



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Ingeniería de las proteínas del sistema PTS en *Escherichia coli*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Yossef López de los Santos

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Xavier Soberón Mainero
Instituto de Biotecnología de la UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

**Dra. Elda Guadalupe Espín
Instituto de Biotecnología de la UNAM
Dr. Miguel Ángel Cevallos
Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM**

MÉXICO, D. F. mes Febrero, 2014



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.

La presente tesis se realizó en el grupo de trabajo del consorcio formado por los investigadores Gloria Saab Rincón, Joel Osuna Quintero y Xavier Soberón Mainero, adjunto al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM), ubicado en Cuernavaca, Morelos, México.

Gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca de Doctorado número 173803 concedida a Yossef López de los Santos.

Comité tutorial

Dr. Xavier Soberón Mainero
Director de tesis
Instituto de Biotecnología de la UNAM; Instituto Nacional de Medicina Genómica
(INMEGEN)

Dra. Elda Guadalupe Espín
Instituto de Biotecnología de la UNAM

Dr. Miguel Ángel Cevallos
Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM

Miembros del jurado del examen de grado

Dra. Nina Pastor Colón
Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

Dr. Otto Geiger
Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM

Dr. D. Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina UNAM

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología de la UNAM

Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Instituto de Biotecnología de la UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Xavier Soberón Mainero por permitirme explorar con libertad el campo de la ingeniería de proteínas en su grupo de trabajo.

A mi comité tutorial compuesto por la Dra. Elda Guadalupe Espín y el Dr. Miguel Ángel Cevallos muchas gracias por sus atinados consejos.

A la unidad de Docencia del IBt-UNAM (Jalil, Toño y Gloria) por todas las facilidades y el trato tan amable recibido de su parte, muchas gracias.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, que estuvieron formando parte del laboratorio del Dr. Juan Enrique Morett y el consorcio SOS (Saab-Osuna-Soberón) la pasé muy bien y aprendí muchas cosas con ustedes.

Un agradecimiento muy especial a mis amigos los doctores Katy Juárez López, Joel Osuna Quintero, Humberto Flores y Gloria Saab, así como a mi buen amigo Filiberto Sánchez, *hace calor bato!!!*

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi querida familia. Mi papa Antonio, mi mama Horalia, y mis hermanos Quevin y Edwin.

A Brenda por supuesto!!!!

ALGO PARA PENSAR

“Dadme errores fructíferos, llenos de semillas, llenos a reventar de sus propias correcciones. Podéis quedaros con vuestra estéril verdad”

Vilfredo Pareto

“Casi se puede definir al buen científico como la persona con el sentido común de discernir la pregunta más grande posible de contestar...y evitar los temas inútiles que suenan más imponentes”

Stephen Jay Gould

“Nada es tan peligroso para el progreso de la mente humana que suponer que nuestras ideas científicas son finales, que no existen misterios en la naturaleza, que nuestros triunfos son completos, y que no existen nuevos mundos por conquistar.....”

Humphrey Davy

Resumen

Se presenta un estudio acerca de las interacciones proteína-proteína de un grupo de proteínas fosfotransferasas conocidas como Sistema Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa (o PTS), el principal sistema de transporte de azúcares en *Escherichia coli*. En PTS la proteína llamada HPr funciona como una lanzadera de grupos fosforilos provenientes de la Enzima I o “EI” (primer elemento del sistema) hacia un grupo de distintas permeasas incorporadas a la membrana celular, que permiten el transporte selectivo de los diferentes azúcares hacia el interior de la célula. Como objetivo primario se evaluaron mutantes de la proteína NPr, una proteína paróloga a HPr (integrante de PTS) incapaz de suplir a HPr en la cascada de elementos fosforilables. Las variantes de NPr construidas con anterioridad por parte del grupo del Dr. Xavier Soberón Mainero, se evaluaron en diferentes regímenes limitantes (medio M9 con al menos 7 diferentes azúcares como fuentes de carbono únicas) de actividad *in vivo*. Logramos observar patrones de actividad diferencial entre las distintas variantes de NPr, algunas de ellas capaces de reemplazar perfectamente a HPr e incluso a superarla. Mediante análisis bioinformáticos evaluamos y discutimos la participación de los residuos sustituidos que ahora estaban formando parte de las nuevas interfaces formadas por las variantes de NPr. En consecuencia con los resultados que obtuvimos al rediseñar la cara de contacto de NPr, nos planteamos un objetivo secundario. Éste, contempló el desarrollo de quimeras de EI. Esta proteína es capaz de autofosforilarse a partir de fosfoenolpiruvato, rindiendo un grupo fosfato que posteriormente es transferido a HPr, con la cual inicia la serie de contactos proteína-proteína que caracteriza a PTS. Utilizamos como donador de un dominio de reconocimiento de ATP a la proteína “phosphoenolpyruvate synthetase” conocida como PEPS. Quisimos desarrollar quimeras de EI capaces de autofosforilarse a partir de ATP en vez de fosfoenolpiruvato. Para esto nos concentramos en rediseñar la interface formada por EI y el dominio exógeno de PEPS, así como en los conectores de dominios. Se presenta el diseño completo de diferentes tipos de quimeras de EI. Hasta el momento ya construimos algunas versiones de quimeras, pero no hemos encontrado ninguna funcional capaz de complementar el crecimiento en nuestro sistema de selección *in vivo*. Por lo tanto, parte del grupo del Dr. Xavier Soberón Mainero se concentra en realizar experimentos de “mutagénesis azarosa y sitio-dirigida” para seguir un esquema de *Evolución Dirigida de Proteínas* y tratar de seleccionar variantes funcionales.

Índice

Introducción.....	1
Sistema PTS.....	1
HPr/NPr.....	2
Ingeniería a nivel de Enzima I de PTS.....	4
Topografía de EI y PEPS.....	6
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
Hipótesis General.....	8
Hipótesis particulares.....	8
Material y métodos.....	9
Vector pZE12.....	9
<i>E. coli</i> BW25113.....	9
Amplificación y clonación de los genes de <i>E. coli</i>	10
Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent, Stratagene).....	10
CloneJet PCR cloning Kit.....	10
Bioinformática en el desarrollo de quimeras de EI.....	11
Construcción de quimeras.....	13
Construcción del conector o “Linker” de composición y longitud variable.....	14
Bisagras de composición variable.....	14
Construcción de las quimeras ½.....	15
Ensayos de complementación.....	15
Purificación de las quimeras.....	15
Mutaciones sitio-dirigidas.....	16
Anticuerpos policlonales contra quimeras de EI.....	16
Análisis de HPLC.....	16
Resultados.....	17
Variantes NPr-HPr.....	17
Identidad genética de las cepas derivadas de BW25113 y azúcares de PTS a probar con las construcciones de NPr mutantes.....	17
Construcción de las variantes de NPr mutantes.....	18
Ensayos de complementación de las variantes CPrs.....	20
Nivel de expresión de los genes NPr 14 y HPr en el vector pZE12.....	26
Diseño y construcción de quimeras de EI.....	26

Sistema de selección <i>in vivo</i> para las quimeras de EI.....	26
Origen de las quimeras de EI.....	29
Diseño y construcción de las quimeras PEPS-EI y EI-PEPS	31
Construcción de los modelos de las quimeras.....	33
Diseño de la cara de contacto en las quimeras de EI.....	34
La construcción de la primera generación (G1) de quimeras de EI.....	37
Construcción de quimeras PEPS-EI.....	38
Construcción de quimeras EI-PEPS.....	39
Construcción de quimeras 1/2 (G2).....	41
Selección de quimeras en el sistema de selección <i>in vivo</i>	49
Discusión.....	54
HPr y NPr mutantes.....	54
Comparación entre los modelos y las estructuras experimentales.....	54
Rediseño de la interface de contacto de las variantes de NPr	54
Comportamiento de las mutantes de NPr: Especificidad vs promiscuidad	57
Quimeras de EI.....	59
Diseño de las quimeras de EI.....	59
Construcción de las quimeras de EI.....	60
Sistema de selección <i>in vivo</i>	61
Relación del DC con sus compañeros barril TIM y el dominio de unión a HPr	61
Consideraciones de los análisis de las interfaces de EI y PEPS en el diseño de las Quimeras ½.....	63
Paisaje energético de las interacciones proteína-proteína de los componentes PTS ..	64
Ventajas de construir quimeras de EI y PEPS de <i>E. coli</i>	67
Perspectivas	67
Para NPr/HPr:.....	68
Para las quimeras de EI:	68
Aplicaciones biotecnológicas.....	68
Nuestras quimeras comparadas con otras	69
Proteínas fosforilables y sus interfaces.....	69
Conclusiones.....	70
De HPr/NPr.....	70
De quimeras de EI.....	70
Referencias	72

Anexos.....	78
-------------	----

Índice de Figuras y tablas

Figuras

Figura 1.- Esquema generalizado de PTS en <i>E. coli</i>	1
Figura 2.- HPr y NPr.....	2
Figura 3.- PEPS vs ATP.....	5
Figura 4.- Complejo EI-H.....	6
Figura 5.- pZE12, del cual deriva nuestro vector de expresión.....	9
Figura 6.- Proceso de identificación y selección de los cambios a implementar sobre el desarrollo de las quimeras de EI.....	13
Figura 7.- PCR de traslape.....	14
Figura 8.- PCR de diagnóstico para comprobar la identidad genética de las cepas de BW25113 con mutaciones en <i>ptsH</i> , <i>fruB</i> y <i>ptsI</i>	17
Figura 9.- Modelos de NPr y sus mutantes.....	20
Figura 10.- Ensayo de complementación donde se muestra el crecimiento de las construcciones de HPr, NPr, CPr14, CPr6, CPr8 expresadas en pZE12.....	22
Figura 11.- Crecimiento y consumo de una mezcla de azúcares PTS para las células 2Δ con HPr y CPr14.....	24
Figura 12.- Crecimiento y consumo de CPr6 en una mezcla de seis diferentes fuentes de carbono.....	24
Figura 13.- Consumo de cada uno de los azúcares observado para las construcciones durante un periodo de 25 horas de cultivo en M9 y siete diferentes fuentes de carbono.....	25
Figura 14.- Eliminación del sitio de corte de KpnI en <i>ptsI</i> y prueba de nuestro vector con PEPS y EIA.....	27
Figura 15.-Proceso seguido para la clonación de PEPS en vector de expresión pZE12.....	28
Figura 16.- Alternativas consideradas para la generación de las quimeras de EI.....	30
Figura 17.- Estructuras de las proteínas parentales.....	31
Figura 18.- Localización estructural de los aminoácidos conservados de EI y PEPS.....	32
Figura 19.-Modelos de las dos quimeras.....	34
Figura 20.- Interfaces del dominio central de EI y PEPS.....	36
Figura 21.- Rediseño de la cara de contacto del DC de EI para reconocer el dominio ATPgrasp de PEPS.....	37
Figura 23.- Armado de quimeras.....	38
Figura 23.- Construcción de las quimeras EI-PEPS.....	40

Figura 24.- Secuencias obtenidas de clonas elegidas al azar con dos quimeras tipo EI-PEPS en el vector pZE12.	41
Figura 25.- Proceso de “escaneo por alaninas” (<i>in silico</i>).....	43
Figura 26.-Disección de las interfaces de contacto de EI.....	46
Figura 27.- Núcleo de reconocimiento del ATP en el dominio tipo “ATPgrasp”.....	50
Figura 28.- Sobreexpresión de las proteínas quiméricas Q2 y Q7 en diferentes fondos genéticos.....	52
Figura 29.- Inmuno-detección de las quimeras.....	53
Figura 30.- Análisis de la interface EI-HPr.....	55
Figura 31.- Paisaje energético de las uniones de los componentes PTS.....	66

Figuras de Material suplementario

Figura S1.- PCR de traslape utilizada para armar las distintas variantes de NPr mutantes.....	79
Figura S2.- Cinéticas de complementación de las cepas BW25113 $\Delta ptsH$ y $\Delta fruB$	79
Figura S3.- Comparación del crecimiento de las construcciones con HPr, NPr y CPr14.....	80
Figura S4.- Estrategias utilizadas para la construcción de los diferentes tipos de quimeras.....	81
Figura S5.- Identificación de los residuos objetivos para trasplantar la cara de contacto de HPr a NPr.....	81
Figura S6.- Crecimiento de las construcciones HPr, NPr y CPr14 en las células 2 Δ en M9 con ácido ascórbico.....	82
Figura S7.- Proteína BS9.....	82
Figura S8.-Resultados de DynDom.....	83

Tablas

Tabla I.- Se presentan los azúcares PTS en <i>E. coli</i> con permeasas específicas identificadas hasta el momento.....	18
Tabla II.- Combinación de cepas y genes utilizados en este estudio.....	21
Tabla III.-Fenotipo de crecimiento de todas las construcciones utilizadas en esta parte del proyecto.....	22
Tabla IV.- Resultados de los alineamientos de EI y PEPS.....	33
Tabla V.-Posibles residuos importantes en la interacciones de DC de EI de <i>E. coli</i> según su efecto sobre la interface de contacto con el conjunto de alfa hélices y el barril	

TIM.....	44
Tabla VI.-Posibles aminoácidos importantes en la interacciones de DC PEPS <i>N. meningitidis</i> según su efecto sobre la estabilidad del complejo DC y ATPgrasp.....	47
Tabla VII.- Quimeras secuenciadas probadas en nuestro sistema de selección <i>in vivo</i>	48
Tabla SI.- Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	84
Tabla SII. – Fenotipos de crecimiento de las construcciones del proyecto de NPr y sus variantes.....	88
Tabla SIII La fermentación de los azúcares ensayo de agar MacConkey.....	89
Tabla SIV.- Interfaces encontradas con valores menores a -0.7 kcal/mol en el experimento teórico.....	90
Tabla SV.- PDB utilizados para calcular el paisaje energético de los componentes de PTS.....	92

Abreviaciones y equivalencias utilizadas:

aa (aminoácidos)

AH (alfa hélices de EI que reconocen a HPr)

AG (la superfamilia ascorbato-galactitol)

AM (Alineamientos Múltiples)

AMP (adenosín monofosfato)

ATE (Análisis de Traza Evolutiva)

ATP (adenosín trifosfato)

ATPgrasp (dominio de unión a ATP)

AS (Alanine Scanning)

Asc (abreviación de ácido ascórbico)

Bgl (abreviación de beta glucósidos)

crr (gen codificante de EI de glucosa)

DC (dominio central de EI y PEPS)

DHA (la familia de dihidroxiacetona)

EI-PEPS (quimeras con dominio EI en el N-terminal)

Fru (abreviación de fructosa)

fruB (gen codificante de la proteína FPr homologa de HPr)

Gat (abreviación de galactitol)

Galactitol = dulcitol

Glc (abreviación de glucosa)

GFL (la superfamilia de Glucosa-Fructosa-Lactosa)

Gut (abreviación de glucitol)

Glucitol = sorbitol

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

IPTG (Isopropilo β -D-1-thiogalactopiranosido inductor de promotor P_{Lac})

Mal (abreviación de maltosa)

Man (abreviación de manosa)

Mtl (abreviación de manitol)

npr (gen codificante de NPr)

NAG (abreviación de N-acetil glucosamina)

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PDB (Protein Data Bank)

PEP (fosfoenolpiruvato)

PEPS (fosfoenolpiruvato sintetasa)

PEPS-EI (quimeras con el dominio EI en el C-terminal)

Pi (fosfato inorgánico)

PPDK (Pyruvate Phosphate Dikinase- Piruvato Fosfato Dikinasa)

PPi (pirofosfato)

pps (gen codificante de fosfoenolpiruvato sintetasa)

PTS (Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System)

PTS^{Ntr} (PTS de nitrógeno)

ptsH (gen codificante de HPr)

ptsI (gen codificante de Enzima I)

TIM (dominio estructural con forma de barril)

WB (Western Blot)

Introducción

Sistema PTS

El sistema Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa o sistema PTS (Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System) es el principal sistema bacteriano de traslocación de azúcares que a través de una molécula de fosfoenolpiruvato o “PEP” inicia una cadena de fosforilación que termina con la internalización de un azúcar específico por un grupo de proteínas transportadoras en la membrana (Deutscher et al., 2006). Posee funciones adicionales al transporte de azúcares, tales como quimiorrecepción (Lux et al., 1995), control de la fosforilación de glucógeno (Seok et al., 1997), inhibición de permeasas no PTS (Deutscher et al., 2006), activación de la enzima piruvato descarboxilasa FrsA (Koo et al., 2004), activación de la adenilato ciclasa (Park et al., 2006) y regulación de la actividad del regulador transcripcional Mlc, relacionado con el control de la expresión de proteínas vinculadas con el catabolismo de los carbohidratos PTS (Lee et al., 2000; Nam et al., 2001; Deutscher et al., 2006).

Enzima I (EI) y HPr forman la base general de PTS (Figura 1), mientras que los componentes IIA, IIB y IIC forman parte de cadenas adicionales de fosforilación específicas para los azúcares PTS como la glucosa, manosa, manitol, entre otros (Postma et al., 1996).

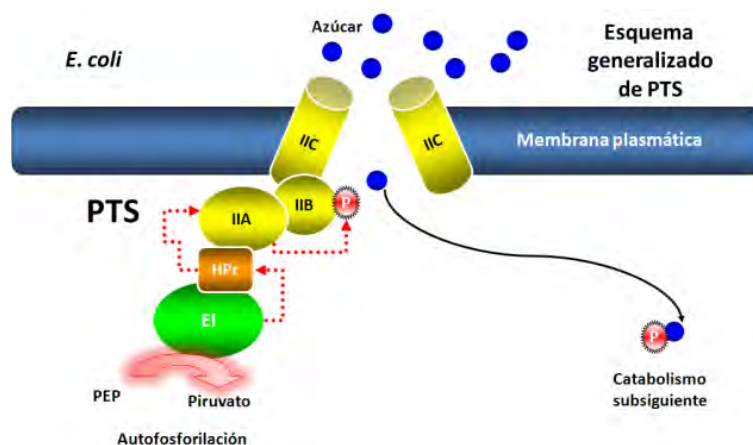


Figura 1.- Esquema generalizado de PTS en *E. coli*. En verde se muestra a EI utilizando PEP rindiendo piruvato. Con flechas rojas se muestra la transferencia del grupo fosforilo hasta llegar a la permeasa transportadora (componentes IIC) de la membrana celular con la fosforilación y entrada del azúcar exterior.

Los componentes de PTS son capaces de formar una serie de interacciones proteína-proteína (EI↔HPr↔IIA↔IIB/IIC). Aprovechando la capacidad de las permeasas de discriminar entre distintos azúcares PTS (como glucosa, manosa y manitol), decidimos emplear herramientas de ingeniería de proteínas para estudiar

dichas interacciones. Como *Escherichia coli* es incapaz de transportar estos azúcares por otro medio diferente al sistema PTS, pudimos relacionar el uso de éstos con la afinidad entre los distintos componentes de la cadena de fosforilación, de manera que, mutamos un componente en particular y observamos los efectos en el consumo de los azúcares.

HPr/NPr

Iniciamos nuestro trabajo sobre esta cadena de proteínas fosforilables utilizando el segundo componente de PTS. HPr es una proteína (9kDa) capaz de interactuar con EI y reconocer a una serie de proteínas transportadoras IIA específicas (IIA^{Glc} para glucosa, IIA^{Man} para manosa, IIA^{Mtl} para manitol y así entre otras), cada una de éstas con diferente cara de contacto (Tchieu et al., 2001). Decidimos investigar que residuos eran relevantes en las interacciones formadas por HPr y sus proteínas compañeras.

Reichenbach y colaboradores (2007) realizaron un estudio en el que reportaron los residuos que contribuían en la regulación de HPr de *Bacillus subtilis* mediante el reemplazo por la proteína homóloga de HPr de *E. coli*. También utilizamos un reemplazo funcional, pero a diferencia de Reichenbach, optamos por utilizar la proteína paróloga NPr del sistema de PTS de nitrógeno o PTS^{Ntr}. Está proteína es incapaz de reemplazar a HPr. Con una reactividad cruzada con EI por debajo de una milésima parte en comparación con HPr (Rabus et al., 1999, obsérvese la Figura 2 para ver ambas cadenas fosforilables).

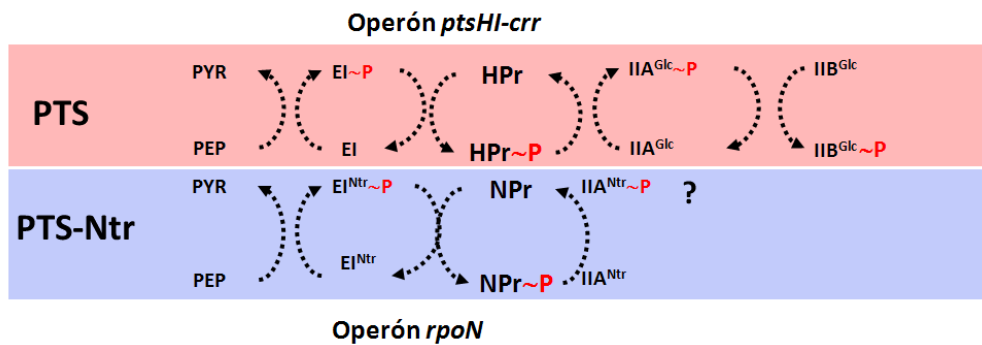


Figura 2.- Comparación de la cadena de PTS y PTS^{Ntr} donde se resalta la participación de HPr y NPr.

Ambas proteínas parálogas poseen estructuras similares pero poseen diferentes funciones: HPr es una proteína transportadora de grupos fosforilos a través de la cadena de PTS en el transporte de azúcares hacia el interior de la célula (Postma et al., 1993; Saier et al., 2001; Li et al., 2008). NPr por otro lado, pertenece a una cadena distinta de intermediarios fosforilados, relacionada con actividades de regulación del metabolismo de nitrógeno (PTS^{Ntr} obsérvese la Figura 2) mediante la regulación de la expresión genética (Pfluger-Grau y Gorke, 2010).

E. coli posee un sistema PTS con numerosos componentes proteicos, muchos de los cuales continúan sin ser funcionalmente caracterizados. Por ejemplo, existen cinco proteínas tipo EI, seis HPr homólogas, y de 21 a 22 diferentes complejos de Enzimas II o EII (Tchieu et al., 2001). Los complejos de EII generalmente consisten de EIIA, EIIB y EIIC aunque los complejos de la familia de la manosa adicionalmente poseen un complejo EIID (todos requeridos para sus funciones). De ahora en adelante nos referimos a los componentes como IIA, IIB o IIC respectivamente.

De acuerdo a su secuencia, estructura y función la Base de Datos de Clasificación de Transportadores (Transporter Classification Database o TCDB www.tcdb.org Saier et al., 2006; Saier et al., 2009), menciona que existen tres diferentes familias de transportadores de azúcares PTS: la superfamilia de Glucosa-Fructosa-Lactosa (GFL), la superfamilia Ascorbato-Galactitol (AG) y la familia de Manosa-Fructosa-Sorbosa o “Man” (Saier et al., 2005). Adicionalmente, hay un complejo tipo EII no transportador de azúcares: la familia de Dihidroxiacetona o DHA (Bachler et al., 2005; Gutknecht et al., 2001). La superfamilia de GFL contiene a los transportadores de glucosa, α glucósidos, β glucósidos, fructosa, manitol, lactosa, *N*, *N'* diacetilquitobiosa y glucitol (Nguyen et al., 2006). La superfamilia AG incluye las proteínas específicas para galactitol y L-ascorbato (Saier et al., 2005; Bachler et al., 2005; Gutknecht et al., 2001; Nguyen et al., 2006; Hvorup et al., 2003). La familia de manosa transporta una variedad de aldo y ceto hexosas (Rephaeli y Saier, 1980). La familia DHA solamente posee como único sustrato al DHA, el que permite la regulación del operón *dhaKLM* (Gutknecht et al., 2001; Bachler et al., 2005).

Dentro de estas superfamilias los transportadores son generalmente muy específicos por sus azúcares blancos, a excepción de los miembros de la familia de manosa con poca especificidad. En *E. coli* la familia de manosa transporta todas las hexosas de configuración tipo D-glucosa (Thompson y Chassy, 1985). Ellas son las

únicas al menos para *E. coli* que han sido identificadas con la capacidad de transportar manosa, glucosamina y el análogo no metabolizable de 2-deoxi-D-glucosa como sus principales sustratos. Sin embargo, son también capaces de transportar glucosa y *N*-acetil glucosamina como sustratos pobres (Rephaeli y Saier, 1980).

En *E. coli* y muchas otras bacterias PTS^{Ntr} ha sido bien caracterizado, aun no se sabe, si es que existe una permeasa tipo EII como aceptor del fósforo. Las funciones de regulación del brazo de PTS^{Ntr} no están aun bien comprendidas como en el caso de transporte de azúcares por PTS. Sin embargo, otras funciones sí; las funciones regulatorias incluyen el metabolismo de nitrógeno (Tchieu et al., 2001; Lee et al., 2005; Powell et al., 1995; Zimmer et al., 2008; Kim et al., 2011), la biosíntesis de lípidos (Kim et al., 2011), el transportador de potasio (Luttmann et al., 2009), la utilización de β -glucósidos (Bahr et al., 2011), la degradación de tolueno (Cases et al., 2001), patogenicidad (Dozot et al., 2010) y la formación de “biofilms” (Houot et al., 2010). Tal vez IIA^{Ntr} y NPr actúan como factores transcripcionales para muchos operones, particularmente aquellos involucrados con el metabolismo del nitrógeno.

Ingeniería a nivel de Enzima I de PTS

La EI del sistema PTS (Figura1) es capaz de autofosforilarse a partir de PEP para iniciar la cadena de intermediarios fosforilados que culminan en el transporte de azúcares hacia el interior de la célula. Como parte de nuestro trabajo abordamos un segundo proyecto de ingeniería sobre EI, con la finalidad de cambiar su especificidad de fosfoenolpiruvato (PEP) por ATP como donador del grupo fosfato.

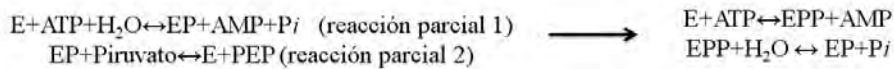
La sustitución de PEP por ATP no parece un tema bio-energético trivial, ya que PEP puede ser considerado un compuesto fosforilado de primera necesidad en los sistemas biológicos (Berman y Cohn. 1970; Gajewski et al., 1986). Por esta razón, la sustitución de PEP por ATP representa un trueque desfavorable y este proyecto podría aparentar ser un callejón sin salida. Sin embargo, una cantidad de energía similar a la liberada en la hidrólisis del PEP (≈ 62 kJ/Mol) se puede obtener a partir del ATP, si se hidrolizan más de uno de sus enlaces fósforo-oxígeno-fósforo (Figura 3).

