence of 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h (for the MTT experiments) and 100 μM for 1 h for the colony-forming assays. Mean ± SEM from three independent experiments is represented.

(G and H) DNA damage upon oxidative stress is Nudt3 dependent. (G) Nudt3 was knocked down in HEK293T cells by using two different CRISPR-Cas9 guides. After 72 h, cells were treated with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h and washed with fresh medium. Histone H2AX phosphorylation was detected by western blot with specific antibodies. Time is from the moment in which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. (H) Nudt3 was silenced in HEK293T cells. After 48 h cells were treated with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h and washed with fresh medium. Histone phosphorylated foci were detected by immunofluorescence (using specific antibodies as in G). Representative images and fluorescence intensity (mean ± SEM) quantification from one experiment where a minimum of 250 cells were analyzed. The scale bars represent 10 μm. See also Figures S3 and S4. \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05.

- Cell extracts, western blot, and Ponceau staining
- Small interfering RNA (siRNA)
- CRISPR Cas9
- Biological samples and endo-polyPase purification
- polyP-zymogram
- PAGE-urea gels and polyP electrophoresis
- Endo-polyPase activity quantification
- Malachite green exo-polyPase activity assay
- Inositol pyrophosphatase assay
- Dinucleoside diphosphatase activity
- Viability assays
- Polyphosphate tissue extraction
- Microscopy and polyP immunolocalization
- ATP measurement
- Intracellular Zn<sup>2+</sup> measurement
- Zebrafish maintenance
- crRNA design
- Ribonucleoprotein complex (Cas9+gRNA) microinjection for F0 knock-out
- Zebrafish Genomic DNA extraction
- Zebrafish amplification of fragments
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110004>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristina Acevedo and Felix Ruiz for the helpful discussion, Sebastián Zagmutt for helping with the graphical abstract, Toshiyazu Shiba (RegeneTiss) for polyP<sub>100</sub>, Miguel Beato and Roni Wright (CRG Barcelona) for Nudt5 protein, and the Hellday Laboratory (Karolinska Institute) for the NUDIX plasmids. The data used for the analyses described in this manuscript were obtained from the GTEx Portal, supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. This work was supported by and is part of the I+D+i grant ref. PGC2018-096597-B-I00 (to J.J.) by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN). B.S.-M. was the recipient of a grant from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca AGAUR ref. 2016FL\_B 00025. H.J.J. was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) under Germany's Excellence Strategy (CIBBS, EXC-2189, Project ID 390939984).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.S.-M., A.S., M.P.-M., R.R.-R., A.B., D.W., and A.S. were in charge of the investigation. H.J.J. and B.A. provided resources. B.A., S.J.K., and A.S. helped with the conceptualization and reviewed and edited the original draft. J.C., J.J., and S.B. did the conceptualization, supervision, funding acquisition, and wrote the original draft.

#### DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 3, 2021  
Revised: October 8, 2021  
Accepted: October 22, 2021  
Published: November 16, 2021

#### REFERENCES

- Aizenman, E., Stout, A.K., Hartnett, K.A., Dineley, K.E., McLaughlin, B., and Reynolds, I.J. (2000). Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *J. Neurochem.* *75*, 1878–1888.
- Albi, T., and Serrano, A. (2016). Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *32*, 27.
- Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., and Kulakovskaya, T. (2015). Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities. *PLoS ONE* *10*, e0119594.
- Azevedo, C., Livermore, T., and Saiardi, A. (2015). Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. *Mol. Cell* *58*, 71–82.
- Babes, V. (1895). Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben- und Kapselbildung pathogener Bakterien. *Zitschr. f. Hygiene* *20*, 412–437.
- Beyersmann, D., and Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* *14*, 331–341.
- Bondy-Chorney, E., Abramchuk, I., Nasser, R., Holinier, C., Denoncourt, A., Bajjal, K., McCarthy, L., Khacho, M., Lavallée-Adam, M., and Downey, M. (2020). A Broad Response to Intracellular Long-Chain Polyphosphate in Human Cells. *Cell Rep.* *33*, 108318.
- Borden, E.A., Furey, M., Gattone, N.J., Hambaridkar, V.D., Liang, X.H., Scoma, E.R., Abou Samra, A., D-Gary, L.R., Dennis, D.J., Fricker, D., et al. (2021). Is there a link between inorganic polyphosphate (polyP), mitochondria, and neurodegeneration? *Pharmacol. Res.* *163*, 105211.
- Brown, M.R., and Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 16085–16087.
- Bru, S., Jiménez, J., Canadell, D., Ariño, J., and Clotet, J. (2016). Improvement of biochemical methods of polyP quantification. *Microb. Cell* *4*, 6–15.
- Bru, S., Samper-Martin, B., Quandt, E., Hernández-Ortega, S., Martínez-Lañez, J.M., Garí, E., Rafel, M., Torres-Torronteras, J., Martí, R., Ribeiro, M.P.C., et al. (2017). Polyphosphate is a key factor for cell survival after DNA damage in eukaryotic cells. *DNA Repair (Amst.)* *57*, 171–178.
- Caffrey, J.J., Safrany, S.T., Yang, X., and Shears, S.B. (2000). Discovery of molecular and catalytic diversity among human diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases. An expanding Nudt family. *J. Biol. Chem.* *275*, 12730–12736.
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A.S., Carter, M., Unterlass, J.E., Hallström, B., Loseva, O., Karem, Z., Calderón-Montaño, J.M., Lindskog, C., et al. (2017). A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nat. Commun.* *8*, 1541.
- Cordeiro, C.D., Ahmed, M.A., Windle, B., and Docampo, R. (2019). NUDIX hydrolases with inorganic polyphosphate exo- and endopolyphosphatase activities in the glycosome, cytosol and nucleus of *Trypanosoma brucei*. *BioSci. Rep.* *39*, BSR20190894.
- Cremers, C.M., Knoeffler, D., Gates, S., Martin, N., Dahl, J.U., Lempart, J., Xie, L., Chapman, M.R., Galvan, V., Southworth, D.R., and Jakob, U. (2016). Polyphosphate: A Conserved Modifier of Amyloidogenic Processes. *Mol. Cell* *63*, 768–780.
- de Baaij, J.H., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. (2015). Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol. Rev.* *95*, 1–46.
- Desfougères, Y., Saiardi, A., and Azevedo, C. (2020). Inorganic polyphosphate in mammals: where's Wally? *Biochem. Soc. Trans.* *48*, 95–101.
- Frederickson, C.J., Koh, J.Y., and Bush, A.I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 449–462.
- Gasa, L., Sanchez-Botet, A., Quandt, E., Hernández-Ortega, S., Jiménez, J., Carrasco-García, M.A., Simonetti, S., Kron, S.J., Ribeiro, M.P., Nadal, E., et al. (2017). A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer. *Sci. Rep.* *7*, 10228.
- Gerasimaitė, R., and Mayer, A. (2017). Ppn2, a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *J. Cell Sci.* *130*, 1625–1636.

