



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE UNA LIBRERÍA BINARIA DE
MUTANTES DE NPR**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

L.C.G. VITO ADRIÁN CANTÚ ALESSIO ROBLES

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. FRANCISCO XAVIER SOBERON MAINERO
Instituto de Biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dr. RUBEN PAUL GAYTAN COLIN
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. GILLERMO GOSSET LAGARDA
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Integrantes de jurado de examen

Presidente

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario

Dr. Mrcela Ayala Aceves

Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal

Dr. Nina Pastor Colón

Facultad de ciencias, UAEM

Vocal

Dr. Gabriel Del Rio Guerra

Instituto de fisiología celular, UNAM

Vocal

Dr. Enrique Merino Perez

Instituto de Biotecnología, UNAM

Este trabajo esta dedicado a:

Mis jefes (Padres)

Yina

Mi Hermano

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Xavier Soberon Mainero ubicado en el Instituto de Biotecnología, campus Morelos de la Universidad Nacional Autónoma de México con recursos aportados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Mi sincero agradecimiento al Dr. Xavier Soberon por asesorarme a lo largo de estos años y darme el espacio y la libertad de elegir mi camino.

Agradezco también Flores, Fily y Joel por formarme en las obscuras y misteriosas artes de la biología molecular. A Gloria Saab, por mantener al consorcio SOS (¡vaya nombre!) unido en las buenas y en las malas.

A los Doctores Paul Gaytan, Guillermo Gosset, Nina Pastor, Marcela Ayala, Enrique Merino, Gabriel Del Río y Lorenzo Segovia por su dedicación al leer y criticar mi trabajo. Sus opiniones y observaciones enriquecieron mucho este trabajo (y evitaron una serie de penosas faltas ortográficas)

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Tatiana por ser una muy decente compañera de mesa. A mis compañeros de generación de la maestría.

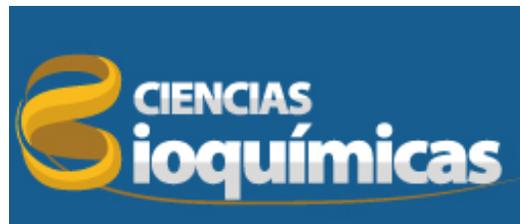
A Yina por escucharme y sacarme a pasear cuando la mi frustración aumentaba.

A Patrick, Leo, Ana y Ronan por su amistad.

A los miembros de la unidad de docencia: Rudiño, Jalil, Toño y Gloria.



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



CONACyT

Índice de contenido

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Represión catabólica del carbono.....	3
El sistema PTS.....	4
Enzima 1.....	5
HPr.....	6
Complejos EII.....	6
Organización del PTS.....	7
Regulación del metabolismo del carbono.....	10
Regulación de la transcripción por Crp/cAMP.....	11
Regulación de cyaA y transcripción de crp.....	12
El sistema PTS nitrógeno.....	13
Conexión entre el metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno.....	15
ANTECEDENTES.....	17
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
Construcción de librería binaria.....	25
Construcción de la librería.....	25
Oligonucleótidos mutagénicos.....	26
Plásmido PZE12-TrpF-Luxp.....	27
Probar construcción.....	28
Transformación de la librería.....	29
Selecciones y plásmidos.....	30
Aclimatar cultivos.....	30
Secuenciación Sanger.....	31
Resumen de secuencias.....	32
DISEÑO MODELADO COMPUTACIONAL.....	33
RESULTADOS.....	35
Comparación entre PJET y la hipótesis nula.....	35
Efecto del tamaño de muestra en la inferencia estadística.....	36
Comparación entre PJET y LB.....	37
Comparación entre LB y MTL.....	38
MODELO.....	39
CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS.....	41
Metodología secuenciación masiva.....	42
MÉTODOS.....	45
Cepas.....	45
Medios.....	45
LB.....	45
M9.....	45
Sales m9(5X).....	46
Medio mínimo M9.....	46

SOC.....	46
GYT.....	47
Otros.....	47
Oligonucleótidos split resin.....	47
Armado de la librería.....	48
Plásmido PZE12-TrpF-LoxP.....	49
Purificar plásmido PZE12.....	51
Digerir.....	53
Ligar.....	53
Verificar librería.....	54
Transformar.....	54
Oligonucleótidos secuenciación masiva.....	55
Platear cajas en medio sólido.....	56
Seleccionar y extraer plásmido de 96 cepas.....	56
Secuenciar.....	56
PCR de cultivo.....	56
Estadística.....	57
Secuencias.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

Índice de tablas

Tabla 1: Constantes de equilibrio del PTS _{glc}	9
Tabla 2: Resumen de secuencias.....	32
Tabla 3: Comparación entre secuencias en pJET y la hipótesis nula.....	35
Tabla 4: Comparación entre pJET y LB.....	38
Tabla 5: Comparación entre LB y MTL.....	39
Tabla 6: Modelo del aporte de cada mutación a la actividad HPr.....	40
Tabla 7: Funciones binarias.....	43
Tabla 8: Oligonucleótidos para armar la librería.....	48
Tabla 9: Oligonucleótidos forward con tag.....	55
Tabla 10: Oligonucleótidos reverse con tag.....	56

Índice figuras

Figura 1: Organización de distintos sistemas PTS en E. coli (105).....	5
Figura 2: Organización del operón rpoN en distintos organismos.....	14
Figura 3: Alineamiento múltiple entre HPr, CPr y NPr.....	17
Figura 4: Perfiles de crecimiento.....	18
Figura 5: Interfaz HPr:EIIMtl.....	18
Figura 6: Reconstrucción de interacciones proteína-proteína por docking molecular.....	20
Figura 7: Comparación en la actividad de las permeasas de glucosa y manosa.....	21
Figura 8: Diagrama de flujo del diseño experimental.....	24
Figura 9: Distribución de los ocho oligonucleótidos que usaron para ensamblar la librería binaria.....	25
Figura 10: Gel del plásmido TrpF-LuxP.....	27

Figura 11: El plásmido pJET.....	28
Figura 12: Variantes del plásmido pJET.....	29
Figura 13: Secuencias de variantes crecidas en MM/manitol.....	30
Figura 14: Secuencias de variantes crecidas en LB.....	31
Figura 15: Diseño modelado computacional.....	33
Figura 16: Efecto del tamaño de muestra en la inferencia estadística.....	36
Figura 17: Regiones variables de la librería binaria.....	43
Figura 18: Producto de PCR de los oligonucleótidos con etiquetas.....	44
Figura 19: Digestión de PZE12-TrpF-LuxP.....	51
Figura 20: Purificación de las bandas B y M.....	51

RESUMEN

NPr y HPr son proteínas parálogas que participan en los sistemas de transferencia de fosfato PTS y PTS^{Ntr} respectivamente. El sistema PTS cataliza simultáneamente la entrada a la célula y la transformación a fosfoéster de un amplio número de carbohidratos mientras que el sistema PTS^{Ntr} está implicado en la regulación del metabolismo del nitrógeno. A pesar de la similitud entre los componentes de ambos sistemas se ha observado muy poca reacción cruzada entre ellos. En el artículo adjunto se describe cómo el cambiar catorce aminoácidos de la superficie de NPr por los correspondientes en HPr le provee a esta NPr quimérica (llamada CPr) la habilidad de interactuar y transferir fosfatos a diversas permeasas de carbohidratos (EIIAs) ; actividad normalmente llevada a cabo por HPr. Adicionalmente se produjeron otras dos variantes: CPr6 con las primeras seis mutaciones y CPr8 con las últimas ocho. CPr6 fue capaz de fosforilar sólo algunas de las EIIA que fosforila CPr. CPr8 no mostró actividad.

El trabajo presentado en esta tesis pretende elucidar el aporte de cada una de estas catorce mutaciones a la interacción con diversas EIIA caracterizando una librería que contenga todas las variantes con una de estas catorce mutaciones, todas las variantes con dos, todas las variantes con tres etc... Esta librería se sintetizó usando el método de separación de resina que es capaz de introducir variación en un gen a nivel de codón. Es decir, para cada una de estas catorce posiciones existen solo dos posibles codones: mutante (el de HPr) o silvestre (el de NPr). Esta librería, denominada binaria, tiene $2^{14}=16384$ variantes.

La librería binaria se clonó, transformó y creció en LB (control), MM/Mnt (medio mínimo más manitol), MM/Man (MM más manosa) , MM/Dul(MM más dulcitol), MM/Sbt(MM más sorbitol) y

MM/Glc(MM más glucosa). Se secuenciaron variantes de cada medio. Solo se contaron con suficientes secuencias MM/Mtl para realizar un análisis estadístico que propone la mutación L13N como perjudicial a la actividad y la mutación A51K como benéfica. La falta de la mutación A51K podría explicar porque CPr6 no crece en manitol como fuente de carbono.

Ya que el reducido tamaño de muestra nos impide formular más conclusiones, se calculó *in silico* la energía de interacción de cada una de las 16384 variantes con cada una de las tres estructuras conocidas de EIIA (manosa, manitol y glucosa). El análisis de estas energías produce un modelo integral del aporte de cada de estas mutaciones a la actividad en estas tres fuentes de carbono. Este modelo es congruente con los resultados experimentales.

Finalmente, se propone y empieza a trabajar en un protocolo que usa oligonucleótidos marcados con secuencias específicas para poder secuenciar miles de variantes crecidas en diferentes condiciones en solo experimento de secuenciación masiva. Con esto se pretende, además de validar el modelo propuesto, observar el cambio en la frecuencia de las variantes de la librería a lo largo del tiempo en las distintas fuentes de carbono.

INTRODUCCIÓN

Represión catabólica del carbono

Dado un entorno extracelular particular, *Escherichia coli* sólo necesita un subconjunto de las enzimas codificadas en su genoma para crecer, indicando que la expresión génica está regulada de forma diferencial. Si un sustrato está ausente los genes responsables de metabolizarlo generalmente se reprimen para no malgastar energía en producir enzimas innecesarias en ese momento. El aumento en la concentración del sustrato relaja la represión de estos genes. El ejemplo clásico de este modo de regulación es el operón *lac* de *E. coli*(1).

Hace más de 100 años se observó que el crecimiento en glucosa reducía la actividad de ciertas enzimas en bacterias y levaduras, fenómeno al que se denominó “efecto glucosa”. Uno de los primeros ensayos cuantitativos de este efecto fue realizado en 1937 por Stephenson y Gale, quienes midieron la actividad galactosidasa (utilización de galactosa) en *E. coli*. Esta actividad se ve reducida siete veces en presencia de glucosa, mientras que el consumo de glucosa no se ve afectado por la presencia de galactosa(2).

A principios de la década de 1940s Monod observó que cuando se cultiva *Bacillus subtilis* en un medio con sacarosa y dextrano la bacteria primero consume la sacarosa, luego deja de crecer por un tiempo (fase lag), para finalmente empezar a consumir dextrano. Al extender sus estudios a más organismos y azúcares(3) se percató que este comportamiento bifásico era un mecanismo general y extendido; cada

organismo parece tener su orden particular de consumo de fuentes de carbono, con glucosa comúnmente en primer lugar.

En los años siguientes se descubrió que azúcares comunes como glucosa, fructosa o sacarosa, en concentraciones suficientes, reducen la síntesis de enzimas requeridas para el transporte y utilización de fuentes de carbono menos favorables. Este fenómeno se conoce como “represión catabólica del carbono” (RCC)(4). Cuando la fuente primaria de carbono es consumida, la bacteria primero expresa los genes necesarios para consumir la fuente de carbono secundaria antes de poder continuar con el crecimiento.

Los mecanismos regulatorios de la RCC han sido estudiados extensamente, encontrándose que el uso preferencial de una fuente de carbono sobre otro implica modulación de la actividad enzimática y/o represión de la transcripción. En *E. coli*, el sistema de fosfotransferasa fosfoenolpiruvato:carbohidrato (PTS) desempeña un papel central en la represión catabólica del carbono.

El sistema PTS

El PTS de *E. coli* fue descrito por Kundig, Ghosh y Roseman como un sistema que utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) para fosforilar ciertas hexosas incluyendo N-actilglucosamina, N-acetilmanosamina, glucosa, manosa y manosamina(5). En seguida se reconoció como un mecanismo de transporte que cataliza simultáneamente la entrada a la célula y la transformación a fosfoéster de un amplio número de carbohidratos. La composición básica del PTS es similar en todas las especies estudiadas(6). Consta de dos componentes citoplásmicos generales, enzima 1 (EI) y HPr (Histidine

Containing Protein) que son comunes para todos los carbohidratos del PTS y enzima 2 (EII) que es específica para cada carbohidrato. En general, una bacteria puede expresar un gran número de EIIs diferentes, en *E. coli* por lo menos 15(7). Cada EII consiste de uno o dos dominios hidrofóbicos integrales de membrana (C y D) y dos hidrofílicos (A y B). Estos dominios pueden o no encontrarse en el mismo polipéptido (ver figura 1). En el caso de fructosa, EIIA^{Fru} está fusionada a FPr, otro parálogo de HPr.

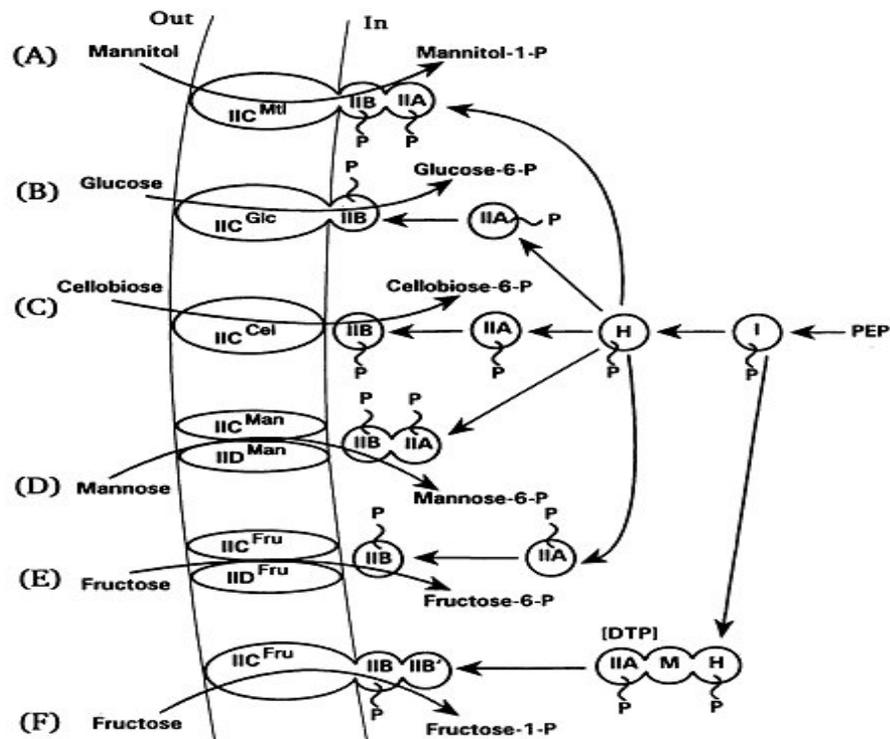


Figura 1: Organización de distintos sistemas PTS en *E. coli* (105)

Enzima 1

El esta significativamente conservada tanto en bacterias gram positivas como gram negativas(8), está compuesta por 570 residuos (63 Kda) y codificada por el gen *ptsI*. Se autofosforila en presencia de

Mg²⁺ en la posición N-3 del anillo de imidazol de la His-189 (9), localizado en el extremo N-terminal de la proteína. El extremo C-terminal contiene el sitio de unión a PEP y es necesario para la dimerización. La proteólisis leve de EI genera un péptido del extremo N-terminal. Los dominios N-terminal (EI-N)(10) y C-terminal (EI-C)(11) han sido clonados y caracterizados; EI-N se fosforila tanto *in vitro* como *in vivo* en presencia de EI-C, PEP y Mg²⁺. La estructura de EI-N ha sido elucidada tanto en cristal(12) como en solución(13). La fosforilación no parece modificar dramáticamente la estructura del dominio.

HPr

HPr tiene solo 90 residuos (9KDa) y es codificada por el gen *ptsH*. Ha sido purificada de varios organismos(6). La similitud es más pronunciada alrededor del sitio activo(14). HPr se fosforila en la posición N-1 del anillo imidazol de la His-15.