La enzima fosfoenolpiruvato sintetasa o “PEPS” (E.C.2.7.9.2) es capaz de generar PEP a través de ATP como donador de fósforo. Para eso utiliza un par de

reacciones parciales para liberar la energía química contenida en los enlaces del ATP rindiendo finalmente PEP+AMP y fosfato inorgánico (Berman y Cohn, 1970).



PEPS (EC 2.7.9.2) es capaz de realizar la conversión de PEP a piruvato y viceversa. PEPS utiliza ATP, piruvato y agua como punto de partida para la síntesis de PEP, AMP y fosfato inorgánico.



Energía liberada a partir de los enlaces de ATP

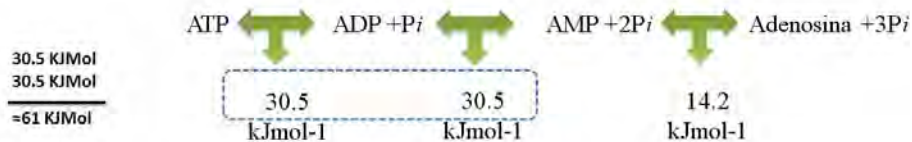


Figura 3.- Posibilidad de intercambiar PEP por ATP como donador de fosfatos para las quimeras de EI. Se describe las diferencias energéticas entre cada uno de los donadores y las dos reacciones parciales que lleva a cabo PEPS, en las cuales ésta es capaz de obtener mediante la ruptura de dos enlaces de fósforo un nivel equivalente de energía al de la hidrólisis del PEP.

Al igual que en el proyecto de HPr/NPr decidimos trabajar a nivel de interfaces de contacto y caras de reconocimiento. Sin embargo, este proyecto involucró el desarrollo de quimeras, con la integración del rediseño de interfaces y la incorporación de dominios exógenos.

Como antecedente tenemos que la construcción de quimeras a partir de los componentes del sistema PTS se ha aplicado anteriormente con la finalidad de localizar las regiones funcionales de los componentes de las permeasas membranales (Kjos et al., 2010). En ese proyecto Kjos y colaboradores lograron identificar las regiones funcionales del componente IICD de la permeasa específica para manosa. Mediante la fusión de un gen homólogo funcional de *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis*. Nuestro proyecto contempló la formación de quimeras a partir de la fusión de EI y el dominio de reconocimiento del ATP o “ATPgrasp” de la enzima fosfoenolpiruvato sintetasa de *E. coli*.

Topografía de EI y PEPS

La característica clave en el diseño de las quimeras de EI con especificidad alterada, recayó en la distribución de funciones compartida por los dominios internos entre cada una de las proteínas parentales (Figura 4). EI (63kDa) posee dos dominios que consisten de una región N-terminal o EIN (1-264) y una parte C-terminal o EIC (265-573). La estructura de EIN está compuesta por dos sub-dominios: el primero entre los residuos 33 al 143 (amarillo) mientras que el segundo es un dominio discontinuo que comprende dos zonas 1 al 20 y 148 al 230 (verde). La histidina catalítica se encuentra en la posición 189, localizada en una fisura de la interface entre los dos sub-dominios (Zhu et al., 1999; Dimitrova et al., 2002; Márquez et al., 2006). Los dos dominios de EI participan en funciones diferentes: mientras que EIC está relacionado con la unión al fosfoenolpiruvato y control de la actividad (es el encargado de formar el homodimero funcional), EIN forma parte del sitio de fosforilación y está relacionado con el transporte del grupo fosfato y reconocimiento de HPr (Garret et al., 1997; Oberholzer et al., 2004).

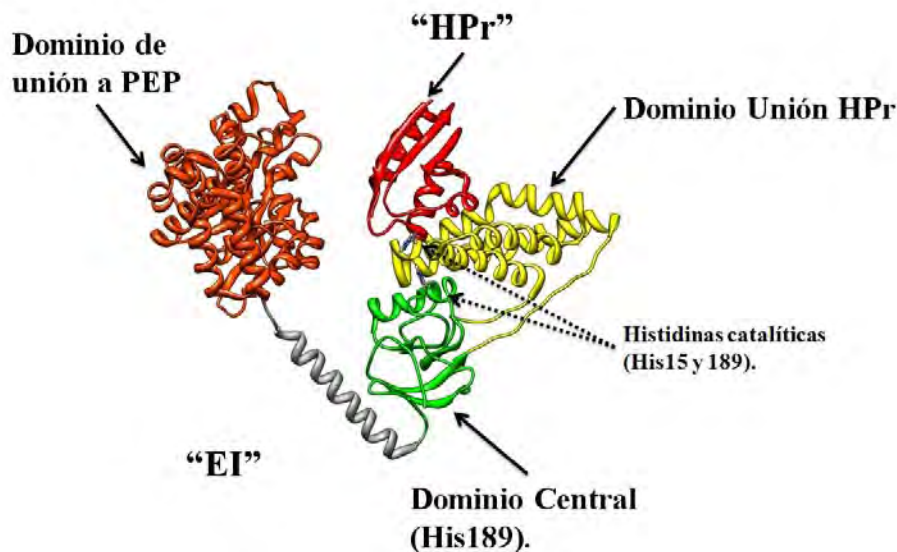


Figura 4.- Complejo EI-HPr.

Al igual que en EI, PEPS supeedita su funcionamiento (conversión $ATP \leftrightarrow PEP$) a la interacción de sus tres dominios, distribuyendo las funciones de captación de ATP y piruvato a diferentes módulos. Toda la conversión es llevada a cabo en dos reacciones parciales (Berman y Cohn, 1970).

En la primera reacción parcial intervienen el dominio N-terminal y el dominio central. El extremo N-terminal de PEPS posee un plegamiento similar al de los

dominios de unión al ATP, compartido por las proteínas de la súper-familia capaz de capturar al ATP o “ATP Grasp Superfamily”. Los miembros de esta familia unen y activan ATP por la transferencia de γ -P a una variedad de co-sustratos. A pesar de la baja similitud a nivel secuencia, existe una conservación estructural en el andamiaje del sitio activo y la posición de los grupos polares para el sustrato y cofactor (Berman y Cohn, 1970; Ye et al., 2001; Nakanishi et al., 2005).

Basados en sus similitudes estructurales, funcionales y en secuencia, se ha sugerido un origen común entre EI y PEPS de *E. coli*. Debido a que no se cuenta con estructuras experimentales para PEPS de *E. coli*, utilizamos como respaldo a la proteína PPDK o “Pyruvate Phosphate Dikinase” (EC 2.7.9.1) ya que ésta cataliza una reacción enzimática similar partiendo de ATP, fósforo inorgánico (P_i) y piruvato a AMP, pirofosfato (PP_i) y PEP en presencia de Mg^{2+} y NH_4^+ como iones activadores (Ye et al., 2001). Para este proyecto utilizamos las estructuras de PPDK de *Clostridium symbiosum* (Lin et al., 2006), *Zea mays* (Nakanishi et al., 2005), *Trypanosoma brucei* (Cosenza et al., 2002), así como la primera estructura de PEPS de *Neisseria meningitidis* (Protein Data Bank código 2ols). Basados en los datos bioquímicos y las similitudes estructurales entre EI, PEPS y PPDK se cree que las tres proteínas funcionan con un mecanismo similar. Al parecer éste involucra un giro del dominio central, permitiéndole interactuar de manera alterna con cada uno de los dominios de unión al PEP y al ATP (Oberholzer et al., 2004; Márquez et al., 2006; Teplyakov et al., 2006).

En este proyecto se construyó un conjunto de quimeras entre las proteínas EI de PTS y la enzima PEPS, ambas codificadas en el cromosoma de *E. coli*. La estrategia consistió en preservar el reconocimiento de HPr (proveído por el dominio N-terminal de EI) y el reconocimiento al ATP dado por el dominio N terminal de PEPS. Se mantuvo el sub-dominio central de EI con la histidina catalítica (cerca del 29% de identidad y 54% de similitud respecto al dominio central de PEPS).

Objetivo general

Utilizar herramientas de ingeniería de proteínas para estudiar las interacciones proteína-proteína formadas por los componentes de Enzima I y HPr del sistema PTS de *Escherichia coli*. Utilizar esta información para tratar de modificar las funciones de los mismos componentes.

Objetivos particulares

- Identificar los residuos relevantes en las interacciones proteína-proteína de HPr con EI y los distintos componentes IIA del sistema PTS.
- Transformar a la proteína paróloga de NPr en una HPr funcional mediante el trasplante de la cara de contacto de HPr.
- Identificar si existen sub-grupos de residuos capaces de proveer de afinidad diferencial a NPr respecto a los distintos componentes IIA específicos para glucosa, manitol, manosa, glucitol, galactitol y *N*-acetil glucosamina del sistema PTS de *E. coli*.
- Identificar las regiones funcionales relevantes de los dominios de EI.
- Construir quimeras con la capacidad de fosforilar a la proteína HPr del sistema PTS de *E. coli* a partir de ATP como donador de grupos fosfatos.

Hipótesis General

Los residuos involucrados en el reconocimiento molecular se encuentran formando parte de las interfaces proteína-proteína, de manera que, si se identifican los componentes principales, es posible manipular la afinidad de los componentes implicados.

Hipótesis particulares

Existe un sub-conjunto de residuos en la cara de contacto de HPr que le permiten interactuar con los distintos componentes IIA del sistema PTS. Por consiguiente, es posible proveer dicha especificidad a la proteína NPr del sistema PTS^{Ntr}, incapaz de realizar las funciones de HPr, si se trasplantan los componentes principales de la cara de contacto.

Se pueden construir quimeras de “Enzima I” del sistema PTS de *E. coli* capaces de autofosforilarse a partir de ATP, si se reemplaza el dominio de reconocimiento de fosfoenolpiruvato (Barril TIM) por el dominio de reconocimiento de

ATP (ATPgrasp) de la proteína homóloga fosfoenolpiruvato sintetasa; y además, se rediseña la nueva interface de contacto entre los dominios fusionados.

Material y métodos

Vector pZE12

Se utilizó un vector derivado de pZE12 en la mayoría de los experimentos. Sin embargo, se usaron también los vectores pBAD24 (Guzman et al., 1995) y pJet1.2/blunt como vectores intermedios de clonación. El vector de expresión utilizado es un derivado de pZE12 de Lutz y Bujard (1997) con dos diferencias, la primera es que no posee el casete de luciferasa (Figura 5). La segunda, es que posee un sitio de restricción extra de HindIII antes del sitio de corte de la enzima de restricción AvrII.

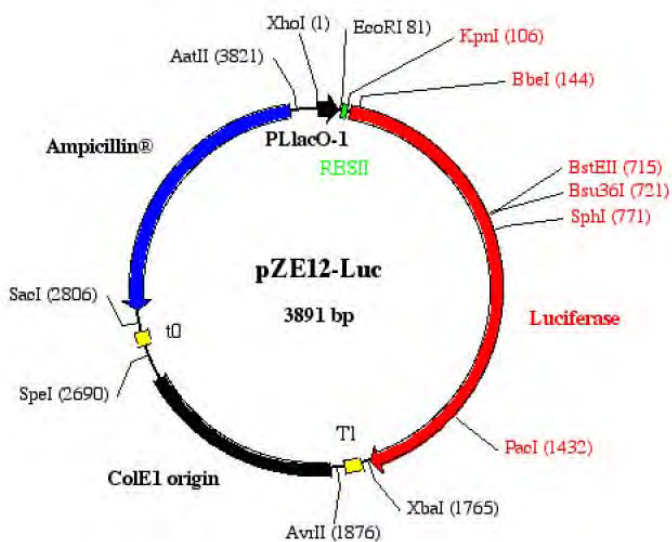


Figura 5.- pZE12 del cual deriva nuestro vector de expresión.

E. coli BW25113

Nuestra cepa experimental es derivada de la cepa BW25113, provenientes de la colección “Keio” (para especificaciones obsérvese la Tabla SI). Para probar las quimeras de EI se usó un sistema de selección *in vivo* donde se utilizó la cepa BW25113 $\Delta ptsI$ de la colección Keio con la ablación en el gen que codifica a la Enzima I del sistema de PTS (Baba et al., 2006). Esta cepa es derivada del trabajo realizado por Datsenko y Wanner (2000), y es incapaz de crecer en medio mínimo M9 con los azúcares PTS como única fuente de carbono.

Amplificación y clonación de los genes de *E. coli*

La construcción de los genes *ptsI* y *pps* (EI \approx 1,700 pb y PEPS \approx 2,400 pb respectivamente) se realizó mediante PCR y se ligó directamente sobre un vector de expresión derivado de pZE12. El templado utilizado fue ADN cromosomal de la cepa de *E. coli* MG1655 y los oligonucleótidos utilizados se muestran en la parte de anexos en la Tabla SI.

Para *pps* se utilizó la pareja de oligonucleótidos FcppsExt y ReppsExt, mientras que para el gen de *ptsI* se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos con el fin de eliminar un sitio KpnI (mediante una mutación puntual sinónima sobre *ptsI*) que se utilizó para ligarlo con el vector de expresión pZE12. Los oligonucleótidos usados fueron F11, R10, F9 y R6. Se usaron las polimerasas “*Pfu* DNA Polymerase” (Fermentas), AmpliTaq Gold (Roche) y Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). Los tratamientos de purificación de ADN se realizaron con la ayuda del kit “High pure PCR product purification Kit” (Roche) con las especificaciones del fabricante.

Las parejas de las enzimas de restricción KpnI con HindIII, así como EcoRI con HindIII (genes *ptsI* y *pps* respectivamente) fueron obtenidas de New England Biolabs, mientras que la fosfatasa alcalina o “CIAP” (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) y “T4 DNA ligase” se compraron a Fermentas. Una vez clonados los genes en el vector de expresión, se secuenciaron con una batería de oligonucleótidos diseñados para comprobar la integridad de las construcciones: “externos” los oligos Forward, Reverse, e “internos en el gen *pps*”, los oligos FIntpps y RIntpps.

Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent, Stratagene)

Debido a una mutación puntual no sinónima en el gen armado de *ptsI*, se usó el Kit QuickChange para corregirla utilizando las instrucciones del fabricante. Se utilizó la pareja de oligonucleótidos FrepEZptsI y RrepEZptsI.

CloneJet PCR cloning Kit

pJet1.2/blunt se usó como vector de clonación (selección positiva) para el gen *pps* de PEPS. Posee un sitio de clonación múltiple extendido, así como el promotor T7 para transcripción *in vitro* (Fermentas No. K1231). Para esto se utilizó la cepa *E. coli* Top 10.

Bioinformática en el desarrollo de quimeras de EI

Se usaron tres modelos cristalográficos de EI publicados en el “Protein Data Bank” (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>): “1zym” donde se encuentra la fracción N-terminal de EI; “3eze”, donde se muestra a EI unida con HPr, y finalmente una estructura cristalográfica de EI en estado homodimérico en su estado fosforilado (2hwg).

Por falta de estructura cristalográfica de PEPS de *E. coli*, se usó una estructura creada mediante modelado por homología con la ayuda de la base de datos y el software proporcionado por MODBASE <http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase/cgi/index.cgi> (Pieper et al., 2008). El principal templado estructural para modelar PEPS de *E. coli* fue la enzima PEPS de *Neisseria meningitidis* (2ols) y las estructuras de la enzima “Pyruvate Phosphate Dikinase” conocida como PPDK de *Clostridium symbiosum* (1dik, 1kc7), *Trypanosoma brucei* (1h6z) y *Zea mays* (1vbh, 1vbh).

El diseño de las quimeras se basó en la convergencia de resultados de tres tipos de análisis: el funcional (movimiento de los dominios, diseño de conectores y bisagras, así como el volumen de los dominios a remplazar), aminoácidos conservados (Alineamientos Múltiples “AM” y Análisis de Traza Evolutiva “ATE”) y las interfaces de interacción de los dominios centrales (“Alanine Scanning o AS”).

Este proceso se dividió en dos fases (Figura 6). La primera involucró la detección de aminoácidos candidatos para mutar o conservar mediante Alineamiento Múltiple “AM” de 1,139 secuencias de EI representantes del grupo de las proteobacterias (a excepción de ϵ -proteobacterias por no poseer sistemas PTS completos) y 576 secuencias para las proteínas PEPS con una matriz BLOSUM62 (se utilizó la paquetería de CLUSTAL W del software Bioedit v7.2.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). En paralelo, se realizó “ATE” para identificar regiones funcionales dentro de la estructura proteica con el mayor grado de conservación evolutivo (Armon et al., 2001). Esto se hizo mediante el servidor “Consurf” (<http://consurf.tau.ac.il/>). En el ATE se utilizaron para el alineamiento los valores predeterminados para CLUSTAL W. Las secuencias homólogas fueron colectadas de SWISS-PROT. El algoritmo utilizado para la búsqueda fue BLAST con el valor E de PSI-BLAST en 0.0001. Se usaron tres iteraciones de PSI-BLAST. El porcentaje máximo de identidad permitida entre secuencias para el análisis fue de 95%.

El valor mínimo de homología aceptado fue de 35%. El árbol filogenético se fabricó usando el algoritmo del vecino más cercano (Neighbor Joining). Los cálculos de conservación se realizaron con el algoritmo de Máxima Probabilidad (Max. Likelihood) con un modelo de sustitución para proteínas “JTT” (Jones-Taylor-Thornton).

En el análisis manual de las estructuras, se incluyó un par de dinámicas moleculares con las estructuras (2hwg, 2kx9 y 2xdf) realizadas con “Chimera” versión 1.3.2577 (Pettersen et al., 2004). Como primer paso de las dinámicas moleculares realizamos una superposición de los modelos de EI. Esta tarea se realizó con la herramienta “MatchMaker” de Chimera, para generar primero un alineamiento estructural partiendo de la secuencia del barril TIM de los modelos. De esta manera fijamos las estructuras de EI espacialmente, convergiendo todas las estructuras de barriles TIM de los tres modelos. Utilizamos la herramienta “Morp Conformations” para calcular la posición de las distintas estructuras secundarias de los modelos. Esta tarea utilizó cien pasos intermedios de interpolación (tasa de interpolación lineal). Esta herramienta de simulación, considera los dominios como cuerpos rígidos individuales. Finalmente usamos “MD Movie” para generar los videos de cada simulación, esto nos permitió observar las zonas con más movilidad entre los dominios y los elementos estructurales.

Por falta de estructuras tridimensionales de PEPS completas, usamos el servidor DynDom (<http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/>) con los modelos 1vbh (proteína PPDK unida a Mg-PEP de *Zea mays*) y 1kc7 (PPDK unido a piruvato) de *Clostridium symbiosum*. De estas simulaciones, se sugieren algunas de las regiones móviles en la proteína PEPS de *E.coli* (Figura S8).

La segunda fase de diseño, involucró el análisis de las interfaces de contacto de ambos dominios centrales (EI y PEPS) con sus respectivos dominios compañeros desde una perspectiva de atracción molecular, mediante la herramienta bioinformática de “Alanine Scanning” del servidor Robetta <http://robeta.bakerlab.org/index.html> (Kortemme y Baker, 2002; Kortemme et al., 2004).

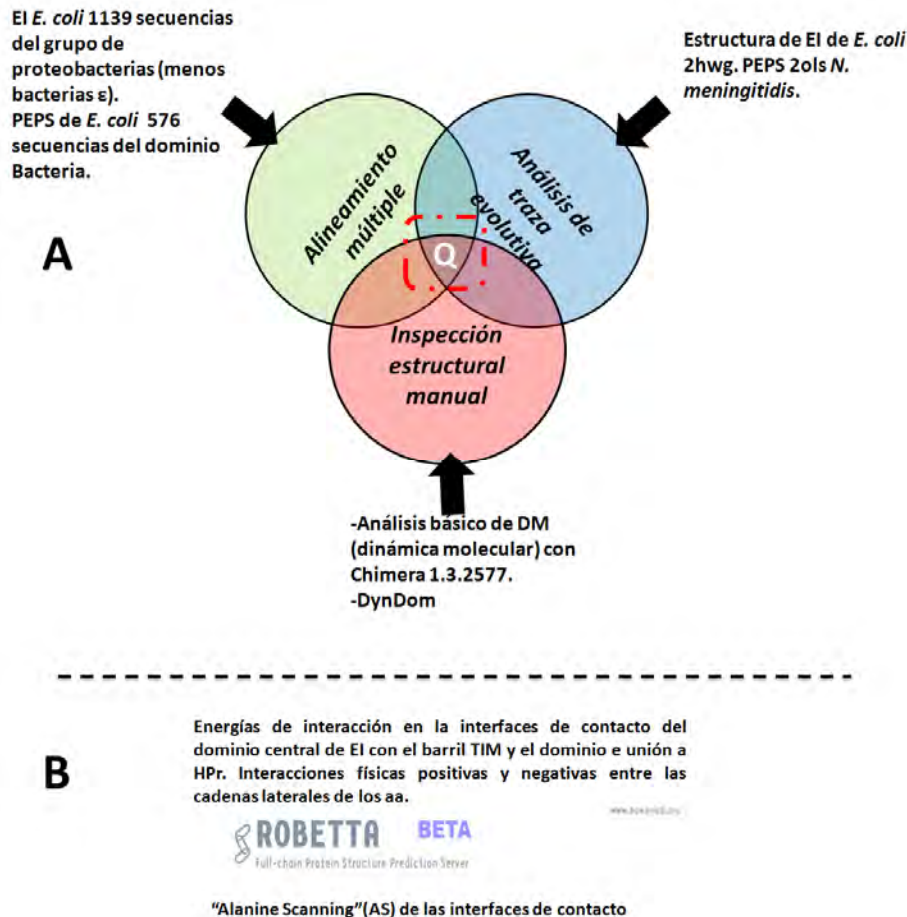


Figura 6.- Proceso

de identificación y selección de los cambios a implementar sobre el desarrollo de las quimeras de EI. **A)-** Primera fase de análisis bioinformática: la detección de “aa” conservados como candidatos en el diseño de las quimeras, que podrían estar involucrados en la función y las interacciones de cada uno de los dominios que conforman a las proteínas parentales (EI y PEPS). **B)-** Segunda fase de análisis bioinformático: revisión de las interacciones en las interfaces formadas por cada uno de los dominios centrales con los dominios compañeros en EI y PEPS de *E. coli*.

Construcción de quimeras

La construcción y clonación de las quimeras en el vector de expresión pZE12 se basó en una estrategia de PCR de traslape (Figura 7), a través del diseño de oligonucleótidos con una zona de traslape de al menos 18 nucleótidos. Se utilizó la polimerasa “Platinum Taq High Fidelity” de Invitrogen y la dupla KpnI-HindIII como endonucleasas de restricción para la preparación previa a las ligaciones con la ligasa comercial de Fermentas.

Los oligonucleótidos usados para la construcción de las dos variantes de quimeras se muestran en la Tabla SI en el Anexo, así como el diseño detallado de la estrategia para la construcción de ambas quimeras (Figura S4).

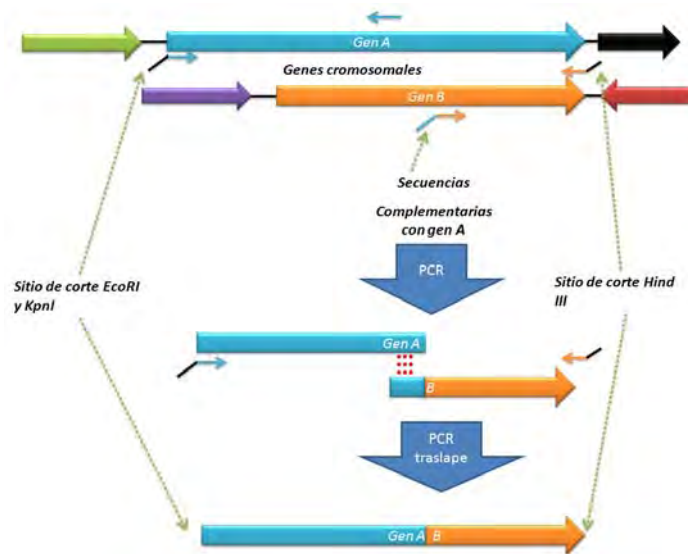


Figura 7.- PCR de traslape. Se muestra la estrategia general de la técnica utilizada para la generación de las proteínas mutantes.

Construcción del conector o “Linker” de composición y longitud variable

Para la construcción de las quimeras PEPS-EI se utilizó una serie de conectores con la firma de “GGGSGGGSG” para unir los dominios provenientes de ambas proteínas, mediante el oligonucleótido PEPSLinR (Figura S4). Esto fue en realidad un complejo de once distintos oligonucleótidos, que juntos constituyen las 10 diferentes composiciones y longitudes de los conectores, al igual que la quimera sin conector alguno. Al momento de sintetizar este oligonucleótido se pidió que se encontraran los diez aminoácidos de la firma, después en orden descendente nueve, ocho, siete y así hasta quedar sin ninguno de los aminoácidos de la firma. Al momento de la PCR se construyeron quimeras con once diferentes conectores, desde GGGSGGGSG, GGGSGGGG, GGGG, o GGG, así como los restantes conectores. Así se pudo explorar las distintas longitudes de conectores entre dominios para las quimeras PEPS-EI.

Bisagras de composición variable

En el caso de las quimeras EI-PEPS se diseñó un oligonucleótido con un par de aminoácidos variables. Éstos se encuentran justo en la zona de contacto entre ambos dominios formando una bisagra de composición variable. El oligonucleótido llevó dentro de su estructura primaria la clave de síntesis “snnsn” que especificó la síntesis libre de cualquiera de los 20 aminoácidos en cualquiera de esas posiciones. De manera similar que con el diseño del conector para las quimeras anteriores, al momento de realizar la PCR de traslape se obtuvo un banco de variantes con bisagras variables entre los dominios fusionados.

Construcción de las quimeras 1/2

Las quimeras 1/2 fueron construidas dirigiendo las mutaciones puntuales sólo a la mitad de las caras de reconocimiento, con el mismo método de PCR de traslape donde se usaron los mismos oligonucleótidos anteriores solo que se incorporó el oligo “Alfa 1 wt R” que reemplazó a “Alfa 1R”. De esta manera se generaron quimeras con la mitad de la cara de contacto modificada pero con las variantes de conector y bisagras variables.