- Gray, M.J., Wholey, W.Y., Wagner, N.O., Cremers, C.M., Mueller-Schickert, A., Hock, N.T., Krieger, A.G., Smith, E.M., Bender, R.A., Bardwell, J.C., and Jakob, U. (2014). Polyphosphate is a primordial chaperone. *Mol. Cell* **53**, 689–699.
- Grudzien-Nogalska, E., Jiao, X., Song, M.G., Hart, R.P., and Kiledjian, M. (2016). Nudt3 is an mRNA decapping enzyme that modulates cell migration. *RNA* **22**, 773–781.
- Harold, F.M. (1966). Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30**, 772–794.
- Hassanian, S.M., Avan, A., and Ardehshirylajimi, A. (2017). Inorganic polyphosphate: a key modulator of inflammation. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 213–218.
- Hoshijima, K., Juryneć, M.J., Klatt Shaw, D., Jacobi, A.M., Behlke, M.A., and Grunwald, D.J. (2019). Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. *Dev. Cell* **51**, 645–657.e4.
- Jiménez, J., Bru, S., Ribeiro, M.P., and Clotet, J. (2017). Polyphosphate: popping up from oblivion. *Curr. Genet.* **63**, 15–18.
- Jimenez-Núñez, M.D., Moreno-Sánchez, D., Hernandez-Ruiz, L., Benitez-Rondán, A., Ramos-Amaya, A., Rodríguez-Bayona, B., Medina, F., Brieua, J.A., and Ruiz, F.A. (2012). Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription. *Haematologica* **97**, 1264–1271.
- Kilari, R.S., Weaver, J.D., Shears, S.B., and Safrany, S.T. (2013). Understanding inositol pyrophosphate metabolism and function: kinetic characterization of the DIPPs. *FEBS Lett.* **587**, 3464–3470.
- Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **23**, 1–18.
- Krezel, A., and Maret, W. (2006). Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 1049–1062.
- Krezel, A., and Maret, W. (2007). Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *Biochem. J.* **402**, 551–558.
- Kulaev, I.S., and Vagabov, V.M. (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **24**, 83–171.
- Kumble, K.D., and Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 5818–5822.
- Kumble, K.D., and Kornberg, A. (1996). Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* **271**, 27146–27151.
- Lee, S.R. (2018). Cellular toxicity of zinc can be attenuated by sodium hydrogen sulfide in neuronal SH-SY5Y cell. *Mol. Cell. Toxicol.* **14**, 425–436.
- Li, Y., and Maret, W. (2008). Human metallothionein metallomics. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1055–1062.
- Lichko, L., Kulakovskaya, T., and Kulaev, I. (1998). Membrane-bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and comparative characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1372**, 153–162.
- Lonetti, A., Szjigartyo, Z., Bosch, D., Loss, O., Azevedo, C., and Saiardi, A. (2011). Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases. *J. Biol. Chem.* **286**, 31966–31974.
- Lorenz, B., Münkner, J., Oliveira, M.P., Kuusksalu, A., Leitão, J.M., Müller, W.E., and Schröder, H.C. (1997). Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1335**, 51–60.
- Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* **130** (5S Suppl), 1455S–1458S.
- Maret, W. (2011). Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1079–1086.
- Maret, W., and Vallee, B.L. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3478–3482.
- McIntyre, B., and Solesio, M.E. (2021). Mitochondrial inorganic polyphosphate (polyP): the missing link of mammalian bioenergetics. *Neural Regen. Res.* **16**, 2227–2228.
- McLennan, A.G. (2006). The Nudix hydrolase superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 123–143.
- Morimoto, D., Tomita, T., Kuroda, S., Higuchi, C., Kato, S., Shiba, T., Nakagami, H., Morishita, R., and Yoshikawa, H. (2010). Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Metab.* **28**, 418–423.
- Negreiros, R.S., Lander, N., Huang, G., Cordeiro, C.D., Smith, S.A., Morrissey, J.H., and Docampo, R. (2018). Inorganic polyphosphate interacts with nuclear and glycosomal proteins in trypanosomatids. *Mol. Microbiol.* **110**, 973–994.
- Nickel, K.F., Ronquist, G., Langer, F., Labberton, L., Fuchs, T.A., Bokemeyer, C., Sauter, G., Graefen, M., Mackman, N., Stavrou, E.X., et al. (2015). The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood* **126**, 1379–1389.
- Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., et al. (2010). Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* **24**, 333–338.
- Pavlov, E., Aschar-Sobbi, R., Campanella, N., Turner, R.J., Gómez-García, M.R., and Abramov, A.Y. (2010). Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 9420–9428.
- Pearce, L.L., Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R., and Levitan, E.S. (2000). Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 477–482.
- Qiu, D., Wilson, M.S., Eisenbeis, V.B., Harmel, R.K., Riemer, E., Haas, T.M., Wittwer, C., Jork, N., Gu, C., Shears, S.B., et al. (2020). Analysis of inositol phosphate metabolism by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Nat. Commun.* **11**, 6035.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308.
- Riley, A.M., Unterlass, J., Konieczny, V., Taylor, C.W., Helleday, T., and Potter, B.V.L. (2018). A synthetic diphosphoinositol phosphate analogue of inositol triphosphate. *MedChemComm* **9**, 1105–1113.
- Safrany, S.T., and Shears, S.B. (1998). Turnover of bis-diphosphoinositol tetakisphosphate in a smooth muscle cell line is regulated by beta2-adrenergic receptors through a cAMP-mediated, A-kinase-independent mechanism. *EMBO J.* **17**, 1710–1716.
- Safrany, S.T., Caffrey, J.J., Yang, X., Bembek, M.E., Moyer, M.B., Burkhart, W.A., and Shears, S.B. (1998). A novel context for the “Mut” module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *EMBO J.* **17**, 6599–6607.
- Safrany, S.T., Caffrey, J.J., Yang, X., and Shears, S.B. (1999). Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositol research? *Biol. Chem.* **380**, 945–951.
- Sahu, S., Wang, Z., Jiao, X., Gu, C., Jork, N., Wittwer, C., Li, X., Hostachy, S., Fiedler, D., Wang, H., et al. (2020). InsP<sub>7</sub> is a small-molecule regulator of NUDT3-mediated mRNA decapping and processing-body dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 19245–19253.
- Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., and Saito, M. (2005). Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5692–5701.
- Sanz-Luque, E., Bhaya, D., and Grossman, A.R. (2020). Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. *Front. Plant Sci.* **11**, 938.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805–808.
- Smith, S.A., Mutch, N.J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R., and Morrissey, J.H. (2006). Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 903–908.

- Spahl, D.U., Berendji-Grün, D., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V., and Kröncke, K.D. (2003). Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn<sup>2+</sup> release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13952–13957.
- Stankovic, R.K., Chung, R.S., and Penkowa, M. (2007). Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 484–489.
- Stepanenko, A.A., and Dmitrenko, V.V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* *569*, 182–190.
- Tammenkoski, M., Koivula, K., Cusanelli, E., Zollo, M., Steegborn, C., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2008). Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry* *47*, 9707–9713.
- Thorsell, A.G., Persson, C., Gräslund, S., Hammarström, M., Busam, R.D., and Hallberg, B.M. (2009). Crystal structure of human diphosphoinositol phosphatase 1. *Proteins* *77*, 242–246.
- Travers, R.J., Smith, S.A., and Morrissey, J.H. (2015). Polyphosphate, platelets, and coagulation. *Int. J. Lab. Hematol.* *37* (Suppl 1), 31–35.
- Vallee, B.L., and Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* *73*, 79–118.
- Wang, L., Fraley, C.D., Faridi, J., Kornberg, A., and Roth, R.A. (2003). Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 11249–11254.
- Wang, X., Shi, C., Mo, J., Xu, Y., Wei, W., and Zhao, J. (2020). An Inorganic Biopolymer Polyphosphate Controls Positively Charged Protein Phase Transitions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *59*, 2679–2683.
- Werner, T.P., Amrhein, N., and Freimoser, F.M. (2005). Novel method for the quantification of inorganic polyphosphate (iPoP) in *Saccharomyces cerevisiae* shows dependence of iPoP content on the growth phase. *Arch. Microbiol.* *184*, 129–136.
- Westerfield, M., Doerry, E., and Douglas, S. (1999). Zebrafish in the Net. *Trends Genet.* *15*, 248–249.
- Wright, R.H., Lioutas, A., Le Dily, F., Soronellas, D., Pohl, A., Bonet, J., Nacht, A.S., Samino, S., Font-Mateu, J., Vicent, G.P., et al. (2016). ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling. *Science* *352*, 1221–1225.
- Wu, R.S., Lam, I.I., Clay, H., Duong, D.N., Deo, R.C., and Coughlin, S.R. (2018). A Rapid Method for Directed Gene Knockout for Screening in G0 Zebrafish. *Dev. Cell* *46*, 112–125.e4.
- Xie, L., Rajpurkar, A., Quarles, E., Taube, N., Rai, A.S., Erba, J., Sliwinski, B., Markowitz, M., Jakob, U., and Knoeffler, D. (2019). Accumulation of Nucleolar Inorganic Polyphosphate Is a Cellular Response to Cisplatin-Induced Apoptosis. *Front. Oncol.* *9*, 1410.
- Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K., and Hirano, T. (2007). Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell Biol.* *177*, 637–645.