Se conoce la estructura tridimensional de HPr de *E. coli*, *B. subtilis* y unas pocas especies más(15) (16). En el caso de *E. coli* también existen co-cristales de HPr con EIIA^{man} (17), EIIA^{glc} (18) o EIIA^{mnt} (19) así como con el dominio N-terminal de EI(20). En todos estos casos el esqueleto de HPr es idéntico, cuatro láminas beta antiparalelas cubiertas por un lado con 3 hélices alfa, lo que indica que HPr no requiere grandes cambios de conformación para lograr la interacción con EIIA o EI. Estudios con un gran número de mutantes de HPr sugieren que los residuos importantes para la interacción, tanto con EI como con todas las EIIA, se encuentran en las hélices 1 y 2 y sus asas cercanas(21). (ver figura 6)

Complejos EII

Los complejos EII tienen la una estructura modular(22) consistente hasta de 4 proteínas diferentes(6). Los dominios EIIA y EIIB se definen como aquellos que reciben el fosfato de HPr~P y EIIA~P respectivamente. Mientras que en EIIA el residuo fosforilable es siempre una histidina, en EIIB puede ser tanto una histidina (familia de manosa) como una cisteína (las demás familias)(23). El grupo fosfato de EIIB~P es transferido al carbohidrato tras la translocación (internado a la célula) por EIIC (y EIID en algunos casos)(ver figura 1).

Los complejos EII se clasifican en 4 superfamilias(24) según sus distintos orígenes evolutivos:

1. La superfamilia glucosa-fructosa-lactosa compuesta por la familia de glucosa (EIIA^{Glc}/EIICB^{Glc} de *E. coli* o EIICBA^{Glc} de *B. subtilis*), la familia fructosa-mannitol (EIICBA^{Mtl} de *E. coli*), y la familia de lactosa (EIIA^{Lac}/EIICB^{Lac} de *L. casei*).
2. La superfamilia ascorbato-galactitol, compuesta por la familia ascorbato (SgaA/SgaB/SgaT de *E. coli*) y la familia galactitol (EIIA^{Gat}/EIIB^{Gat}/EIIC^{Gat} de *E. coli*).
3. La familia de manosa (EIIB^{Man}/EIIC^{Man}/EIID^{Man} de *E. coli* o EIIA^{Lev}/EIIB^{Lev}/EIIC^{Lev}/EIID^{Lev} de *B. subtilis*).
4. La familia de dihidroxiacetona (EIIA-HPr-EI^{Dha} [DhaM] en *E. coli*).

Esta clasificación basada en secuencia está respaldada por análisis de cristalografía y RMN que muestran claramente que EIIA y EIIB pertenecientes a diferentes familias son estructuralmente distintos. La información estructural sobre los dominios integrales de membrana, EIIC y EIID, es limitada.

Organización del PTS

La transferencia de fosfato entre los componentes del PTS ocurre por una “asociación en línea” (25). Esta transferencia se facilita por la formación de complejos heterodiméricos, y dada la cinética del proceso, éstos deberían ser efímeros. Se ha descrito la estructura de varios complejos del PTS incluyendo EI/HPr (20), Hpr/EIIGlc (26) (27), Hpr/EIIMtl (28), Hpr/EIIMan (17), EIIGlc/EIIBGlc (29) y EIIChb~P/EIIBChb (29). La formación de los complejos heterodiméricos afecta las propiedades de control de flujo de los componentes de PTS (30).

Dado que tanto EI como HPr en *E. coli* están unidos a fragmentos de membrana(31), se ha propuesto que el PTS se asocia en un metabolón(32) (estructura multiprotéica formada por enzimas secuenciales de una misma vía metabólica) que mejoraría la función PTS. Sin embargo existen argumentos que ponen en duda esta afirmación ; por ejemplo, no es claro cómo se lleva a cabo la transferencia de fosfatos en un complejo completamente ensamblado. Además, no debería haber mejora funcional de un complejo EI-HPr-EII contra los componentes en solución, ya que la difusión no limita el flujo de glucosa(33).

La formación de complejos se observa con EI marcada con la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés), tanto en células crecidas en carbohidratos PTS como no-PTS, cuando llegan a fase estacionaria y altas densidades(34). En razón de que al agregar más carbohidratos los complejos desaparecen, parece que los azúcares propician su disociación.

Varias proteínas de PTS forman dímeros funcionales. La primera en ser descrita fue EI(35) y se cree que la transición monómero/dímero puede regular el flujo de entrada ya que PEP sólo fosforila a la forma dimérica y la asociación/disociación es muy lenta comparada con el flujo de carbohidratos(36). EI~P tiene una constante de dimerización 10 veces mayor que EI. Siendo esta promovida por Mg²⁺ y

PEP e inhibida por piruvato (37).

Algunas EII tansmembranales como EIICBA^{Mtl} (38) y EIICB^{Glc} (39) dimerizan. Análisis proteómicos han encontrado oligómeros de EII^{Nag} y EII^{Tre} (40), apoyando la visión generalizada que las permeasas del PTS funcionan como dímero u oligómeros. En general se acepta que HPr y EIIA no forman oligómeros sin embargo existe evidencia que sugiere lo contrario en el caso de EIIA^{Lac}, EII^{Glc} y EIIAB^{Man} (41). También EIIA^{Ntr}, componente del sistema PTS^{Ntr} y homólogo a EIIA^{Fru}, cristaliza como dímero (42) pero parece ser monómero en solución (43).

Se conocen las constantes de equilibrio del PTS de *E. coli* (ver tabla 1). El K_{eq} en este caso expresa la razón entre producto y sustrato. Es decir, en el equilibrio, existen 80 moléculas de HPr~P por cada molécula de EI~P. Esto significa que existe una proporción no despreciable de EI~P en el equilibrio. Tradicionalmente se considera que una reacción es irreversible si su K_{eq} es mayor a 10^5 .

Reacción	K_{eq}	referencia
$EI\sim P \leftrightarrow HPr\sim P$	80	(36)
$HPr\sim P \leftrightarrow EIIA^{Glc}\sim P$	1~1.5	(44)
$EIIA^{Glc}\sim P \leftrightarrow EIICB^{Glc}\sim P$	12	(36)
$EIICB^{Glc}\sim P \leftrightarrow Glc-6\sim P$	3.2×10^6	(36)

Tabla 1: Constantes de equilibrio del PTS^{glc}

Sólo la última reacción del PTS^{Glc} es irreversible (Ver tabla 1). Se cree que las constantes de otros PTS son similares. La reversibilidad de las reacciones del PTS tiene implicaciones reguladoras discutidas más adelante.

Regulación del metabolismo del carbono

Cuando *E. coli* se enfrenta a un cambio en las fuentes de carbono disponibles puede adaptar su metabolismo mediante la expresión de operones específicos, generalmente inducidos por sustrato (45). Datos de transcriptómica muestran que cuando las células crecidas en fuentes ricas de carbono son posteriormente expuestas a fuentes de carbono que sólo permiten un crecimiento lento, el número de genes inducidos incrementa progresivamente (46). Células que crecen bajo limitación de carbono expresan y utilizan un gran número de transportadores, mientras que aquellas que crecen en glucosa sólo expresan unos pocos(47). Esta respuesta transcripcional está mediada por un número pequeño de reguladores(48): Crp, Mlc, FruR, CsrA y σ^{54} . La actividad de algunos de estos reguladores está directamente afectada por el PTS.

La importancia del PTS en la regulación del carbono se volvió evidente cuando se encontró que mutantes con deleciones en HPr y/o EI no sólo eran incapaces de crecer en azúcares PTS sino en una gran gama de azúcares no PTS(6). Buscando mutaciones que restauraran el crecimiento en azúcares no PTS recurrentemente se encontró la mayoría un gen que se denominó *crr* (carbohydrate repression resistant)(49) que luego se demostró codifica para EIIA^{Glc}. La triple mutante HPr, EI y EIIA^{Glc} crece bien en azúcares no PTS, pero no crece en azúcares PTS. Esto muestra que EIIA^{Glc} no sólo está implicada en el transporte de glucosa, sino también en la regulación del transporte y metabolismo de un gran número de fuentes de carbono no PTS.

EIIA^{Glc} ~P es requerida para la activación de la adenilato ciclasa. Mutantes en este gen muestran una actividad marginal correspondiente a 5% de la enzima parental(50). EIIA^{Glc} sin fosforilar puede unirse e inhibir múltiples proteínas no PTS incluyendo la permeasa de lactosa (LacY) y melibiosa (MclB), el

componente hidrolizador de ATP del sistema de transporte de maltosa malK y la glicerol cinasa. Al evitar la entrada de estos metabolitos se detiene la inducción de los genes involucrados en su transporte. A este proceso se le denominó “exclusión de inductor” (inducer exclusion). Estos mecanismos permiten a la célula usar fuentes de carbono alternativas sólo cuando EIIA^{Glc} se encuentra mayoritariamente fosforilada (cuando no hay azúcares PTS).

Regulación de la transcripción por Crp/cAMP

Crp es un regulador global que controla la expresión de diversos genes y operones (51). Crp se activa al unirse a cAMP sintetizado por adenilato ciclasa (*cyaA*). Diferentes genes y operones requieren distintas concentraciones de Crp/cAMP para activarse ya que este complejo puede tomar diferentes estados conformacionales activos y la afinidad por cada sitio en el ADN es diferente (52).

La concentración de Crp/cAMP está regulada por el PTS ; la adición de glucosa a células crecidas en lactosa baja la concentración de cAMP (53). Experimentos con células toluenizadas (54) (este tratamiento vuelve las membranas permeables a carbohidratos) muestran que la actividad de adenilato ciclasa se inhibe por glucosa (55). Otros carbohidratos PTS también inhiben la síntesis de cAMP (56) . Tanto las mutantes *ptsHI* y *crr* tienen baja actividad adenilato ciclasa (50). Basado en estos estudios se propuso un modelo en el cual EIIA^{Glc}~P activa a adenilato ciclasa. Creciendo en una fuente rica de carbono, el flujo de fosfato hacia el carbohidrato externo genera una menor proporción EIIA^{Glc} fosforilada inhibiendo la adenilato ciclasa. Sin embargo, en una fuente pobre de carbono, como lactato o succinato, toda la EIIA^{Glc} se encuentra fosforilada, promoviendo la síntesis de cAMP. Este modelo no puede explicar por qué el crecimiento en algunas azúcares no PTS como glucosa-6~P o gluconato genera niveles similares de cAMP a los generados por glucosa (57). Más aún, el efecto inhibitorio de

glucosa-6~P sólo ocurre en células intactas y no en tolueñizadas (55).

Regulación de *cyaA* y transcripción de *crp*.

Nuestro entendimiento de la regulación mediada por Crp/cAMP proviene del estudio de mutantes *cyaA*, *crp*, *ptsH*, *ptsI* y/o *crr* (58). El efecto de diversas fuentes de carbono en el crecimiento, expresión génica, concentración de cAMP y *crp* ha sido monitoreado en estas mutantes. Agregar cAMP exógeno sirve para distinguir entre los efectos causados por cambios en la concentración de cAMP y aquellos causado por la actividad de Crp.

La inactivación de *cyaA* evita que *E. coli* crezca en muchos azúcares PTS, aunque la sobre expresión parece ser perjudicial (59). La inactivación de *crp* aumenta la concentración de cAMP en sesenta veces pero es dependiente de *crr* ; la doble mutante *cyaA crr* sólo presenta un aumento de cuatro veces (60). Esto se debe a que la expresión de *cyaA* está regulada negativamente por Crp/cAMP en *E. Coli* (61) y la de *crp* está regulada tanto negativamente (62) como positivamente (63) por Crp/cAMP, dando altos niveles de expresión a concentraciones muy bajas o muy altas del inductor. La expresión de *crr* es independiente de Crp/cAMP (64) pero la expresión de *ptsG* (EIICB^{Glc}) esta casi completamente inhibida en mutanres en *cyaA* o *crp* (65).

No es claro como EIIA^{Glc}~P ejerce su efecto regulatorio sobre *cyaA*. Se ha demostrado que tanto EIIA^{Glc}~P como EIIA^{Glc} se unen de manera similar a la adenilato ciclasa(66) pero sólo la forma forforilada permite la unión de un factor extra aún no identificado. El extremo N-terminal de la adenilato ciclasa es la parte catalítica mientras el C-terminal es necesario para la regulación mediada por EIIA^{Glc}~P(66), ya que mutantes en *crp* generan un aumento de cincuenta veces en la concentración

de cAMP que se ve casi normalizado en mutantes sin los 48 aminoácidos C-terminales de *cyaA* (67) . Mutantes en *crr* tienen de 5 a 20 % de la actividad adenilato ciclasa, que se recupera a niveles casi normales al expresar *crr* en un plásmido(68). Si EIIA^{Glc} fuese el único factor que estimula la adenilato ciclasa la mutante en *crr* y la *cyaA* truncada deberían exhibir el mismo fenotipo, pero el efecto positivo de la concentración de cAMP al expresar *crr* en un plásmido (5x) es mucho menor al negativo causado por la delección del dominio C-terminal de CyaA (50x).

El sistema PTS nitrógeno

Existe un sistema homólogo a PTS denominado PTS^{Ntr} (PTS nitrógeno) compuesto por EI^{Ntr} (PtsP), homólogo a EI ; NPr (PtsO), homólogo a HPr y EIIA^{Ntr} (PtsN) homólogo a EII^{Fru} (41). Ninguna de estas proteínas es capaz de complementar la ausencia de su parálogo (41). La función de este sistema aún no está bien entendida, pero se cree que regula el metabolismo del nitrógeno(69). También se ha propuesto un rol en la regulación de los niveles de K⁺(70). Tanto NPr como EII^{Ntr} se encuentran codificados en el mismo operón que el factor σ^{54} , el operón *rpoN*. (Figura 2) En *E. coli* (69) y *K. pneumoniae* (71) la expresión del operón *rpoN* es constitutiva pero en *B. japonicum* (72) , *P. putida* (73) y *R. etli* (74) está auto-regulada negativamente por EI^{Ntr}. Estos genes codifican para σ^{54} (*rpoN*), la proteína Y asociada a ribosoma (*yhnH*), EIIA^{Ntr} (*ptsN*), una proteína de unión a ATP (*yhbJ*) y NPr (*npr*). (41)

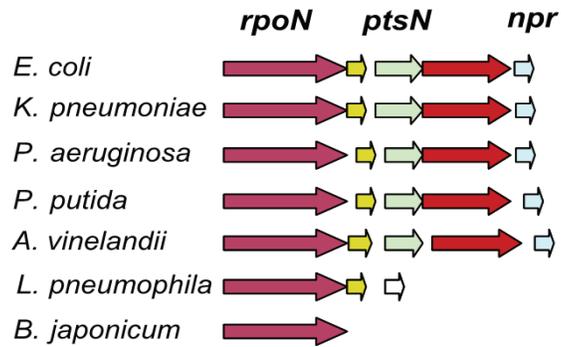


Figura 2: Organización del operón *rpoN* en distintos organismos

EI^{Ntr} , NPr y $EIIA^{Ntr}$ forman una cadena de transferencia de fosfato in vitro (69). PTS^{Ntr} fosforila glucosa 1000 veces más lento que el PTS, sugiriendo que su función principal no es el transporte de carbohidratos (75). EI^{Ntr} contiene un dominio GAF que regula a algunos activadores dependientes del factor transcripcional σ^{54} (sigma54) lo que sugiere un papel regulatorio(76). Mutantes carentes de $PtsN$ crecen mal en fuentes de orgánicas de nitrógeno cuando el carbono es limitante, pero crecen bien en glucosa (69). En *E. coli* aún no ha sido aislada una mutante en $PtsP$, pero su pérdida en otros organismos previene la expresión de genes importantes(77). HPr no parece estar involucrado en regulación (69). De estas observaciones no es obvio un modelo sobre cómo PTS^{Ntr} regula la expresión genética.

Aunque está generalmente aceptado que la función del PTS^{Ntr} requiere de la cadena de transferencia de fosfato $EI^{Ntr}\sim P \rightarrow NPr\sim P \rightarrow EIIA^{Ntr}\sim P$ para realizar su función, existe una gran diversidad en las proteínas del PTS^{Ntr} entre bacterias (ver figura 2)(de hecho *R. etli* parece no tener NPr pero sí copias funcionales de EI^{Ntr} y $EIIA^{Ntr}$ (74)). Esto sugiere que existe reacción cruzada entre las proteínas del PTS^{Ntr} y del PTS(78). La estructura del complejo $NPr:EIIA^{Ntr}$ en solución(43) muestra una interfaz muy

parecida a la de HPr:EIIA.

HPr y NPr tienen una identidad de alrededor de 30% a lo largo de toda la proteína, lo que supone un plegamiento similar. También la estructura parcial de NPr (79) es idéntica a HPr. Aunque hay evidencia de reacción cruzada entre estos dos sistemas(78) nunca se ha observado transferencia de fosfatos de NPr a algún EII de PTS.

Conexión entre el metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno.