Ensayos de complementación

Los ensayos de complementación se realizaron partiendo de pre-cultivos en medio Luria-Bertani o LB (Extracto de levadura Bacto-212750, NaCl 3624-01-J.T. Baker) a 37⁰ C toda la noche con agitación constante. Posteriormente se lavaron dos veces en agua estéril enfriada en hielo y se re-suspendieron en 5 ml de H₂O estéril enfriada. Se ajustaron las densidades ópticas (DO_{600 nm}) en un intervalo 0.1-0.18 con la ayuda de un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys). Se incubaron a 37⁰C bajo agitación constante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en un volumen de 0.3 ml en una placa (Corning Costar 3599) de 96 pozos con la ayuda del equipo “Safire” (Tecan). Se utilizaron glucosa, manosa, manitol, galactitol, glucitol, fructosa y xilosa (Sigma) como fuentes de carbono en medio M9 (Anexo Composición del medio M9). Todos los ensayos de complementación se realizaron en presencia de ampicilina como factor de selección (el vector pZE12 provee la resistencia) 300 mg/ml (1,000X).

Para el proyecto de quimeras de EI se probó nuestro sistema de complementación *in vivo* utilizando las construcciones de pZE12 (*ptsI*) y pZE12 (*pps*) como los controles positivo y negativo de complementación.

Purificación de las quimeras

Se utilizaron los oligonucleótidos Chi PEPS-EI H y Chi EI-PEPS para construir versiones de las quimeras PEPS-EI y EI-PEPS, respectivamente, con una etiqueta de seis histidinas y purificarlas con una columna de níquel. Se utilizó la cepa de *E. coli* MC1061 para los experimentos de sobre-expresión de las distintas quimeras construidas.

Se usó el oligonucleótido “PEPS-EI Histag N” para construir quimeras PEPS-EI con una etiqueta de seis histidinas en la región amino terminal.

Mutaciones sitio-dirigidas

Se realizó un escaneo de alaninas del sitio activo en el dominio central de las quimeras (histidina catalítica), así como de los aminoácidos de reconocimiento de ATP en el dominio tipo ATPgrasp se llevó a cabo mediante PCR de traslape con oligonucleótidos mutantes. Los cebadores “H=AQF” y “H=AQR”, se usaron para el sitio activo, mientras que “Rgrasp VQ”, “grasp1”, “RgraspDE” y “Fgrasp QR” se usaron para la el ATPgrasp.

Se construyeron tres variantes de quimeras tipo PEPS-EI con cambios específicos en los aminoácidos del ATPgrasp que reconocen e interactúan con el ATP. Se usaron los oligonucleótidos RgraspVQ-AN, RgraspDE-NH, Frgrasp2, Rgrasp3 y Fgrasp QR-NL (obsérvese Tabla SI del anexo).

Anticuerpos policlonales contra quimeras de EI

Se inmunizaron un par de conejos de la raza Nueva Zelanda con una quimera tipo EI-PEPS denominada “BS9” purificada con columnas de níquel, con la finalidad de desarrollar anticuerpos específicos para quimeras de EI. Los anticuerpos fueron colectados y se usaron para detectar en “Western Blot” de los extractos celulares de nuestras quimeras en los experimentos de cinéticas de complementación. Como adyuvante utilizamos Freund’s (SIGMA F-5881); “Inmuno Pure antibody” Antigen: Rabbit IgC Fc, Etiqueta: “Alkaline phosphatase” (No. 31341). Finalmente revelamos con 1-step[™] NBI/BCIP Pierce (No. 34042).

Análisis de HPLC

Se utilizó HPLC para cuantificar el consumo de una mezcla de carbohidratos de glucosa, manosa, manitol, sorbitol, galactitol y xilosa. Se calibró el HPLC usando concentraciones de 1.5, 1, 0.5 y 0.1 g/l para cada fuente de carbono. Los carbohidratos en el sobrenadante fueron analizados por HPLC usando los siguientes componentes: bomba cuaternaria 00E, un inyector automático 717 y un detector de índice de refracción 2410 con una columna Aminex HPX 87P (BioRad). Las condiciones de

corrida fueron, con una fase móvil de agua con un flujo 0.6 ml / min a una temperatura de 85°C.

Resultados

Variantes de NPr y HPr

Identidad genética de las cepas derivadas de BW25113 y azúcares de PTS a probar con las construcciones de NPr mutantes.

Antes de comenzar con el diseño y los experimentos, comprobamos la identidad genética de las diferentes cepas derivadas de BW25113 con mutaciones en *ptsH*, *fruB* y *ptsI*. Para esto utilizamos el oligonucleótido “K2” diseñado por Datsenko y Wanner (2000) y tres distintos cebadores (DRptsHKeio, DRptsIKeio y DRfruBKeio) que diseñamos para corroborar dicha identidad. Comprobamos que las tres cepas derivadas poseían el gen de kanamicina esperado (una banda de $\approx 1,000$ pb, obsérvese la Figura 8).

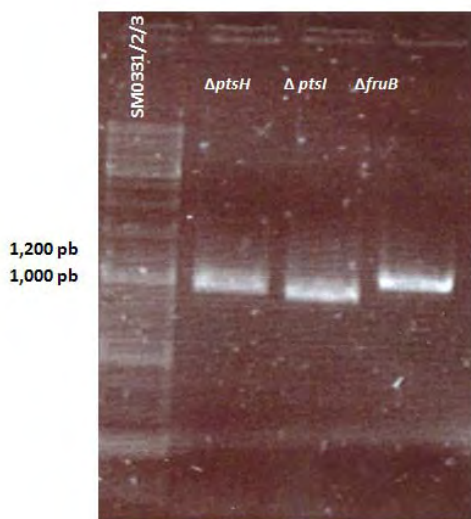


Figura 8.- PCR de diagnóstico para comprobar la identidad genética de las cepas de BW25113 con mutaciones en *ptsH*, *fruB* y *ptsI*.

Las permeasas de trealosa, sacarosa y maltosa comparten el mismo componente IIA^{Glc} codificado por el gen *crr* (obsérvese la Tabla I). Por esta razón utilizamos la glucosa, manosa, manitol, *N*-acetilglucosamina, glucitol, galactitol, salicilina (β -glucósidos) y la fructosa como azúcares de prueba para los ensayos de complementación. De esta manera, evitamos la redundancia de repetir las interacciones de HPr y las variantes de NPr con el mismo componente IIA.

Tabla I.- Se presentan los azúcares PTS en *E. coli* con permeasas específicas analizadas en este trabajo (Postma et al., 1996).

<i>Azúcar (nomenclatura)</i>	<i>Permeasa que transporta</i>	<i>Familia de permeasa</i>
Glucosa (Glc)	<i>ptsG, crr</i>	I (glucosa)
N-acetilglucosamina (Nag)	<i>nagE</i>	I
β-glucósidos (Bgl)	<i>bglF</i>	I
Manitol (Mtl)	<i>mtlsA</i>	II Mtl
Manosa (Man)	<i>manXYZ</i>	IV Man
Glucitol (Gut)	<i>gutAB</i>	V Gut
Galactitol (Gat)	<i>gatABC</i>	VI Gat
Celobiosa (Cel)	<i>celAB</i>	III Lac
Maltosa (Mal)*	<i>malX, crr</i>	I
Trealosa (Tre)*	<i>treB, crr</i>	I
Fructosa (Fru)**	<i>fruF(B)A</i>	II Fru
Sacarosa (Scr)*	<i>crr</i>	

Nota:** Estas tres permeasas comparten el componente IIA de la glucosa (*crr*) para el transporte de sus respectivos azúcares y por esta razón fueron excluidos dentro del presente estudio. *Nota:** La fructosa fue excluida originalmente debido a que existe una delección en la cepa BW25113 de *E. coli* del gen *fruF* correspondiente a la proteína DTP utilizada por *E. coli* para el transporte del azúcar fructosa. Sin embargo se incorporó más tarde en los ensayos de complementación.

Construcción de las variantes de NPR mutantes

Obtuve de un trabajo previo del Dr. Xavier Soberón Mainero y su equipo, el diseño y la construcción de las variantes de NPR. Estas construcciones se basaron en análisis de alineamiento múltiple y estructuras cristalográficas depositadas en el Protein Data Bank (obsérvese la Figura S5).

Hasta ahora no existe una estructura experimental de NPR con la suficiente resolución acerca de la posición de sus cadenas laterales, solo existe una estructura resuelta a nivel de esqueleto carbonado (Li et al., 2008). Considerando el 33% de identidad entre ambas proteínas y sus similitudes en plegamiento decidimos usar la metodología de modelado por homología a través del servidor de MODBASE (Pieper et al., 2008) partiendo del modelo experimental de HPr (1POH). Se solicitó el cómputo de 1000 modelos de manera individual. Se seleccionaron aquellos modelos con los mayores puntajes, entre ellos z-DOPE (Discrete Optimized Protein Energy), que está basado en la teoría de probabilidad para la distancia de un conjunto de átomos tomados de una muestra de estructuras nativas que no dependen de ningún parámetro ajustable. En otras palabras, de los modelos predichos, cual posee la mayor probabilidad de

ocurrencia considerando el área de probabilidad a partir de las estructuras experimentales.

Filiberto Sánchez construyó los genes sintéticos de NPr (obsérvese Figura S1). Con diferentes mutaciones sitio-dirigidas sobre dos alfa hélices que forman parte de la cara de contacto de NPr (Figura 9). De ahora en adelante las versiones de NPr mutantes serán reconocidas como CPr.

Los cambios específicos fueron K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, F25K, Q28K, V49L, I50F, A151K, L53Q, M54T, D56G y A58T. Estas sustituciones al parecer podrían estar reorganizando la cara de contacto, cambiando no sólo las características electrostáticas de la superficie de interacción, sino a su vez también la aparición de una “*topografía*” similar a la observada para HPr, distinta de NPr (Figura 9). Dentro de las características principales se puede subrayar la predicción de una cavidad muy parecida a la observada en el caso de HPr, cercana a la histidina catalítica (H15).

Se realizaron simulaciones donde se comparó la interacción CPr14 contra los componentes IIA de HPr. Se utilizaron las estructuras experimentales de IIA^{Glc}, IIA^{Man} y IIA^{Mtl}. Este ejercicio teórico nos indicó que probablemente CPr14 podría interactuar con los nuevos componentes IIA de una manera similar a la observada para HPr (Lopez-de los Santos et al., 2012).

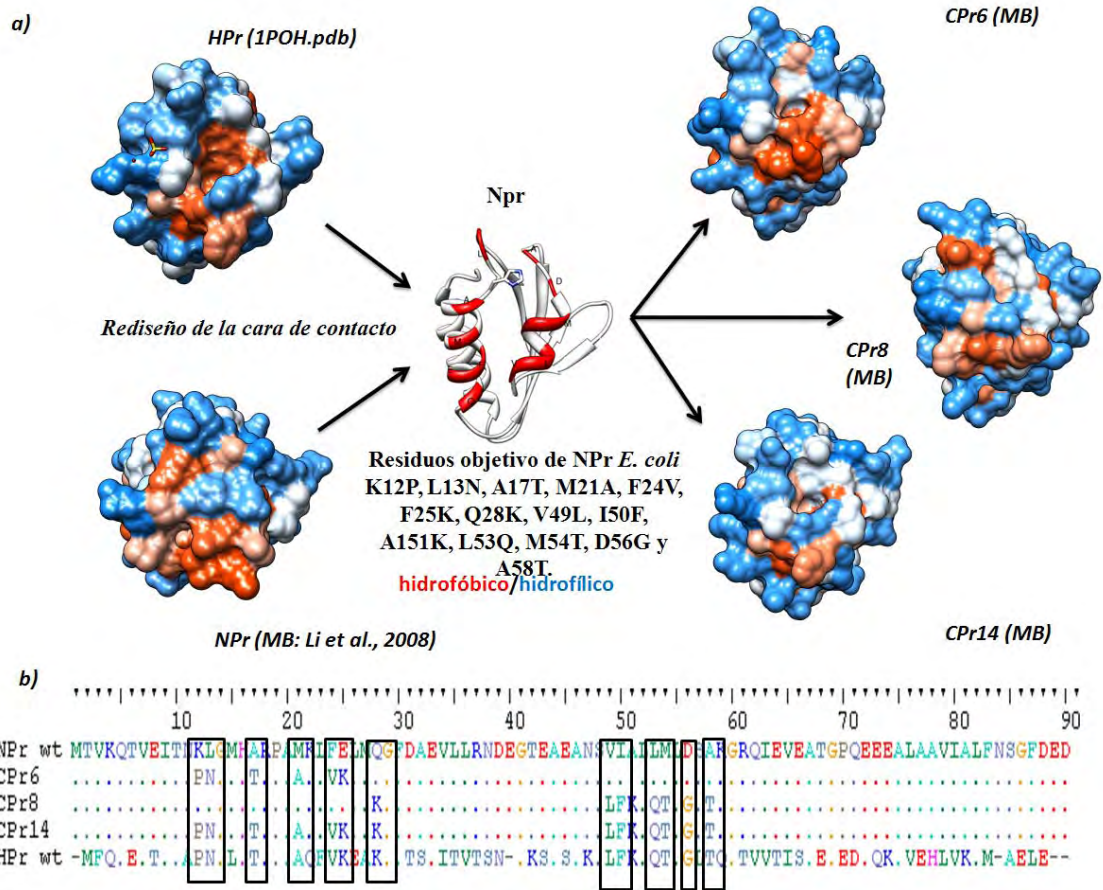


Figura 9.- Modelos de NPr y sus mutantes. a) Diferentes áreas de reconocimiento de HPr (Wt), NPr (wt) y las quimeras (CPrs). Los modelos están colocados a la misma orientación espacial; las coordenadas de NPr y las quimeras se obtuvieron por modelación por homología de “ModBase database (MB)” (Pieper et al., 2008). b) Alineamiento de NPr, las quimeras y HPr; los residuos mutados se muestran mediante rectángulos.

Para CPr14 se predicen valores inferiores de afinidad (ΔG unión) a los observados para HPr para los componentes IIA de glucosa y manitol, mientras que podría interactuar mejor con el componente IIA de manosa de lo que HPr lo hace (resultados publicados Lopez-de los Santos et al., 2012).

Ensayos de complementación de las variantes CPrs

Se probaron diferentes combinaciones de cepas y genes (Tabla II). Decidimos realizar cinéticas de crecimiento con manitol como azúcar clave, ya que entra a las células únicamente por PTS, a diferencia de glucosa que puede entrar por el transportador de galactosa (GalP). En esta primera evaluación trabajamos con versiones de BW25113 con ablaciones en los genes *ptsH* y *fruB*, que justifican nuestra estrategia

de generar una doble mutante, ya que en ambos casos (sólo una de ambas deleciones) permiten a las células crecer en estos medios de cultivo con un azúcar PTS como única fuente de carbono (Figura S2).

Tabla II.- Combinación de cepas y genes utilizados en los experimentos de las variantes de NPr.

Fondo genético	Vector/gen	“Fenotipo” crecimiento en M9 con:	
		Fructosa	Manitol
<i>E. coli</i> BW25113		+	+
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(NPr)	-	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr 14)	ND	+
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr 6)	ND	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr 8)	ND	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(HPr)	ND	+
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$)		+	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta fruB$)		-	+
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsI$)		-	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsI$)	pZE12(CPr 14)	-	-
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$)	pZE12(CPr 14)	ND	+
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$)	pZE12(HPr)	ND	+

Nota. - ND= no determinado.

El crecimiento de HPr y CPr14 en medio mínimo con glucosa, manitol, *N*-acetilglucosamina, manosa, glucosamina y fructosa demostró que ambas construcción fueron capaces de permitir el crecimiento en ellos como fuentes de carbono (Figura S3 y Tablas III y SII), mientras NPr no mostró crecimiento para ninguno de esos azúcares. La variante con CPr14 creció mejor que HPr en medio mínimo con fructosa. Considerando que el componente IIA de fructosa no es funcional, la fructosa podría estar entrando únicamente por ruta del sistema de PTS de manosa, ya que es capaz de transportar además de la manosa los azúcares de fructosa y glucosamina.

Las otras variantes de CPr se compararon en ensayos de complementación en medio mínimo M9 con siete diferentes azúcares PTS más xilosa que funcionó como control positivo de crecimiento por ser un azúcar no-PTS (Figura 10). Comparado con CPr14, CPr6 fue capaz de restablecer el crecimiento en menor nivel que la variante con catorce cambios. CPr6 fue incapaz de complementar el crecimiento en los azúcares manitol, galactitol, glucitol (Figura 10 y Tabla III). CPr8 fue incapaz de restablecer el crecimiento en el fondo genético de las células 2Δ .

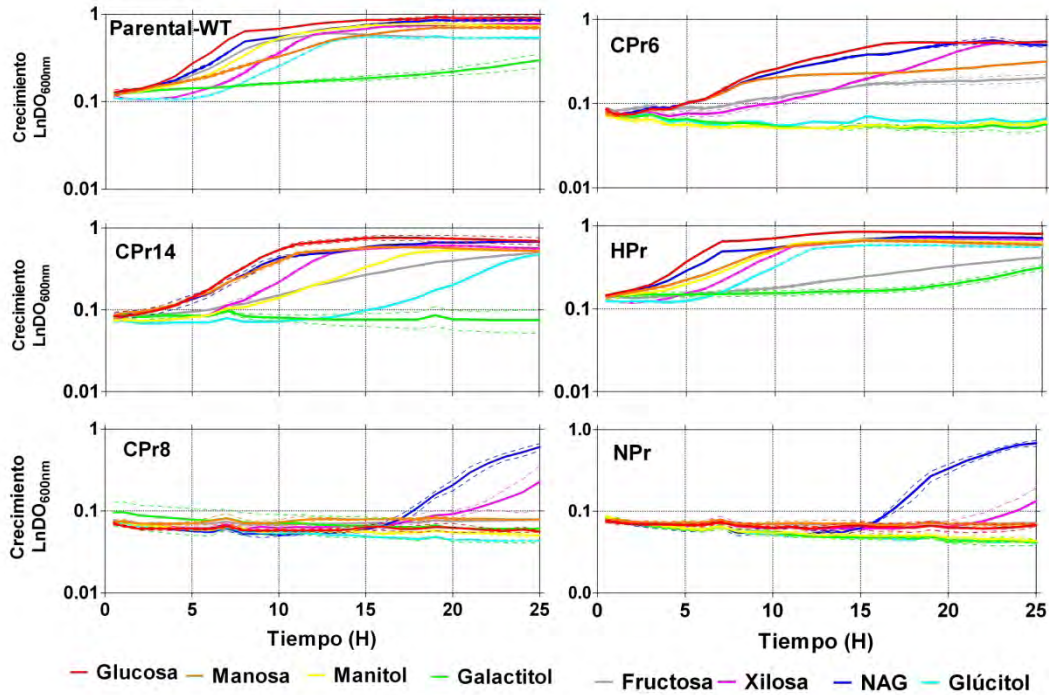


Figura 10.- Ensayo de complementación donde se muestra el crecimiento de las construcciones de HPr, NPr, CPr14, CPr6, CPr8 expresadas en pZE12. Medio mínimo M9 con ocho diferentes fuentes de carbono a 0.1% peso/volumen, a 37°C. IPTG 0.2 mM estuvo presente en todos los casos. Las líneas punteadas indican la desviación estándar observada.

Tabla III.-Fenotipo de crecimiento de todas las construcciones utilizadas en esta parte del proyecto de las variantes de NPr.

Fondo genético en <i>E. coli</i> BW25113	Vector/Gen	Fenotipo de crecimiento en medio M9 con diferentes fuentes de carbono:									
		Glc	Man	Mtl	Gat	Gut	Sal	NAG	Fru	Xil	
wt		+	+	+	+	+	-	+	+	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)		-	-	-	-	-	-	+	-	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(NPr)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr14)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr6)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(CPr8)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
($\Delta ptsH \Delta fruB$)	pZE12(HPr)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	

Nota: crecimiento (+) y sin crecimiento (-). Abreviaciones usadas: glucosa (Glc), manosa (Man), manitol (Mtl), galactitol o dulcitol (Gat), sorbitol o glucitol (Gut), salicílica (Sal), *N*-acetil glucosamina (NAG), fructosa (Fru) y xilosa (Xil).

CPr14 fue incapaz de complementar el crecimiento en galactitol mientras que HPr rescató el crecimiento de una manera deficiente. Un comportamiento similar se observó para la fructosa en HPr. Se observó un crecimiento residual de parte de NPr y CPr8 después de las 15 horas para la *N*-acetilglucosamina y la xilosa.

Ninguna de las combinaciones usadas fue capaz de complementar en la cepa BW25113 2Δ en M9 con salicílica (azúcar para la permeasa de beta-glucósidos, obsérvese las Tablas I y III).

En paralelo, el grupo del Dr. Milton Saier Jr. de la universidad de California en San Diego (UCSD) comprobó que la variante de CPr14 fue capaz de complementar el crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis mediante el crecimiento en M9 con ácido ascórbico como única fuente de carbono (Figura S6). En este caso CPr14 mostró una capacidad menor que HPr para rescatar el crecimiento. Esto significa que CPr14 le permite a la células de *E. coli* utilizar fuentes de carbono de la superfamilia de permeasas de ascorbato y galactitol (Deutscher et al., 2006), a pesar de no complementar el crecimiento de BW25113 Δ *ptsI* con galactitol (Figura 10).

Utilizamos un análisis de HPLC para comparar el patrón preferencial de consumo de azúcares PTS, este experimento nos sirvió para conocer si las construcciones CPrs presentaban preferencia por la glucosa y los azúcares PTS como fuentes de carbono antes de aquellas fuentes no PTS. El experimento consistió en una mezcla de cinco azúcares PTS (glucosa, manosa, manitol, galactitol y glucitol) y la xilosa como azúcar no-PTS (Figura 11).

El orden de consumo para la cepa de BW25113 parental y la cepa 2Δ con HPr y CPr14 fue aproximadamente el mismo: glucosa > manosa > xilosa = manitol > galactitol > glucitol. CPr6 mostró correspondencia con los resultados observados con anterioridad (Figura 10 y Tabla III) con la glucosa > manosa > xilosa ya que no fue capaz de permitir el consumo con alguno de los azúcares restantes (Figura 12). La xilosa (un azúcar no PTS) fue consumido antes los polioles de manitol, galactitol y glucitol, un resultado inesperado, ya que es de la idea general que los azúcares PTS son consumidos antes que cualquier otro azúcar no-PTS. Las células de 2Δ con NPr no fueron capaces de crecer y utilizar los azúcares presentados (datos no presentados).

HPr, CPr14 y la cepa parental crecieron hasta una densidad óptica de 1.5. La diferencia fue que HPr comenzó su fase exponencial apenas pasadas las tres horas, mientras que CPr14 y la cepa parental empezaron su fase exponencial cerca de las ocho horas de haber comenzado el experimento. HPr también mostró una mayor habilidad para empezar a consumir las fuentes de carbono al inicio del experimento.

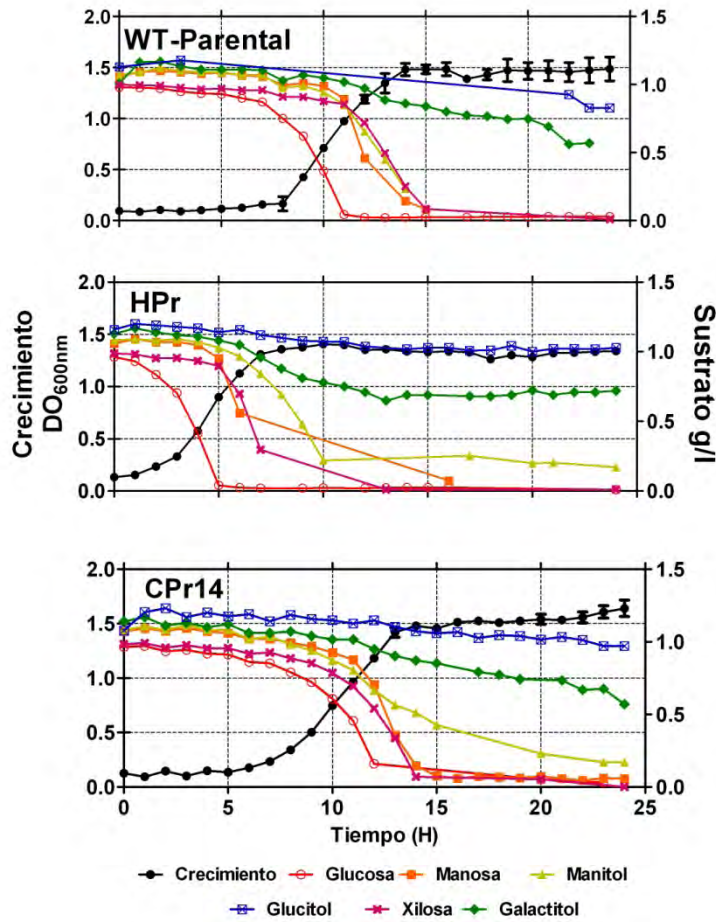


Figura 11.- Crecimiento y consumo de una mezcla de azúcares PTS para las células Δ con HPr y CPr14. La cepa parental BW25113 (WT) se muestra por motivos de comparación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado usando M9 con seis diferentes azúcares PTS más xilosa como fuentes de carbono (0.1% peso/volumen; 0.2 mM IPTG a 37°C).

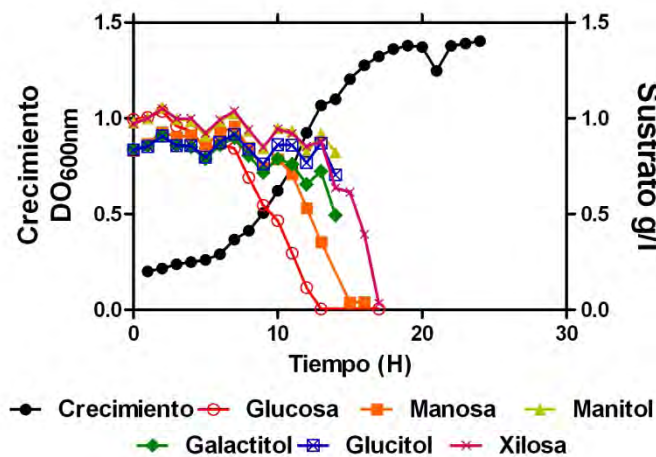


Figura 12.- Crecimiento y consumo de CPr6 en una mezcla de seis diferentes fuentes de carbono en medio mínimo M9. **Nota:** Debido a un problema con el sistema de HPLC después de las diez y seis horas del experimento se omitieron los valores posteriores.