## STAR METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Rabbit Anti-Nudt3	Sigma Aldrich	Ref: SAB2700523; RRID: AB_2894928
Mouse monoclonal anti-Xpress	Life and Technologies	Ref: 46-0528; RRID: AB_2556552
Mouse Anti-Flag	Sigma Aldrich	Ref: F3165; RRID: AB_259529
Rabbit Anti-GFP	Cell Signaling	Ref: 29565; RRID: AB_1196615
Mouse $\gamma$ H2AX	Millipore	Ref: 05-636; RRID: AB_309864
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti mouse	Invitrogen	Ref: A11001; RRID: AB_2534069
AlexaFluor 633 conjugated goat anti mouse	Invitrogen	Ref: A21052; RRID: AB_2535719
HRP-Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research	Ref: 111-035-144; RRID: AB_2307391
<b>Bacterial and virus strains</b>		
<i>E. coli</i> DL21 DE3	Bio-RAD	Ref: 1563003
<b>Biological samples</b>		
<i>Rattus norvegicus</i> brain (Sprague Dawley)	UB animal facility	N/A
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
C-Myc/DDK-Nudt3	Origene	Ref: TP302900
polyP <sub>100</sub>	RegeneTiss	EUI005
5-InsP <sub>7</sub>	This work	N/A
Ap <sub>5</sub> A	This work	N/A
<b>Critical commercial assays</b>		
ATP determination kit	Molecular Probes	Ref: A22066
ZinPyr	Sigma Aldrich	Ref: AB145349
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
HEK293T	ATCC authenticated	N/A
SH-SY5Y	Sigma Aldrich	Ref: 94030304-1vl
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
<i>Danio rerio</i>	CRG animal facility	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
Nudt3guide1 AGCAGTTCGTGAAGTCTGTG	IDT	N/A
Nudt3guide2 GTAGTCGCCATCCAGACAGA	IDT	N/A
Nudt3A siRNA rGrCrArCrArGrGrArCrGrUrArUrGrUrCrUrArUrGrUGC	IDT	N/A
Nudt3B siRNA rUrArArArGrUrGrCrUrGrCrArGrUrArUrCrArCrAAA	IDT	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
pGEX6p1-Nudt3	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-Nudt3E70A	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-Nudt4	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-Nudt10	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-Nudt11	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-zNudt3a	This work. BamHI	N/A
pGEX6p1-zNudt3b	This work. BamHI	N/A
pWPI-Nudt3-flag	This work. PmeHI	N/A
pWPI-NLS-PPX1-flag	This work. PmeHI	N/A
pRetroX-Tet-on-Advanced	Takara	Ref: 632104

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
pRetroX-Tight-Pur	Takara	Ref: 632104
pRetroX-Tight-Pur-NUDT3	This Work	N/A
pX459	Addgene	Ref: 62988
Software and algorithms		
Image Studio Lite	Li-Cor	N/A
ImageJ	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>	N/A
Other		
crRNA tool designer Chop-Chop	<a href="https://chopchop.cbu.uib.no/">https://chopchop.cbu.uib.no/</a>	N/A

**RESOURCE AVAILABILITY**

**Lead contact**

Further information and request for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Javier Jiménez ([jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es)).

**Materials availability**

All materials and reagents generated in this work are available from the lead contact upon request.

**Data and code availability**

- All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data is available from the lead contact upon request.

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

HEK293T (authenticated by ATCC cell authentication service by STR profile report. FTA barcode: STRA6311) and SH-SY5Y (purchased to Sigma Aldrich ref: 94030304-1v1. Lot number 14A035. Test number 51117) cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 1% glutamax (Biowest, Nuallé) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). All cells were grown in humidified air at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Mycoplasma contamination was monitored periodically.

**METHOD DETAILS**

**Cell lines transfection**

CaCl<sub>2</sub> method was used to transfect plasmids as follows: cell medium was changed 2 h before transfection. 0.75 µg of plasmid to be transfected was included in the following mix (final concentration): Tris -EDTA (3 mM and 0.3 mM respectively); 2.5 mM HEPES pH 7.3; 18.5 mM CaCl<sub>2</sub>; HeBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O). The solution was carefully added to the well, gently agitated to obtain homogeneous color, and incubated overnight at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> containing atmosphere.

Lipofectamine 2000 system was used to transfect siRNAs. The protocol was as indicated by the purchaser. In short, for each transfection, 100 µL of the transfecting mix was added to every well. Transfecting mix includes 12.5 pmol siRNA oligomer (25 nM final concentration) in 50 µL of culture medium without serum or penicillin-streptomycin and 50 µL of lipofectamine mix (0.5 µL of lipofectamine 2000 in 50 µL of culture medium without serum or antibiotics). Both components, previously kept at room temperature for 5 min, were mixed gently and incubated for 20 min at room temperature. Once the lipofectamine-siRNA was added to the cells, the plates were gently agitated and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> containing atmosphere for 24-48 h.

**Plasmids and recombinant proteins**

Plasmids are in the key resources table. HEK293T human cell line cDNA was used to amplify the different NUDIX genes. All of them were cloned into a pGEX6P1 vector (Cytiva ref: 28954648). Site-directed mutagenesis of Nudt3 was performed by PCR using oligonucleotides containing the desired change. Nudt5 was a present from Dr. M. Beato (CRG Barcelona). For expression of the recombinant proteins, pGEX6P1 NUDIX containing plasmids were transformed into BL21 DE3 cells (Bio-RAD). Purification was performed as indicated by the purchaser.

### Cell extracts, western blot, and Ponceau staining

Cell extracts and western blot were as described in (Gasa et al., 2017). For antibodies, see the key resources table. Detection was done with Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) and images were taken using the GeneSnap (Syngene) software. The density of the bands was analyzed using the Image Studio Lite (Li-Cor) software and Ponceau staining (Sigma-Aldrich) was used to normalize sample load.

### Small interfering RNA (siRNA)

HEK293T and SH 5YSY cells were seeded in 24-well plates at a density of 25,000 cells per well. Cells were transfected the following day with Nudt3A siRNA, Nudt3B siRNA (See key resources table), or scrambled (51-01-14-04, IDT) using Lipofectamine 2000 (12566014, Thermo Fisher Scientific).

### CRISPR Cas9

The pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 vector was obtained from Addgene (Cambridge, MA, USA; plasmid #62988). The Nudt3-specific RNA guides (see Nudt3guide1 and Nudt3guide2 in the key resources table) were selected using the design tool BENCHLING and purchased from IDT. The gRNA was cloned into pX459 as described elsewhere (Ran et al., 2013). HEK293T cells were transfected with 1  $\mu$ g of gRNA plasmid DNA (final concentration, 10  $\mu$ M) using FuGENE HD (Promega).

### Biological samples and endo-polyPase purification

The protocols for animal care and use were approved by the Clinical Research Ethics Committee of the University of Barcelona (Procedure Ref. 11113, Generalitat de Catalunya). All experimental animal procedures were carried out in strict accordance with European directive 2010/63/EU and Spanish legislation (BOE 252/34367-91, 2005) regulating animal research. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. Animals were housed according to a 12h/12h light/dark cycle (from 8am to 8pm) in a temperature- and humidity-controlled room, and were allowed free access to water and standard laboratory chow diet. Animals were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia and brain was quickly removed and processed.