La regulación parece estar ligada tanto a las proteínas del PTS^{Ntr} como a las de PTS. Las enzimas clave para la utilización del nitrógeno se encuentran en el operón *glnALG* que codifica a la glutamato sintetasa (*glnA*) y el sistema de dos componentes NtrB (*glnL*) – NtrC (*glnG*). En condiciones limitantes de nitrógeno, NtrC~P bloquea la transcripción a partir del promotor principal σ 54-dependiente *glnAp1* (80). Aunque el promotor alternativo σ 70-dependiente *glnAp2* es estimulado por Crp/cAMP(que esta a su vez regulada por el PTS), la expresión de *glnA* es mucho mayor en células crecidas en glucosa que en fructosa o glicerol ya que, según se tiene entendido, Crp/cAMP también reprime al promotor *glnAp1* y este efecto es más fuerte que el activador (80). La observación de que al aplicar cAMP a células crecidas en glucosa la actividad de *glnA* se reduce siete veces (81) apoya este modelo.

Mutantes en *ptsN*, crecidas en limitación de nitrógeno, tienen una reducción en la actividad del promotor *glnAp2*; en este caso aumentar cAMP no tiene efecto alguno (69). Estas mismas mutantes no pueden crecer en leucina o serina como fuente de nitrógeno y tienen crecimiento reducido en isoleucina (82). Suministrar *ptsN* en plásmido recupera el fenotipo, pero cuando el plásmido contiene *ptsN*

His73Ala (no es fosforilable) crece aún mejor que la proteína silvestre. También se ha propuesto un papel de EIIA^{Ntr} en la regulación de la síntesis de algunos aminoácidos (82).

Por otro lado, células crecidas en limitación de nitrógeno acumulan α -cetoglutarato(83), inhibidor alosterico no competitivo de EI(84) (se cree que el PTS^{Ntr} inhibe a la α -cetoglutarato dehidrogenasa (85)) . Esta interacción ocasiona que, cuando el nitrógeno es limitante para el crecimiento, la actividad del PTS ,y por lo tanto el consumo de carbohidratos, se ve reducida considerablemente.

ANTECEDENTES

Los antecedentes experimentales relevantes, descritos en el artículo adjunto(86), corresponden a los grupos de investigación del Dr. Xavier Soberón y el Dr.Milton Saier. En este trabajo, que se realizó en gran medida durante mi maestría, se sustituyeron catorce residuos de la proteína NPr (K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, E25K, Q28K, V49L, I50F, A51K, L53Q, M54T, D56G y A58T) en su superficie de interacción NPr-EII^{Nr} por los correspondientes en HPr en esas posiciones (ver figura 3). Esta nueva proteína, denominada CP14, fue capaz de complementar la actividad de HPr sobre un fondo genético BW25113(87): Δ ptsH y Δ fruF (codificantes de HPr y FPr respectivamente), usando diversos azúcares PTS como fuente de carbono (figura 4)(glucosa, manitol, manosa, dulcitol y sorbitol). Los catorce residuos se eligieron examinando interfaz del complejo Hpr:EII^{mnt} (ver figura 5).

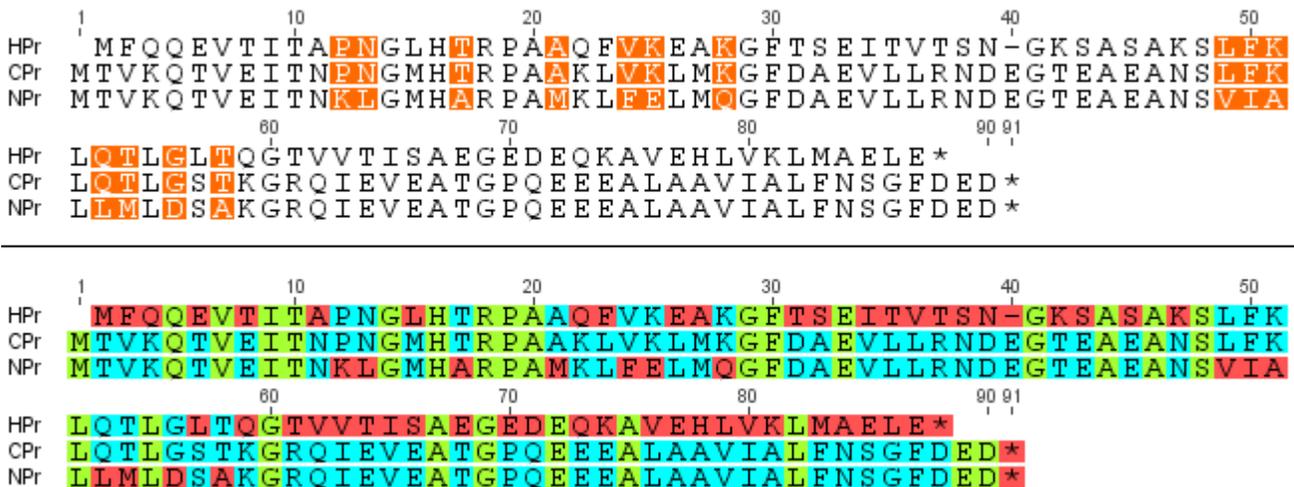


Figura 3: Alineamiento múltiple entre HPr, CP14 y NPr

La figura 3 muestra, en el alineamiento superior los residuos que fueron mutados en NPr para generar CP14. El alineamiento inferior muestra la similitud entre secuencias: en verde los aminoácidos conservados en las tres proteínas, en azul los conservados en dos y en rojo los solo presentes en una.

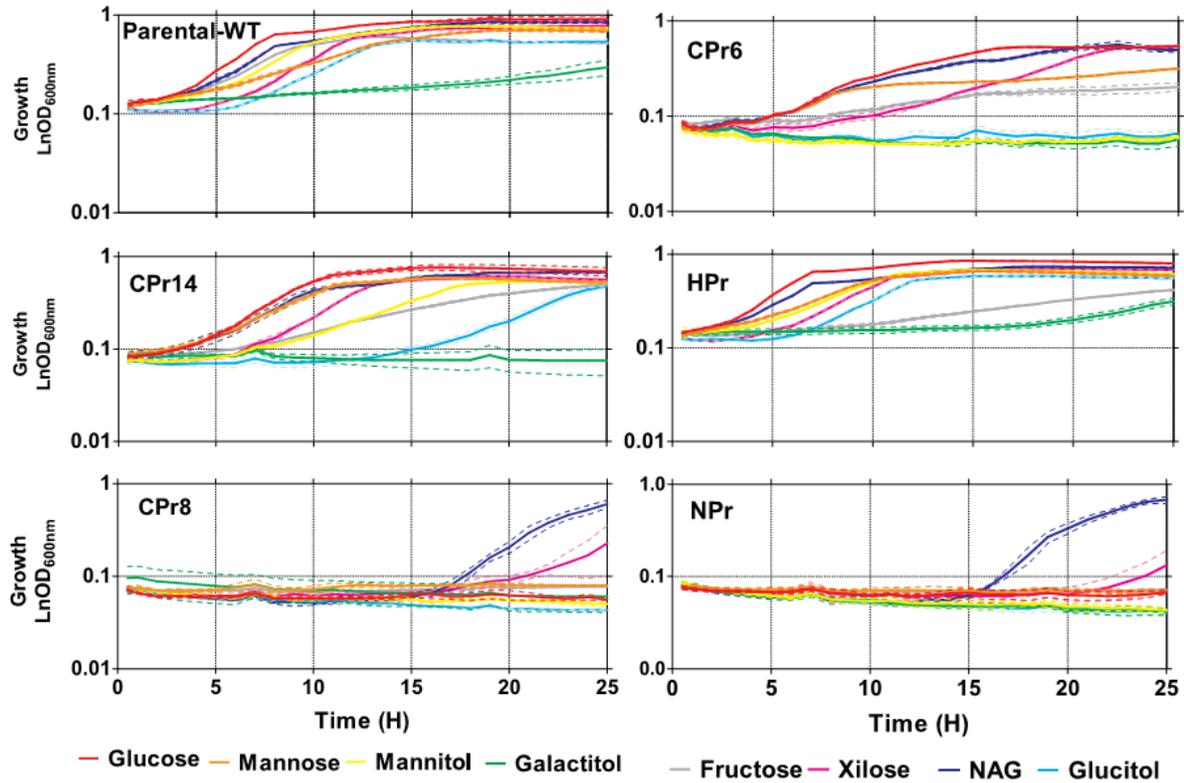


Figura 4: Perfiles de crecimiento

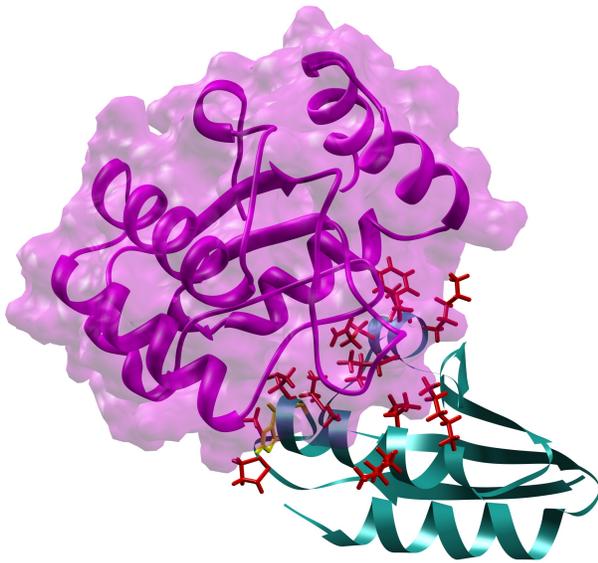


Figura 5: Interfaz HPr:EII^{Mnt}

Figura 4.- (Arriba) Perfil de crecimiento de múltiples cepas en diversas fuentes de carbono. Es claro que las cepas NPr y CPr8 carecen casi por completo de actividad PTS. CPr14 y HPr presentan perfiles de consumo similares a la cepa parental excepto por el consumo de fructosa (debido a la delección del gen *fruF*). CPr6 sin embargo es capaz sólo de transportar algunos carbohidratos; existe información parcialmente responsable del transporte de manitol y glucitol que se encuentra en las otras 8 mutaciones.

Figura 5.- (izquierda) Estructura del complejo HPr:EII^{mnt} (PDB 1J6T)(19) que fue usada como modelo para seleccionar las 14 mutaciones. HPr es la proteína verde, EII^{mnt} la magenta. En rojo se muestran los 14 aminoácidos a ser sustituidos en NPr y en amarillo la histidina fosforilable.

Se construyeron diversos modelos de docking proteína-proteína para elucidar la naturaleza de este fenómeno. La figura 6 muestra los modelos obtenidos por HEX y MODELLER de los complejos de CPr y HPr con EIIA de manosa, manitol y glucosa. El número de modelos se refiere a cuantas conformaciones superaron el umbral de energía para ser reportado o, en caso de no existir ninguno, la mejor conformación evaluada.

La energía de unión mostrada corresponde a la función objetivo de HEX. Esta es teóricamente igual a ΔG en Kcal/Mol, pero los supuestos usados en el modelo de interacción hace que muchas veces este no se el caso. El RMSD (Root-mean-square deviation) es una medida promedio de la distancia de átomos sobrepuestos y, en este caso particular, de la distancia de los carbonos alfa del modelo tras el docking y el cristal (en el caso de HPr) o el modelo antes del docking (en los demás). El uso de MODELLER(88) y HEX(89) y específicamente la energía calculada y el RMSD han demostrado ser discriminantes para interacción y transferencia de fosfato a EII de NPr, HPr y CPr.

Ya que un modelo rígido fue capaz de reconocer variantes funcionales, se sugiere que la transferencia de fosfato entre HPr (o CPr o NPr) depende más bien de la fuerza de interacción entre las caras de las proteínas que de algún cambio de conformación.

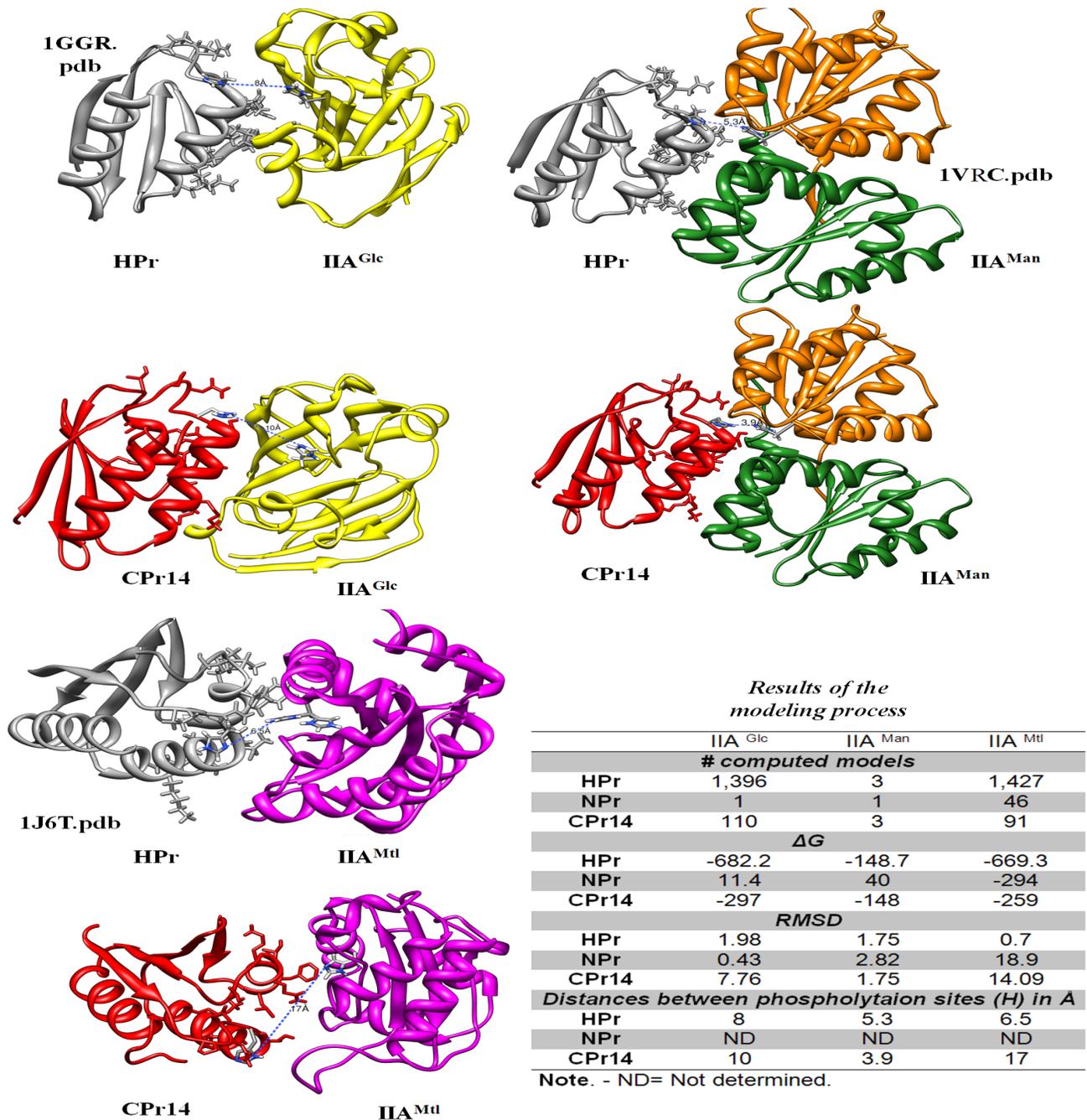


Figura 6: Reconstrucción de interacciones proteína-proteína por docking molecular

Usando un sitio de restricción *aseI*, se construyeron las variantes CPr6, con las primeras seis mutaciones, y Cpr8, con las últimas ocho. Cpr8 fue incapaz de crecer en fuentes de carbono PTS. CPr6 presentó un crecimiento normal en glucosa, manosa y dulcitol pero nulo en sorbitol y manitol. (figura

4)

Los perfiles de crecimiento sugieren que Cpr14 transporta mejor manosa que HPr. Para comprobar esto se midió y comparo el transporte de 2-Desoxiglucosa (carbohidrato no metabolizable transportado específicamente por la permeasa de manosa) y glucosa marcadas radioactivamente (ver figura 7). Este experimento muestra claramente que HPr es mejor que CPr para fosforilar el transportador de glucosa. Sin embargo, en el caso del transportador de manosa CPr fosforila mejor que HPr. NPr, como era de esperarse, no fosforila a ninguno de estos transportadores.