Al comparar la utilización final de las seis fuentes de carbono después de las 25 horas de cultivo, observamos que HPr, CPr14 y la cepa parental fueron capaces de consumir aproximadamente de la misma manera las fuentes de carbono (Figura 13). A excepción del galactitol y el glucitol, el primero utilizado en mayor cantidad por la variante de CPr14 y el segundo por la cepa silvestre.

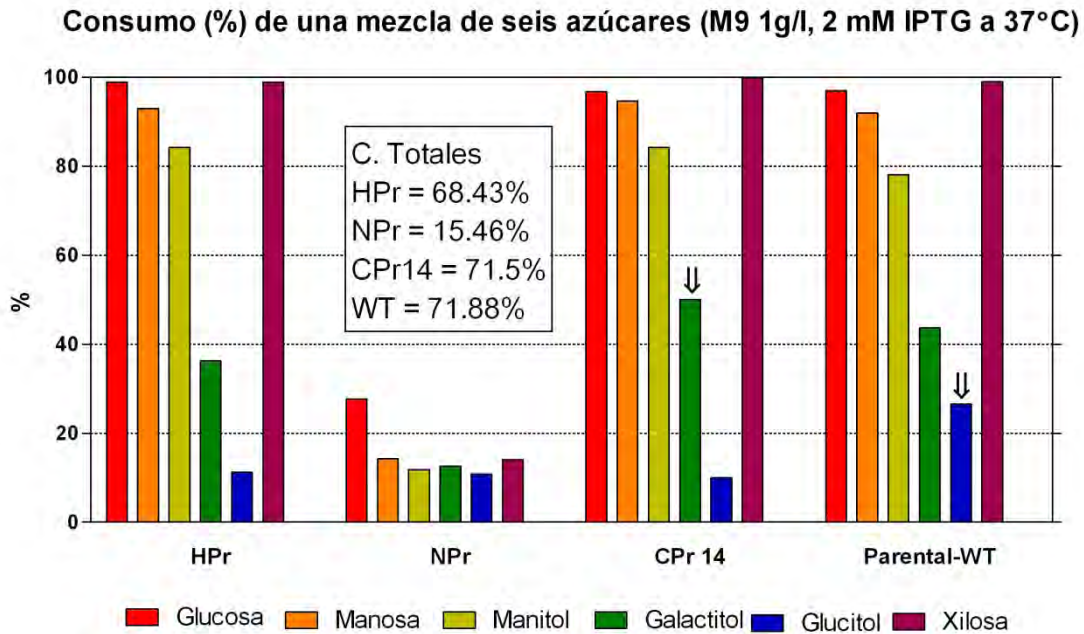


Figura 13.- Consumo de seis diferentes fuentes de carbono para cada una de las construcciones durante un periodo de 25 horas de cultivo en medio mínimo M9. Se muestran los consumos totales en el recuadro y resaltadas con flechas las diferencias más importantes en el consumo de galactitol y glucitol por parte de CPr14 y la parental respectivamente.

La proteína mutante de CPr14 permitió el crecimiento en la mayoría de los azúcares probados de manera individual a excepción del galactitol (Figura 10). Pero al parecer en una mezcla completa de diversas fuentes de carbono permite a las células 2Δ consumir este azúcar (Figuras 12 y 13).

Finalmente se comprobó que CPr14 es más eficiente que HPr al transportar azúcares mediante el transportador de manosa, ya que pudo transportar mejor el análogo no metabolizable de 2-deoxi glucosa (Lopez-de los Santos et al., 2012). También fue capaz de rescatar el crecimiento con fructosa como única fuente de carbono con las variantes CPr14 y CPr6 mientras que HPr fue incapaz de hacerlo (Figura 10).

Nivel de expresión de los genes NPr 14 y HPr en el vector pZE12

Con motivos de comparación de expresión a nivel de ARNm, se realizó un experimento con RT-PCR para comparar HPr y CPr14. Se obtuvo el ARN total de las células de 2Δ con las variantes y se trató con la enzima DNAsa I libre de RNAsas para eliminar el ADN residual. Se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes como una etapa de control. Posteriormente se llevó a cabo una reacción con la reversa transcriptasa con los oligonucleótidos reversos específicos para cada gen, obteniendo sólo los ADNc para los genes NPr 14 y HPr. Las concentraciones finales de cada uno de estos fragmentos de ADN fueron de 970 ng/ μ l y 943 ng/ μ l para HPr y NPr 14 respectivamente.

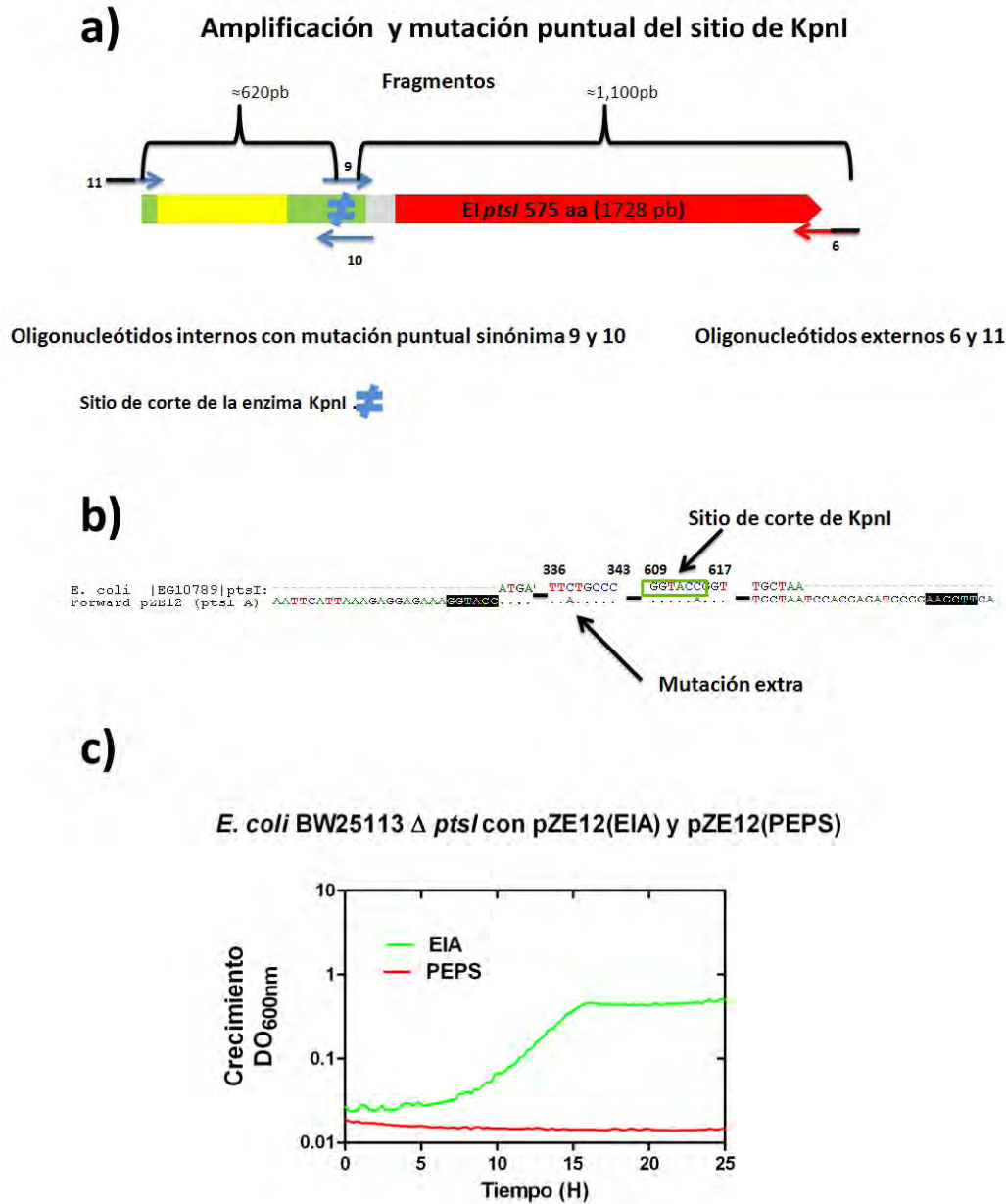
Se construyeron tres “librerías”, en las cuales se utilizó un oligonucleótido “random” de seis nucleótidos (5`NNNNNN3`). Las concentraciones de ADNc para cada una de las librerías fueron 1,156.3 ng/ μ l, 1,103.4 ng/ μ l y 1,052 ng/ μ l para *E. coli* BW25113 $2\Delta_{pZE12(CPr14)}$, BW25113 $2\Delta_{pZE12(HPr)}$ y BW25113 respectivamente. Estas librerías están guardadas a -60°C para su conservación y posterior análisis por PCR tiempo real, en caso de ser necesario, permitiendo calcular el nivel de expresión de dichos genes utilizando un gen de referencia, como el que codifica para una proteína de choque térmico (*e.g.*, *dnaK*).

Diseño y construcción de las quimeras de EI

Sistema de selección *in vivo* para las quimeras de EI

El sistema de selección *in vivo* se construyó con la cepa BW25113 de *E. coli* proveniente de la colección Keio (Baba et al., 2006) con una delección del gen *ptsI* que codifica para EI y con el vector de expresión pZE12. Se usaron como controles positivo y negativo el vector de expresión con los genes *ptsI* y *pps* (Figura 5). Debido a que se utilizó un vector derivado del pZE12 original (en nuestro caso sin “polilinker”), se usaron las enzimas KpnI y EcoRI para clonar los genes de EI y PEPS. Fue necesario armar en dos partes el gen de EI, alterando el sitio de corte de la enzima KpnI mediante una mutación puntual sinónima. En el transcurso de esta parte del trabajo fue preciso el uso del “*Kit QuickChange Site-Directed Mutagénesis*” ya que se obtuvo una versión

clonada del gen con un cambio no sinónimo (Figura 13b). Una vez armado el sistema de selección *in vivo* se comprobó mediante secuenciación la integridad de las construcciones, así como mediante complementación en medio mínimo con manitol como única fuente de carbono, logrando complementar nuestra versión de EI armada (EIA) perfectamente el crecimiento en medio con manitol (Figura 14c).



Figura

14.- Eliminación del sitio de corte KpnI en *ptsI* y prueba de nuestro vector con PEPS y EIA en BW25113 $\Delta ptsI$ a).- Proceso de amplificación de dos fragmentos de *ptsI* para eliminar el sitio de corte KpnI y clonarlo en el vector pZE12. b) Alineamiento parcial de las secuencias del gen *ptsI* silvestre y el gen armado con una mutación dirigida sobre el sitio de corte de la enzima KpnI (recuadro verde): se muestra la mutación adicional que fue removida con la ayuda del “Kit QuickChange Site-directed Mutagenesis”. Los sitios de corte de las enzimas de restricción de KpnI y HindIII utilizados (resaltados) c).-Se observa que EI Armada (EIA) fue capaz de rescatar el crecimiento en BW25133 $\Delta ptsI$ de *E. coli* en medio M9 con 1g/l de manitol como única fuente de carbono 0.2 mM IPTG.

Se clonó el gen de la enzima PEPS (*pps*) en el vector de expresión pZE12, pasando antes por el vector pJet como vector suicida de clonación. Para la clonación en el vector suicida se utilizó la cepa Top 10 de *E. coli*, mientras que la cepa MC1061 se usó para la purificación del vector de pZE12. La estructura correcta se comprobó mediante secuenciación (Figura 15). Este gen clonado en el vector de expresión (pZE12) posteriormente sirvió como control negativo para los ensayos de complementación y como templado para la construcción de las quimeras de EI.

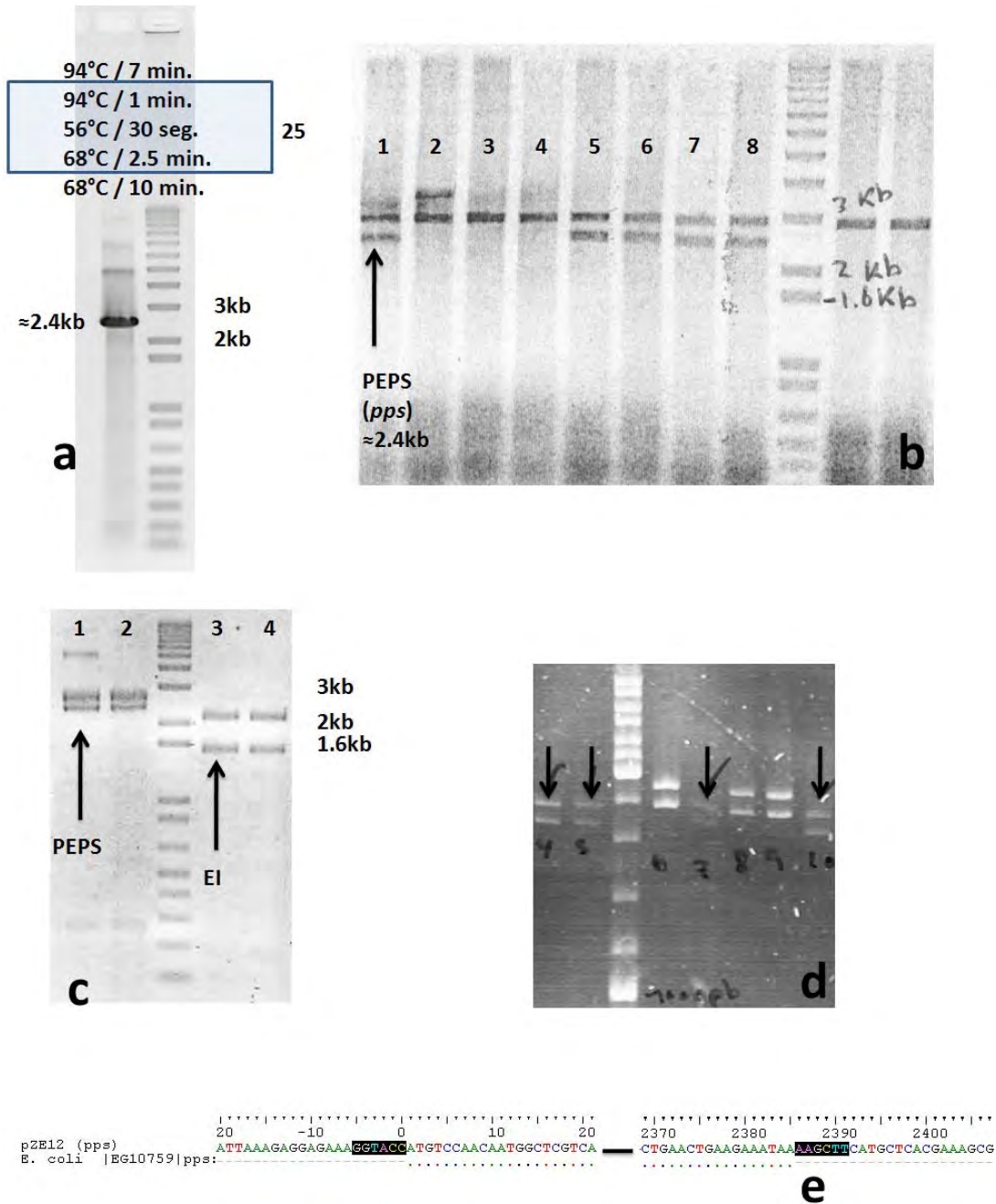


Figura 15 (página anterior).- Clonación de PEPS en el vector de expresión pZE12. **a)** Amplificación del gen *pps* se muestran las condiciones de PCR en el recuadro **b)** Se muestra la digestión de pJet (PEPS) con BglIII. **c)** Digestión de los vectores pJet(PEPS) y pZE12(EIA) con las enzimas EcoRI-HindIII. **d)** Digestión (EcoRI y HindIII) de las construcciones pZE12 (PEPS) seleccionadas azarosamente a partir de colonias de la cepa de *E. coli* MC1061 (resaltan clonaciones exitosas con flechas). **e)** Alineamiento de *pps* vs el vector pZE12 (*pps*) se muestra en los recuadros negros el sitio de corte EcoRI y HindIII.

Origen de las quimeras de EI

El diseño de las quimeras incorporó dos alternativas (Figura 16), debido a que ambas proteínas parentales (EI y PEPS) poseen tres dominios funcionales (en estricto sentido EI posee sólo dos dominios, estando el dominio N-terminal compuesto de dos sub-dominios: el de reconocimiento de HPr y el sub-dominio central con la histidina catalítica -obsérvense las Figuras 4 y 17- arbitrariamente se mencionaran estos sub-dominios como dominios) ambas con un dominio central móvil con la histidina catalítica que de manera alternativa genera dos diferentes interacciones (una con cada uno de sus dominios compañeros). Nos inclinamos por desarrollar quimeras que preservaran el reconocimiento por el dominio de unión a HPr sacrificando la interacción con el dominio de ATP.

Elegimos esta alternativa basados en tres consideraciones. La primera es que la proteína de EI posee estructuras experimentales mientras que PEPS no, con la finalidad de realizar un diseño racional (mutaciones sitio-dirigidas) optamos por usar a EI como donadora de dos terceras partes de la estructura de las quimeras. La segunda posee un carácter funcional. Preferimos no modificar la interacción del dominio central con el dominio de unión a HPr, ya que EI sólo se une a HPr si el dominio central está interactuando con el dominio de reconocimiento a HPr. La tercera consideración es de carácter estructural por que el dominio de unión a HPr (dominio amarillo Figura 17) está unido por dos lados al dominio central, mientras que el ATPgrasp en PEPS sólo está unido al resto de la proteína por su C-terminal. Por esto elegimos realizar ingeniería sobre la unión de ATPgrasp al dominio central de EI.

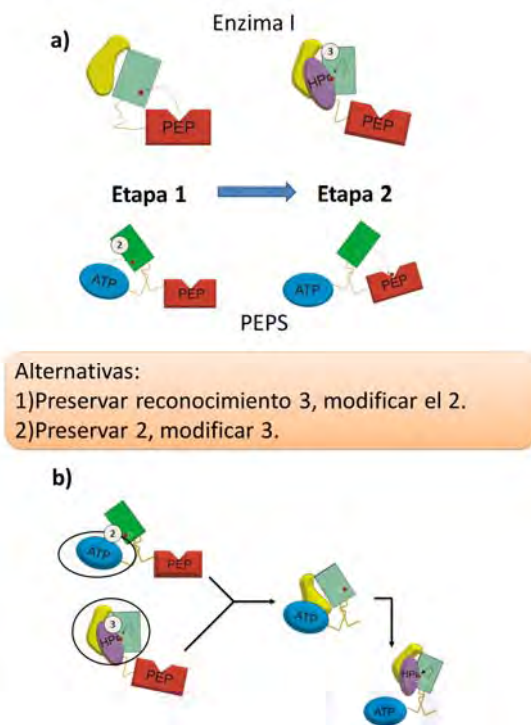


Figura 16.- Alternativas consideradas para la generación de las quimeras de EI. **a).**- Esquemas de los componentes de las enzimas parentales mostrando la autofosforilación (etapa 1) y la transferencia del grupo fosfato al siguiente dominio proteico (etapa 2) o HPr en el caso de EI. **b).**- Alternativa seleccionada para construir las quimeras. **Nota:** En los esquemas se representa los dominios funcionales en colores que se respetan en todas las figuras presentadas en este trabajo.

Para el diseño de las quimeras se decidió utilizar a una estructura de PEPS modelada (Modelación por Homología) tomando como apoyo la estructura experimental de *Neisseria meningitidis* de 2.4Å de resolución (Figura 17). A pesar de que esta estructura está incompleta por no presentar las regiones móviles de las conexiones entre los tres dominios, las regiones del dominio central (al menos la cara de reconocimiento con la histidina catalítica) y el dominio de ATPgrasp están perfectamente bien delimitados. Por esta razón tenemos la noción de que al menos la estructura modelada de ATPgrasp de PEPS de *E. coli* fue apropiada para los objetivos de diseño de nuestras quimeras sin perder de vista las limitantes mismas del diseño por homología.

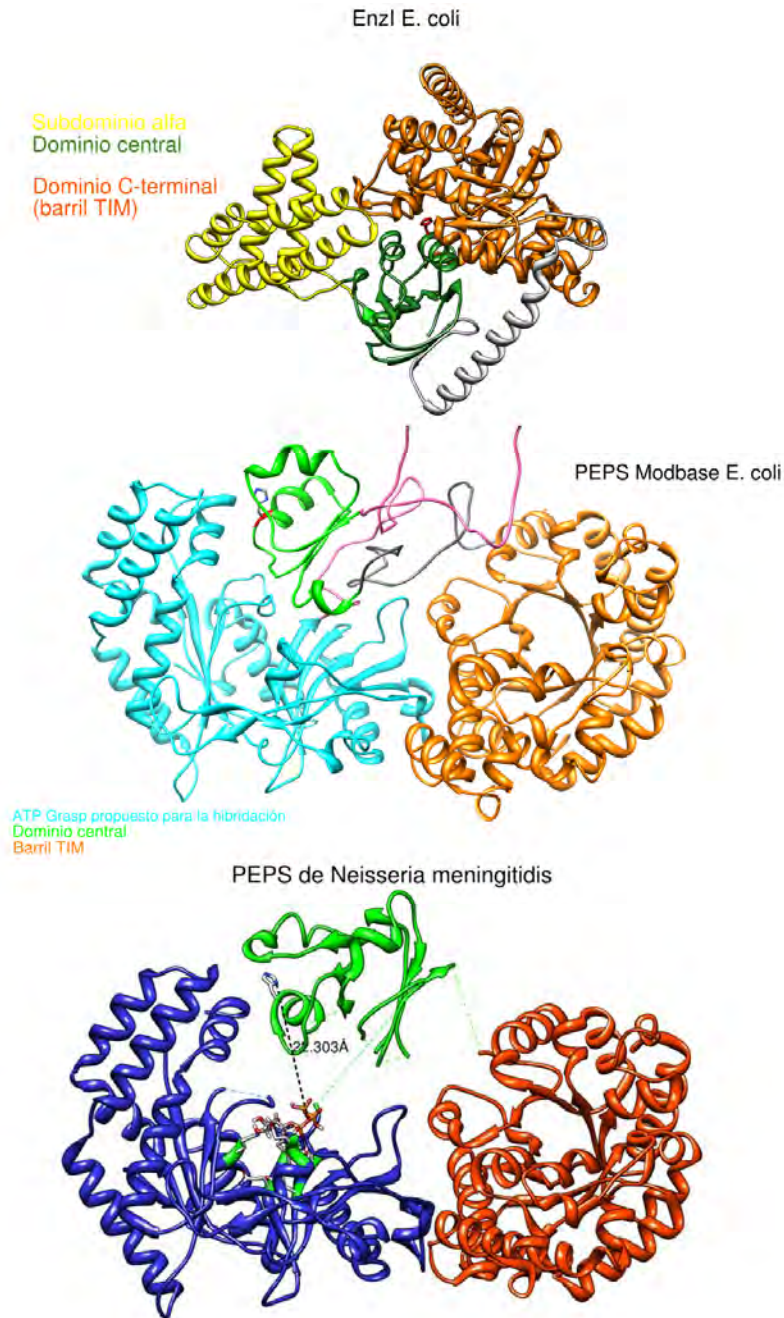


Figura 17.-

Estructuras de las proteínas parentales. Se muestran los dominios ATPgrasp (azul), dominio central con la histidina catalítica (verde), barril TIM (naranja) también el dominio de unión a HPr (amarillo). **Nota:** Las imágenes se muestran de N a C terminal de izquierda a derecha.

Diseño de las quimeras PEPS-EI y EI-PEPS

Decidimos construir dos versiones de quimeras, aquellas con el ATPgrasp en el N-terminal (PEPS-EI) y en el C-terminal (EI-PEPS). De esta manera exploramos la posición natural de los dominios de las proteínas parentales (Figura 17).

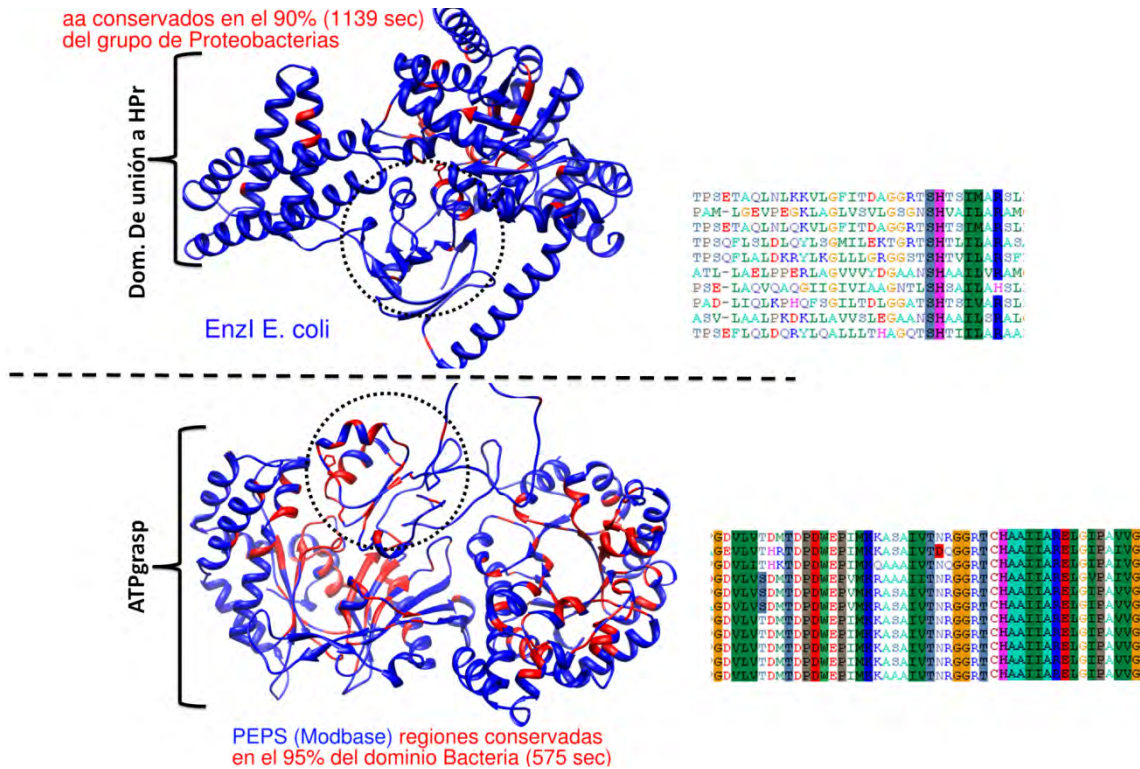


Figura 18.- Localización estructural de los “aa” conservados de EI y PEPS. Las regiones conservadas se muestran en rojo y las regiones variables en azul. La posición de las proteínas es la misma que en las estructuras que se muestran en la Figura 17. Se resalta el dominio central con un círculo y se muestra la cadena lateral de la histidina catalítica.