Protein purification has been performed by the ICTS "NANBIOSIS," more specifically by the Protein Production Platform of CIBER in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BBN)/ IBB, at the UAB SePBioEs scientific-technical service. A Sprague Dawley male rat (weight 300 g) brain was obtained and homogenized. Proteins were extracted with 30 ml/gr of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 2% glycerol and protease inhibitors (1  $\mu$ g/ml pepstatin; 1  $\mu$ g/ml leupeptin; 1 mM benzamidin and 1 mM PMSF)) and were lysed with 1.4 mm ceramic beads (QIAGEN) in the FastPrep (FastPrep-24 from MP Biomedicals). All following steps were performed in the gel. The glass beads were removed by centrifugation at 2,000 rpm for 2 min. The supernatant was sonicated three times, 30 s with 1 min interval for cooling. The sonicate was centrifuged twice for 15 min at 12,000 rpm and the supernatant was applied to a ÄktaStart protein purification system 5 mL HiTrap Heparin HP affinity column (GE Healthcare Life Science) previously equilibrated with lysis buffer. The column was washed with a 1-bed volume of lysis buffer and eluted with sequentially bed volumes of a NaCl gradient (from 0-1.2 M). Fractions were concentrated with an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters of 10,000 MWCO (Merck) to a final volume of 0.5 ml. The fraction showing endo-polyPase activity (0.5 M NaCl), was added to a Äkta pure Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Science) previously equilibrated with buffer A (20mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 100 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 5 mM  $\text{ZnSO}_4$ ). Buffer A was used to collect 24 fractions of 1 ml. The fractions were concentrated with an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters of 10,000 MWCO (Merck) to a final volume of 0.5 ml. The endo-polyPase activity was obtained in fractions 18-19 corresponding to 15.5-23.5 kDa. The endo-polyPase activity for these fractions was assayed in a polyP-zymogram gel and bands were cut and processed for proteomic analysis.

### polyP-zymogram

The non-denaturing gels were 10% (37.5:1) acrylamide/bisacrylamide TBE gels (Tris-HCl 0.13 M /Boric acid 45 mM/ EDTA 2.5 mM pH 8.5). The running buffer was TBE containing 4 g/l commercial polyP<sub>100</sub> (kindly provided by T. Shiba from RegeneTiss). 100-200 ng of the protein sample were included in sample buffer (5X TBE, 7.3 mM sucrose, and bromophenol blue). Before running the sample, 5  $\mu$ g of commercial polyP<sub>100</sub> were loaded into the gel and 150 V were applied until the bromophenol blue entered around 2 cm into the gel. After this, the samples were loaded and kept under 150 V for 3 h. After the electrophoresis, the gel was incubated in reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM ammonium acetate, and 5 mM zinc sulfate) for 1 h at 37°C. Polyphosphate was visualized by DAPI staining of the gel; for this, DAPI (7.2  $\mu$ M) was added to the fixing solution, incubated for 1 h at room temperature. The destaining was done by washing the gel twice for 30 min using the fixing solution but without DAPI. Gels were visualized in a Synergy HT trans-illuminator from Biotek Instruments.

### PAGE-urea gels and polyP electrophoresis

Acrylamide gels (15%) containing 7 M urea (17 g urea, 8 mL of 5x TBE (54 g Tris-HCl pH 7.5; 27.5 g of boric acid; 20 mL of 0.5 M EDTA), 27 mL acrylamide/bisacrylamide solution (10:1), 200  $\mu$ l of ammonium persulfate (10% v/v), 16  $\mu$ l of TEMED and water to a volume of 50 ml) were cast in a Bio-Rad casting stand (20x20x0.1 cm). Samples containing the polyP to be analyzed were loaded onto the gel by adding 0.2 volumes of loading buffer 6x (TBE, 7.3 mM sucrose, and bromophenol blue). Gels were run for 4 h at 300 V. To visualize polyP, gels were incubated in fixing solution (25% (v/v) methanol and 5% (v/v) glycerol) with DAPI (10  $\mu$ g/ $\mu$ l)

for 1 h at room temperature. Gels were washed twice for 30 min in fixing solution without DAPI and visualized in a Synergy HT (BioTek Instruments) trans-illuminator.

#### Endo-polyPase activity quantification

25  $\mu\text{g}$  of rat brain extract or 100 ng of recombinant protein were added to a reaction mix containing 20 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM ammonium acetate, 5 mM  $\text{ZnSO}_4$ , and 5  $\mu\text{g}$  of polyP<sub>100</sub> (kindly provided by T. Shiba from RegeneTiss). The temperature was 37°C. The reaction was stopped by adding 0.2 volumes of loading buffer 6x (TBE, 7.3 mM sucrose, and bromophenol blue) and analyzed by PAGE-urea and DAPI staining.

Endo-polyPase activity (nmol/min · mg or  $\rho\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ) was calculated by measuring the line intensity of the DAPI staining using the software Image Studio Lite (Li-Cor). Intensities were compared to  $t = 0$  to establish the percentage of polyP degradation. Taking into account that the initial amount of polyP and enzyme are known, the amount of degraded polyP, the velocity of the reaction, and the specific activity can be estimated.

#### Malachite green exo-polyPase activity assay

Exo-polyPase activity assay was as in (Werner et al., 2005). Briefly, the sample to be analyzed was added to a reaction mix containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM ammonium acetate, and 5 mM magnesium acetate in a final volume of 100  $\mu\text{l}$ . Released phosphate was quantified by adding 86  $\mu\text{l}$  of 28 mM ammonium heptamolybdate in 2.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and 64  $\mu\text{l}$  of malachite green solution (0.015% malachite green, 0.1% acetic acid, and 0.17% glycerol). The solution was measured using a microplate spectrophotometer (Synergy HT, Bio Tek Instruments) at 600 nm and compared with phosphate standards (0–500  $\mu\text{M}$  Pi)

#### Inositol pyrophosphatase assay

Inositol pyrophosphatase activity was measured as in (Riley et al., 2018). Briefly, the sample was incubated in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM magnesium acetate, and 5  $\mu\text{g}$  of 5-InsP7 for 90 min at 37°C. Free Pi was quantified by malachite green.

#### Dinucleoside polyphosphatase activity

Dinucleoside polyphosphatase activity quantification was as in (Riley et al., 2018). Briefly, the sample was incubated in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5  $\mu\text{g}$  Ap5A (D4022: Sigma-Aldrich) for 90 min at 37°C, and then free Pi was quantified by malachite green.

#### Viability assays

For colony-forming assays, Nudt3 was silenced or overexpressed in HEK293T cells for 48 h, cells were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 1 h, trypsinized and 800 cells per well were seeded in a 6 well plate. After 7 days colonies were visible, fixed with 100% cold methanol, washed with PBS, and stained with 0.1% crystal violet for 30 min in the dark.

For MTT analysis, 4 days after transfection (for overexpression or silencing and treatment), cells were incubated with MTT solution (Sigma-Aldrich; M2128) for 1 h at 37°C. The resulting formazan crystals were dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 570 nm in a Synergy HT plate reader.

#### Polyphosphate tissue extraction

Rat brain polyP extraction was as in (Kumble and Kornberg 1995; Bru et al., 2016)). Briefly, the tissue was suspended in 2.5 volumes of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M urea, 0.1% SDS, and 10 mM EDTA) containing 0.25 M sucrose and homogenized using a Polytron for three 10 s pulses and 30 s ice-cooling in between pulses. The lysate was incubated with proteinase K (0.75 mg/ml; 2h at 37°C) and extracted with phenol/chloroform. The polyP was precipitated with barium acetate 0.1 M final concentration pH 4.5 for 4 h at 4°C. After centrifugation and solubilization, the sample was treated with DNase I and RNase A each at 0.35 mg/ml for 1h at 37°C. The sample was deproteinized by extracting with phenol/chloroform and chloroform.