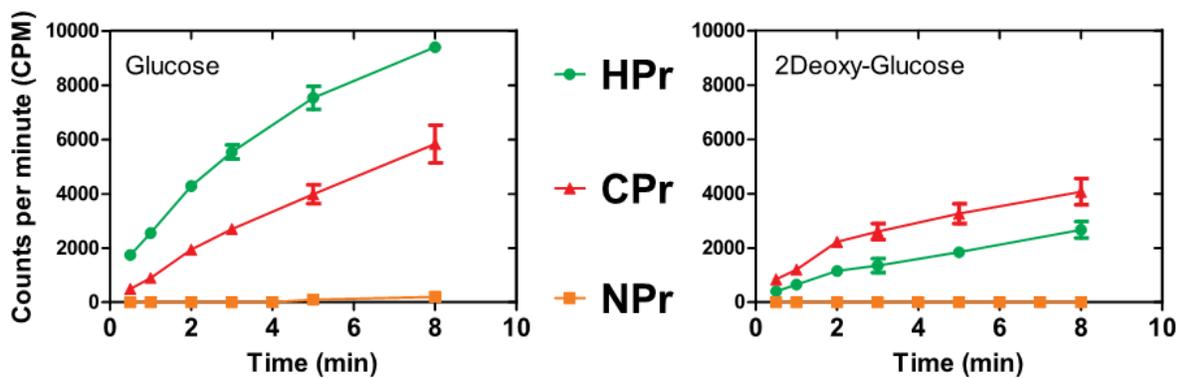


Figura 7: Comparación en la actividad de las permeasas de glucosa y manosa

Existen muchas presiones de selección que acotan las mutaciones posibles sobre la cara de interacción HPr : interactuar con suficiente afinidad con cada una de las EIIA del sistema PTS, interactuar con EI y no interactuar de más con EI^{Ntr} o EII^{Ntr}. Entre tantas funciones que tiene HPr, es difícil imaginar que esté optimizada para alguna en particular (claramente no es óptima para el transporte de manosa).

Modificar la cara de interacción de NPr nos podría permitir controlar el flujo de fosfato de PEP al carbohidrato de nuestra elección, permitiéndonos desarrollar cepas con interés biotecnológico. Claramente, mutar 14 residuos basados en un cristal es un experimento burdo de ingeniería genética; no sabemos cuales de estas mutaciones son realmente necesarias para el fenotipo o incluso si algunas son

deletéreas para el sistema PTS. Un estudio metódico y exhaustivo de estos catorce cambios es necesario.

HIPÓTESIS

Existe un subconjunto propio de los 14 residuos que debe ser clave en las interacciones proteína-proteína realizadas por HPr, de tal forma que le permitan interactuar con las diversas EII de manera diferencial. Dicho conjunto es discernible mediante la utilización de una biblioteca binaria de mutantes de la proteína homóloga Npr.

OBJETIVOS

- 1) Generar una librería binaria de las 14 mutaciones en NPr.
- 2) Caracterizar variantes de NPr según su patrón diferencial de consumo de cinco azúcares PTS: glucosa, manosa, manitol, sorbitol, dulcitol.
- 3) Modelar, mediante herramientas bioinformáticas, la estructura y posibles interacciones con EII de las mutantes NPr.
- 4) Proponer un modelo sobre la especificidad de la interacción con EII que confieren estos 14 aminoácidos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En este estudio se utilizó la cepa BW25113 de E. coli y una variante doble mutante (Δ ptsH, Δ fruF) de BW25113(87) (llamada 2 Δ). La librería de **16384** variantes fue clonada en el plásmido pZE12(90) .

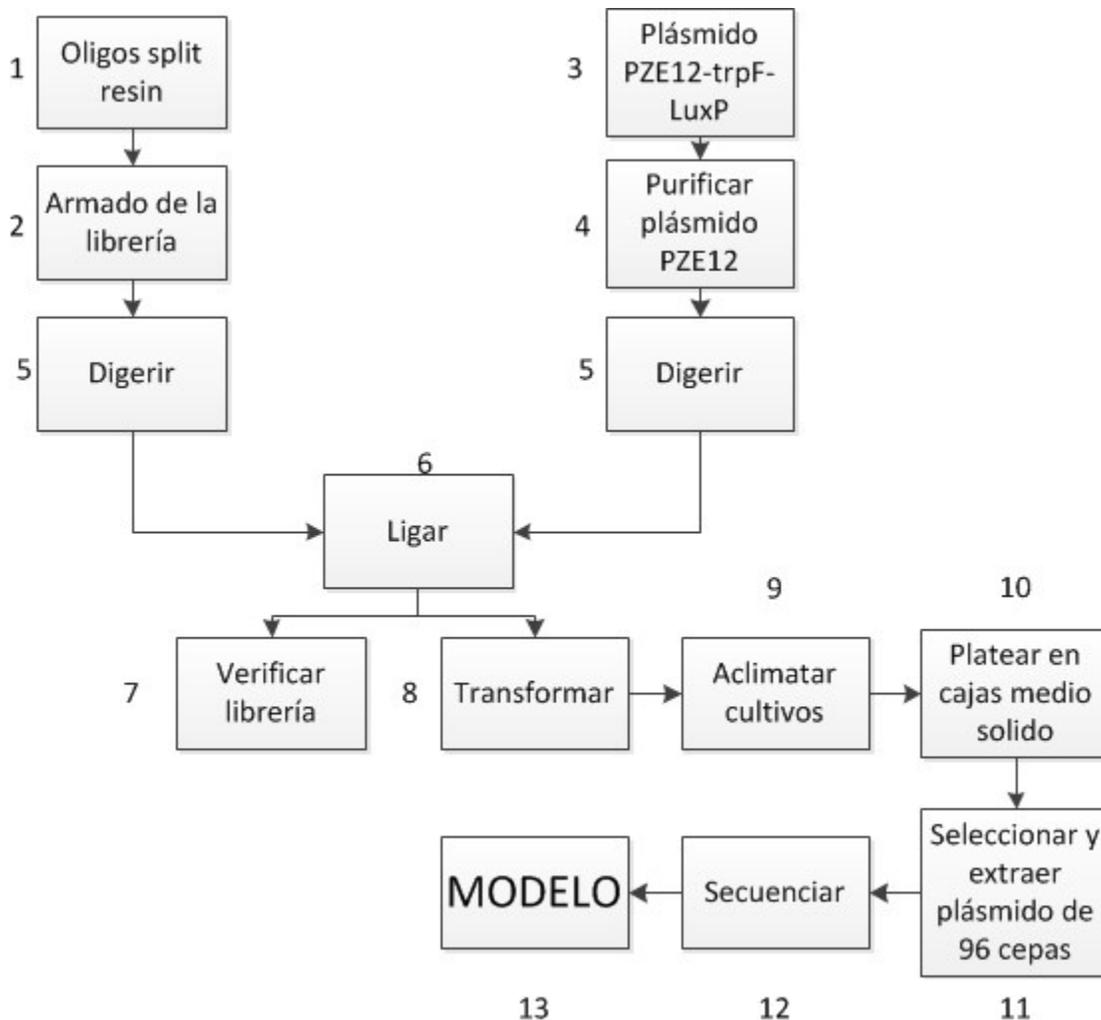


Figura 8: Diagrama de flujo del diseño experimental

Se usó el método de separación de resina (“resin-splitting”) (91) para general la librería binaria ya que es capaz de generar solo la variación que nos importa explorar. Otras técnicas como mutación aleatoria o barajado de genes generan variación “inútil”. Se usó el plásmido PZE12 y la cepa 2Δ para que los resultados fueran directamente comparables con los del artículo adjunto.

Ya que 2Δ carece de un sistema PTS activo, su crecimiento en LB es reducido. Esto causa que esta cepa produzca muy poco plásmido. Por esta razón se usó la cepa MC1061 (92) tanto para producir suficiente plásmido para las ligaciones así como para amplificar la librería binaria.

Construcción de librería binaria

Construcción de la librería

La librería binaria se ensambló con una variación del método usado para armar CPr (ver figura 9). Ocho oligonucleótidos que cubren el gen NPr (tres de ellos mutagénicos) se juntaron por pares por medio de reacciones de PCR (denominados P1, P2, P3 y P4). Solo P1 y P4 requieren NPr como templado. Los productos de PCR fueron purificados usando un gel nativo de acrilamida al 15%. Tras otra ronda de PCR, P1 y P2 generan H1, así como P3 y P4 generan H2. Se purificó de nuevo. Una última reacción de PCR de H1 con H2, amplificada con los oligonucleótidos “forward” y “reverse” generó el fragmento completo correspondiente a la librería armada.

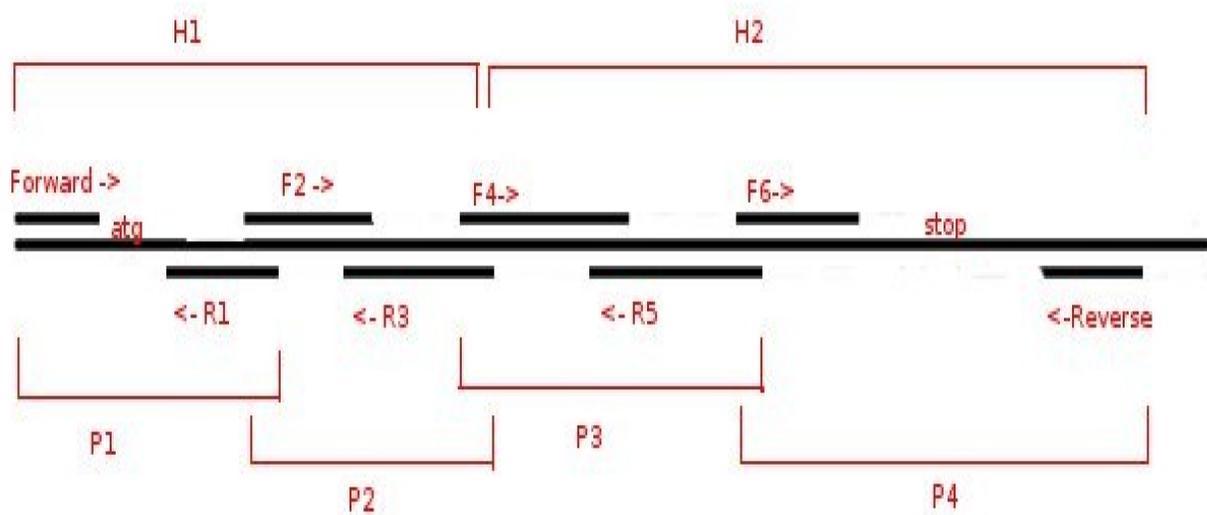


Figura 9: Distribución de los ocho oligonucleótidos que usaron para ensamblar la librería binaria.

Oligonucleótidos mutagénicos

Tres oligonucleótidos mutagénicos (F2, R3 y R3) se ensamblaron por el método de separación de resina(91) : cada uno de los catorce codones por explorar se sustituyó con un tercio del codón correspondiente a HPr y dos tercios del correspondiente a NPr. Así, tomando en cuenta la composición esperada en cada codón, F2 está compuesto por $2^3 = 8$ variantes, R3 por $2^4 = 16$ variantes y R5 por $2^7 = 128$ variantes. Cuando se combinan con otros oligonucleótidos estándar para armar la librería binaria, se generan un total de 16384 ($8*16*128$) variantes.

Los oligonucleótidos mutagénicos ensamblados por separación de resina se sintetizan de manera ordinaria, en fase sólida, adicionando nucleótido por nucleótido hasta llegar a la región variable. Entonces la columna se abre y una porción se transfiere a una segunda columna, mientras que el resto se mantiene en la primer columna. Para el caso particular de los oligonucleótidos ensamblados en este trabajo, un tercio de la resina se transfirió a la segunda columna, donde se ensambló el codón mutante nucleótido por nucleótido, mientras que en la primer columna se ensambló el codón silvestre de igual manera. Concluida la síntesis de ambos codones de manera independiente, las resinas se mezclaron en la primer columna y nuevamente se transfirió un tercio a la segunda columna para continuar con la síntesis del segundo codón mutante, mientras que en la primer columna se sintetizó el segundo codón silvestre. Este proceso de partición de resina, síntesis y mezclado se repitió para cada posición a explorar y las resinas se juntaron en una sola columna cada vez que los codones por sintetizar fueran los inmutables, es decir, aquellos que siempre deberían permanecer silvestres.

Esta técnica es muy versátil, porque en base a la proporción de resina separada se puede manipular el contenido de mutaciones en las variantes(93). No hay razón para limitarse a solo dos codones ni a

regiones variantes de la misma longitud. Transferir un porcentaje pequeño de la resina generará variantes con pocos reemplazos, mientras que transferir un porcentaje alto generará variantes con alta proporción de mutaciones.

Plásmido PZE12-TrpF-Luxp

Con la finalidad de poder diferenciar rápidamente por PCR de colonia aquellas clonas que contenían un inserto de la librería de aquellas que conservaban el fragmento silvestre, se clonó en el plásmido PZE12 la fusión proteica TrpF-LuxP usando los mismos sitios de restricción (*EcoRI* y *HindIII*). El tamaño de este inserto (900 bp) es claramente distinguible del tamaño de la librería y de NPR (400bp).

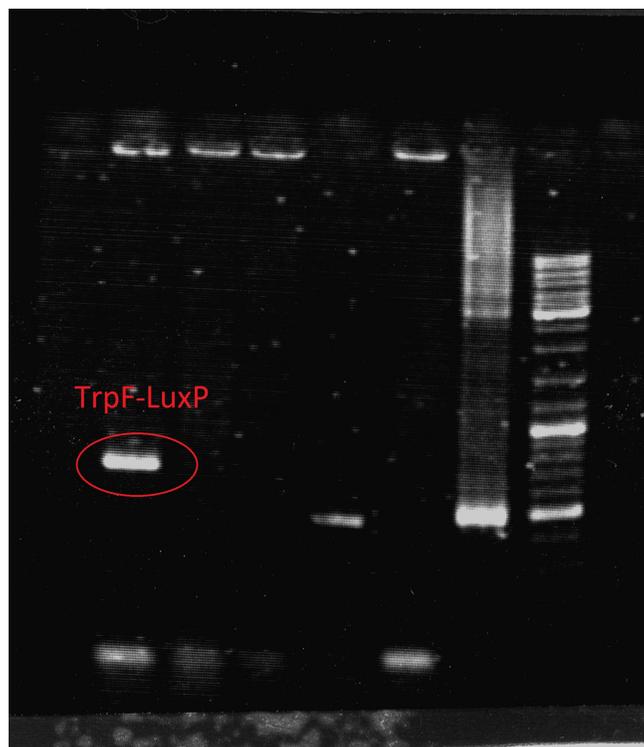


Figura 10: Gel del plásmido *TrpF-LuxP*

Se probaron varias condiciones para la ligación (ver métodos), donde la mejor produjo 126 variantes por 10 μ l de células transformadas (de un total de 1000 μ l). Esta ligación debería alrededor de 63000

variantes ($126 * 100$ del micro-litro de la transformación*5 de la mezcla de ligación restante). Con esta cantidad de variantes (sin corregir para las posibles mutantes y las que no tengan el inserto) cada una de las 16384 variantes tiene 98% de probabilidad de estar representada. Sin embargo, con estos números sólo hay una posibilidad muy baja (1.8×10^{-100}) de observar al menos una vez cada una de las variantes.

Finalmente, usando estas concentraciones, se generaron cinco nuevas ligaciones que, tras transformarse, dieron lugar a una diversidad combinada de 250,000 clonas individuales lo que da 99.6% de posibilidad de observar todas las variantes por lo menos una vez. Estas transformaciones fueron crecidas en LB y se extrajo plásmido super-enrollado. El DNA de las cinco librerías se mezcló en proporciones definidas para normalizar (ver métodos).

Probar construcción

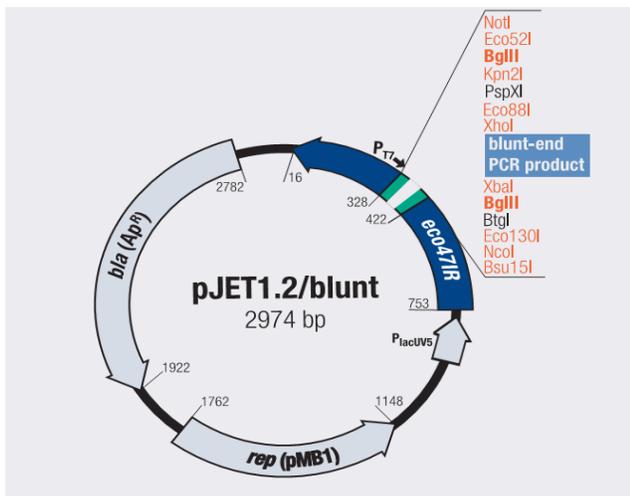


Figura 11: El plásmido pJET

Para explorar la diversidad de la librería sin expresar las variantes se usó el plásmido pJET 1.2 blunt (ver figura 11). En este vector el sitio de clonación interrumpe el gen de una enzima de restricción letal (*eco47IR*) de tal forma que el plásmido ligado sobre sí mismo no es viable.