Como resultado de los análisis de alineamientos múltiples y el de Traza Evolutiva o “ATE” localizamos los aminoácidos conservados de las regiones funcionales de EI y PEPS (Figura 18). Las zonas proteicas con mayor grado de conservación se observaron sobre el barril TIM en el caso de EI (Tabla IV), mientras que PEPS exhibió un número similar de aa conservados entre ATPgrasp y el barril TIM (87 y 88 aa respectivamente).

Los dominios centrales de ambas proteínas mostraron un número de aminoácidos conservados muy diferentes, mientras que el dominio central de PEPS posee 28 aa, el dominio central de EI apenas exhibió cinco aa conservados, distribuidos tres en la cara de reconocimiento y dos en el núcleo del mismo dominio. En ambos casos los aa conservados se encontraron rodeando a la histidina catalítica.

Sorprendentemente, la región de las alfa hélices del dominio de reconocimiento de HPr mostraron solo tres aa conservados; estos aa se encuentran expuestos hacia la cara de contacto con HPr y no del lado que interactúa con el dominio central.

Tabla IV.- Resultados de los alineamientos de EI y PEPS

aa conservados en EI y PEPS de <i>E. coli</i>					
Proteína	N terminal (alfas hélices y ATPgrasp)	DC	TIM	Total	% conservación
EI	3	5	22	30	5
PEPS	87	28	88	203	25

Construcción de los modelos de las quimeras

Ambos modelos de quimeras (PEPS-EI y EI-PEPS) se construyeron gracias a la ayuda de las herramientas del software Chimera. Se tomó el ATPgrasp modelado por MODBASE en la estructura de PEPS de *N. meningitidis* y mediante manipulación manual se armaron las distintas quimeras (Figura 19). Para la quimera PEPS-EI la región de EI por fusionar estuvo comprendida entre la I4 a D221, mientras que para las quimeras EI-PEPS abarcó de M1 a A261. Para ambos casos la sección de PEPS que se fusionó fue la abarcada por los residuos del M1-E338 justo antes de comenzar el conector que une a éste con el dominio central en PEPS. El residuo de ácido glutámico 338 fue el último de los residuos que en el modelo de PEPS de *E. coli* estaba formando parte del ATPgrasp, y por esta razón se seleccionó como el último aa por tomar para las quimeras.

Al colocar al ATPgrasp en el carboxilo terminal (Figura 19) se decidió diseñar un conector artificial basado en una composición de ocho glicinas y dos serinas para permitirle tener flexibilidad de plegamiento al conector entre la fusión de los dominios. El conector se diseñó con una firma de cuatro glicinas (GGGSG) y una serina (de naturaleza polar). El uso de oligonucleótidos con variabilidad en composición y longitud nos permitió explorar distintas proximidades entre los dominios a fusionar.

En el caso de las quimeras tipo EI-PEPS decidimos utilizar un elemento estructural natural de la EI en forma de *brazo* que conecta el barril TIM con el dominio central. Este elemento se encuentra resaltado en gris en la Figura 17 como una alfa hélice larga que toma por detrás al barril TIM. De esta manera explotamos este elemento estructural de EI para fusionar un nuevo dominio con un volumen similar al ocupado anteriormente por el barril TIM. Solo dirigimos la diversidad a un par de aa que podrían funcionar como bisagras entre el ATPgrasp y el *brazo* que lo conecta con el resto de la proteína, con la finalidad de proveer de flexibilidad y cierta libertad a las quimeras.

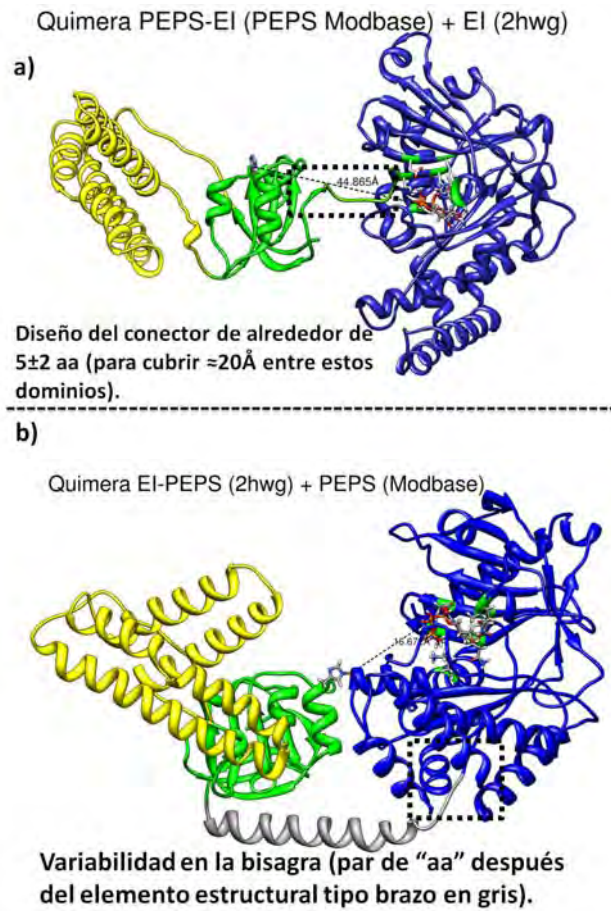


Figura 19.-Modelos de las dos quimeras resaltando los dominios y los diferentes motivos estructurales, se indica la distancia entre la histidina catalítica y el átomo de fósforo del ATP capturado por el ATPgrasp (azul). Se muestra las diferentes conexiones diseñadas para la fusión de los dominios (recuadros negros punteados).

En el análisis obtenido de DynDom (Figura S8) se observaron tres puntos de inflexión sobre los elementos estructurales que sirven de anclaje entre los tres dominios de PPDK, los cuales podrían servir de pivote para el movimiento alrededor del DC. Considerando las similitudes estructurales, así como la filogenia entre esta proteína y las proteínas parentales, decidimos explotar el

funcionamiento natural de estas enzimas incorporando un conector variable para las quimeras PEPS-EI y reutilizando el elemento estructural tipo *brazo* en las quimeras EI-PEPS.

Diseño de la cara de contacto en las quimeras de EI

Indistintamente para cualquiera de las quimeras (PEPS-EI y EI-PEPS) se buscó aumentar la afinidad del DC de EI para reconocer al nuevo dominio fusionado de ATPgrasp. Con esa finalidad se analizaron las distintas interfaces de comunicación entre los dominios centrales de EI y PEPS con sus compañeros naturales (Figura 20), y se determinó mediante los "ATE" y los análisis de alineamientos aquellos residuos que podrían estar involucrados en dicho reconocimiento molecular. La superposición estructural de los dominios centrales nos permitió observar que ambos DC poseían relativamente la misma estructura secundaria de dos alfa hélices formando la cara de contacto, para EI la hélice 1 de los residuos de aspártico 162 a la leucina 175 mientras

que la hélice 2 comprende de la treonina 187 al glutámico 198. El DC de PEPS es más grande que el de EI (no es posible saber con exactitud que longitud ya que actualmente no se cuenta con los resultados experimentales estructurales), ya que éste abarca del aspártico 148 al aspártico 221 (Figura 20d).

Un alineamiento parcial de ambos DC mostró que poseen un porcentaje de identidad cercano al 29%, con 53% de similitud en su composición de residuos, posicionando como era de esperarse residuos conservados cercanos a la histidina catalítica. Considerando los resultados de “ATE” localizamos al menos diez residuos altamente conservados en DC de EI dispersos sobre las alfa hélices 1 y 2; por otro lado, en el DC de PEPS sólo se encontraron ocho (Figura 21). De estos aa blanco se eligieron solo 5 de ellos, ya que el resto son compartidos entre las caras de reconocimiento. En base a esto decidimos sustituir aquellos que consideramos importantes (para la interacción ATPgrasp-DC de PEPS) en el DC de EI con la finalidad de mimetizar la cara de contacto y aumentar la afinidad por ATPgrasp. Los aa seleccionados fueron para el alfa 1 la S166D, A169E y Q170P, mientras que para alfa 2 se seleccionaron M193I y S196E.

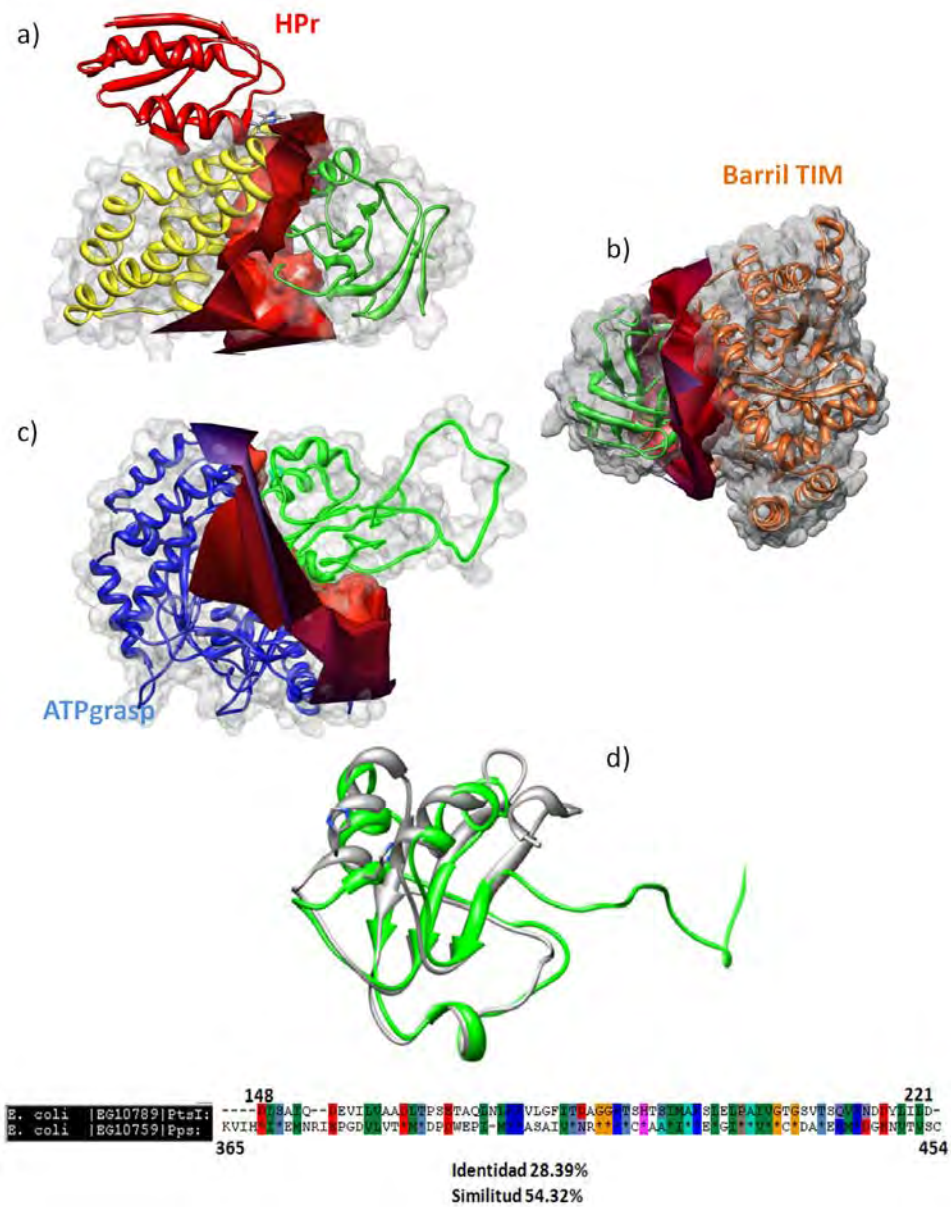


Figura 20.- Interfaces del dominio central de EI y PEPS. **a)-** Interface de DC de EI con las alfas hélices de reconocimiento de HPr. **(b)** con el barril TIM. **(c)** la interface del DC con ATPgrasp en PEPS. **(d)** Superposición del DC de EI (verde) y el dominio central de PEPS (gris claro), así como el alineamiento parcial de sus secuencias de aminoácidos mostrando su porcentaje de identidad (*) y similitud (columnas de colores).**Nota:** se muestran en rojo las interfaces de cada una de las uniones.

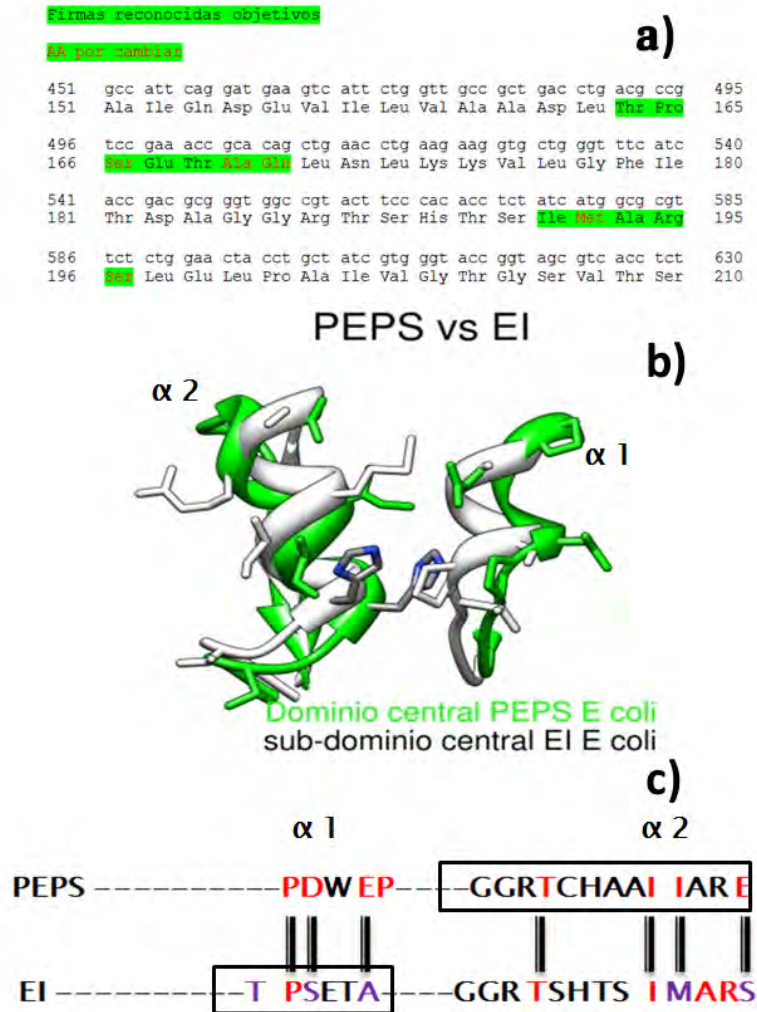


Figura 21.- Rediseño de la cara de contacto del DC de EI para reconocer el dominio ATPgrasp de PEPS. **a)** Aminoácidos objetivos en la modificación de la cara de contacto. **b)** Sobreposición de las caras de contacto del dominio central de EI y PEPS. **c)** Residuos identificados como candidatos para mutación en color (rojo o violeta) donde se muestran resaltados (violeta) aquellos residuos seleccionados para re-diseño de cara de contacto de PEPS a EI.

La construcción de la primera generación (G1) de quimeras de EI

Se construyeron tres generaciones de quimeras denominadas como G0, G1 y G3. La primera fueron las quimeras sin cambios sólo dominios fusionados (Figura 19). La generación 1 (G1) fue aquella que involucró cambios en la cara de contacto del dominio central y las bisagras variables. La G2 fueron las quimeras que tuvieron cambios sólo en el alfa hélice 2 del dominio central de EI y variabilidad de conectores.

Construcción de quimeras PEPS-EI

Para construir las quimeras PEPS-EI se utilizaron seis diferentes oligonucleótidos (Figura 22). Se logró fusionar los distintos productos de PCR para obtener dos grupos (o mini-bancos) de quimeras, el primero con la cara de contacto sin modificaciones y el segundo con mutaciones sitio dirigidas en la cara de contacto del dominio central de EI.

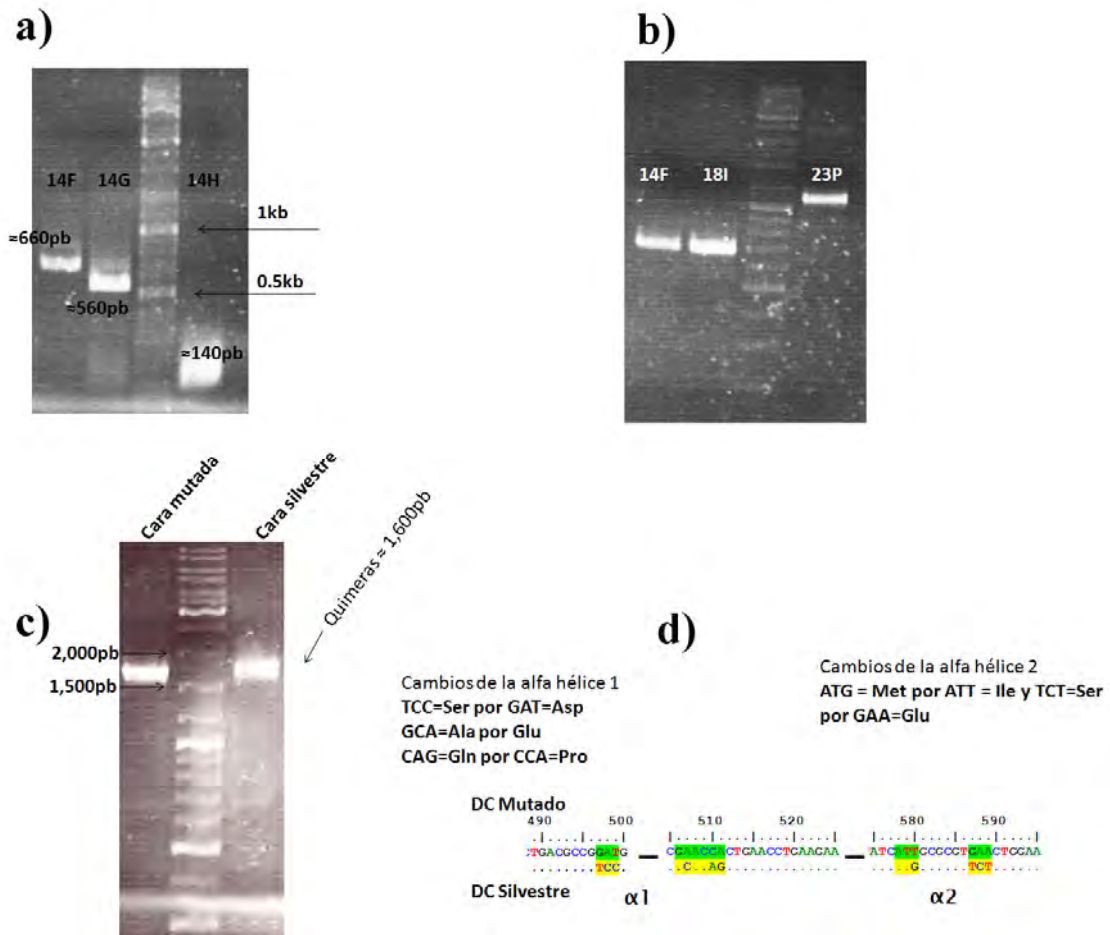


Figura 22.- Armado de quimeras. **a)** 14F: cara de contacto sin cambios, los productos 14G y 14H sirvieron para mutar la cara de contacto. **b)** 18I: fragmento de la cara de contacto con mutaciones y 23P representa banco con conector de longitud variable unido al ATPgrasp de PEPS. **c)** Productos finales de un PCR de traslape de las quimeras PEPS-EI con y sin la cara de contacto mutada. **d)** Cambios en las alfas hélices mutadas y secuenciadas.

Construcción de quimeras EI-PEPS

En la construcción de las quimeras EI-PEPS se utilizaron siete diferentes oligonucleótidos, con las mutaciones dirigidas hacia las alfa hélices de la cara de contacto, y oligonucleótidos degenerados para conferir de variabilidad de los 20 aminoácidos a los residuos de la bisagra (Figuras 19 y 23). Con la ayuda de PCR de traslape se obtuvieron los diferentes tipos de quimeras EI-PEPS, una quimera básica sin cambios en cara de contacto ni bisagras, una quimera con cambios sólo sobre la cara de contacto, una tercera quimera con cambios sobre la bisagra (banco), y finalmente el banco de quimeras que poseían cambios en la cara de contacto y variabilidad sobre la bisagra.

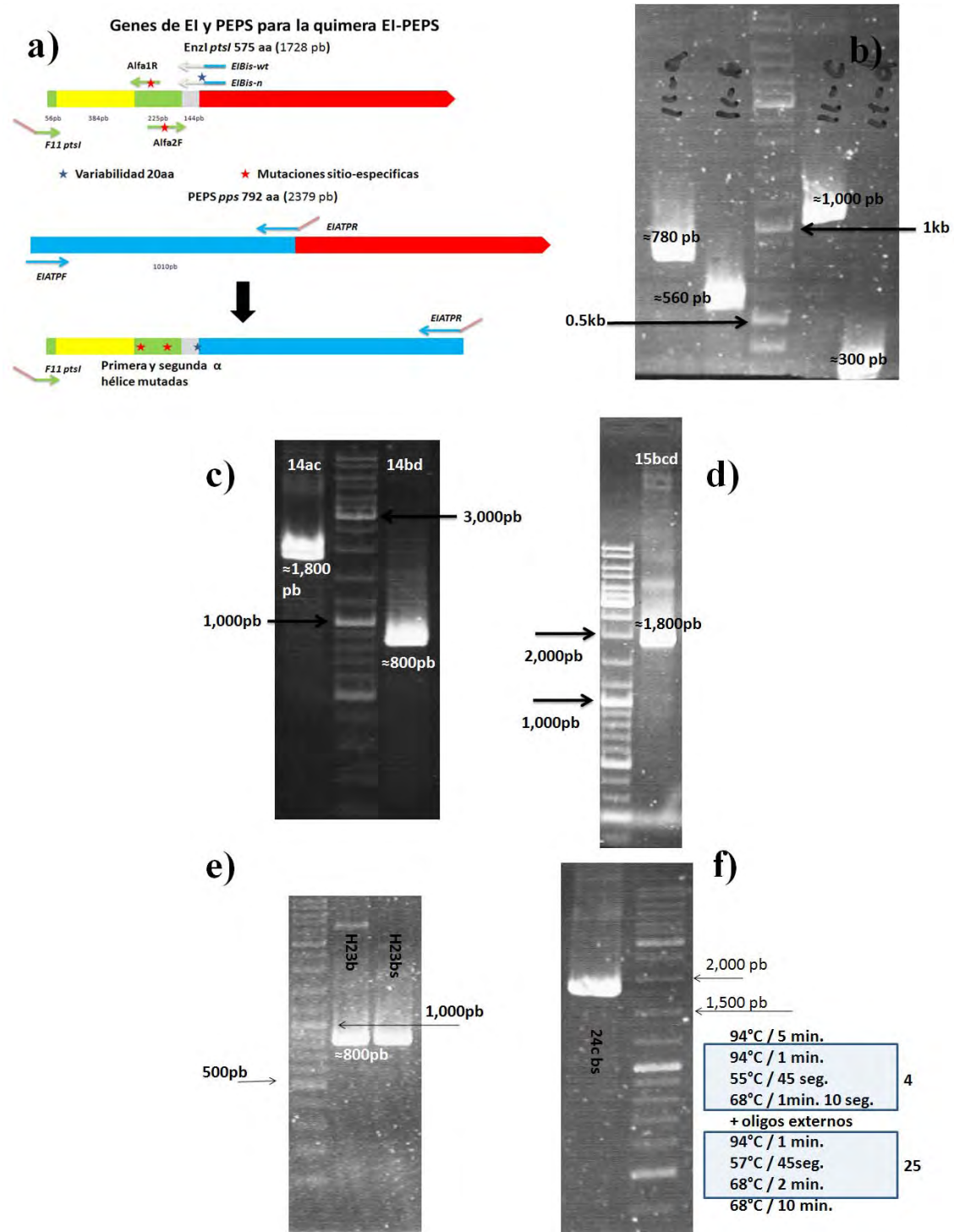


Figura 23.- Construcción de las quimeras EI-PEPS. **a)** Esquema que explica la construcción de las diferentes quimeras EI-PEPS. Los oligonucleótidos se representan con flechas de colores **b)** Productos de PCR necesarios para el armado de las distintas quimeras (EI-PEPS): 11a sin modificaciones en la cara de contacto y bisagra, 11b con mutaciones específicas sobre la primera hélice alfa de la cara de contacto, 11c (ATPgrasp), 11d mutaciones dirigidas sobre la segunda hélice alfa de la cara de contacto. **c)** producto 14ac obtenido de la fusión entre los productos 11a y 11c quimera básica sin cambios, producto 14bd obtenido de la fusión de los productos 11b y 11d rindiendo la cara de contacto del dominio central con los 5 cambios puntuales. **d)** Fusión de los productos 14bd y 11c rindiendo la quimera con los cambios en la cara de contacto. **e)** H23b para generar banco de variantes de bisagras variables y producto H23bs banco de variantes con cambios en la cara de contacto y las bisagras variables. **f)** Armado del banco de quimeras con cambios en la cara de contacto y bisagras (fusión de los productos de PCR H23bs y 11c). Se presenta en recuadros las condiciones de PCR utilizadas en la fusión de estos fragmentos.

Utilizando los productos de PCR y las fusiones entre estos fragmentos se logró clonar estas quimeras en células de la cepa *E. coli* MC1061 y Top 10. Posteriormente se mandaron a secuenciar aquellas colonias que presentaron insertos del tamaño esperado ($\approx 1,800$ pb) para las quimeras. Se confirmó la construcción y clonación exitosa de al menos dos tipos diferentes de quimeras (Figura 24), la quimera wt sin cambios ni en bisagra ni en la cara de contacto del dominio central de EI, y una quimera con las mutaciones sobre la cara de contacto y una bisagra mutada al azar.