#### Microscopy and polyP immunolocalization

For polyP immunolocalization, cells were fixed by incubation with 4% paraformaldehyde (v/v) for 15 min at 4°C. For blocking, cells were treated with a PBS solution containing 10% goat serum and 0.5% Tween20 for 1 h at room temperature. Cells were incubated with Xpress-tagged PPBD and anti-Xpress tag antibody (Life Technologies) at a ratio of 20:5 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 h at 4°C in blocking solution. The secondary antibody was (1:1000) Alexa 488 conjugated anti-mouse (Invitrogen) in blocking solution for 1 h in darkness and high humidity conditions. Finally, (1:1000) Hoechst 33342 (Sigma ref: 14530) was added for 5 min at room temperature. Samples were mounted using Fluoromount-G (Southern Biotech, ref: 0100-01). The microscope was a Leica confocal SP8. For polyP quantification, Fiji (ImageJ) software was used. ROIs were selected in the DAPI channel using the filter plugin Gaussian B. To ensure accurate ROIs and to create the mask, threshold, fill holes, and watershed plugins were applied. ROIs mask was overlaid on the polyP channel to obtain the integrated density of every nucleus. The average of polyP integrates density including all microscopy fields was calculated. The graphs represent the difference between the average in the control and the experiment.

### ATP measurement

Total cellular ATP content was measured using the ATP determination kit (Molecular Probes). Briefly, Nudt3 was silenced in HEK293T. After 24 h, 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  was added for the indicated times, cells were harvested, permeabilized with 0.1% saponin solution, and the supernatant was used to quantify the total cellular ATP using a microplate reader luminometer as indicated in the kit instructions. The luminometer reads were expressed in arbitrary units.

### Intracellular $\text{Zn}^{2+}$ measurement

As described in (Lee, 2018). Briefly, ZinPyr (from Sigma) was added to a final concentration of 25  $\mu\text{M}$  for 1 h at 37°C. Cells were fixed adding 4% p-formaldehyde and fluorescence was recorded (excitation 485 nm; emission 595 nm) in a Leica SP8 confocal microscope.

### Zebrafish maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained as previously described (Westerfield et al., 1999) at the aquatic facility of the Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Injections were performed on Ab/Tübingen strain. The sex of zebrafish embryos cannot be assessed.

### crRNA design

crRNAs were designed using the online tool Chop-Chop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) and according to the guidelines from (Wu et al., 2018). As controls, 4 crRNAs that do not target the zebrafish genome were chosen, called *scrambled*. The sequences are in Table S1 named crNudt3a crNudt3b and crScramble.

### Ribonucleoprotein complex (Cas9+gRNA) microinjection for F0 knock-out

As described in (Hoshijima et al., 2019). Briefly, target-specific crRNA (36 nucleotides) and common tracrRNA (67 nucleotides) were diluted separately in RNase free TE buffer 1X pH 7.5 to a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Stocks were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Equal volumes of crRNA and tracrRNA were added and diluted in IDT Nuclease Free Duplex Buffer to a final concentration of 28  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). The mix was heated at 95°C for 5 min, and then slowly cooled down to room temperature, forming the duplex gRNA (crRNA+tracrRNA). The process was repeated independently for every crRNA. The duplex gRNAs were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Up to 4 different duplex gRNAs were mixed at equal concentrations in RNase free water, to a final concentration of total duplex gRNAs of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (250 ng/ $\mu\text{l}$  (7.13  $\mu\text{M}$ ) of each duplex gRNA if 4 different duplex gRNAs were to be added). PNABio Cas9 (Ref#CP01) protein or S.p. Cas9 Nuclease V3 (Ref# 1081058) protein was added to a final concentration of 300 ng/ $\mu\text{l}$  (1.84  $\mu\text{M}$ ). The mix (Cas9 + duplex gRNAs + water) was heated at 37°C for 10 min and cooled to room temperature to facilitate the formation of the ribonucleoprotein (RNP) complex. Embryos were injected with 1-2 nL of RNP mix at the 1-cell stage into the cell. Embryos received 1-2 ng of total duplex gRNAs and 300-600 pg Cas9.

### Zebrafish Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from embryos by alkaline lysis or a commercial kit. For the former, single embryos were placed in 1.5 mL Eppendorf tubes containing 15-50  $\mu\text{l}$  NaOH 5 mM and heated at 95°C 10 min. After that, the tubes were cooled to 4°C. Following, 1/10<sup>th</sup> of Tris-HCl 1 M pH 8 was added. The mixture was vortexed and centrifuged to pellet debris. From the supernatant, 1-5  $\mu\text{l}$  was taken to do the PCR. 1-5  $\mu\text{l}$  of the PCR was loaded in a 3% agarose gel. Alternatively, we used an XNAT2 Extract-N-Amp Tissue PCR kit. Here, single embryos were placed in 1.5 mL Eppendorf tubes. 10  $\mu\text{l}$  of extraction buffer plus 2.5  $\mu\text{l}$  of tissue preparation was added per tube. Tubes were vortexed and spun down. Tubes were incubated for 10 min at 55°C, then 3 min at 95°C. 10  $\mu\text{l}$  of neutralization buffer was added per tube. After vortexing and spinning, samples were used for PCR, taking 1-5  $\mu\text{l}$  as a template.

### Zebrafish amplification of fragments

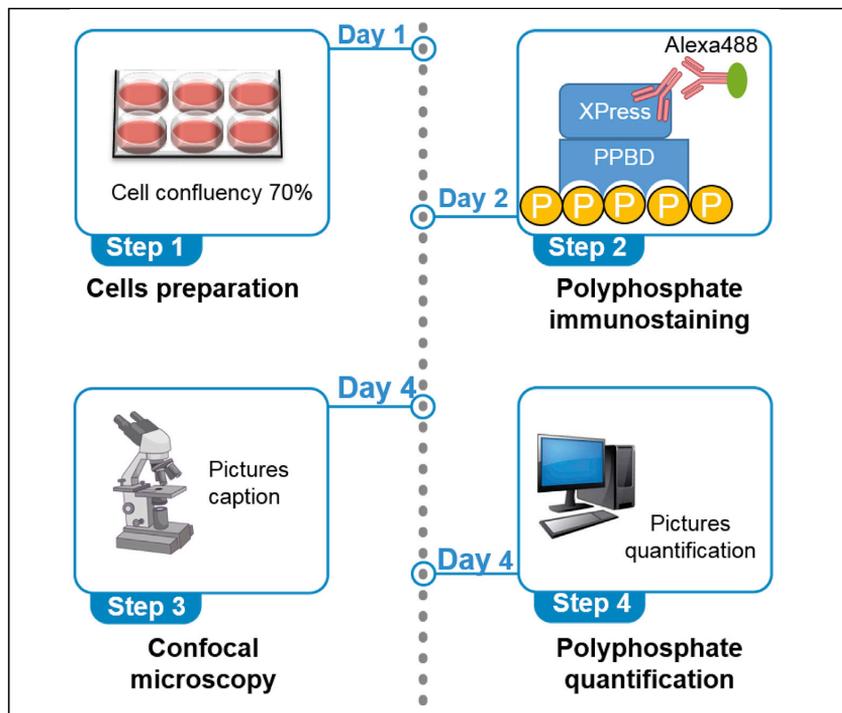
Genome sequences containing CRISPR/Cas9 target sites were amplified with pairs of primers listed in Table S1 (named CRISPRNudt3a and CRISPRNudt3b). All fragments ranged from 200 to 280 bp. For proper sequencing, Cas9 targeting sites were, at least, 80 bp away from the primer.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

In endo-polyPase activity experiments, a minimum of three independent experiments were included (particular n values for every experiment can be found in the figure legends), data are represented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. In Nudt3 activity experiments over the different substrates, ANOVA was used. *p-values*: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . In the microscopy experiments, a minimum of 5 fields with 30-100 cells in each were analyzed. Particular n values for every experiment can be found in the corresponding figure legend. Mann-Whitney was used. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism.