Con este método se obtuvieron alrededor de 1000 colonias al platear 20 μ l. De estas se secuenciaron quince (figura 12). Se muestran en naranja/azul los catorce residuos; en naranja los correspondientes a NPr (silvestre) y en azul los correspondientes a HPr (mutantes). En magenta se muestran las mutaciones no deliberadas que fueron probablemente introducidas por PCR durante el armado del gen.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	91																																																																											
NPr	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*
6242.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*	
6245.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*
2454.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	F	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*
12665.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	?	?	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	?	G	R	Q	I	E	V	E	?	T	G	P	?	E	E	E	E	A	A	V	I	?	L	F	N	S	G	F	D	E	?	?
12666.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*
12667.ab1	M	T	V	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	F	D	A	E	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*
6244.ab1	M	T	A	K	Q	T	V	E	I	T	N	I	G	M	H	R	P	A	V	K	L	F	S	L	M	G	-	D	A	V	L	L	R	N	D	E	G	T	E	A	E	A	N	S	V	F	L	F	N	L	D	S	A	K	G	R	Q	I	E	V	E	A	T	G	P	Q	E	E	E	E	A	A	V	I	A	L	F	N	S	G	F	D	E	D	*	

Figura 13: Secuencias de variantes crecidas en MM/manitol

Selecciones y plásmidos

En teoría las variantes obtenidas con el plásmido PJET no están sujetas a ninguna selección, ya que éste no es un vector de expresión y las células fueron crecidas en la cepa MC1061 que tiene un PTS intacto. Esto nos permite estudiar si hay desviación con respecto al diseño de la librería (1/3 de mutantes en las posiciones relevantes. También nos da una base contra la cual comparar las otras condiciones.

Las variantes obtenidas de LB están sujetas a una selección leve; aunque un PTS funcional no es estrictamente necesario para el crecimiento, puede ayudar. Además, el plásmido PZE12 es un vector de expresión y algunas de las proteínas de la librería podrían ser tóxicas para la célula. Por tóxica se entiende que se pliega mal y se agrega.

Las variantes obtenidas de MM/manitol están sujetas a una selección fuerte. Un sistema PTS funcional es necesario para el crecimiento. Podrían crecer cepas que expresen variantes de la librería ligeramente tóxicas pero funcionales.

Aclimatar cultivos

Con el fin de evitar el lavado mecánico del medio, que en este caso ha mostrado reducir considerablemente el número de células viables, y de iniciar el programa genético que permitirá a las bacterias crecer en distintas fuentes de carbono, las células fueron sometidas a varios pases por cultivos líquidos.

Primero se tomó 2 µl de la transformación para crecer en LB/AMP y verificar que el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) fuera suficiente. En paralelo, la transformación se usó para inocular 50 ml de LB/AMP líquido y se incubó a 30°C toda la noche. Tomando 1mL de este cultivo, se inocularon cinco matraces con 50 ml de medio mínimo, más uno de los carbohidratos (manosa, manitol, dulcitol, sorbitol o glucosa) como fuente de carbono. Tras crecer toda la noche, se usó 1 ml de cada uno de estos cultivos para inocular un matraz con el mismo medio y se creció una vez más.

Secuenciación Sanger

Finalmente se plateó 100µL de estos cultivos en cajas con medio sólido con la fuente de carbono correspondiente. Se picaron 96 colonias, 14 de cada carbohidrato y 26 de LB para crecer en 5ml de LB. Se extrajo plásmido de estas 96 cepas usando un kit comercial de ROCHE. Los plásmidos se mandaron secuenciar a la unidad de secuenciación del IBT. Los resultados para LB se muestran a continuación.

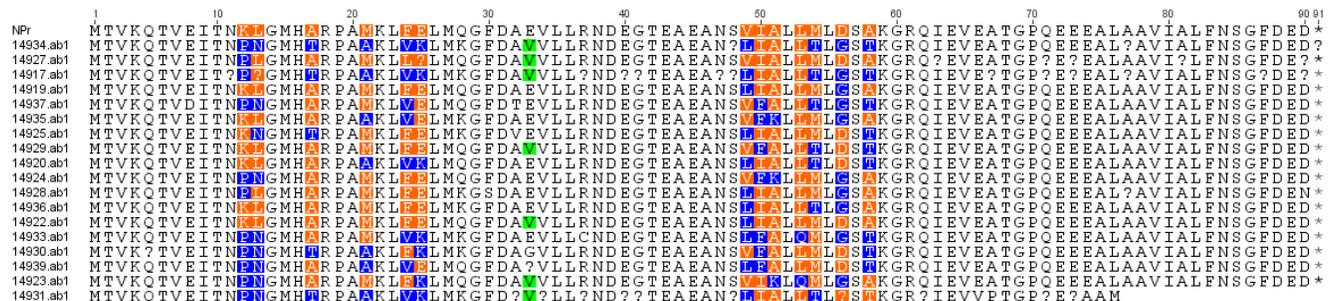


Figura 14: Secuencias de variantes crecidas en LB

Estos datos corroboran que la librería clonada en el plásmido PZE12 está bien construida y están representadas las catorce mutaciones. Para el caso de las 70 secuencias en selección, todas, con la excepción de dos, fueron la misma variante ; aquella con las diez mutaciones esperadas K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, Q28K, V49L, M54T, D56G Y A58T así con la mutación no esperada E33V(en verde en la figura 14).

Existen dos posibilidades para explicar este comportamiento. La primera es que la adecuación proporcionada por esta combinación de mutaciones es enorme, tanto que la variante es capaz de desplazar fácilmente a las demás variantes en todas las selecciones probadas. La otra posibilidad es que sea un fenómeno causado por el efecto fundador al hacer tantos pases por medio fresco. Cualquiera sea el caso, se ha encontrado una nueva mutación que parece ayudar a que NPr adquiera la actividad de HPr.

Resumen de secuencias

N=	15	18	7
mutación/experimento	PJET	LB	MTL
K12P	5	11	1
L13N	8	9	0
A17T	5	5	1
M21A	8	7	3
F24V	6	9	3
E25K	4	8	1
Q28K	3	9	4
V49L	11	11	4
I50F	4	7	5
A51K	1	3	4
L53Q	1	2	1
M54T	5	7	1
D56G	8	11	5
A58T	6	10	5
total	75	109	38
%mut	35.71%	43.25%	38.78%

Tabla 2: Resumen de secuencias

Esta tabla resume los resultados de las secuencias de diversas variantes en los medios de cultivo probados. Cada fila muestra una de las 14 mutaciones y el número de ocurrencias. Se secuenciaron 15 variantes de PJET, 18 de LB y 7 de manitol.

DISEÑO MODELADO COMPUTACIONAL

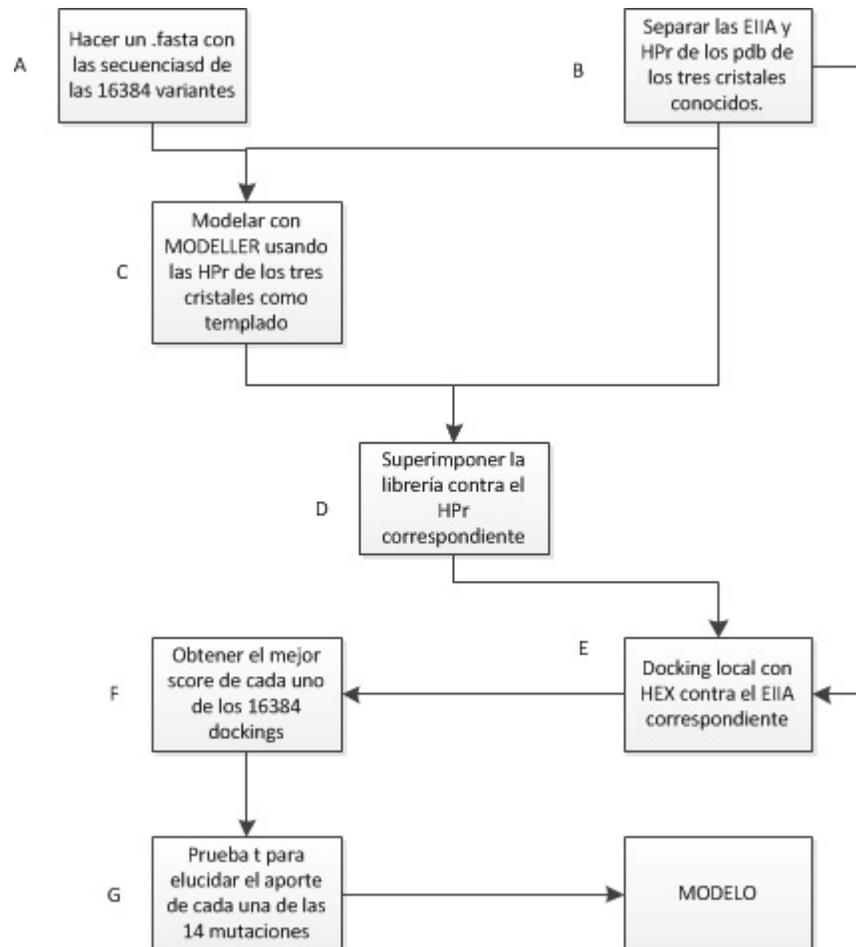


Figura 15: Diseño modelado computacional

La figura 15 muestra los pasos seguidos para obtener un modelo de la aportación de cada una de las catorce mutaciones a la actividad. Ya que la interacción Hpr:EII parece ser fundamentalmente electrostática la energía de interacción calculada por un método de docking rígido debería ser

proporcional a la ΔG real. Esto nos significa que la relación entre las energías de los modelos se conserva ; si el primero interacciona mejor que el segundo con EII Hex puede reconocer esto (aunque tal vez no reconozca del todo la magnitud de la diferencia).

Se usó Hex para calcular la energía de interacción de los modelos de cada una de las 16384 estructuras contra EII^{Mtl}. Para calcular la aportación de la mutación K12P se separaron estas 16384 energías en dos poblaciones: la primera con las 8192 energías correspondientes a los modelos que tienen la mutación, y la segunda con las 8192 energías de los modelos que no la tiene. Esta partición no da dos poblaciones pareadas, cada energía en la primera corresponde a una en la segunda (la del modelos con secuencia idéntica excepto por la mutación K12P). Se realizó una prueba T de Student(94) sobre estos datos para obtener que el aporte de la mutación K12P a la interacción con EIIA^{Mtl} es de 3.58 (desviaciones estándar sobre la media). Se repitió este proceso para cada Mutación y para cada EIIA con estructura conocida (manitol, manosa y glucosa) para proponer un modelo (ver tabla 6 en resultados).

RESULTADOS

Comparación entre PJET y la hipótesis nula.

N=	15	
mutación	PJET	binomial
K12P	5	0.6184
L13N	8	0.9692
A17T	5	0.6184
M21A	8	0.9692
F24V	6	0.7970
E25K	4	0.4041
Q28K	3	0.2092
V49L	11	0.9997
I50F	4	0.4041
A51K	1	0.0194
L53Q	1	0.0194
M54T	5	0.6184
D56G	8	0.9692
A58T	6	0.7970

Tabla 3: Comparación entre secuencias en pJET y la hipótesis nula

Los oligonucleótidos mutagénicos se construyeron de tal forma que cada codón tiene aproximadamente un 33% de probabilidad de estar mutado. Usando esta información como hipótesis nula, suponiendo que las secuencias en PJET no están sujetas a ninguna selección, con una distribución binomial se puede inferir si la síntesis de los oligonucleótidos y/o el armado de la librería introdujeron sesgo a la proporción de mutantes.

En este caso la mutación V49L (en verde) está sobre representada ($p < 0.02$) y las mutaciones A51K y L53Q están subrepresentadas.

Efecto del tamaño de muestra en la inferencia estadística

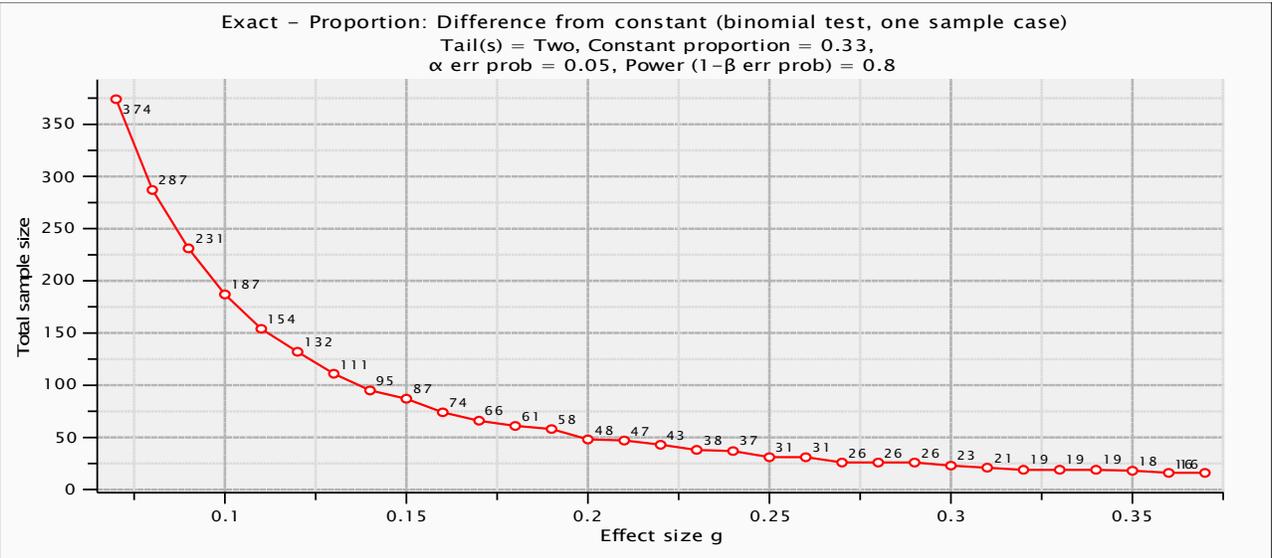
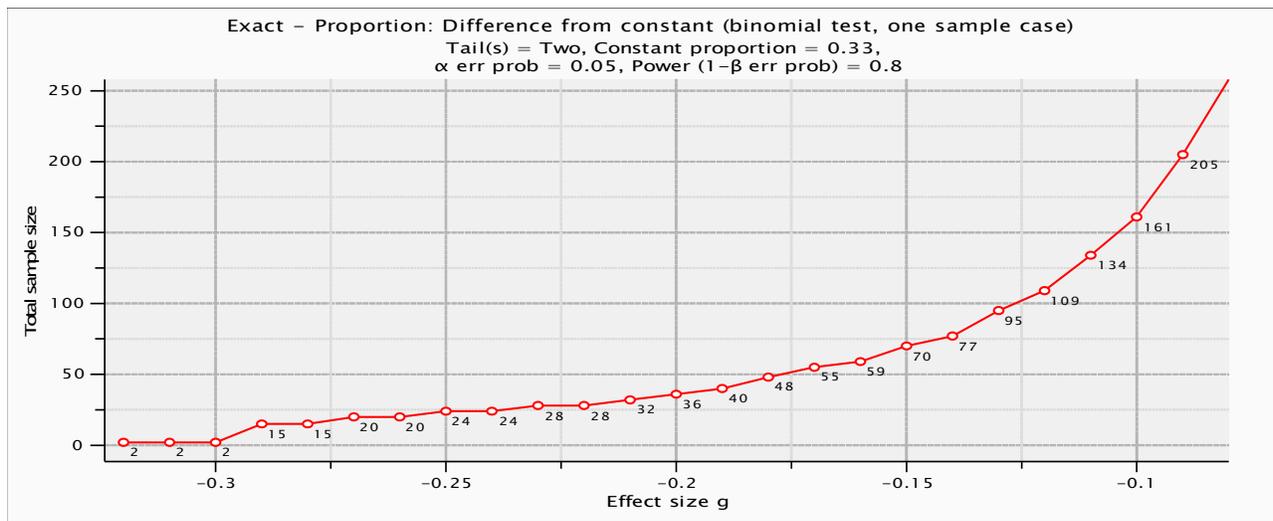


Figura 16: Efecto del tamaño de muestra en la inferencia estadística

Las gráficas de la figura 16 describe el tamaño mínimo de muestra para obtener $\alpha=5\%$ y $\beta=20\%$. según la desviación observada respecto al modelo (33% de mutantes en todos los sitios). α es la probabilidad de que nuestra prueba concluya erróneamente que la proporción de mutantes en un posición está sesgada cuando en realidad es efecto del muestreo (falso positivo). β es la probabilidad de que la prueba concluya que no existe sesgo en una posición cuando en realidad sí lo hay (falso negativo).

Como se espera que el que exista sesgo sea un evento más bien raro, en general se acepta que β sea mayor que α . La primera gráfica explora tamaños de efecto g entre -0.32 y -0.8 (de 1% a 25% de frecuencia de sustitución observada). Así mismo la segunda gráfica explora tamaños de efecto g entre 0.07 y 0.37 (de 40% a 70% de frecuencia de sustitución observada).

Con el actual tamaño de muestra $N=15$ en PJET solo sesgos muy evidentes como V49L (11/15 observado contra 5/15 esperado) pueden alcanzar este nivel de certeza. La única forma de poder tener más certeza sobre nuestras predicciones, así como poder usar criterios más estrictos, es aumentar considerablemente el tamaño de muestra ($N=200$ sería un buen comienzo).