Quimera EI-PEPS quimera sin cambios (WT o básica)

```
MISGILASPGIAFGKALLKKEDEIVDRKKISADQVDQEVERFLSGRAKASQALETIKTKAGETFGEEKEAIFEGH
IMLLEDEELEQEIIALIKDKHMTADAAAHEVIEGQASALEELDDEYLKERAADVRDIGKRLRNILGLKIIDLSAI
QDEVILVAADLTPETLNKLVLFITDAGGRTSHTSIARLELPAIVGTGSVTSQVKNDDYLILDVANN
QVYVNPTEVIDKMRVAVQEQVASEKAELAKLKLPAIMSNNGSSPLVLWYNQLGMNDVDRVGGKNASLG
EMITNLSGMGVSVPNGFATTADAFNQFLDQSGVNRQRIYELDKTDIDDVTQLAKAGAQIRQWIIDTPFQPE
LENAIREAYAQLSADDENASFAVRSSATAEDMPDASFAGQQTFLNVQGFDAVLVAVKHVFASLFDRAISY
YRVHQGYDHRGVALSAGVQRMVRSDLASSGVMFSDTESGFDQVVVITSAWGLGEMVVQGA VNPDEFYV
VHKPTLAANRPAIVRRMTGSKKIRMVYAPTQEHGKQVKIEDVPQEQRDIFSLTNEEVQELAKQAVQIEKHY
GRPMDIEWAKDGHTGKLFIVQARPE—
```

Bisagra variable

Cara de reconocimiento modificada residuos objetivo

Quimera Chi 5 B con la cara de contacto mutada y con la bisagra cambiada.

```
MISGILASPGIAFGKALLKKEDEIVDRKKISADQVDQEVERFLSGRAKASQALETIKTKAGETFGEEKEAIFEGH
IMLLEDEELEQEIIALIKDKHMTADAAAHEVIEGQASALEELDDEYLKERAADVRDIGKRLRNILGLKIIDLSAI
QDEVILVAADLTPETLNKLVLFITDAGGRTSHTSIARLELPAIVGTGSVTSKVKNDYILDVANNQ
VYVNPTEVIDKMRVAVQEQVASEKAELAKLKLPAIMSNNGSSPLVLWYNQLGMNDVDRVGGKNASLGE
MITNLSGMGVSVPNGFATTADAFNQFLDQSGVNRQRIYELDKTDIDDVTQLAKAGAQIRQWIIDTPFQPEL
ENAI REAYAQLSADDENASFAVRSSATAEDMPDASFAGQQTFLNVQGFDAVLVAVKHVFASLFDRAISY
RVHQGYDHRGVALSAGVQRMVRSDLASSGVMFSDTESGFDQVVVITSAWGLGEMVVQGA VNPDEFYV
HKPTLAANRPAIVRRMTGSKKIRMVYAPTQEHGKQVKIEDVPQEQRDIFSLTNEEVQELAKQAVQIEKHYGR
PMDIEWAKDGHTGKLFIVQARPE**
```

Figura 24.- Secuencias obtenidas de clonas elegidas azarosamente con dos quimeras tipo EI-PEPS en el vector pZE12.

Utilizando el sistema de selección *in vivo* se observó que las quimeras clonadas en nuestro vector de expresión y secuenciadas fueron incapaces de complementar el crecimiento en medio mínimo M9. Se realizaron más experimentos de

complementación en los cuales se probaron las quimeras PEPS-EI y EI-PEPS iniciales sin cambios en la cara de contacto y bisagra (quimeras G0), así como quimeras con cambios en la bisagra y cara de contacto (quimeras G1). No se obtuvo ninguna construcción capaz de permitir el crecimiento en medio mínimo M9 con manitol como única fuente de carbono.

Construcción de quimeras 1/2 (G2)

Mientras se construían las quimeras de primera generación (con cambios dirigidos y conectores variables) se diseñó un nuevo tipo de quimeras, que sólo conservaban mutaciones sobre su alfa hélice 2. Para el desarrollo de esta nueva línea de quimeras se utilizó una aproximación nueva, basada en la detección de puntos calientes o “Hot Spots” energéticamente importantes para las interfaces proteína-proteína. La técnica experimental conocida como Escaneo por Alaninas o “Alanine Scanning” se

apoya en la mutación de los residuos de las interacciones proteína-proteína por alaninas, permitiéndonos identificar cuales residuos son críticos para las interfaces y cuáles no. Usando la herramienta el servidor ROBETTA para el escaneo por alaninas establecimos un nuevo criterio de selección para los aa objetivo de la interface, y decidimos re-diseñar la cara de contacto de DC de EI.

En la identificación de los puntos calientes de los dominios centrales de EI y PEPS, se usaron las estructuras de EI unida a HPr, a EI fosforilada unida al barril TIM y a la estructura de PEPS de *N. meningitidis* donde se observan bien las caras de reconocimiento del DC con el ATPgrasp (3eza,2hgw y 2ols respectivamente). El proceso consistió en localizar el eje de la interface y aislar a cada uno de los participantes para después someterlos al “Alanine Scanning” *in silico* del servidor de Robetta que maneja el programa de Rosetta para conseguir las tablas de resultados (Figura 25).

Debido a los requerimientos de cómputo del servidor, las diferentes interfaces experimentales se sometieron a diversos refinamientos. En la interface DC-TIM se eliminaron los residuos del extremo N-terminal que se encuentran fuera de la interface de contacto, pero que están formando parte de un ancla que junta el dominio amarillo de unión a HPr con el DC (Figura 25), justo antes de la secuencia DLSA de las alfa hélices. Los residuos del elemento estructural tipo *brazo* que conectan con el barril TIM fueron eliminados antes de la secuencia PAITL, eliminando también el átomo de Mg^{+} y el oxalacetato utilizado como sustituto de PEP para la cristalografía.

Se modificó el rotamero de la histidina catalítica 189 de EI utilizando la librería Dumbrack, ya que este residuo se encontraba unido a un átomo de fósforo en la estructura experimental. Se utilizaron las opciones presentes en el programa Chimera para la sustitución de rotameros.

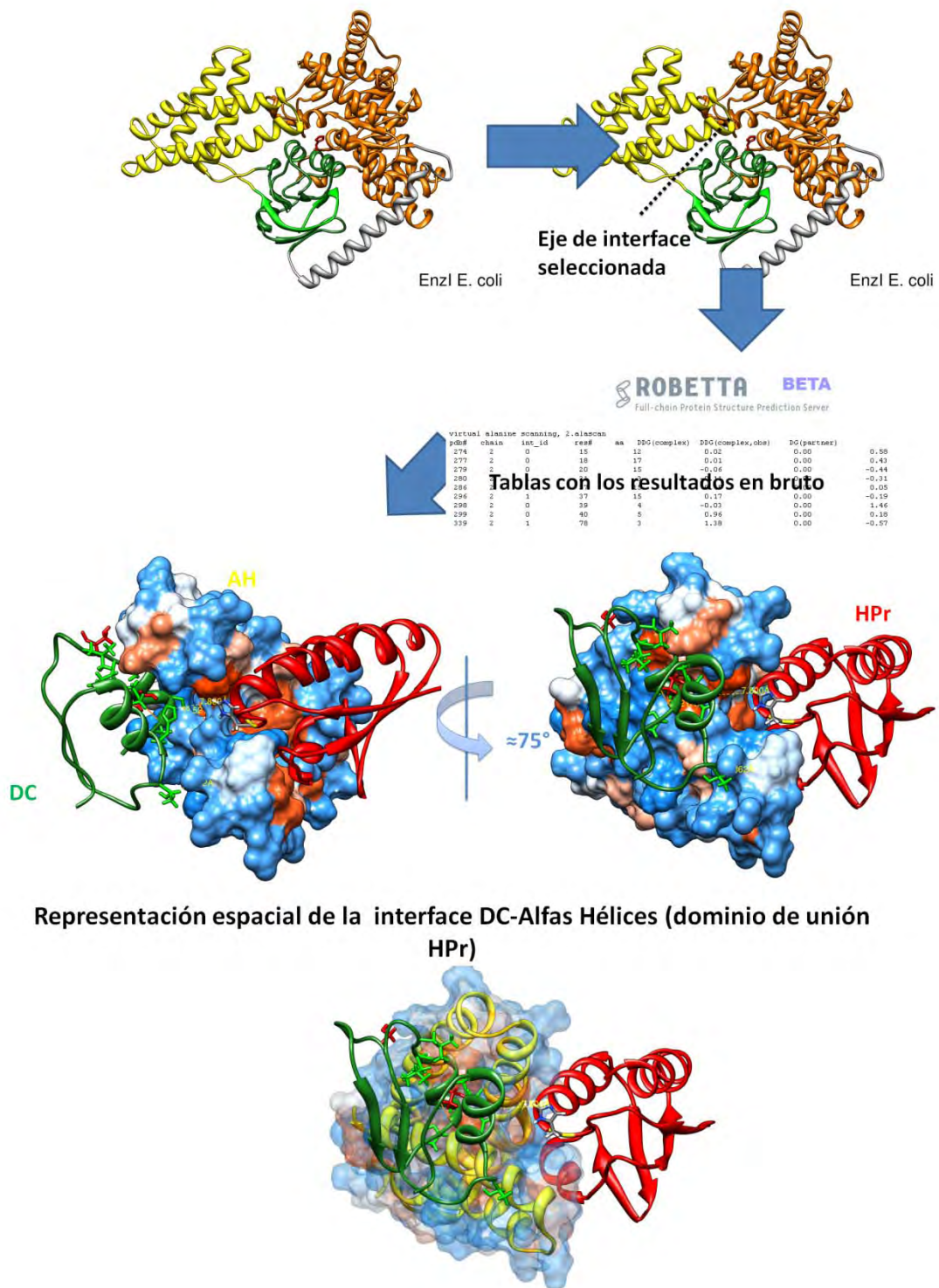


Figura 25.- Proceso de “escaneo por alaninas” (*in silico*). Se muestra el resultado del análisis de la interface dominio central (DC)-alfas hélices (AH). Las cadenas laterales mostradas representan la mitad de la interface (sólo las del DC). En rojo se muestran las interacciones negativas mientras que en verde están aquellos aa que favorecen la energía de unión de la interface. **Nota:** La superficie representada muestra su carácter hidrofóbico (rojo) e hidrofílico (azul).

Por ausencia de una estructura cristalográfica para la proteína de PEPS de *E. coli*, se utilizó la estructura de la proteína de PEPS de *Neisseria meningitidis* con una identidad del 0.9444 y una similitud con un valor de 1 en el DC entre ambas proteínas. Los resultados de “alanine scanning” mostraron que los residuos del dominio central que interactúan con el barril TIM y con ATPgrasp (en EI y PEPS respectivamente) se encuentran concentradas principalmente en el alfa hélice 2 (Tabla V), mientras que las interacciones con el dominio de unión a HPr se dan en su mayoría por alfa hélice 1.

Tabla V.- Posibles residuos importantes en la interacciones de DC de EI de *E. coli* según su efecto sobre la interface de contacto con el conjunto de alfa hélices y el barril TIM.

aa número	Efecto sobre TIM (T) o alfas (A)	Efecto (+) (-)	Tipo de aa
150	(A)	(-) (-0.04)	Ser
164	(A), (T)	(0.26) (+) (0.02)	Thr
166	(A), (T)	(0.25) (+) (0.56)	Ser
168	(A)	(-) (-0.03)	Thr
170	(A)	(+) (0.27)	Gln
171	(A)	(+) (0.06)	Leu
173	(A)	(+) (0.8)	Leu
186	(T)	(+) (1.89)	Arg
187	(A),(T)	(0.23) (+) (0.84)	Thr
188	(T)	(+) (1.01)	Ser
189	(A),(T)	(0.15) (+) (0.61)	His
190	(T)	(-) (-0.03)	Thr
191	(T)	0	Ser
192	(T)	(+) (0.73)	Ile
193	(A)	(+) (0.2)	Met
195	(T)	(+) (0.66)	Arg
196	(T)	(-) (-0.09)	Ser
197	(T)	0	Leu
198	(T)	(+) (0.38)	Glu
203	(T)	0	Val

Nota1: Cuando el aminoácido es importante para ambas interacciones como el aminoácido número 164 se colocan entre paréntesis los valores de interacción en unidades de kcal/mol de $\Delta\Delta G$ de unión sobre el complejo total. **Nota2:** El color sobre la columna de los números de “aa” señala las estructuras secundarias de las alfa hélices en verde y azul para las alfa 1 y 2 respectivamente. Los aminoácidos 166, 170, 193 y 196 habían sido reconocidos anteriormente como potenciales objetivos de mutación, según los análisis de traza evolutiva, la inspección sobre las estructuras experimentales y los análisis de alineamiento múltiple (se muestran en fuente azul).

Al comparar las interfaces formadas por el DC en EI observamos que son completamente diferentes (Figura 26), mientras que la interface DC-AH (alfa hélices) utiliza una cara hidrofóbica, la interface DC-TIM mostró lo contrario, con la participación de una zona hidrofílica (Figura 26a). La complementariedad de formas es también diferente, ya que en la interacción con el barril TIM el DC se acopla con éste mediante una depresión de carácter hidrofílico, mientras que no existe una depresión similar cuando interactúa con el dominio AH.

Al observar la contribución individual de los residuos de ambas interfaces, el DC mostró una contribución menor a la estabilidad de las interfaces ya que no presentó

ningún “punto caliente” en ninguna de las interfaces con los dominios compañeros. El DC contribuye estabilizando a las interfaces con tres residuos, dos en la interface con el barril TIM R186 y S188 con 1.89 kcal/mol y 1.01 kcal/mol respectivamente (Figura 26b), y con la leucina 173 en el complejo formado con AH con 0.8 kcal/mol. Todo lo contrario sucede para las contrapartes del barril TIM y AH, ya que contribuyen ampliamente con los residuos sobre sus caras de contacto: la interface DC-TIM con la participación de la arginina 465 con 5.23 kcal/mol (el valor más elevado reportado en este trabajo) y la fenilalanina 65 aportando 2.36 kcal/mol a la unión con AH (obsérvense las superficies mostradas en verde en la Figura 26b).

Se observó claramente que cada una de las interfaces analizadas presenta un grupo definido de diferentes residuos (Tablas V), que cooperan entre sí para estabilizar ambas uniones. La participación de los residuos en la cara de contacto del DC se encontró bien delimitada: residuos sobre el alfa hélice 1 en el reconocimiento de AH y residuos sobre el alfa hélice 2 reconociendo el barril TIM (Figura 26d).

Fue interesante notar que los residuos conservados (Figura 18) tanto para el dominio del barril TIM como para las AH podrían estar en su mayoría involucrados con funciones de estabilidad del plegamiento de los mismos dominios, ya que no se observó gran contribución a la formación de las interfaces de éstos con el DC (Figura 26c). Incluso, al parecer sólo estuvieron relacionados con la unión y reconocimiento de HPr, y con una contribución menor a la formación de la interface DC-TIM.

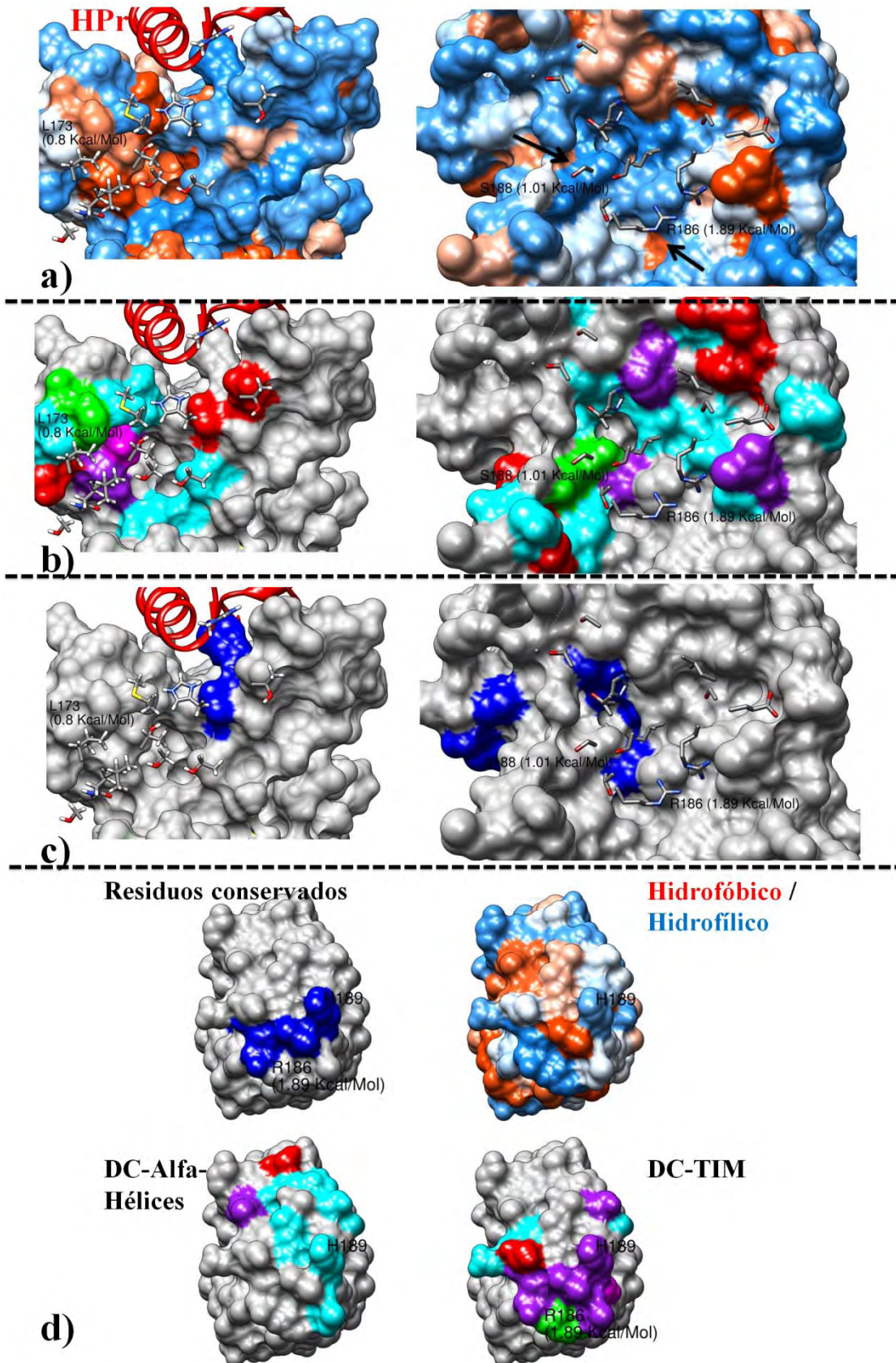


Figura 26.-Diseción de las interfaces de contacto del DC de EI. **a)** propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas. **b)** $\Delta\Delta G$ sobre la interface ≤ 0.05 kcal/mol (cian), 0.5-1 (Purpura), 1-1.5 (Magenta) y ≥ 1.5 (verde). **c)** Residuos conservados (azul). **d)** DC de EI. Del lado izquierdo se muestra la interface de unión con alfa hélices y del derecho con el barril TIM. **Nota:** Se muestran las cadenas laterales que forman la interface pertenecientes al DC de EI (Se resaltan los residuos importantes de DC con flechas).

En el caso de la interface ATPgrasp-DC de PEPS, los resultados mostraron que la interacción podría estarse dando del DC hacia la alfa hélice siete de ATPgrasp con la secuencia NPRAISYRVHKG, que abarca desde el residuo 167 al 178. Las dos alfa hélices del DC de PEPS que conforman la cara de contacto se encuentran compuestas por las firmas DPDWEP (399-405) y CHAIIAREP (421-433), terminando ésta última en la A430, cinco residuos después de la histidina catalítica de PEPS.

Tabla VI.-Posibles aminoácidos importantes en la interacciones de DC PEPS *N. meningitidis* según su efecto sobre la estabilidad del complejo DC y ATPgrasp.

AA número	Efecto (+)(-)	Tipo de AA	aacomptsI
368	(+)	Gln	-
397	(+)	Met	Leu163
399	(-)	Asp	Pro 165
419	(-)	Arg	-
420	(+)	Thr	-
422	(+)	His	-
425	(+)	Ile	-
429	(-)	Glu	Ser 196

aacomptsI = aminoácidos compartidos por *pps* y *ptsI*, donde (-) significa el mismo aminoácido.

Los residuos del DC de PEPS mostraron una tendencia similar a lo observado para las interfaces formadas por EI. Los residuos del alfa hélice 2 podrían estar involucrados con la interacción del DC con el ATPgrasp, mientras que los residuos del alfa hélice 1 apenas contribuyen en dicha unión (Tabla VI), y ninguno de los residuos analizados para la interface DC-ATPgrasp mostró valores mayores a 1 kcal/mol.

Los resultados obtenidos por el “Alanine Scanning” de PEPS en base a la estructura de *N. meningitidis*, son considerados incompletos por provenir de una estructura con regiones no resueltas localizadas en el lugar de los elementos estructurales que conectan los diferentes dominios (Figura 17). Decidimos utilizarlos, ya que presentan éstos congruencia con los resultados obtenidos del análisis de las interfaces formadas por EI y los resultados de Análisis de Traza Evolutiva, Alineamientos Múltiples, así como la inspección manual de los modelos. Por esta razón, se decidió mantener la alfa hélice 1 sin cambios y mutar a su compañera, tratando de favorecer la nueva interacción con ATPgrasp manteniendo su afinidad por el dominio amarillo (Figura 17).

Por lo tanto, realizamos una sustitución de residuos no polares hidrofóbicos (M193I) con las cadenas laterales expuestas hacia la cara de contacto con el ATPgrasp.

Este no apareció como un residuo importante en el análisis de la interface (Tabla V); sin embargo, apareció como uno de los aa conservados en el DC de PEPS de *E. coli* (ATE y AM) y favorece la interacción del DC de EI con el barril TIM. Para la segunda sustitución optamos por mantener un elemento con efecto negativo sobre la interface (Tablas V y VI), ya que apareció en los ATE con un valor alto de conservación para PEPS *E. coli*, insertamos un residuo polar cargado (-) sustituyendo a un compañero polar sin carga de menor tamaño (S196E).

Se construyeron los diferentes tipos de quimeras mediante PCR de traslape, acoplando nuevos oligonucleótidos con mutaciones dirigidas sobre la cara de contacto, únicamente sobre el alfa hélice 2 (Figura 21). De ahora en adelante se mencionaran éstas como quimeras 1/2.

Se probaron las quimeras construidas y clonadas en el vector de expresión en medio M9 con manitol como única fuente de carbono en la cepa de *E. coli* BW25113 $\Delta ptsI$. Cabe resaltar que las quimeras EI-PEPS 1/2 nunca se probaron ya que primero probamos otras quimeras recién construidas (Tabla VII).

Tabla VII.- Quimeras secuenciadas probadas en nuestro sistema de selección *in vivo*.

<i>Quimera</i>	<i>Tipo de Quimera</i>	<i>Características</i>
PEPS-EI	PEPS-EI	Sin cambios en la cara de contacto y conector “GGG”
EI-PEPS	EI-PEPS	Bisagra y cara de contacto sin cambios
24-1	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GG”
24-2	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGG”
24-6	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGS”
Q2	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGG” Mutación extra en una alfa hélice de reconocimiento de HPr I→T.
Q7	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGSG” Mutaciones extras en las alfa hélices de reconocimiento de HPr F→L y F→S.
Q11	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGG” / Mutaciones extras en las alfa hélices de reconocimiento de HPr E→K y E→G.
QE	PEPS-EI 1/2	Alfa hélice 2 mutada y conector “GGG”/ Mutaciones extras en las alfa hélices de reconocimiento a HPr.
BS9-2	EI-PEPS	Bisagra mutada (P→A y A→I) y cara de contacto con las 5 mutaciones puntuales diseñadas.
Parte del Banco de variantes	EI-PEPS	Parte del banco con cara mutada y las bisagras mutadas azarosamente.

Selección de quimeras en el sistema de selección *in vivo*

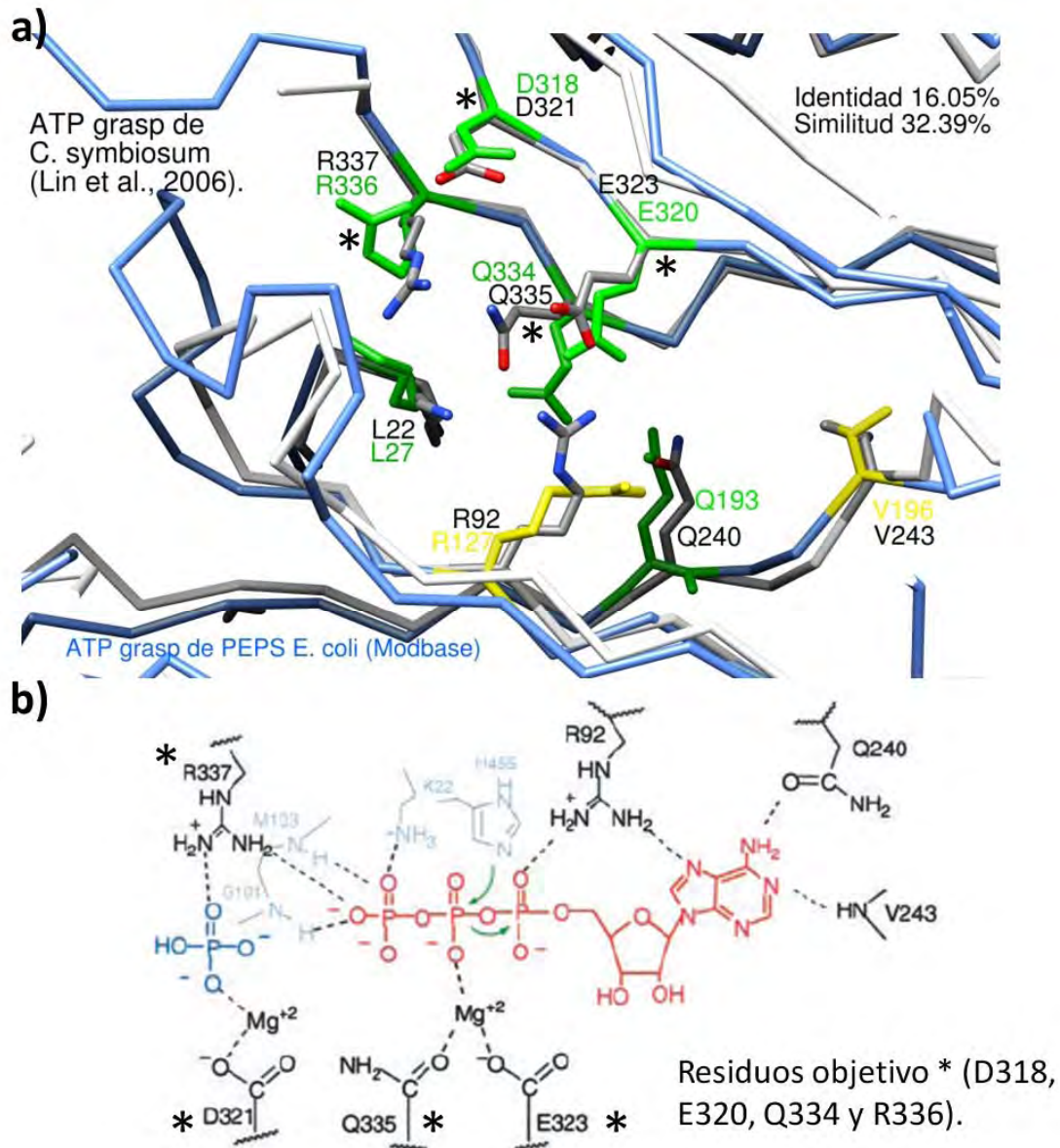
Dentro de las distintas quimeras construidas no identificamos ninguna capaz de complementar el crecimiento en nuestro sistema de selección *in vivo*. Por lo tanto, decidimos empezar a realizar experimentos para evaluar la auto-fosforilación.