## Protocol

# Protocol to quantify polyphosphate in human cell lines using a tagged PPBD peptide



Polyphosphate (polyP) is an evolutionarily conserved polymer of phosphates that is difficult to study in human cells because of its low concentration and high lability. First, we described how to express and purify Xpress-tagged PPBD (P<sub>ppx1</sub> PolyP Binding Domain). We describe the detection and quantification of nuclear polyP in HEK293T cells using Xpress-PPBD, Xpress antibody and Alexa conjugated secondary antibodies. We have also used this protocol in SH-SY5Y HeLa and HEK293 cells.

Javier Jiménez,  
Blanca Lázaro, Ana  
Sarrias, Francisco J.  
Tadeo, Marta Pérez-  
Montero, Josep  
Clotet, Samuel Bru

jjimenez@uic.es (J.J.)  
sbru@uic.es (S.B.)

### Highlights

*E. coli* PPBD peptide to localize polyP in human cells cultures

PPBD purification and storage is a critical step for polyP staining

Detection of nuclear polyP fraction that can be degraded by the endopolyPase Nudt3

Quantification of relative polyP amounts using a free image analysis software

Jiménez et al., STAR Protocols  
3, 101363  
June 17, 2022 © 2022 The  
Author(s).  
[https://doi.org/10.1016/  
j.xpro.2022.101363](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101363)

## Protocol

## Protocol to quantify polyphosphate in human cell lines using a tagged PPBD peptide

Javier Jiménez,<sup>1,3,\*</sup> Blanca Lázaro,<sup>1</sup> Ana Sarrias,<sup>1</sup> Francisco J. Tadeo,<sup>1</sup> Marta Pérez-Montero,<sup>1</sup> Josep Clotet,<sup>1</sup> and Samuel Bru<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Basic Sciences Department, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Technical contact

<sup>3</sup>Lead contact

\*Correspondence: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es) (J.J.), [sbru@uic.es](mailto:sbru@uic.es) (S.B.)

<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101363>

## SUMMARY

Polyphosphate (polyP) is an evolutionarily conserved polymer of phosphates that is difficult to study in human cells because of its low concentration and high lability. First, we described how to express and purify Xpress-tagged PPBD (Ppx1 PolyP Binding Domain). We describe the detection and quantification of nuclear polyP in HEK293T cells using Xpress-PPBD, Xpress antibody, and Alexa-conjugated secondary antibodies. We have also used this protocol in SH-SY5Y HeLa and HEK293 cells.

For complete details on the use and execution of this protocol, please refer to Samper-Martín et al. (2021).

## BEFORE YOU BEGIN

This protocol describes the steps for obtaining the PPBD peptide (able to bind polyP (Saito et al., 2005)), immunodetecting and quantifying nuclear polyP in HEK293T cells. However, we have also successfully used it in the SH-SY5Y (a brain cell line), HeLa, A549 (lung carcinoma cell line) and HEK293 cell lines. Here we describe details for growing and preparing the cells for polyP detection. We present critical aspects for fixing and permeabilizing the cells. Finally, we describe a method for quantifying the polyP content. Before beginning, it is important to have the recombinant tagged PPBD peptide purified and ready to use (see below).

## Xpress-tagged PPBD peptide cloning, expression, and purification

⌚ Timing: 4 days not including the cloning

1. PCR amplification of *E. coli* Ppx1 PPBD domain (from residue 306–534) using the oligonucleotides in the [key resources table](#).
2. Cloning PPBD in the pRSET-A expression vector (which includes the 6×His tag for purification and XPress tag). pRSET-A was *Bam*HI-digested and PPBD fragment was cloned using In-Fusion HD Cloning kit. The construct was checked by restriction mapping and sequencing.
3. 6×His-Xpress-PPBD expression and purification:
  - a. Transform into BL21 (DE3) pLysS *E. coli* competent cells.
  - b. Grow a transformant colony in 50 mL of LB supplemented with ampicillin (50 µg/mL) and chloramphenicol (25 mg/mL) for 16 h at 37°C with agitation.
  - c. Add the 50 mL grown culture into 500 mL of fresh LB medium containing the antibiotics as above. Incubate for 2 h at 37°C with agitation.



- d. Add 0.5 mL of 1 M IPTG and incubate for 6 h at 25°C in agitation.
- e. Centrifuge the cells at 3300 rcf for 15 min at 4°C. Remove the supernatant.

▮ **Pause point:** pellet can be stored at –80°C for several weeks.

4. Purification of 6×His-Xpress-PPBD:

- a. Resuspend the cells in the pellet by adding 40 mL of cold lysis buffer (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM β-mercaptoethanol, 10 mM imidazole, lysozyme (0.4 mg/mL), 50 Units of benzonase and the protease inhibitors: 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), leupeptin (1 μg/mL), pepstatin (1 μg/mL), and 1 mM benzamidine.

△ **CRITICAL:** Lysozyme and benzonase must be added fresh.

- b. Incubate for 15 min at 4°C with gentle agitation. Note that the solution gets less dense and close to transparent.
- c. Sonicate once for 30sec at 30 kHz (Dr. Hielscher, UP 50H).
- d. Centrifuge at 3300 rcf for 10 min at 4°C.
- e. Keep the supernatant and centrifuge at 3300 rcf for 10 min at 4°C. Note that after this second centrifugation the pellet should be very small.
- f. Pipette out the supernatant in a separate tube and dilute it to a final concentration of 2 mg/mL of total protein according to a Bradford quantification.
- g. Purify 6×His-Xpress-PPBD peptide by using a HisTrap HP 5 mL affinity column in an ÄKTA™ start protein purification system. Conditions can be found in the [materials and equipment](#) section.
- h. Collect 5 mL from the elution step containing the highest amount of imidazole and inject (1 mL per injection) into an ÄKTA HiTrap™ 5 mL desalting column. Desalting buffer was 50 mM Tris-HCl pH 9.
- i. Collect 1 mL aliquot from the fractions 2 and 3 in tubes containing 100 μL glycerol. Repeat in all (five) desalting injections.

△ **CRITICAL:** Proceed rapidly to avoid PPBD precipitation.

- j. Concentrate the pooled ÄKTA eluted fractions using Amicon 10 KDa columns until obtaining a volume of 1 mL (around ten folds).
- k. Add glycerol until a final concentration of 50% (v/v) and store at –20°C for several months.

△ **CRITICAL:** Different PPBD storage conditions were tested and we chose the one described above.

**Note:** PPBD concentration and purity can be checked by PAGE and coomassie staining. 6×His-Xpress-PPBD has a Mw 25kDa.

### Thawing the cells

⌚ **Timing:** 3 days

Cells are stored in liquid nitrogen tanks (culture medium containing DMSO 10% (v/v)).

5. Thaw the cells:

- a. Take the vial from the N<sub>2</sub> tank and thaw in a 37°C water bath. Add to a tube containing 5 mL of pre-warm DMEM supplemented with 10% FBS, 1% glutamax and 1% penicillin/streptomycin (complete DMEM).

- b. Centrifuge at 300 rcf for 3 min. Take the pellet and suspend it in 1 mL of complete DMEM medium.
- c. Add 24 mL of fresh complete DMEM medium into a T175 flask.
- d. Inoculate 1 mL of the recent thaw cells and incubate at 37°C in a cell culture incubator containing CO<sub>2</sub> 5%.

△ **CRITICAL:** Cell viability decreases importantly after the thaw when DMSO is present. Proceed rapidly after the thaw.

6. Grow the cells:
  - a. After 3 days, and 80%–90% confluence, wash once with 5–10 mL of pre-warmed PBS.
  - b. Add 1.5 mL of commercial trypsin solution for 3 min at 37°C in the cell culture incubator.
  - c. Harvest the cells by adding 9 mL of fresh culture medium. Put them into a 15 mL tube.
  - d. Centrifuge at 300 rcf for 3 min.
  - e. Suspend the cells in 5 mL of fresh medium. Take 10% of the cells and seed them in a T75 flask containing 14.5 mL of fresh medium. Incubate at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a cell culture incubator.