Comparación entre PJET y LB

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de cada mutación entre las variantes con la librería clonada en el plásmido pJET y aquellas donde se clona en el plásmido PZE12, ambas crecidas en LB se busca elucidar su efecto en la toxicidad. Una mutación poco frecuente en PZE12 como a L53Q, se explica por el hecho de que también es poco frecuente en pJET, indicando que existe un sesgo en la librería. Una mutación con mayor proporción en PZE12 podría indicar actividad PTS, mientras que una con menor indicaría que es desventajosa para el (crecimiento probablemente es tóxica).

mutación	binomial	p-fisher
K12P	0,9961	0,1663
L13N	0,4791	1,0000
A17T	0,4122	1,0000
M21A	0,1606	0,4939
F24V	0,8653	0,7285
E25K	0,9708	0,4688
Q28K	0,9991	0,1451
V49L	0,1802	0,7120
I50F	0,9205	0,7120
A51K	0,9716	0,6074
L53Q	0,8857	1,0000
M54T	0,7767	1,0000
D56G	0,8147	0,7325
A58T	0,9424	0,4905

Tabla 4: Comparación entre PJET y LB

La segunda columna muestra el P-valor obtenido a partir de una distribución binomial para cada mutación. Esta prueba infiere sobre que tan probable es que las diferencias en las proporciones de sustitución observadas entre las dos condiciones se deban al azar. Se marcan con verde las mutaciones que ayudaron significativamente al crecimiento en LB ($p < 0.05$). Al corregir para el tamaño pequeño de muestra con una prueba de Fisher(95) se pierde la significancia estadística (tercera columna). De este estudio se concluye que el efecto de estas mutaciones en el crecimiento de la cepa 2Δ en LB es pequeño. Un mayor número de muestras sin duda es necesario para aseverar esto con certeza.

Comparación entre LB y MTL

Comparar la frecuencia de ocurrencia de cada mutación entre las variantes con la librería clonada en el plásmido PZE12 aisladas de medio LB y aquellas aisladas en MTL nos dará una inferencia sobre la aportación, positiva o negativa, de esa mutación al crecimiento celular, y por ende a la actividad del sistema PTS.

mutación	binomial	P-fisher
K12P	0.0161	0.0730
L13N	0.0078	0.0267
A17T	0.3784	0.6372
M21A	0.7314	1.0000
F24V	0.5000	1.0000
E25K	0.1078	0.3548
Q28K	0.7734	1.0000
V49L	0.5557	1.0000
I50F	0.9839	0.2016
A51K	0.9980	0.0664
L53Q	0.8221	1.0000
M54T	0.1736	0.3623
D56G	0.8264	1.0000
A58T	0.8922	0.6592

Tabla 5: Comparación entre LB y MTL

La segunda columna muestra el P-valor obtenido a partir de una distribución binomial para cada mutación. Esta prueba infiere sobre que tan probable es que las diferencias en las proporciones de sustitución observadas entre las dos condiciones (LB y manitol) se deba al azar. Se marcan con verde las mutaciones que ayudaron significativamente al crecimiento en manitol y con rojo las que perjudicaron ($p < 0.1$). Al corregir para el tamaño pequeño de muestra con una prueba de Fisher (tercera columna) solo se conserva significancia estadística en dos posiciones. En particular la mutación A51K también fue descrita por el método de docking molecular como importante para la actividad PTS en MM/MTL.

MODELO

MUT\prueba T	Manitol	glucosa	manosa
K12P	3.58	-9.86	-6.27
L13N	-0.21	0.44	0.84
A17T	-2.83	3.34	-0.83
M21A	0.75	-2.27	0.05
F24V	5.36	-6.17	0.76
E25K	1.72	26.59	23.3
Q28K	-1.4	13.71	12.43
V49L	0.21	0.78	-0.44
I50F	-0.7	5.43	-1.49
A51K	6.22	12.26	8.8
L53Q	1.02	1.5	1.22
M54T	-9.46	-1.79	-0.99
D56G	2.97	-2.71	4.92
A58T	0.58	2.9	1.67

Tabla 6: Modelo del aporte de cada mutación a la actividad HPr

Tras realizar los pasos descritos en el diseño del modelado computacional se propuso un valor para la aportación de cada uno de los 14 aminoácidos mutados a la interacción de HPr con las tres EIIA de las que existe estructura cristalina. El valor se obtiene con una prueba t de Student(94) (se evaluó también con una prueba t de Welch(96) para varianzas diferentes y el resultado fue idéntico). Se tomó ± 3 como valor de corte ($p=0.003$) para definir significancia estadística. Los valores mayores a 3 (en verde) indican que en esa posición es ventajoso el codón mutante (el de HPr), los menores a -3 (en rojo) indican que el codón silvestre (el de NPr) es ventajoso para la interacción.

Este modelo es congruente con los resultados experimentales y confirma que la mutación A51K es relevante para la actividad. También el modelo propone que la cepa CPr6 no tiene actividad en manitol ya que le falta la mutación A51K y/o le sobra la M54T. Finalmente, estos perfiles de aportación energética sugieren que la interacción HPr:EII^{Mtl} parece tener una orientación ligeramente distinta a HPr:EII^{Glc} o HPr:EII^{Man}.

CONCLUSIONES

Construimos una librería binaria de un gen completo usando oligonucleótidos sintetizados con la técnica de separación de resinas. Dicha librería presentó una distribución de mutaciones cercana a la esperada y nos permitió, por lo menos en el caso de la interacción con EII^{Md}, elucidar la importancia de algunos aminoácidos a la actividad HPr. Incluso con un tamaño de muestra pequeño fue posible identificar la mutación A51K como importante para la actividad PTS y la mutación L13N como detrimental .

Los resultados de docking molecular son congruentes con los obtenidos experimentalmente, en particular la mutación A51K también fue identificada como importante para la actividad PTS en manosa, manitol y glucosa. Esto es congruente con el artículo adjunto ya que esta sustitución también está presente en la cepa CPr6 que crece bien en manosa y glucosa (pero no en manitol).

Ninguna de las 14 mutaciones es estrictamente necesaria para la actividad PTS en ninguno de los medios probados. Existen múltiples subconjuntos de estas catorce mutaciones que tienen actividad y algunas mutaciones parece ser más importantes en algunas selecciones que otras (E25K parece aportar mucho a la actividad en manosa y glucosa, pero poco en manitol).

PERSPECTIVAS

Ya que el tamaño de muestra afecta la confianza en las pruebas estadísticas, es indispensable incrementarlo. Sin embargo, el número de secuencias necesarias para inferir la contribución a la actividad PTS de algunas de las sustituciones es tan elevado que no es práctico obtenerlas por

secuenciación de Sanger. Un método usando secuenciación masiva como el propuesto en este trabajo resolvería este problema al obtener millones de secuencias en cada medio de selección. Estos experimentos se están realizando actualmente.

La construcción de la mutante sencilla A51K o de cualquiera de las variantes propuestas por el docking nos dará un mejor entendimiento de la interacción HPr-EIIA.

El comprender plenamente la comunicación entre los sistemas PTS y PTS^{Ntr} así como entender las interacciones entre HPr y sus parálogos con las diversas EIIA nos permitirá regular el flujo de carbono y en especial respecto al orden y velocidad de consumo de los azúcares PTS.

Metodología secuenciación masiva

La librería binaria solo tiene dos regiones variantes (ver figura 17. las mutaciones están marcadas en naranja). Usando los oligonucleótidos marcados en azul para amplificar con PCR se genera un oligonucleótido de 218 bp que podría ser secuenciado por illumina pair-end 2x75 (regiones en naranja) o por ion torrent (el producto completo). En nuestro caso se amplificaría por PCR la sección central del gen de un plásmido proveniente de selección en una fuente de carbono particular. El primer Forward contiene una etiqueta que permitirá saber de qué selección viene esta molécula en particular. El oligonucleótido reverse tiene una etiqueta que codifica para el tiempo en que se tomó la muestra. El producto de PCR de 218bp purificado se mezclará con los provenientes de otras selecciones y tiempos y serán secuenciados en una sola reacción.

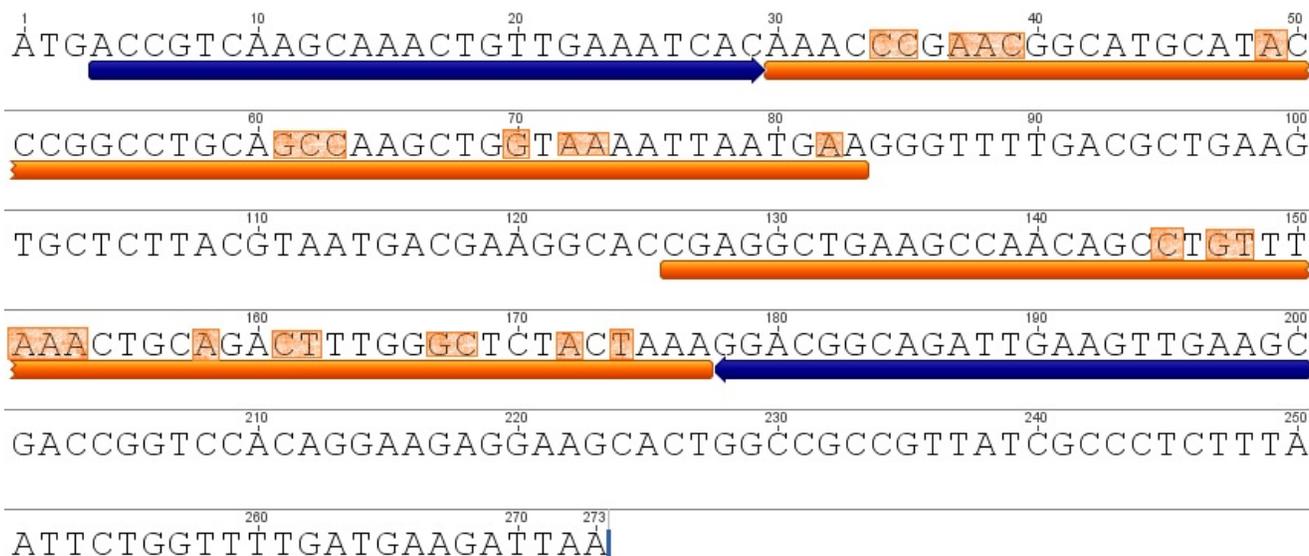


Figura 17: Regiones variables de la librería binaria

Con el fin de poder contener fácilmente los errores de secuenciación se diseñaron estas etiquetas con información redundante. Cada etiqueta es de 7 pares de bases, las primeras tres identifican ya sea el tiempo o la selección. Ninguna mutación sencilla puede transformar una en otra y darnos un falso positivo. Las siguientes cuatro se obtienen a partir de operaciones binarias con las tres primeras bases. De esta forma si una base está mutada hay forma de recuperar la información.

Las funciones binarias son:

Función {+} (X {+} Y = Z)			Función {sii} (X {sii} Y = Z)		
X	Y	Z	X	Y	Z
A	A	A	A	A	C
	C	C		C	A
	T	G		T	T
	G	T		G	G
C	A	C	C	A	A
	C	A		C	C
	T	T		T	G
	G	G		G	T
T	A	G	T	A	T
	C	T		C	G
	T	A		T	C
	G	C		G	A
G	A	T	G	A	G
	C	G		C	T
	T	C		T	A
	G	A		G	C

Tabla 7: Funciones binarias

Con estas funciones las 7 bases de la etiqueta se definieron 1,2,3, 1 {+} 2 , 2 {+} 3, 3 {sii} 1 y 1 {ssi}2.

Para evaluar el cambio en la abundancia relativa de las variantes se planea extraer muestras del primer cultivo en cada medio de selección a diferentes densidades ópticas (0.2 ; 0.5 ; 1.0 y 1.0 + 3h). A esta muestra se le realizará PCR de cultivo con los oligonucleótidos correspondientes para el medio de selección y el tiempo. También se obtendrá un PCR del medio en LB (tiempo 0, sin selección) con la intención de normalizar y poder capturar los cambios en la población de secuencias.

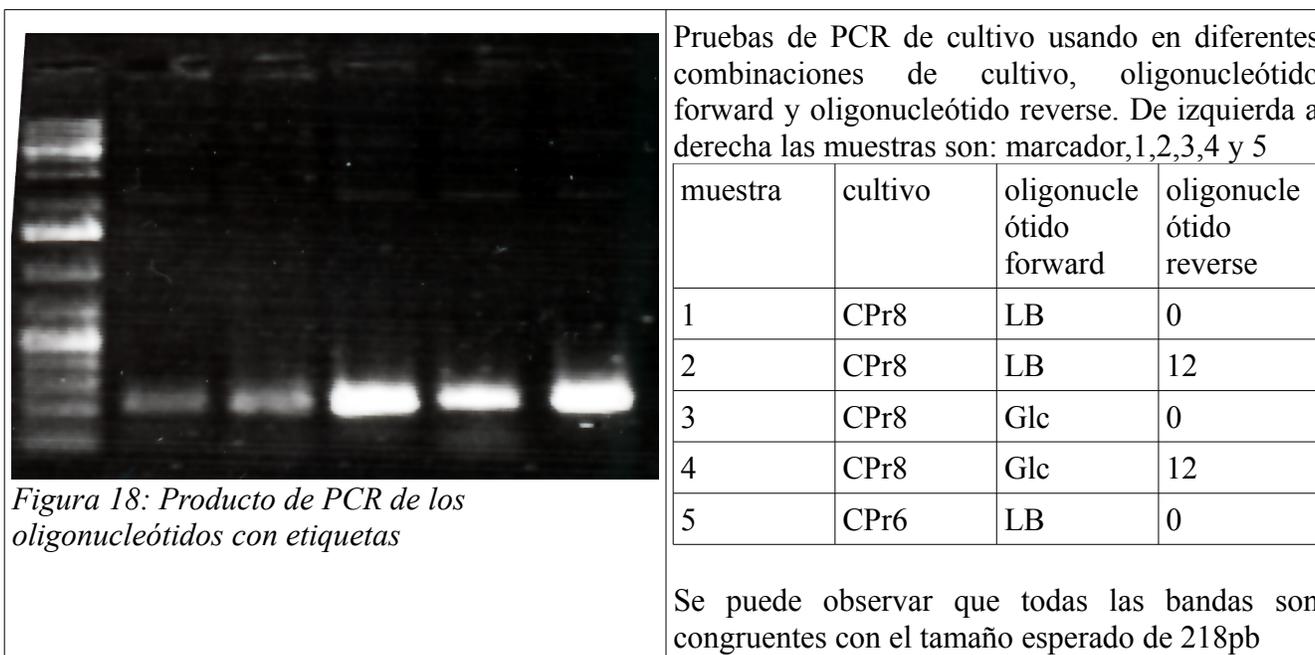


Figura 18: Producto de PCR de los oligonucleótidos con etiquetas

Se planea purificar estos 25 PCR (6 medios x 4 tiempos +tiempo 0), normalizarlos y secuenciarlos en una sola reacción del chip 316 de ion torrent.

MÉTODOS

Cepas

Se usaron las cepas descritas en el artículo (MC1061 (92) y 2delta(86)).

Medios

LB

El medio LB se preparó según describe Bertani (97) . En caso de necesitar antibiótico se le agregó una solución stock de ampicilina para llegar a una concentración final de 200µg/ml. En caso de ser sólido se le agregó agar para llegar a una concentración de 1.5%.

A 900ml de H₂O agregar:

20g	Tryptona
5g	Extracto de levadura
2ml	5M NaCl
2.5ml	1M KCl
10ml	1M MgCl ₂
10ml	1M MgSO ₄
20ml	1M glucosa

Aforar a 1L con H₂O ,esterilizar en la autoclave.

M9

El medio minino M9 se preparó según describe Adams (98). En caso de necesitar antibiótico se le agregó una solución stock de ampicilina para llegar a una concentración final de 200µg/ml. En caso de ser sólido se le agregó agar para llegar a una concentración de 1.5%. A menos que se indique de otra forma, se usó una concentración final de 1g/l para todas las fuentes de carbono.

Sales m9(5X)

A 800ml agregar:

64g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

15g KH_2PO_4

2.5g NaCl

5.0g NH_4Cl

Agitar hasta disolver. Aforar a 1000ml con H_2O . Esterilizar en la autoclave.

Medio mínimo M9

A 700ml de H_2O (estéril) agregar:

200ml sales M9

2ml 1M MgSO_4 (estéril)

Aforar a 1000ml con H_2O . Esterilizar en la autoclave.

SOC

El medio SOC se preparó según describe Hanahan (99) .

A 900ml de H_2O se agregan:

20g tryptona

5g extracto de levadura

2ml 5M NaCl .