El fenómeno de complementación en nuestro sistema de selección *in vivo* se debe a la suma de tres fenómenos. El reconocimiento del ATP por parte del ATPgrasp, seguido de una autofosforilación (mediado por la interacción entre el dominio central y el ATPgrasp) y finalmente el reconocimiento y fosforilación de HPr por EI. Construimos variantes de quimeras tipo PEPS-EI con sustituciones por alaninas sitio-dirigidas a la histidina catalítica y al ATPgrasp para comprobar si nuestra ingeniería de la nueva interface está o no permitiendo la autofosforilación.

El escaneo por alaninas de la histidina del DC de EI fue sencillo ya que se tiene perfectamente identificada como sitio activo en la posición 526. Por falta de una estructura cristalográfica experimental para PEPS de *E. coli*, decidimos utilizar la comparación de los ATPgrasp entre PEPS y PPDK (proteína homóloga de *Clostridium symbiosum*). Identificamos los residuos involucrados en el reconocimiento de ATP por parte de PEPS de *E. coli*. Lin y colaboradores (2006) resaltan la participación de ocho residuos en la captación de ATP en PPDK. Encontramos una correlación espacial casi idéntica entre la posición de estos residuos en PEPS respecto a PPDK (Figura 27) a pesar de compartir un porcentaje de identidad del 16.05%. Estos ocho residuos fueron identificados como aa conservados en todo el dominio Bacteria en las proteínas de PEPS (Figura 18).

Se construyeron dos versiones de quimeras PEPS-EI^{1/2} con alaninas sustituyendo los residuos identificados. La primera construcción tuvo una doble sustitución de los residuos V232A y Q233A (VQ-AA) con las cadenas laterales hacia el núcleo de la proteína cercana al sitio de unión del ATP. La segunda construcción involucró cuatro mutaciones consecutivas D318A, E320A, Q334A y R336 (DEQR-AAA) sobre el sitio de reconocimiento de ATP.

Hasta este momento, el grupo del Dr. Xavier Soberón se encuentra preparando los experimentos de autofosforilación, para comprobar si las quimeras son capaces de autofosforilarse a partir de ATP.



Tomado de Ye et al., 2001.

Figura 27.- Núcleo de reconocimiento del ATP en el dominio tipo “ATPgrasp”. a) Superposición estructural de los sitios de reconocimiento de ATP para PEPS *E. coli* (azul) y PDK *C. symbiosum* (gris claro-negro). Se muestran únicamente cadenas laterales de aminoácidos que interactúan con ATP (Lin et al., 2006): en verde están aquellos con misma localización en la secuencia de aminoácidos y orientación espacial, y en amarillo los residuos con distinta localización en secuencia pero orientación espacial similar. b) Esquema de propuesto para explicar la interacción con el ATP.

Nota: Existe una clave de profundidad en el esqueleto carbonado de PEPS *C. symbiosum*, de gris claro a negro sobre el eje espectador y la profundidad espacial de la imagen.

No fue posible encontrar a nuestras quimeras y proteínas control en los extractos celulares de nuestra cepa de prueba *E. coli* BW25113 Δ *ptsI* bajo condiciones de sobre expresión (Figura 28a). Se realizó un experimento con una quimera tipo EI-

PEPS con la cara mutada en los cinco residuos de la cara de contacto (BS9) como control positivo de expresión (purificada con anterioridad en *E. coli* MC1061), localizamos en cuerpos de inclusión mientras que EI no fue detectada (Figura 28b). Sin embargo, al cambiar la cepa de expresión a *E. coli* MC1061 logramos observar la presencia de nuestras quimeras en los extractos celulares de la cepa de *E. coli* MC1061 (Figura 28c). Con la finalidad de detectar a nuestra quimeras en el ambiente celular de la cepa de prueba *E. coli* BW25113 Δ *ptsI*, optamos por el desarrollo de anticuerpos policlonales de conejo anti-quimeras, utilizando la quimera BS9 como antígeno inmunogénico (Figura S7). Detectamos la presencia de nuestras quimeras por medio de inmunodetección en las fracciones solubles y cuerpos de inclusión de los extractos celulares de los cultivos en M9 con manitol (Figura 29). Al parecer las proteínas quiméricas podrían estar degradándose en el ambiente celular provisto por BW25113 utilizada como cepa de prueba.

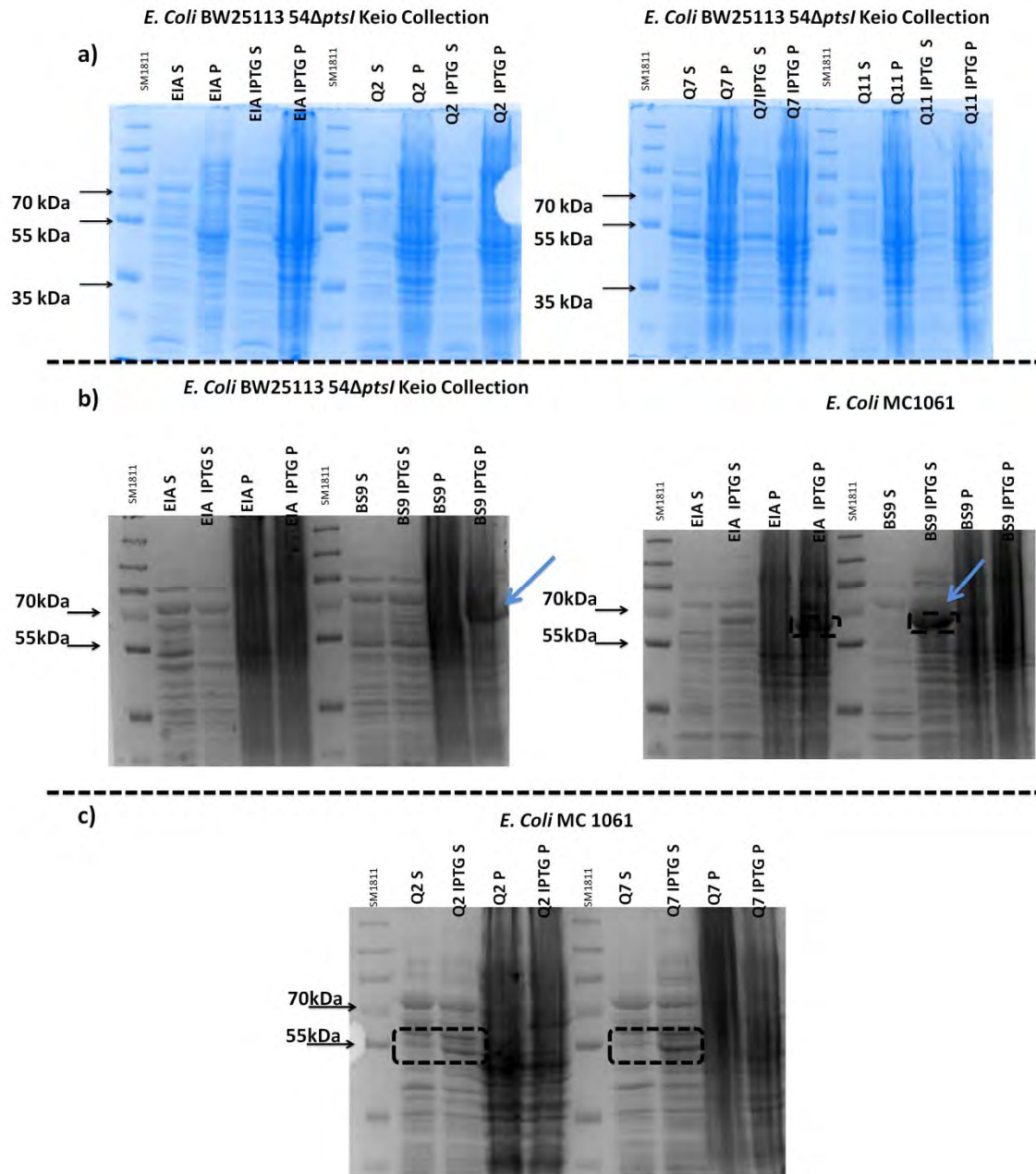


Figura 28.- Sobreexpresión de las proteínas quiméricas PEPS-EI (Q2, Q7 y Q11) en diferentes fondos genéticos. **a)-** Expresión de las proteínas quiméricas Q2, Q7 y Q11 en el sobrenadante (s) y precipitado (p) con y sin inducción de IPTG (0.5mM). **b)-** Experimento de comparación de expresión de EIA y la quimera BS9 (PEPS-EI) en BW25113 y MC1061 de *E. coli* con y sin inducción de IPTG (0.5 mM). **c)-** Expresión de Q2 y Q7 en el fondo genético MC1061 con y sin inducción de IPTG (0.5mM). SDS-PAGE 10% acrilamida.

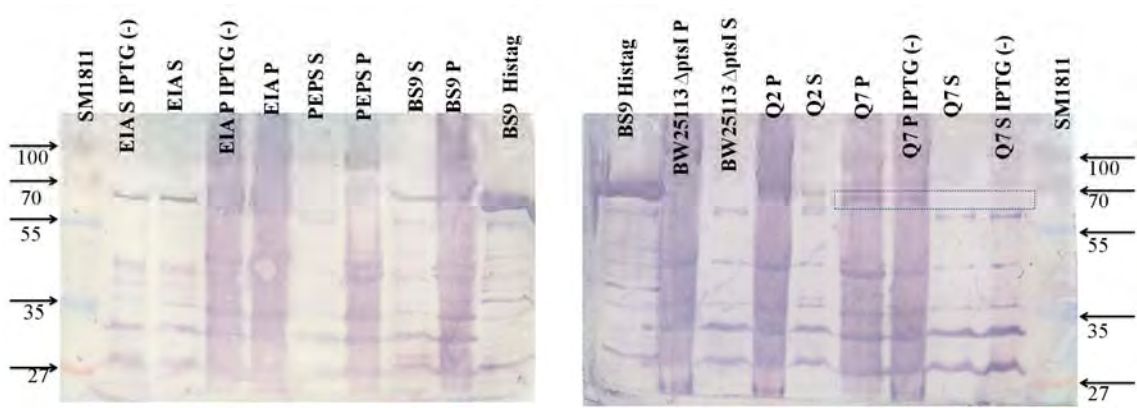


Figura 29.- Inmuno-detección de las quimeras. Controles con proteínas parentales EI y PEPS así como la quimera tomada como antígeno inmunogénico BS9. Cepa BW25113 Δ ptsI sin vector y quimeras Q2 y Q7 (ésta con y sin inducción). Membrana de nitrocelulosa a partir de un SDS-PAGE 10% acrilamida. **Nota:** Los experimentos se realizaron con extractos celulares con inducción a 1mM IPTG a excepción de aquellos con IPTG (-). Las letras “S” y “P” indican el sobrenadante y el precipitado. “BS9 Histag” funciono como el control positivo del WB.

Discusión

HPr y NPr mutantes

Comparación entre los modelos y las estructuras experimentales

En la cadena de fosforilación de PTS, HPr está involucrada en la formación de dos interfaces, con EI y con los componentes IIA de las diferentes permeasas. Algunas de las características claves para dichas interacciones estuvieron presentes en los modelos de nuestras mutantes (obsérvese la Figura 9). A pesar de que HPr y NPr muestran un plegamiento similar (Li et al., 2008), HPr posee una región convexa entre las alfa hélices 1 y 2 que es clave para la formación de las interfaces entre EI y los componentes IIA de glucosa, manosa y manitol (Wang et al., 2000; Peterkofsky et al., 2001). Esta característica superficie convexa posee una zona hidrofóbica central y se encuentra rodeada por un anillo de residuos polares y positivamente cargados. En nuestros modelos, pudimos observar este atributo compartido por HPr y las mutantes CPr14 y CPr6, el cual estaba prácticamente ausente en el caso de CPr8 y NPr. Es posible que la ausencia de esta superficie convexa afectara la capacidad de complementar el crecimiento de manera definitiva en NPr y CPr8 (Peterkofsky et al., 2001).

Rediseño de la interface de contacto de las variantes de NPr

Un análisis de la interface (“Alanine Scanning”) mostró que dentro de las catorce sustituciones realizadas sobre el esqueleto de NPr, nueve se encuentran involucrados en la interface, jugando un papel preponderante como punto caliente, tales como la Phe48 (2.92 kcal/mol), pudiendo estabilizar la interface junto con otros residuos con valores menores en el complejo EI-HPr (Thr16, Lys24 y Gln51 obsérvese la Figura 31). Esto es congruente con resultados anteriores donde se ha encontrado que Phe48 se encuentra involucrada con contactos de naturaleza hidrofóbica que son importantes en las interfaces formadas por HPr (Peterkofsky et al. 2001).

El éxito de las variantes CPr6 y CPr14 al parecer estriba en el hecho que los residuos Thr16, Arg17, Ala20, Leu47, Phe48 y Thr52 se encuentran involucrados en al menos once interacciones electrostáticas, incluyendo enlaces de H entre las cadenas

laterales y seis puentes salinos en los complejos de HPr con sus proteínas compañeras en PTS (Garret et al., 1999; Peterkofsky et al., 2001). Si bien la Arg17 posee un papel preponderante en las interacciones de HPr en los eventos de fosforilación (Garret et al., 1999), ésta se encuentra presente en el esqueleto basal provisto por NPr, así que no fue necesario suministrarla mediante sustitución (Figura 9).

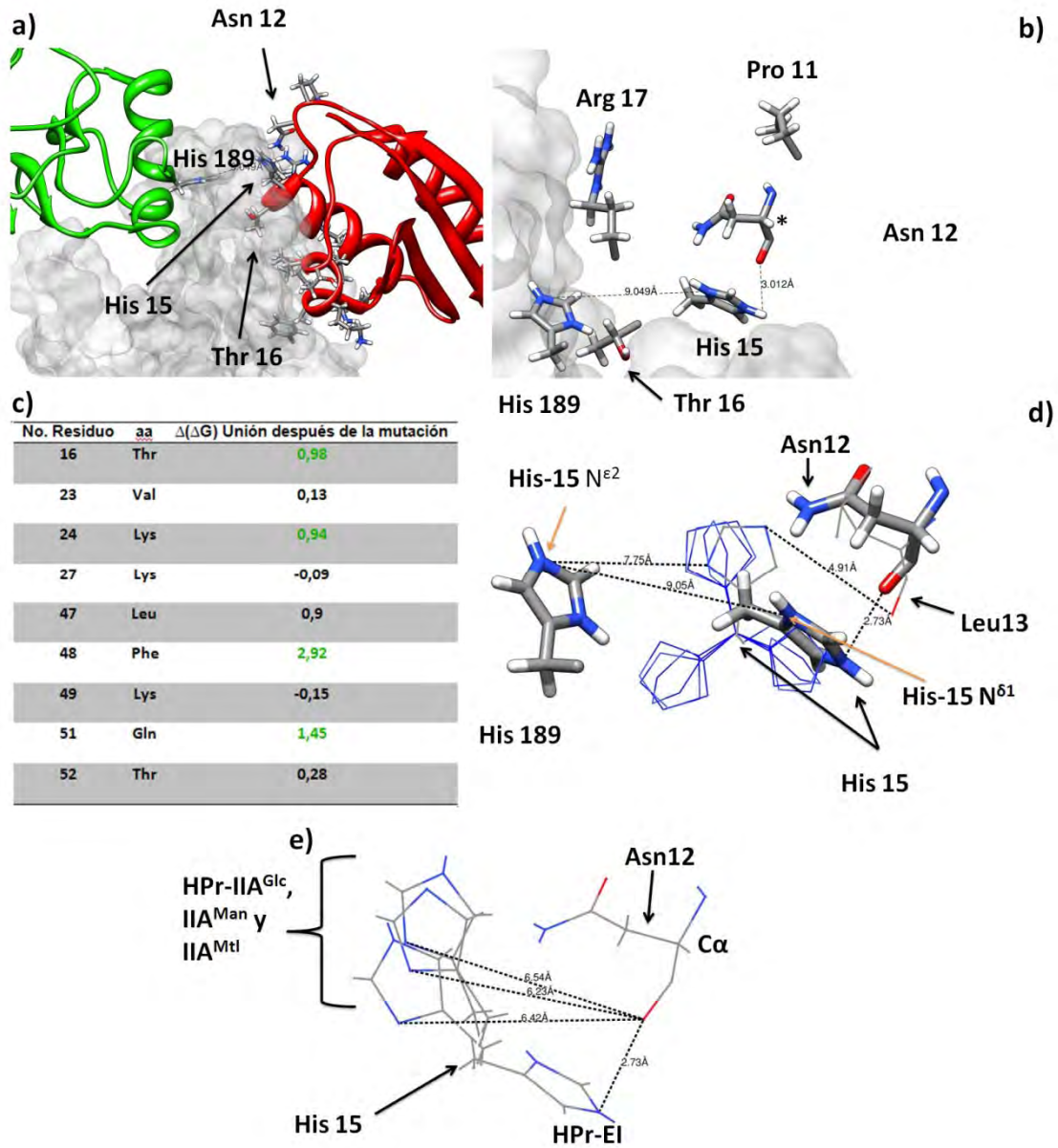


Figura 30.- Análisis de la interface EI-HPr. **a)** Interface, se muestran todas las sustituciones que se hicieron sobre NPr. **b)** Otra perspectiva de las histidinas catalíticas y las cadenas laterales de los residuos cercanos a His 15. **c)** Resumen de la contribución esperada con los nueve de los catorce residuos que se encuentran formando parte de la interface. **d)** histidina 15 de CPR8 (MODBASE) vs His 15 HPr (experimental), se muestra la libertad de His 15 de CPR8 (rotameros Dunbrack-lineas delgadas-) y las distancias entre los átomos de las histidinas catalíticas y la interacción con el esqueleto del residuo en la posición 13 y 12 NPr-HPr respectivamente. **e)** Versatilidad de la histidina catalítica de HPr en las diferentes interfaces de IIA^{Glc}, IIA^{Man} y IIA^{Mtl}. **Notas:** Las estructuras en listones de HPr (Rojo) y el dominio central de EI (Verde). Sólo se muestran las cadenas laterales a excepción de Asn12 donde se muestra el residuo completo (Carbono alfa *). Los valores de la contribución energética se muestran en valores de kcal/mol, donde se resaltan aquellos residuos que favorecen con mayor energía de unión el complejo EI-HPr.

Se han identificado dos regiones interactuantes en la estructura de HPr (Asn12 a la Lys27 la primera y de Lys45 a la Thr56 la segunda), ambas están involucradas diferencialmente con los compañeros de HPr (Peterkofsky et al., 2001). Esto es muy razonable, ya que encontramos con nuestras variantes de NPr (resultados que apoyan la hipótesis anterior) que al menos el subconjunto de seis residuos sobre la alfa hélice que sostiene a la histidina catalítica (His15) son capaces de restablecer el crecimiento en la cepa de prueba (Figura 10 y Tabla III). Creemos esto ya que los residuos en la segunda región (segunda hélice de la cara de reconocimiento) están involucrados en la afinidad con sólo algunos de los componentes IIA de PTS como lo es el caso de la permeasa de manitol, donde CPr6 fue incapaz de complementar el crecimiento (Figura 10).

No podemos desacreditar la posibilidad de que los residuos sustituidos en la variante CPr8 (mutante incapaz de restablecer el crecimiento) estén involucrados en el reconocimiento de HPr con sus compañeras. De hecho, suponemos que éstos se encuentran formando parte de las interfaces de otros complejos, lo cual explicaría la incapacidad de CPr6 de complementar el crecimiento en otros azúcares PTS como manitol (Figura 10).

A pesar de que CPr8 posee el residuo Phe48 que podría estar participando como punto caliente en la mayoría de las interfaces formadas por HPr, y éste exhibe una marcada flexibilidad y versatilidad al interactuar en más de una ocasión como parte de las interfaces de HPr (Garret et al., 1999; Peterkofsky et al., 2001) CPr8 es incapaz de complementar el crecimiento. Además, existen otras cuatro sustituciones importantes (Figura 30bc) para HPr (Peterkofsky et al., 2001), sustituciones que también posee CPr8. ¿Por qué razón CPr8, a pesar de tener estos residuos, es incapaz de complementar el crecimiento? Suponemos que la ausencia del residuo de Asn12 en las cercanías de la histidina catalítica podría ser el motivo por el cual CPr8 no es capaz de crecer bajo ninguna fuente de carbono PTS (Figura 30ab). Se sabe que His15 N^{-ε2} forma enlaces de hidrógeno con la cadena principal del residuo Asn 12 (obsérvese la distancia a la que se encuentra del átomo de oxígeno en la Figura 30b), de manera que funciona como un estabilizador de la cadena lateral de la histidina 15 permitiendo el estado de transición entre ambas proteínas que constituyen la interface EI-HPr (Waygood, 1998).

Por lo tanto, la variante de NPr sin Asn12 sugiere que los eventos de reconocimiento y fosforilación podrían no estar conectados. Es decir, podrían reconocerse ambas proteínas pero no favorecer el intercambio de grupos fosfatos. Los resultados de los ejercicios de simulación, respaldan nuestra idea de que los eventos de reconocimiento molecular y la fosforilación podrían estar desfasados, ya que NPr es capaz de reconocer al componente IIA^{Mtl} casi con la misma afinidad que CPr14 (Lopez-de los Santos et al., 2012). Los resultados anteriores concuerdan con la libertad conformacional observada para His15 en las interfaces experimentales con IIA^{Glc}, IIA^{Man} y IIA^{Mtl} (Figura 30e). Por último, el modelo de CPr8 muestra la His15 orientada en otra posición a lo observado en estructuras experimentales de HPr, si bien es solo una predicción, refuerza nuestra idea de que el reconocimiento podría ser independiente a la fosforilación (Figura30d).

Comportamiento de las mutantes de NPr: Especificidad vs promiscuidad

Mientras las células de 2Δ con HPr fueron las mejores en usar los azúcares transportados por las permeasas de la superfamilia GFL, aquellos azúcares transportados las permeasas de la familia de manosa fueron transportados mejor por la variante de CPr14. Estos resultados fueron inesperados, ya que el diseño de sustituciones específicas se basó en el complejo formado por HPr-IIA^{Mtl} y un miembro de la familia GFL (Cornilescu et al., 2002). Si estos resultados aplican o no a otros miembros de la familia de manosa, aún está por determinarse.

Considerando que HPr y CPr14 se expresaron a niveles cercanos a la saturación, las diferencias encontradas presumiblemente son debidas a la interacción diferencial de éstas con los componentes IIA de las distintas permeasas. Estas interacciones podrían estar influenciadas por las conformaciones de alguno de los componentes de las enzimas IIA, y así influir sobre la V_{max} del acoplamiento de transporte y fosforilación de toda la cadena PTS. Los resultados obtenidos al comparar HPr contra CPr14 en los ensayos de crecimiento y transporte de manosa/glucosamina/fructosa, no parecen deberse únicamente a la interacción con la Enzima I; éstos continúan hasta el componente IIA^{Man}, el cual debería de presentarse como un paso limitante en la cadena de fosforilación. Por lo tanto, es prudente mencionar que el transporte de azúcares puede estar desacoplado con el proceso de

fosforilación (Aboulwafa y Saier, 2002; Aboulwafa y Saier, 2004). Por esta razón, consideramos que ensayos de fosforilación de azúcares *in vitro*, manteniendo a saturación los niveles de EI, y usando cantidades variables de las proteínas de HPr y las mutantes de NPr, podrían indicarnos si el paso limitante en el transporte de azúcares es la interacción con los componentes IIA.

CPr6, con sólo seis mutaciones en la fracción N-terminal, fue capaz de abastecer relativamente bien cualquiera de los azúcares probados en el medio de cultivo (Figura 10). Estas pocas mutaciones en el gen *npr* le permitieron reconocer a algunos de los componentes IIA de las permeasas como para permitir la transferencia de fosforilos. Sin embargo, ninguna de las sustituciones demostró ser crítica, ya que fueron ineficientes para lograr la complementación en los medios de cultivo con manitol, glucitol y galactitol como fuentes de carbono. Estos azúcares son todos sustratos exclusivos de diferentes permeasas que no son capaces de ser transportados por la permeasa de manosa. Por consiguiente, parece ser que esas seis mutaciones dotan de suficiente capacidad a NPr para interactuar con la permeasa de manosa, pero no lo suficiente como para permitir el crecimiento bajo el suministro de polioles de las familias GFL y AG. Como ya lo mencionamos anteriormente, estas mutaciones se encuentran rodeando la histidina 15 y probablemente afectan las funciones catalíticas así como también su afinidad por sus respectivos componentes IIA.

La presencia de selectividad respecto a los componentes IIA mostrada por CPr6, y la marcada afinidad de la variante CPr14 por la permeasa de manosa, sugiere que algunos residuos en la región C-terminal de NPr podrían ser más favorables con respecto a la interacción con IIA^{Man} de lo que es incluso HPr. Una posible explicación para esto es que HPr haya favorecido su funcionamiento en el transporte de grupos fosforilos por el promedio de la mayoría de los componentes IIA, en vez de por alguno en particular. Este comportamiento más bien parece la respuesta a un tipo de selección normalizadora que a la especialización. Asumiendo que esto es verdad, entonces, nuestra ingeniería desarrollada sobre NPr produjo una proteína mutante más eficaz en el transporte de grupos fosforilos que HPr natural, particularmente cuando el aceptor de grupos fosfatos es IIA^{Man}. Esta posibilidad nunca se había considerado previamente por nosotros o algún otro investigador para el sistema PTS.