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse monoclonal anti-Xpress	Life Technologies	Cat#46-0528; RRID: AB_2556552
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti mouse	Invitrogen	Cat#A11001; RRID: AB_2534069
Alexa Fluor 633 conjugated goat anti mouse	Invitrogen	Cat # A-21052; RRID: AB_2535719
<b>Bacterial and virus strains</b>		
<i>E. coli</i> DL21 DE3 pLysS	Bio-Rad	Cat#1563003
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
PBS 10x	Sigma-Aldrich	Cat# MFCD00131855
Goat serum	Sigma-Aldrich	Cat#G9023
DMEM	Sigma-Aldrich	Cat#D5671
FBS-12A	Quimigen	Cat# FBS-12A
Glutamax	Biowest	Cat#x0551
Trypsin solution	Thermo Fisher Scientific	Cat#25200072
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	Cat#P0781
L-Lysine solution	Sigma-Aldrich	Cat#P4707
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Cat#14530
Immersion oil	Leica Microsystems	Cat#195371-10-9
Fluoromount-G	SouthernBiotech	Cat#0100-01
Benzonase	Merck	Cat#103773
Protease inhibitors	Thermo Fisher Scientific	Cat#A32955
<b>Critical commercial assays</b>		
In-Fusion HD Cloning kit	Takara Bio	Cat#638920
<b>Cell lines</b>		
HEK293T	ATCC authenticated	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
5'GATAAGGATCGATGGGGATCCA TGGAAGGACGTTTCCGTC	Integrated DNA Technologies	Forward
5'GCAGATCTCGAGCTCGGATC CTTAAGCGGCGATTTC	Integrated DNA Technologies	Reverse
<b>Software and algorithms</b>		
Fiji ImageJ 1.53c	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>	Schindelin et al. (2012)
<b>Other</b>		
HisTrap HP affinity column	Cytiva	Cat#17524802

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
ÅKTA HITrap™ 5 mL desalting column	Cytiva	Cat#17140801
pRSET-A	Thermo Fisher Scientific	Cat#V35120
Leica SP8 confocal microscope	Leica Microsystems	N/A
Round 12 mm coverslips	Thermo Scientific	Cat#15820692

**MATERIALS AND EQUIPMENT**

**ÅKTA buffers and conditions**

Reagent	Final concentration	Amount
ÅKTA buffer	(25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol)	1 mL
Wash buffer	ÅKTA buffer supplemented with 20 mM imidazole	3 times the column volume
Elution buffer (3 buffers differing in the progressive increase in the imidazole concentration)	ÅKTA buffer supplemented with 50, 200, and 500 mM imidazole	Once with each . 2 column volumes each
Column Flow		1 mL/min

△ **CRITICAL:** We tried in batch purification of PPBD; for unknown reasons, we consistently obtained a staining pattern not reflecting polyP and based on a homogeneously distributed signal of tiny dots very different to the irregularly distributed pattern of several sizes dots presented in [Figure 1](#) and [Samper-Martin et al. \(2021\)](#).

**STEP-BY-STEP METHOD DETAILS**

**Step 1: Preparing the cells**

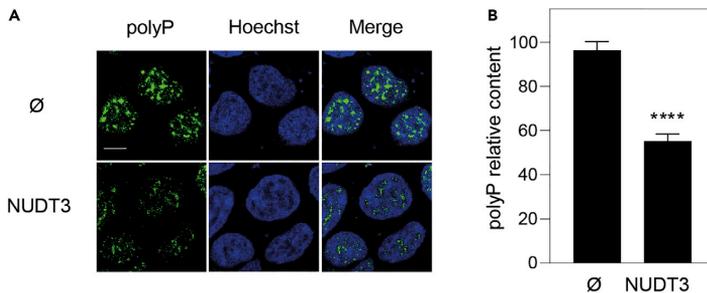
⌚ **Timing:** 1.5 h

This section includes the steps for culturing the cells on the coverslips and preparing them for immunostaining.

1. Coverslips preparation:
  - a. Put 12 mm diameter coverslips in P24 culture plate wells.
  - b. Add 90 μL of commercial poly-L-Lysine solution for 1 h (as a tip to save time, during this step, step 2 might be conducted in parallel).
  - c. Wash three times using PBS.
2. Cells trypsinization:
  - a. Take the culture medium carefully from the flask.
  - b. Wash once using pre-warmed 5–10 mL PBS.
  - c. Add 1 mL of trypsin and incubate for 3 min at the cell culture incubator.
  - d. Add 4 mL of pre-warm fresh culture medium and harvest the cells. Eliminate the trypsin by centrifugation 300 × g for 3 min and suspend the cells in pre-warm fresh medium.

△ **CRITICAL:** Cells must be carefully and thoroughly suspended before counting and seeding. Clumped cells will make the ulterior fluorescence analysis very difficult.

3. Cells adhesion on the coverslip.
  - a. Seed  $8 \times 10^4$  cell/mL in the P24 plate from step 1. Spread the cells by performing round movements assuring a homogeneous cell distribution on the coverslip.



**Figure 1. Immunolocalization of nuclear polyP using PPBD**

HEK293T cells transfected with pWPI empty vector (Ø) or with pWPI-NUDT3; plasmid overexpressing the polyP endopolyphosphatase (hydrolase) NUDT3 (NUDT3) for 72 h. The cells were grown and treated as described in this protocol.

(A) Representative fluorescence confocal images of the above cells after being subjected to the polyP immunolocalization protocol presented in this article. Note that in this particular experiment where Nudt3 polyPase is overexpressed by transfecting cells with pWPI which contains the GFP gene as a transfection marker, the secondary antibody for the polyP immunolocalization was conjugated with Alexa 633 instead. The bar is for 10 nm.

(B) Quantification of the polyP content as described here. Mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. A minimum of 300 cells per experiment were analyzed. Mann-Whitney test was applied,  $p < 0.0001$ .

b. Incubate for 24 h in the cell incubator until reaching at 60%–70% confluency.

**△ CRITICAL:** It is essential not to go further than 70% confluence. Seeded amount will vary depending on the cell line and the experiment.

#### 4. Cells fixation:

- Aspirate the culture medium carefully.
- Add 0.5 mL of p-formaldehyde 4% (v/v).
- Incubate for 15 min at 4°C.
- Wash three times using 0.5 mL of PBS.

**▮▮ Pause point:** Coverslip containing fixed cells can be stored in PBS at 4°C for no more than a week or move forward with the immunostaining.

### Step 2: Polyphosphate immunostaining

**⌚ Timing:** 20 h

This section describes the immunostaining method for polyP detection using Xpress tagged PPBD, its visualization by confocal microscopy and further quantification.

#### 5. Blocking and immunostaining:

- Blocking: Incubate the coverslip containing the cells for 1 h without shaking in 0.5 mL of blocking buffer (PBS containing goat serum 2.5% (v/v) and Tween20 0.5% (v/v)).
- PPBD and anti-Xpress antibody pre-incubation: mix anti Xpress antibody (5  $\mu$ g/mL final concentration) and recombinant 6 $\times$ His-Xpress-PPBD (20  $\mu$ g/mL final concentration) in blocking buffer and incubate them for 1 h at 4°C in a rotating shaker.
- Remove the blocking solution and add 250  $\mu$ L of the above PPBD and Xpress antibody mix. Incubate for 16 h at 4°C.
- Wash three times for 5 min using 0.5 mL of PBS at 20°C with gentle agitation.