2.5ml 1M KCl .

10ml 1M MgCl_2

10ml 1M MgSO₄

20ml 1M glucosa

Aforar a 1000ml con H₂O. Esterilizar en la autoclave.

GYT

El medio GYT se preparó según descrito por Tung(100) .

A 70 ml de H₂O se agregan:

0.25g tryptona

0.125g extracto de levadura

10ml glicerol 100%

Aforar a 100ml con H₂O. Esterilizar por filtro de 0.22µm.

Otros

BufferF

600 mM tris-HCl, 150 mM NH₄PO₃ , 20 mM MgCl₂, pH 9

dNTP's

2.5mM ATP, 2.5mM CTP, 2.5mM TTP, 2.5mM GTP.

Oligonucleótidos split resin

Para armar la librería se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido	secuencia
forward	CGA GAA TTG TGA GCG GAT AAC
R1	CTT GAC GGT CAT GGT ACC TTT C
F2*	G ACC GTC AAG CAA ACT GTT GAA ATC ACA AAC [AAG/CCG] [CTG/AAC] GGC ATG CAT [GCC/ACC] CGG CCT GCA
R3*	TAA GAG CAC TTC AGC GTC AAA ACC [CTG/CTT] CAT TAA [TTC/TTT] [AAA/TAC] CAG CTT [CAT/GGC] TGC AGG CCG
F4	AGT GCT CTT ACG TAA TGA CGA AGG CAC CGA GGC TGA AGC CAA C
R5*	AAT CTG CCG TCC TTT [GGC/AGT] AGA [ATC/GCC] CAA [CAT/AGT] [CAG/CTG] CAG [CGC/TTT] [AAT/AAA] [AAC/CAG] GCT GTT GGC TTC A
F6	ACG GCA GAT TGA AGT TGA AGC GAC CGG TCC ACA GGA AGA GGA AGC ACT GGC CGC CGT T
reverse	GAC AAA CAA CAG ATA AAA CGA AAG G

Tabla 8: Oligonucleótidos para armar la librería

Los oligonucleótidos marcados con * son aquellos sintetizados por el método de separación de resina.

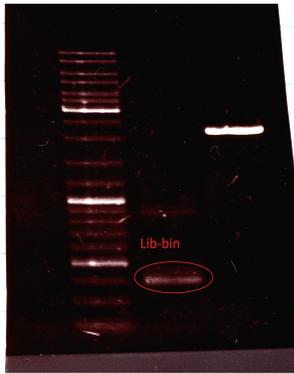
Armado de la librería

La librería se armó a partir de las mitades del gen (H1 y H2) proporcionadas por Filiberto Sánchez en un PCR con los siguientes ingredientes:

H1	10µl
H2	10µl
oligonucleótido forward (10pm/µl)	4µl
oligonucleótido reverse (10pm/µl)	4µl
dNTP's	10µl
bufferF	10µl
taq(2U/µl)	5µl
H2O	47µl

Se usó una maquina “GeneAmp PCR System 9700” con el programa: 95°C x 5min ,(95°C x 1min ,

60°C x 1min, 72°C x 1min) *30, 72°C x 5 min.



Análisis del producto de PCR por gel de agarosa. El tamaño del fragmento observado concuerda con el esperado para la librería binaria de NPr (400bp)

Plásmido PZE12-TrpF-LoxP

El plásmido PZE12-NPr se digirió mezclando:

50µl	plásmido
5µl	buffer 2(new ingland biolab)
1µl	HindIII
1µl	EcoRI

Se dejó reposar a 37°C toda la noche. Se corrió la muestra en gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio y se cortó la banda correspondiente al plásmido lineal sin inserto (+/- 3000bp). Esta banda se purificó con columna de fibra de vidrio (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuencia TrpF-LoxP(101) (GAATTCATATGCATCATCATCATCACGGGGAG
AATAAGGTATGTGGCCTGACGCGTGGGCAAGATGCTAAAGCAGCTTATGACGCGGGCGCGA
TTTACGGTGGGTTGATTTTTGTTGCGACATCACCGCGTTGCGTCAACGTTGAACAGGCGCA
GGAAGTGATGGCTGCGGCACCGTTGCAGTATGTTGGCGTGTTCGCAATCACGATATTGCCG
ATGTGGTGGACAAAGCTAAGGTGTTATCGCTGGCGGCAGTGCAACTGCATGGTAATGAAGA
ACAGCTGTATATCGATACGCTGCGTGAAGCTCTGCCAGCAGGAGGGTTCGACCATAACTTCGT

ATAATGTATACTATACGAAGTTATCCTCGAGCGGTGGCCATGTTGCCATCTGGAAAGCATTAAGCGTTCGGTGAAACCCTGCCCCGCCGCGAGTTTCAGCACGTTGATAAATATGTTTTAGACAA
CGGCCAGGGTGGAAGCGGGCAACGTTTTGACTGGTCACTATTAAATGGTCAATCGCTTGGC
AACGTTCTGCTGGCGGGGGGCTTAGGGCGCAGATAACTGCGTGGAAGCGGCACAAACCGGC
TGCGCCGGACTTGATTTTAATTCTGCTGTAGAGTCGCAACCGGGCATCAAAGACGCACGTC
TTTTGGCCTCGGTTTTCCAGACGCTGCGCGCATATTAATGAGCTAGCGGCAAACCAATCCAA
GCTT) fue donada por Humberto Flores en forma ya digerida.

La ligación se realizó en la siguiente mezcla:

PZE12	5µl
TrpF-Loxp	2µl
bufferF	2µl
H ₂ O	10µl
ligasa T4	1µl

Se reposó a 18°C durante 12 horas.

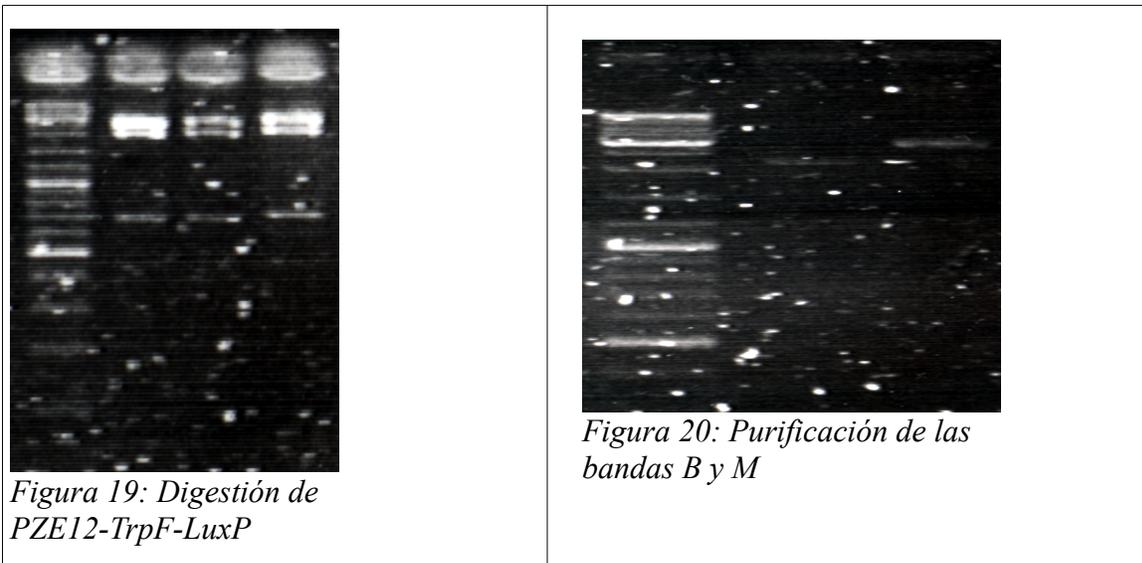
La mezcla de ligación se trató con butanol para remover sales de acuerdo al protocolo siguiente:

- 1.-Agregar 700 µl de butanol a la mezcla.
- 2.-Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
- 3.-Remover el sobrenadante con una micropipeta con cuidado de no desechar la pastilla.
- 4.-Secar la mezcla a 60°C al vacío y centrifugar hasta quedar completamente seco.
- 5.-Resuspender en 10 µl de H₂O.

Purificar plásmido PZE12

El plásmido PZE12-TrpF-LuxP se transformó en células MC1061 y se crecieron en cajas LB/AMP. Se inoculó una colonia en LB líquido y se creció en condiciones ordinarias, para finalmente extraer plásmido con una columna comercial (Roche).

PZE12-TrpF-LuxP tras digestión con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (). Nótese que tras liberar el inserto existen dos bandas del gen digerido



El plásmido PZE12-TrpF-luxP se digirió en las mismas condiciones de PZE12-NPr. Esta digestión no es completa y da dos bandas (figura 19). Para poder elucidar el origen de estas bandas, ambas se purificaron a la grande se le denominó M y a la chica B (figura 20). M fue cuantificada en 30ng/μl y B en 15ng/μl. Se hicieron ligaciones en diversas concentraciones.

Las mezclas de ligación fueron transformadas en la cepa MC1061 y se usaron dos controles adicionales C- que fueron células electroporadas sin DNA y C-- que fueron células electrocompetentes sin

electroporar.

(μg)	0B	1B	2B	3B	0M	1M	2M	3M
B	5	5	5	5	0	0	0	0
M	0	0	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5
PCR	0	1	2	3	0	1	2	3
buffer	2	2	2	2	2	2	2	2
ligasa	1	1	1	1	1	1	1	1
agua	12	11	10	9	14,5	13,5	12,5	11,5

Se crecieron 10 μl en cajas LB+AMP, y el conteo de colonias fue el siguiente:

C-- 212 (son muy pequeñas)
C- 9
0M 521
1M 375
2M 189
3M 78
0B 19
1B 108
2B 126
3B 72

Estos números sugieren que el plásmido ligado sobre sí mismo corresponde la banda M.

Se usaron 2 μl de esta mezcla tratada para transformar células MC1061 en un equipo bio-rad[®] a 1.8 Kv/cm².

Las células se recuperaron en medio SOC a 37°C durante una hora. Después se platearon 2 μl en medio LB+AMP sólido y se creció a 37°C toda la noche. Finalmente se picó una colonia de tamaño mediano para inocular 5ml de LB+AMP, que después de crecer a 37°C con agitación durante 8 horas se usó para purificar plásmido con una columna de fibra de vidrio (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La construcción se verificó, tras una digestión con las mismas condiciones, en un gel de agarosa al 1.5%.

Digerir

Tanto la librería como el plásmido se digirieron con las siguientes proporciones:

50µl	plásmido
5µl	buffer 2(new ingland biolab®)
1µl	HindIII
1µl	EcoRI

Se purificó con gel de agarosa al 1.5% usando una columna de fibra de vidrio (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligar

La ligación se realizó en un volumen de 20 µL con los siguientes ingredientes:

PZE12	5µL (15ng/µL)
inserto	2µL
buffer	2µL
ligasa	1µL
H ₂ O	10µL

Se trató la muestra usando butanol (método antes descrito).

Para preparar la librería binaria se mezclaron las ligaciones siguientes en estas proporciones :

Lib1.5.2	4 µl
Lib3.1	18.3 µl
Lib4.1	10.4 µl
Lib3.2	15.5 µl
Lib1.3.1	1 µl

Esto con el fin de normalizar a 1,000,000 moléculas de plásmido por clona por cada 4µl.

Verificar librería

La librería purificada se ligó al plásmido PJET1.2 usando el kit comercial “CloneJET PCR Cloning Kit” de “Thermo scientific”® siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias elegidas se crecieron en 5ml LB+AMP a 37°C con agitación por 12 horas y se extrajo plásmido usando el kit comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” de ROCHE® según las instrucciones del fabricante. Se mandaron secuenciar estos plásmidos en la unidad de secuenciación del IBT usando el oligonucleótido forward incluido en el kit PJET.

Transformar

Se usaron células 2Δ electro competentes producidas con el siguiente protocolo:

- 1.- Se estriaron en LB+AMP células de un vial congelado a -70°C.
- 2.- Se incubó toda la noche a 37°C.
- 3.- Se tomó una colonia y se estrió e incubó de nuevo en LB+AMP a 37°C.
- 4.- Se repitió el proceso hasta obtener un fenotipo uniforme (3 veces).
- 5.- Se inocularon 200 ml de LB 1/2 NaCl y se incubó con agitación a 37°C durante 3 horas.
- 6.- Se midió la absorbancia a 600 nm y cada 15 minutos hasta que llegó a 0.89 .

- 7.- Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 8.- La pastilla se resuspendió en 200 ml de glicerol 10% frío (Esto se hace lentamente a mano en frío para no lastimar las células).
- 9.- Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 10.- La pastilla se resuspendió con el mismo procedimiento en 100 ml de glicerol 10% frío.
- 11.- Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 12.- La pastilla se resuspendió con el mismo procedimiento en 80 ml de glicerol 10% frío.
- 13.- Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 14.- Se resuspendió la pastilla en 1ml glicerol 10% + 2ml medio GYT.
- 15.- Se hicieron alicotas de 60µl y se congelaron a -70°C.

La transformación se hizo en un equipo Bio-rad® “micropulser” con celdas de aluminio de 1mm de ancho a 1.8 Kv/Cm².

Oligonucleótidos secuenciación masiva

los oligonucleótidos usados para marcar el medio de selección son:

FORDUL	ÀGTGCGTACCÇGTCAAGCAAÀCTGTTGAAAÏCAC
FORGLC	TGGCAAACCGTCAAGCAAACÏGTTGAAAÏCAC
FORLB	CCCAACCACCGTCAAGCAAACÏGTTGAAAÏCAC
FORMAN	GTAÇTTAACCGTCAAGCAAACÏGTTGAAAÏCAC
FORMTL	AAAAACCAACCGTCAAGCAAACÏGTTGAAAÏCAC
FORSBT	TCAGCGTACCÇGTCAAGCAAACÏGTTGAAAÏCAC

Tabla 9: Oligonucleótidos forward con tag

Los usados para marcar el tiempo son:

REV0	A	T	G	T	C	T	G	C	G	C	T	T	C	A	A	C	T	T	C	A	A	T	C	T	G	C	C	G	T	C	C
REV12	C	A	G	C	G	G	A	C	G	C	T	T	C	A	A	C	T	T	C	A	A	T	C	T	G	C	C	G	T	C	C
REV24	C	T	T	G	A	T	T	C	G	C	T	T	C	A	A	C	T	T	C	A	A	T	C	T	G	C	C	G	T	C	C
REV48	G	G	C	A	T	G	C	C	G	C	T	T	C	A	A	C	T	T	C	A	A	T	C	T	G	C	C	G	T	C	C

Tabla 10: Oligonucleótidos reverse con tag

Estos oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de síntesis de DNA del IBT.

Platear cajas en medio sólido

Se platearon 100µl de cultivo en cajas de medio mínimo M9+AMP con la fuente de carbono correspondiente o LB+ AMP usando un triángulo de vidrio.

Seleccionar y extraer plásmido de 96 cepas

Las colonias elegidas se crecieron en 5ml LB+AMP a 37°C con agitación por 12 horas y se extrajo plásmido usando el kit comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” de ROCHE® según las instrucciones del fabricante.

Secuenciar

Se mandaron secuenciar estos 96 plásmidos en la unidad de secuenciación del IBT usando el oligonucleótido forward.

PCR de cultivo

Para las pruebas del PCR de cultivo se tomó 1.5ml de cultivo (CPr8 o CPr6) LB+AMP crecido a 37°C por 12 horas. Se centrifugó a 13000 rpm por un minuto y se descartó el sobrenadante. Con una micropipeta se tomó una pequeña cantidad de la pastilla y se añadió a una mezcla de PCR conteniendo:

dNTP's	2.5µl
bufferF	2.5µl
Taq(2u/µl)	2.5µl
oligonucleótido forward(10pmol/µl)	2.5µl
oligonucleótido reverse(10pmol/µl)	2.5µl
H ₂ O	12.5µl

Se usó una maquina “GeneAmp PCR System 9700” con los siguientes parámetros: 95°C x 5min ,(95°C x 1min ,70°C x 1min, 72°C x 1min) *30, 72°C x 5 min.

La existencia del producto se verifico por gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Estadística

Las distribuciones binomiales, las pruebas t y las pruebas de Welch fueron calculadas usando el programa Calc de OpenOffice. Las pruebas de Fisher fueron calculadas en R(102). Las gráficas de la figura 16 fueron hechas usando el software G*Power 3.1 (103).

Secuencias

Todas las figuras donde se muestras secuencias fueron hechas usando el software Geneious 4.8.5 (104).

BIBLIOGRAFÍA

1. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 1961 Jun;3:318–56.
2. Stephenson M, Gale EF. The adaptability of glucozymase and galactozymase in *Bacterium coli*. *Biochem. J.* 1937 Aug;31(8):1311–5.
3. Monod J. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann Cie. 1942;
4. Contesse G, Crépin M, Gros F, Ullmann A, Monod J. On the Mechanism of Catabolite Repression. 1969;
5. Kundig W, Ghosh S, Roseman S. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1964 Oct;52:1067–74.
6. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 1993 Sep;57(3):543–94.
7. Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier Jr MH. The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001;3(3):329–46.
8. Hu K-Y, Saier MH Jr. Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* 2002 Sep;153(7):405–15.
9. Weigel N, Kukuruzinska MA, Nakazawa A, Waygood EB, Roseman S. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 1982 Dec 10;257(23):14477–91.
10. Chauvin F, Fomenkov A, Johnson CR, Roseman S. The N-terminal domain of *Escherichia coli* enzyme I of the phosphoenolpyruvate/glycose phosphotransferase system: molecular cloning and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996 Jul 9;93(14):7028–31.
11. Fomenkov A, Valiakhmetov A, Brand L, Roseman S. In vivo and in vitro complementation of the N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system by the cloned C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998 Jul 21;95(15):8491–5.
12. Liao DI, Silverton E, Seok YJ, Lee BR, Peterkofsky A, Davies DR. The first step in sugar transport: crystal structure of the amino terminal domain of enzyme I of the *E. coli* PEP: sugar phosphotransferase system and a model of the phosphotransfer complex with HPr. *Struct. Lond. Engl.* 1993. 1996 Jul 15;4(7):861–72.

13. Garrett DS, Seok YJ, Liao DI, Peterkofsky A, Gronenborn AM, Clore GM. Solution structure of the 30 kDa N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by multidimensional NMR. *Biochemistry (Mosc.)*. 1997 Mar 4;36(9):2517–30.
14. Deutscher J, Pevec B, Beyreuther K, Kiltz HH, Hengstenberg W. Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry (Mosc.)*. 1986 Oct 21;25(21):6543–51.
15. Azuaga AI, Neira JL, van Nuland NAJ. HPr as a model protein in structure, interaction, folding and stability studies. *Protein Pept. Lett.* 2005 Feb;12(2):123–37.
16. Waygood EB. The structure and function of HPr. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 1998;76(2-3):359–67.
17. Williams DC, Cai M, Suh J-Y, Peterkofsky A, Clore GM. Solution NMR Structure of the 48-kDa IIMannose-HPr Complex of the *Escherichia coli* Mannose Phosphotransferase System. *J. Biol. Chem.* 2005 May 27;280(21):20775–84.
18. Wang G, Louis JM, Sondej M, Seok YJ, Peterkofsky A, Clore GM. Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal transducing proteins HPr and IIA_{Glucose} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Embo J.* 2000;19(21):5635–49.
19. Cornilescu G, Lee BR, Cornilescu CC, Wang G, Peterkofsky A, Clore GM. Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the cytoplasmic A domain of the mannitol transporter IIMannitol and HPr of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 2002 Nov 1;277(44):42289–98.
20. Garrett DS, Seok YJ, Peterkofsky A, Gronenborn AM, Clore GM. Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr. *Nat. Struct. Biol.* 1999 Feb;6(2):166–73.
21. Bringhurst RM, Gage DJ. Control of inducer accumulation plays a key role in succinate-mediated catabolite repression in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 2002 Oct;184(19):5385–92.
22. Miwa Y, Nagura K, Eguchi S, Fukuda H, Deutscher J, Fujita Y. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* gnt operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* 1997 Mar;23(6):1203–13.
23. Pas HH, Robillard GT. S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochemistry (Mosc.)*. 1988 Aug 9;27(16):5835–9.
24. Saier MH, Hvorup RN, Barabote RD. Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem. Soc. Trans.* 2005 Feb;33(Pt 1):220–4.
25. Begley GS, Hansen DE, Jacobson GR, Knowles JR. Stereochemical course of the reactions

catalyzed by the bacterial phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system. *Biochemistry (Mosc.)*. 1982 Oct 26;21(22):5552–6.

26. Chen Y, Reizer J, Saier MH Jr, Fairbrother WJ, Wright PE. Mapping of the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIAGlc. *Biochemistry (Mosc.)*. 1993 Jan 12;32(1):32–7.
27. Wang G, Louis JM, Sondej M, Seok Y-J, Peterkofsky A, Clore GM. Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal transducing proteins HPr and IIAGlucose of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Embo J*. 2000 Nov 1;19(21):5635–49.
28. Cornilescu G, Lee BR, Cornilescu CC, Wang G, Peterkofsky A, Clore GM. Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the cytoplasmic A domain of the mannitol transporter II mannitol and HPr of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem*. 2002 Aug 28;M207314200.
29. Keyhani N, Rodgers ME, Demeler B, Hansen JC, Roseman S. Analytical sedimentation of the IIACHb and IIBChb proteins of the *Escherichia coli* N,N'-diacetylchitobiose phosphotransferase system. Demonstration of a model phosphotransfer transition state complex. *J. Biol. Chem*. 2000 Oct 20;275(42):33110–5.
30. Rohwer JM, Postma PW, Kholodenko BN, Westerhoff HV. Implications of macromolecular crowding for signal transduction and metabolite channeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1998 Sep 1;95(18):10547–52.
31. Saier MH Jr, Cox DF, Feucht BU, Novotny MJ. Evidence for the functional association of enzyme I and HPr of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system with the membrane in sealed vesicles of *Escherichia coli*. *J. Cell. Biochem*. 1982;18(2):231–8.
32. Norris V, Gascuel P, Guespin-Michel J, Ripoll C, Saier MH Jr. Metabolite-induced metabolons: the activation of transporter-enzyme complexes by substrate binding. *Mol. Microbiol*. 1999 Mar;31(5):1592–5.
33. Francke C, Postma PW, Westerhoff HV, Blom JG, Peletier MA. Why the phosphotransferase system of *Escherichia coli* escapes diffusion limitation. *Biophys. J*. 2003 Jul;85(1):612–22.
34. Patel HV, Vyas KA, Li X, Savtchenko R, Roseman S. Subcellular distribution of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system depends on growth conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2004 Dec 14;101(50):17486–91.
35. Misset O, Brouwer M, Robillard GT. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of enzyme I. *Biochemistry (Mosc.)*. 1980 Mar 4;19(5):883–90.
36. Meadow ND, Mattoo RL, Savtchenko RS, Roseman S. Transient state kinetics of Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system of *Escherichia coli*: equilibrium and second-order rate constants for the phosphotransfer reactions with phosphoenolpyruvate and HPr.

Biochemistry (Mosc.). 2005 Sep 27;44(38):12790–6.

37. Dimitrova MN, Peterkofsky A, Ginsburg A. Opposing effects of phosphoenolpyruvate and pyruvate with Mg(2+) on the conformational stability and dimerization of phosphotransferase enzyme I from Escherichia coli. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2003 Sep;12(9):2047–56.
38. Robillard GT, Broos J. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999 Jul 6;1422(2):73–104.
39. Meins M, Zanolari B, Rosenbusch JP, Erni B. Glucose permease of Escherichia coli. Purification of the IIGlc subunit and functional characterization of its oligomeric forms. *J. Biol. Chem.* 1988 Sep 15;263(26):12986–93.
40. Spelbrink REJ, Kolkman A, Slijper M, Killian JA, de Kruijff B. Detection and identification of stable oligomeric protein complexes in Escherichia coli inner membranes: a proteomics approach. *J. Biol. Chem.* 2005 Aug 5;280(31):28742–8.
41. Deutscher J, Francke C, Postma PW. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006 Dec;70(4):939–1031.
42. Bordo D, van Monfort RL, Pijning T, Kalk KH, Reizer J, Saier MH Jr, et al. The three-dimensional structure of the nitrogen regulatory protein IANtr from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 1998 May 29;279(1):245–55.
43. Wang G, Peterkofsky A, Keifer PA, Li X. NMR characterization of the Escherichia coli nitrogen regulatory protein IANtr in solution and interaction with its partner protein, NPr. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2005 Apr;14(4):1082–90.
44. Meadow ND, Roseman S. Rate and equilibrium constants for phosphoryltransfer between active site histidines of Escherichia coli HPr and the signal transducing protein IIIIGlc. *J. Biol. Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33440–5.
45. Brückner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *Fems Microbiol. Lett.* 2002 Apr 9;209(2):141–8.
46. Liu M, Durfee T, Cabrera JE, Zhao K, Jin DJ, Blattner FR. Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 2005 Apr 22;280(16):15921–7.
47. Ihssen J, Egli T. Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing Escherichia coli confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization. *Environ. Microbiol.* 2005 Oct;7(10):1568–81.
48. Martínez-Antonio A, Collado-Vides J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003 Oct;6(5):482–9.

49. Saier MH Jr, Roseman S. Sugar transport. The *crr* mutation: its effect on repression of enzyme synthesis. *J. Biol. Chem.* 1976 Nov 10;251(21):6598–605.
50. Feucht BU, Saier MH Jr. Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1980 Feb;141(2):603–10.
51. Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas WA, Saier MH Jr. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004 Jun;186(11):3516–24.
52. Dai J, Lin S-H, Kemmis C, Chin AJ, Lee JC. Interplay between site-specific mutations and cyclic nucleotides in modulating DNA recognition by *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Biochemistry (Mosc.)*. 2004 Jul 20;43(28):8901–10.
53. Makman RS, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1965 Mar;240:1309–14.
54. Jackson RW, DeMoss JA. Effects of Toluene on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1965 Nov;90(5):1420–5.
55. Harwood JP, Peterkofsky A. Glucose-sensitive adenylate cyclase in toluene-treated cells of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 1975 Jun 25;250(12):4656–62.
56. Harwood JP, Gazdar C, Prasad C, Peterkofsky A, Curtis SJ, Epstein W. Involvement of the glucose enzymes II of the sugar phosphotransferase system in the regulation of adenylate cyclase by glucose in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1976 Apr 25;251(8):2462–8.
57. Hogema BM, Arents JC, Inada T, Aiba H, van Dam K, Postma PW. Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1997 May;24(4):857–67.
58. Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1993;62:749–95.
59. Reddy P, Hoskins J, McKenney K. Mapping domains in proteins: dissection and expression of *Escherichia coli* adenylate cyclase. *Anal. Biochem.* 1995 Nov 1;231(2):282–6.
60. Crasnier M, Danchin A. Characterization of *Escherichia coli* adenylate cyclase mutants with modified regulation. *J. Gen. Microbiol.* 1990 Sep;136(9):1825–31.
61. Aiba H. Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* 1985 Mar 10;260(5):3063–70.
62. Hanamura A, Aiba H. A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gene: positive autoregulation. *Mol. Microbiol.* 1992 Sep;6(17):2489–97.
63. Hanamura A, Aiba H. Molecular mechanism of negative autoregulation of *Escherichia coli* *crp* gene. *Nucleic Acids Res.* 1991 Aug 25;19(16):4413–9.

64. Thompson J, Torchia DA. Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 1984 Jun;158(3):791–800.
65. Rephaeli AW, Saier MH Jr. Regulation of genes coding for enzyme constituents of the bacterial phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 1980 Feb;141(2):658–63.
66. Park Y-H, Lee BR, Seok Y-J, Peterkofsky A. In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2006 Mar 10;281(10):6448–54.
67. Pas HH, Meyer GH, Kruizinga WH, Tamminga KS, van Weeghel RP, Robillard GT. ³¹P phospho-NMR demonstration of phosphocysteine as a catalytic intermediate on the *Escherichia coli* phosphotransferase system EIIMtl. *J. Biol. Chem.* 1991 Apr 15;266(11):6690–2.
68. Liberman E, Saffen D, Roseman S, Peterkofsky A. Inhibition of *E. coli* adenylate cyclase activity by inorganic orthophosphate is dependent on IIIglc of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986 Dec 30;141(3):1138–44.
69. Pflüger-Grau K, Görke B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol.* 2010 May;18(5):205–14.
70. Lee C-R, Cho S-H, Yoon M-J, Peterkofsky A, Seok Y-J. *Escherichia coli* enzyme IANtr regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007 Mar 6;104(10):4124–9.
71. Merrick MJ, Coppard JR. Mutations in genes downstream of the rpoN gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 1989 Dec;3(12):1765–75.
72. Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke H, Fischer HM. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (rpoN). *J. Bacteriol.* 1991 Feb;173(3):1125–38.
73. Köhler T, Alvarez JF, Harayama S. Regulation of the rpoN, ORF102 and ORF154 genes in *Pseudomonas putida*. *Fems Microbiol. Lett.* 1994 Jan 15;115(2-3):177–84.
74. Michiels J, Van Soom T, D’hooghe I, Dombrecht B, Benhassine T, de Wilde P, et al. The *Rhizobium etli* rpoN locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of rpoN, ptsN, and ptsA mutants. *J. Bacteriol.* 1998 Apr;180(7):1729–40.
75. Rabus R, Reizer J, Paulsen I, Saier MH Jr. Enzyme I(Ntr) from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *J. Biol. Chem.* 1999 Sep 10;274(37):26185–91.
76. Reizer J, Reizer A, Merrick MJ, Plunkett G 3rd, Rose DJ, Saier MH Jr. Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene.* 1996 Nov 28;181(1-2):103–8.

77. King ND, O'Brian MR. Evidence for direct interaction between enzyme I(Ntr) and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport. *J. Biol. Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21311–6.
78. Pflüger K, de Lorenzo V. Evidence of in vivo cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 2008 May;190(9):3374–80.
79. Wang G, Peterkofsky A, Keifer PA, Li X. NMR characterization of the *Escherichia coli* nitrogen regulatory protein IANtr in solution and interaction with its partner protein, NPr. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2005 Apr;14(4):1082–90.
80. Tian ZX, Li QS, Buck M, Kolb A, Wang YP. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2001 Aug;41(4):911–24.
81. Maheswaran M, Forchhammer K. Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. *Microbiol. Read. Engl.* 2003 Aug;149(Pt 8):2163–72.
82. Lee C-R, Koo B-M, Cho S-H, Kim Y-J, Yoon M-J, Peterkofsky A, et al. Requirement of the dephospho-form of enzyme IANtr for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol. Microbiol.* 2005 Oct;58(1):334–44.
83. Yuan J, Doucette CD, Fowler WU, Feng X-J, Piazza M, Rabitz HA, et al. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol. Syst. Biol.* [Internet]. 2009 Aug 18 [cited 2013 May 21];5(1). Available from: <http://www.nature.com/msb/journal/v5/n1/full/msb200960.html>
84. Doucette CD, Schwab DJ, Wingreen NS, Rabinowitz JD. α -Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 2011 Dec;7(12):894–901.
85. Ninfa AJ. Unnecessary Signaling: Poorly Named? *J. Bacteriol.* 2011 Sep 15;193(18):4571–3.
86. Santos YL los, Chan H, Cantu VA, Rettner R, Sanchez F, Zhang Z, et al. Genetic Engineering of the Phosphocarrier Protein NPr of the *Escherichia coli* Phosphotransferase System Selectively Improves Sugar Uptake Activity. *J. Biol. Chem.* 2012 Aug 24;287(35):29931–9.
87. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(12):6640.
88. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M-Y, et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Editor. Board John E Coligan Al. 2007 Nov;Chapter 2:Unit 2.9.
89. Ritchie DW, Venkatraman V. Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2010 Oct 1;26(19):2398–405.
90. Lutz R, Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via

the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 1997 Mar 15;25(6):1203–10.

91. Glaser SM, Yelton DE, Huse WD. Antibody engineering by codon-based mutagenesis in a filamentous phage vector system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1992 Dec 15;149(12):3903–13.
92. Casadaban MJ, Cohen SN. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1980 Apr;138(2):179–207.
93. Fontana L, Nuzzo M, Urbanelli L, Monaci P. General strategy for broadening adenovirus tropism. *J. Virol.* 2003 Oct;77(20):11094–104.
94. Student. The probable error of a mean. *Biometrika.* 1908;6:1–25.
95. Fisher RA. On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *J. R. Stat. Soc.* 1922 Jan;85(1):87.
96. Welch BL. THE GENERALIZATION OF “STUDENT”’S PROBLEM WHEN SEVERAL DIFFERENT POPULATION VARIANCES ARE INVOLVED. *Biometrika.* 1947;34(1-2):28–35.
97. Bertani G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1951 Sep 1;62(3):293–300.
98. Adams MH. *Bacteriophages.* New York, Interscience Publishers; 1959.
99. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557–80.
100. Lin Tung W, Chow K-C. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 1995 Apr;11(4):128–9.
101. Saab-Rincón G, Mancera E, Montero-Morán G, Sánchez F, Soberón X. Generation of variability by in vivo recombination of halves of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel protein. *Biomol. Eng.* 2005 Oct;22(4):113–20.
102. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. 2006; Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.144.5507>
103. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods.* 2007 May;39(2):175–91.
104. Biomatters. Geneious 4.8.5. Available from: <http://www.geneious.com/>
105. Saier Jr MH, Reizer J. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 1992;174(5):1433.