- e. Incubate with 0.5 mL of the Alexa Fluor 488 or 633 secondary antibody (1:1000) in blocking solution for 1 h at 20°C in gentle agitation.
- f. Wash three times for 5 min using 0.5 mL of PBS at 20°C in gentle agitation.
- g. Hoechst staining. Add 0.5 mL of Hoechst (final concentration 1 µg/mL) in PBS for 5 min at 20°C in gentle agitation.
- h. Wash three times for 5 min using 0.5 mL of PBS at 20°C in gentle agitation.
- i. Put the coverslip upside down a slide using a drop of mounting solution. Keep them protected from light.

**Note:** The mounting solution Fluoromount-G takes 1 h to get dry at 20°C.

### Step 3: Confocal microscopy

This section includes the microscope configuration and image acquisition. We used a Leica DMI8 microscope with TCS SP8 confocal module equipped with a Leica 63× 1.4NA HC Apo CS2 immersion oil objective. Hoechst was excited using the 405 nm laser channel. Alexa Fluor 488 or 633 were excited using its correspondent laser channel. Channel was set by using Leica Application Suite X (LASX) Acquisition software. The images were obtained by the sequential scanning named “between frames” at 400 Hz. Pixel size was 240.5 × 240.5 nm; image size was 246.03 × 246.03 µm; zoom was set at 0.75. The initial microscope settings were: pinhole 1 UA (for both excitation wavelengths), laser energy power was between 0.5 al 2%, the gain was between 700 and 900, and the offset between -10 and -20. Emission was collected using a Leica PMT detector with collection windows of 408–475 nm (405 channel), 498–550 nm (488 channel) and 648–800 nm (638 channel). These settings must be fine-tuned to obtain optimal images.

**△ CRITICAL:** 1. Keep the laser energy and/or the PMT gain below the maximum rendering photobleaching. 2. Take a minimum of 10 shots for every condition in three independent experiments. 3. Save the pictures in .LIF format to be open using LAS X or ImageJ Fiji. Pictures can be saved to other formats such as tiff for ulterior analysis.

### Step 4: Polyphosphate quantification

We used the free available software Fiji ImageJ 1.53c. As a summary, to quantify the polyP signal intensity we used the blue channel (Hoechst) to identify the nuclei and define the “regions of interest” (ROIs). These ROIs were the areas where polyP signal was quantified.

6. LIF file generation:
  - a. Go to the ImageJ toolbar: file>open>file name>open.
  - b. The window “Bio-Formats Import options” pops up; select the following options:
    - i. Dataset organization>open all series.
    - ii. Color options>color mode>colorized.
    - iii. Split into separate windows>Split channels.
  - c. Click OK to get images from the different fluorescence channels. In this case, the blue channel is for Hoechst and green for polyP.
7. ROIs selection:
  - a. Select the Hoechst channel.
  - b. Process>filters>Gaussian blur. Establish a value of 2 at “sigma (Radius)”. Click OK.
  - c. Image>adjust>threshold. Select “dark background”>default>over/under. Select the auto setting or manually move the sliders until all nuclei are delimited.
  - d. Click “apply” to obtain a binary mask.
  - e. Process>binary>fill holes.
  - f. Process>binary>watershed.
  - g. Analyze>analyze particles. Click OK to get the ROIs.

**Note:** To avoid the selection of undesired ROIs, the size of the ROI can be selected or modified to get a better automatic selection. Go to Analyze particles>size (micron<sup>2</sup>). To help in a more precise selection go to Clear results>add to manager>exclude on edges.

- h. Opening "ROI manager" all the ROIs generated according to the selected parameters can be checked.
- i. Signal quantification:
- j. To eliminate unspecific signal apply a threshold (cut off around 50 in 8 bits images). Select the green (polyP) channel>image>adjust>threshold.
- k. Select "dark background">default>over/under. Adjust the sliders manually until the unspecific signal disappear.

△ **CRITICAL:** To avoid alterations in the quantification, once the threshold has been established, DO NOT click on "apply".

△ **CRITICAL:** To compare the signal intensity among different quantifications (pictures, conditions, etc.).

The threshold values must be the same.

- l. Select "ROI manager". Click on "show all" to overlay the ROIs over the image to be quantified.
- m. Analyze>set measurements. Select at least "integrated density (intDent)" and "limit to threshold". Click on "measure".
- n. A new window pops up showing a table containing the results. "intDent" is the parameter used to measure the fluorescence intensity.
- o. For statistical significance, at least 400 cells in each of 3 independent experiments should be analyzed.

We recommend the analysis of 3 independent experiments containing a minimum of 5 fields with 30–100 cells in each. For statistical significance analysis, we applied Mann-Whitney test using GraphPad Prism software.

## EXPECTED OUTCOMES

This protocol is for nuclear polyP staining which appears as a punctuated pattern distributed throughout the nucleus. Interestingly the intensity of the signal reduces when the endopolyPase Nudt3 is overproduced using transfected cells with the pWPI-NUDT3 plasmid (Figure 1) indicating specificity for the signal detected. For more details, see (Samper-Martin et al., 2021).

## LIMITATIONS

Cell fixation and permeabilization conditions used permit nuclear polyP visualization mainly. Polyphosphate in other places could be elusive to this method.

This protocol is for cell lines growing in flat two dimension cultures that is not how cells are in tissues or organs.

Polyphosphate quantification is by image analysis; in consequence, only polyP relative amounts can be obtained.

## TROUBLESHOOTING

### Problem 1

At the before you begin section and regarding the recombinant PPBD purification. The *E. coli* suspension remains turbid before sonication and after lysis buffer addition.

**Potential solution**

Add benzonase and lysozyme again and an extra sonication cycle.

**Problem 2**

At the before you begin section and regarding the recombinant PPBD purification. Äkta eluted aliquots; both in the affinity of desalting process, get a milky aspect or have some degree of precipitation.

**Potential solution**

Purify PPBD again after regenerating the column by stripping all accumulated impurities (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.4) following the steps described by the provider.

**Problem 3**

At the before you begin section and regarding the recombinant PPBD purification. The amount of PPBD recovered after the purification consecutively reduces.

**Potential solution**

Regenerate the column by stripping all accumulated impurities (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.4) following the steps described by the provider. The column should be cleaned every 5–6 uses.

**Problem 4**

At steps 2 and 3. Nuclear dotted pattern homogeneously distributed in the immunostaining.

**Potential solution**

PPBD is not working properly; purify it again. In our hands, PPBD stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  lasts no more than 2 months.

**Problem 5**

At steps 2 and 3. Nuclear and cytoplasmic background signal in the immunostaining including enormous randomly distributed stains.

**Potential solution**

Centrifuge the secondary antibody and keep the supernatant.

**RESOURCE AVAILABILITY****Lead contact**

Further information and requests for resources should be directed to the lead contact, Javier Jiménez: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es).

**Materials availability**

All materials are available upon request to the lead contact, Javier Jiménez: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es).

**Data and code availability**

This study did not generate datasets or code.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by and is part of the I+D+i grant ref. PGC2018-096597-B-I00 (to J.J. and J.C.) by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN). We want to thank our collaborators in this project: Adolfo Saiardi, Henning J. Jessen, Berta Alsina, and Stephen J. Kron.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.B. set up most of the protocol. M.P. helped with the image acquisition. A.S., B.L., and F.T. helped in particular parts of the protocol. S.B., J.C., and J.J. conceptualized, supervised, and wrote the original draft.

### DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

### REFERENCES

- Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., and Saito, M. (2005). Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 5692–5701. <https://doi.org/10.1128/aem.71.10.5692-5701.2005>.
- Samper-Martín, B., Sarrias, A., Lázaro, B., Pérez-Montero, M., Rodríguez-Rodríguez, R., Ribeiro, M.P.C., Bañón, A., Wolgeher, D., Jessen, H.J., Alsina, B., et al. (2021). Polyphosphate degradation by Nudt3-Zn2+ mediates oxidative stress response. *Cell Rep.* *37*, 110004. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110004>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