Con sólo algunas sustituciones, es posible convertir una proteína NPr en una HPr funcional. Considerando que las seis sustituciones puntuales (y posiblemente aún

menos) bastaron para proveer nueva especificidad en NPr, esto insinúa la facilidad con la cual este tipo de proteínas pueden evolucionar en el sistema PTS. Los análisis asistidos por medio de algoritmos computacionales nos proveen de algunas interacciones posibles entre las mutantes de NPr y las proteínas compañeras de HPr en la cadena de fosforilación. Con la finalidad de profundizar en nuestro entendimiento acerca de estas interacciones, es necesario de nuevos estudios con carácter estructural como Resonancia Magnética Nuclear y/o Cristalografía de Rayos X.

Quimeras de EI

Diseño de las quimeras de EI

Durante el proceso de diseño involucramos tres análisis como herramientas de identificación y discriminación entre zonas relevantes para las proteínas parentales. Con éstas, se trató de analizar tres aspectos principales que apuntalaron el diseño de las quimeras: primero la información obtenida dentro de su estructura primaria (Alineamiento Múltiple y Análisis de Traza Evolutiva) revelando posibles aa importantes, bajo la premisa función- presión de selección-conservación de residuos. Creemos que al involucrar el AM y ATE logramos delimitar eficientemente las regiones funcionales de las proteínas parentales, ya que utilizamos el mayor número de secuencias disponibles en las bases de datos, cubriendo casi en su totalidad los principales grupos taxonómicos representados en la naturaleza. Para PEPS dirigimos los análisis hacia todo el dominio Bacteria (Figura 18) ya que es una enzima distribuida ampliamente, mientras que para EI sólo analizamos al grupo de las proteobacterias, organismos ampliamente distribuidos en la mayoría de los ambientes existentes en nuestro planeta (Barabote y Saier, 2005; Cases et al., 2007), excluyendo únicamente al grupo de las ϵ -proteobacterias, las cuales poseen un sistema PTS incompleto (Postma et al., 1996; Cases et al., 2007).

La inspección manual de las distintas estructuras utilizadas fue parte del segundo análisis. La información obtenida nos permitió conocer la topografía funcional de las proteínas parentales, es decir, los dominios centrales móviles (Dinámica Molecular y los resultados de DynDom), los elementos estructurales que conectaron los dominios y las distintas interfaces (Figura 17) formadas entre los mismos. El uso de una estructura de PEPS de *E. coli* modelada no fue limitante en el desarrollo de las

quimeras, ya que sólo fue necesario fusionar el dominio ATPgrasp muy bien representado y con un porcentaje de identidad 94%, al menos en la sección del DC, y ATPgrasp de PEPS en *N. meningitidis*.

Creemos que el uso de escaneo de alaninas como la tercera herramienta utilizada en el diseño, nos permitió singularizar nuestro caso de estudio, es decir, el origen de la información obtenida de los análisis de secuencias nos permite acceder a información generalizada, con la cual se puede identificar el núcleo básico de aa importantes para realizar cierta función. En el caso contrario, el ensayo *in silico* parte de una exploración particular, ya que sólo intervienen en el análisis las interfaces de reconocimiento que provienen de estructuras experimentales únicas, que nos permitieron observar desde un punto energético la contribución individual de cada uno de los residuos a un mismo complejo (*e.g.*, DC-TIM o DC-alfa hélices). Creemos que, si bien se puede mejorar nuestro diseño de quimeras para EI, fue útil tomar la convergencia de resultados de diferentes herramientas para diseñar las quimeras de EI.

Construcción de las quimeras de EI

Los oligonucleótidos variables facilitaron en gran medida la elaboración de las distintas quimeras permitiéndonos explorar los distintos conectores así como parte de las diferentes combinaciones de bisagras. Fue posible obtener en un mismo proceso de ensamblaje quimeras con las mismas características en la cara de reconocimiento pero diferente combinación de bisagras y conectores. Decidimos emplear bisagras variables (EI-PEPS) para la fusión de dominios debido a que quisimos proveer la mayor versatilidad posible dada por la combinación de todos los residuos existentes. En el caso de las quimeras PEPS-EI diseñamos un conector con una secuencia utilizada comúnmente en la elaboración de permutaciones circulares, donde se busca alterar lo mínimo posible el plegamiento de las diferentes estructuras involucradas y fusión de proteínas (Yu y Lutz, 2010). Debido a que las quimeras EI-PEPS (Figura 19) fueron diseñadas para explotar el elemento estructural tipo *brazo*, sólo modificamos la bisagra, mientras que la conexión de dominios en las quimeras PEPS-EI tenía además como objetivo inspeccionar diez diferentes longitudes de conectores.

Reizer (1993) menciona que las proteínas de EI presentan los conectores Q en la sección N-terminal, ricos en residuos de alanina y prolina. Sin embargo, decidimos no utilizar este tipo de conectores por qué no sabíamos exactamente qué distancia y qué

tipo de plegamiento iban a ser necesarias para permitir al nuevo dominio de ATPgrasp mayor libertad. En cambio, optamos por la incorporación de una combinación exclusiva de residuos de glicina y serina en el diseño del conector, tratando de explotar la libertad de movimiento, al permitir mayor versatilidad ya que no limita la flexibilidad por su tamaño pequeño.

Sistema de selección *in vivo*

La cepa BW25113 Δ *ptsI* podría estar seleccionando fuertemente a nuestras quimeras, ya que en este ambiente celular se están expresando bajas concentraciones de las proteínas quiméricas. No fue posible detectarlas en los experimentos con extractos y electroforesis desnaturizante (Figura 28), fue necesario detectarlas con la ayuda de anticuerpos específicos (Figura 29). Por lo tanto, es posible que al realizar nuevas rondas de selección *in vivo* (cambiando nuestra cepa de *E. coli*) e incorporando ciclos de evolución dirigida (mutaciones sitio-dirigidas y azarosas) podríamos encontrar quimeras capaces de rescatar el crecimiento.

Relación del DC con sus compañeros barril TIM y el dominio de unión a HPr

Realizar una comparación de las características que componen las interfaces de EI fue imprescindible para el diseño de las quimeras. Al inspeccionar las interfaces de DC nos percatamos que ninguna poseía residuos con valores mayores a 1 kcal/mol. Se considera que los “Hot Spots” poseen valores por arriba de los 2 kcal/mol (Delano, 2002), EI posee sólo dos residuos con esta característica, y se encuentran distribuidos alternativamente en los dominios compañeros de DC móvil (Figura 26b). Con valores menores a 2 kcal/mol se considera que la contribución de estos residuos a la estabilidad de los complejos es baja. Al parecer la estabilidad en ambas interfaces está dada por los dominios compañeros del DC, el barril TIM y el dominio de unión a HPr.

Parece ser que las dos interfaces formadas por el DC se estabilizan de manera distinta. Contario a la superficie hidrofílica utilizada en la interface con el barril TIM, la interface de unión con la proteína HPr parece estabilizarse con un nucleó hidrofóbico. Creemos que la estabilidad de la interface DC-TIM es mantenida principalmente por

fuerzas de carácter electrostático, ya que se sabe que en las interfaces con un elevado número de constituyentes polares se encuentran principalmente estabilizadas por fuerzas de esta naturaleza, si bien interacciones débiles, cuantiosas, podrían actuar como estabilizadores de carácter aditivo (Lo conte et al., 1998; Moreira et al., 2007). Por otro lado, el parche hidrofóbico observado para la interface de unión a HPr posee claramente el “punto caliente” en el centro rodeado por residuos hidrofílicos. Esto está de acuerdo con una hipótesis denominada “anillo en O”, que corresponde a una característica generalizada para los “puntos calientes” rodeados por una barrera de aa polares que impiden la entrada de las moléculas de agua, lo cual le permite al residuo hidrofóbico estabilizar la interacción proteína-proteína (Jones y Thornton, 1996; Moreira et al., 2007). Pudimos observar una superficie similar a la utilizada por HPr (anillo en “O”) para estabilizar sus interacciones (Figura 9).

Al parecer la propiedad funcional del DC de interactuar con dos distintas superficies de reconocimiento (con distintas características físico-químicas y estructura), ha moldeado su topografía, ya que presenta una distribución heterogénea de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 26d). Como consecuencia, al parecer especializó cada una de sus alfa hélices de la cara de contacto para reconocer diferencialmente a sus compañeros. En la interface DC-TIM, se podría formar una interacción fuerte con la región hidrofílica (donde se encuentra el “punto caliente”) constituida por la cadena lateral de la Arginina 465 (5.23 kcal/mol), la cual en su entorno podría establecer múltiples puentes de hidrogeno estabilizadores (Sheinerman et al., 2000), mientras que en la otra interface forma una interacción con un carácter principalmente hidrofóbico.

Las superficies de reconocimiento de TIM y AH, poseen casi el 70% de residuos polares. Ésta es una característica compartida por sub-unidades o dominios independientes que forman interacciones proteína-proteína temporales (Jones y Thornton, 1996). Algunas interacciones proteína-proteína son favorecidas por la participación de agentes externos o “gatillos moleculares” como los compuestos fosforilados de ATP, GTP, PEP (Nooren y Thornton, 2003). Creemos esto podría estar ocurriendo con los componentes de PTS.

Creemos que la ausencia de “puntos calientes” en el DC es consecuencia de sus restricciones funcionales, es decir, interacciones proteína-proteína temporales. Éste posee una superficie heterogénea (en sus características fisicoquímicas) con bajo grado

de conservación en sus aminoácidos, apenas tres residuos involucrados en la fosforilación de la histidina catalítica (Figura 18). Por esta razón, quizá los puntos calientes se encuentran distribuidos en sus compañeros.

Nosotros cambiamos sólo aquellos residuos que creímos importantes para el reconocimiento (identificados por los Análisis de Traza Evolutiva), pero dejamos aquellos que no interfieren con la estabilidad entre las caras de contacto de una interface u otra, ya que dirigimos los cambios al DC sin “puntos calientes”, de manera que los posibles puntos calientes no corrieran ningún riesgo, para que estos interactuaran con un dominio que posee prácticamente lo mismo que el DC parental de ATPgrasp.

Consideraciones de los análisis de las interfaces de EI y PEPS en el diseño de las Quimeras

Mediante los análisis *in silico* de escaneo por alaninas, logramos identificar aquellos residuos que podrían estar formando parte importante de la interface por su contribución individual a la energía total de unión en los diferentes complejos (Figura 25). Una vez que calculamos las diferentes interfaces para los dominios de las proteínas parentales (Figura 25), supusimos *a priori* que debíamos encontrar residuos en las interfaces de EI y PEPS que afectaran negativamente dichas interacciones. Encontramos el conjunto de residuos que probablemente afectan las interacciones (Tabla V y Tabla VI) de estas dos proteínas.

El análisis indicó que los residuos polares de Ser150 y Thr168 sobre el alfa hélice 1, dificultan la interface de DC-alfa hélices (Tabla V), mientras que el alfa hélice 2 posee el mismo tipo de residuos (Thr190 y Ser196) afectando la interface DC-TIM. De las cinco mutaciones objetivos (S166D, A169E, Q170P, M193I y S196E), sólo optamos por modificar las dos últimas que se encuentran en el “alfa hélice 2” en ambas proteínas (EI y PEPS), ya que ésta es la que interactúa principalmente en la estabilización de las interfaces. Reflexionando sobre las similitudes entre los DC de ambas proteínas parentales (Figura 17 y Figura 21) decidimos no modificar todos aquellos residuos identificados por vulnerar las interacciones del DC con sus dominios compañeros, partiendo de un hecho básico fundamentado. Tanto las proteínas parentales de EI y PEPS, PPKs homólogas y demás componentes de la cadena del sistema PTS forman interacciones transitorias con otras proteínas durante sus estados activados por

grupos fosforilos, lo cual podría explicar la conservación evolutiva de residuos que dificultan la estabilidad de las interfaces sin llegar a tener la fuerza suficiente como para impedirlos. Lo anterior, permitió especular que la fuerza de estas interacciones deba de estar por debajo de aquellas interacciones proteína-proteína más estables y duraderas. Para respaldar nuestra decisión estratégica de sólo mutar parte de los residuos, realizamos un ejercicio teórico en el cual comparamos la fuerza de las interacciones de los complejos PTS y proteínas PEPS y PPDK (mencionados con anterioridad) con otros complejos encontrados en el “Protein Data Bank”.

Paisaje energético de las interacciones proteína-proteína de los componentes PTS

Con el análisis de escaneo por alaninas se puede inferir la contribución relativa de cada uno de los residuos que componen una interface. Esta contribución está determinada por el grado de cambio en el $\Delta\Delta G$ de unión entre las partes que interactúan en una interface y se representa en unidades de energía (kcal). Utilizar la suma de los valores $\Delta\Delta G$ de todos los residuos que participan en la interface dio como resultado un único valor representante de la interface, y consideramos que este valor expresa la fuerza de la interacción proteína-proteína (como un índice descriptivo).

Realizamos un análisis (Figura 31) que involucró a 272 complejos moleculares (entre 2 y 4 Å de resolución) en los cuales se incluyeron homodímeros (28), interacciones multiméricas (17), interacciones proteína-proteína empaquetadas en cristales (69), interacciones moleculares obligadas (73) y transitorias (54), las interacciones de los componentes PTS de *E. coli*, PEPS y PPDK, entre otras (Tabla SV). Observamos que los valores de los componentes PTS e interfaces de PEPS y PPDK en su mayoría (a excepción de HPr-IIA^{Man} 57 kcal/mol) se encuentran por debajo de los -27 kcal/mol. Obtuvimos una diferencia significativa al agrupar arbitrariamente y comparar los complejos de PTS, PEPS y PPDK contra el resto de las interfaces computadas (Figura 31b). Además de los componentes de PTS, encontramos otras interacciones proteína-proteína con energías de unión menor a los -27 kcal/mol. Entre ellas el citocromo C3 en su forma tetramérica, resolvasas formando tetrámeros, la enzima malato sintasa, la interface entre una proteína anti-HIV y el HIV y la T7 RNA polimerasa.

Como parte final de este ejercicio teórico quisimos tratar de predecir el efecto de las mutaciones sobre DC de EI en la nueva interface formada por DC-ATPgrasp. Para esto se realizó el modelado del DC (utilizando los servicios de Rosetta Design <http://rosettadesign.med.unc.edu/>) con las mutaciones puntuales y posteriormente se obtuvieron los modelos de acoplamiento o “Docking”. Los complejos con menor energía de interacción más favorable se compararon con aquellas interfaces con DC de EI silvestres. Se encontró que la modificación de la cara de contacto de DC podría aumentar la afinidad por el dominio ATPgrasp si se aplican las mutaciones puntuales identificadas en este proyecto (Figura 31c).

Consideramos útiles los resultados obtenidos en el ejercicio teórico y la naturaleza funcional de PEPS y EI (dominio central giratorio y la formación de dos interfaces, obsérvese la Figura 20) para diseñar las nuevas interfaces de las quimeras a través de la modificación del DC. Por eso decidimos mantener algunos de los residuos que podrían dificultar la interacción del DC con sus dominios compañeros sustituyendo sólo M193I y S196E (Tabla V y VI).

Las interfaces formadas por los complejos proteína-proteína de los componentes PTS de *E. coli* presentan una distribución anormal de los residuos fenilalanina y treonina (Bogan y Thorn, 1998; Lo conte et al., 1998; obsérvese la Figura 31d). Encontramos cinco “puntos calientes” distribuidos en todas las interfaces experimentales, tres de ellos residuos de fenilalanina. Esto es interesante, ya que este residuo presenta poca frecuencia de aparición en las interfaces como punto caliente (Bogan y Thorn, 1998; Lo conte et al., 1998). La composición y el limitado número de puntos calientes, sugieren que las interfaces de los componentes fosforilados de PTS son diferentes a las interfaces formadas por otras proteínas.

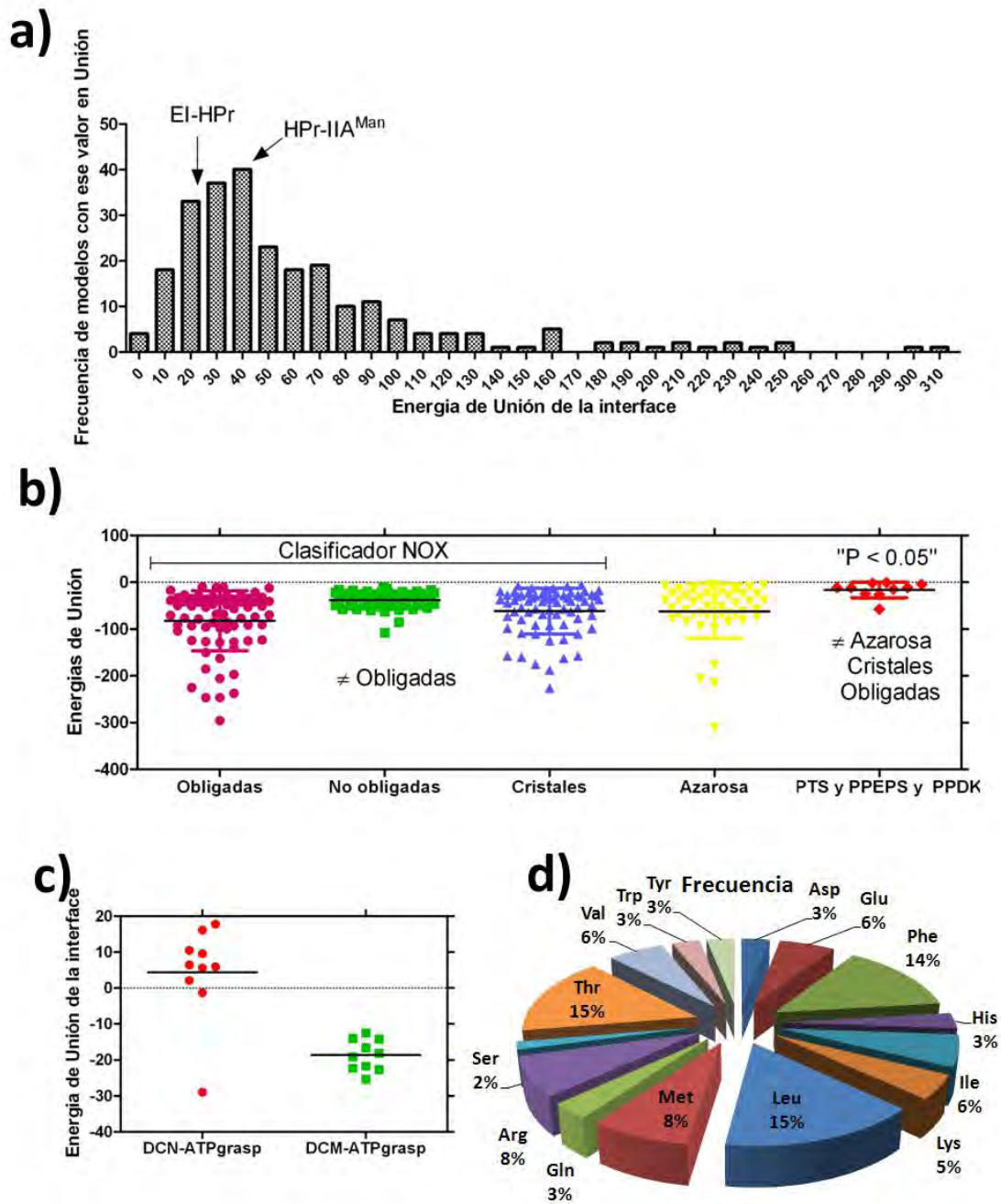


Figura 31.- Paisaje energético de las uniones de los componentes PTS. **a)** Distribución de frecuencias de los distintos modelos utilizados para conocer el paisaje energético de los componentes de PTS y sus energías de interacción en la interfaces. **b)** Comparación entre interacciones obligadas, no obligadas, debidas al empaquetamiento cristalino y los componentes PTS, así como un conjunto de modelos del “Protein Data Bank” tomados azarosamente. **c)** Predicción del cambio en la energía de interacción entre el dominio central de EI respecto al ATPgrasp de PEPS, con mutaciones sobre la cara de contacto (DCM) y sin ellas (DCN) **d)** Composición de las interfaces de los componentes PTS en *E. coli*.

Nota: Las unidades energéticas representan cal/mol.

Nota 2: La comparación entre distintos grupos de interacciones se encuentra representada por un análisis de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza, donde las diferencias significativas se encontraron con valores de $P > 0.05$.

Nota 3: Se usaron los modelos del clasificador NOX de interacciones proteína-proteína (Zhu et al., 2006).

Posibles ventajas de construir quimeras de EI y PEPS de *E. coli*

Sin importar los resultados obtenidos hasta el momento con las quimeras construidas y probadas, existen al menos cinco ventajas de haber seleccionado a EI y la proteína PEPS:

Primero, las proteínas parentales provienen del mismo ambiente celular, *E. coli*. Es decir, estas proteínas ya son capaces de plegarse correctamente en esta bacteria, ya que evolutivamente han sido seleccionadas en el mismo ambiente en el que fueron desarrolladas las quimeras.

Segundo, son proteínas homólogas (Reizer et al., 1993; Reizer et al., 1996; Reizer y Saier, 1997) muy relacionadas entre sí, incluso comparten dominios funcionales autónomos como el barril TIM con una marcada resiliencia a las mutaciones y el dominio central con una cara de contacto similar.

Tercero, comparten un mecanismo de función conservado, con una histidina catalítica en un dominio central móvil que alterna entre dos dominios compañeros (Patel et al., 2006). Con el desarrollo de nuestras quimeras consideramos esta característica y tratamos de emplearla en lo posible a través del diseño de diferentes estrategias.

Cuarto, está reportado que EI es capaz de funcionar perfectamente si se suministra a *E. coli* en dos fragmentos, el dominio que contiene al sitio catalítico y de unión a HPr y el barril TIM (Fomenkov et al., 1998). Al utilizar esta sección de EI en el desarrollo de nuestras quimeras teóricamente aseguramos parte del funcionamiento de las mismas.

Quinto, la naturaleza modular evolutiva del sistema PTS. Tanto las proteínas individuales como los dominios de los componentes de PTS, han permitido la formación constante de quimeras naturales (Sonnhammer y Kanh, 1994; Paulsen et al., 2000; Siebold et al., 2002), tan solo en *E. coli* existen al menos cinco proteínas homólogas a EI con funciones no determinadas aún (Tchieu et al., 2001).

Perspectivas

En este proyecto realizamos ingeniería sobre NPr y EI, dos componentes de los sistemas PTS^{Ntr} y PTS en *Escherichia coli*. Ambos proyectos se encaminaron a la ingeniería de interfaces entre dominios de proteínas fosforilables.

Para NPr/HPr:

Sería muy interesante probar tres nuevas actividades para las proteínas CPrs. Primero, observar si poseen éstas la actividad de NPr. Debido a la sutileza con la cual NPr realiza sus funciones *in vivo*, desarrollar una deleción del gen *npr* tal vez no sería la mejor opción. En su lugar, proponemos el desarrollo de un ensayo *in vitro* para medir la actividad de NPr. Éste podría ser un ensayo de fosforilación con las proteínas mutantes de NPr teniendo como IIA^{Ntr} como sustrato, donde mediríamos la fosforilación a través de TrkA, un receptor de potasio capaz de unirse a IIA^{Ntr} exclusivamente en su forma defosforilada (Lee et al., 2007). Si resulta ser que cualquiera de las CPrs conserva propiedades funcionales de NPr, podríamos haber creado una proteína con la dualidad funcional, algo así como una foto instantánea de un intermediario evolutivo entre ambas cadenas de fosforilación. Segundo, revisar si las variantes son capaces de inactivar alostericamente la enzima Glucógeno Fosforilasa (GP), como lo hace HPr en *E. coli* (Seok et al., 1997; Alonso-Casajús et al., 2006). Y tercero, como HPr participa en la co-regulación del operón *bglG* a través de la fosforilación de un anti-terminador transcripcional (Görke y Rak, 1999), ¿podrá alguna de las proteínas CPrs, desarrollar la misma función?

Para las quimeras de EI:

La experiencia que obtuvimos en nuestro primer objetivo diseñando la cara de contacto de NPr, nos permitió desafiar el proyecto de generar quimeras de EI mediante la incorporación de dominios externos. Aún no logramos obtener quimeras funcionales, planeamos usar herramientas de evolución dirigida de proteínas, ya que sólo se exploró el diseño racional. Como etapa siguiente, las quimeras deberán ser evaluadas bajo un régimen que contemple experimentos de carácter bioquímico, para comprobar efectivamente la autofosforilación de las quimeras a partir de ATP.

Aplicaciones biotecnológicas

El desarrollo de mutantes de NPr capaces de remplazar a HPr en el transporte de azúcares PTS podría tener aplicaciones biotecnológicas, tales como la utilización mixta de mezclas de azúcares PTS y no-PTS, o la utilización selectiva eficiente de fuentes específicas de azúcares PTS mientras deja otros sin utilizar (obsérvese las

Figuras 10,11 y 12). Por consiguiente, cepas expresando diferentes mutantes CPR, permitiría la remoción selectiva de azúcares específicos. Este proceso podría facilitar la producción de algunos azúcares para propuestas biotecnológicas, así también, la remoción de otros azúcares con propuestas de bioremediación.

Nuestras quimeras comparadas con otras

Trabajos anteriores han desarrollado quimeras que involucran la fusión de dominios con el fin de aumentar características como la solubilidad y estabilidad, como es el caso de las quimeras de la enzima celobiohidrolasa I o Cel7A (Komor et al., 2012). Otros grupos han desarrollado quimeras como método para encontrar las zonas funcionales mediante procesos de fisión-fusión de regiones de dominios de proteínas homólogas (Sanchez-Lopez et al., 1993; Smirnov et al., 1998; Smith et al., 2012). El presente proyecto representa mayores retos para la generación de proteínas quiméricas funcionales, con la generación de quimeras con especificidad alterada mediada por la combinación de dominios completos y de sus elementos estructurales. Nuestras proteínas parentales funcionan por la interacción de tres dominios móviles que interactúan alternamente entre ellos, y esta característica distingue nuestras quimeras de trabajos similares donde sólo interviene un dominio que lleva todas las funciones.

Proteínas fosforilables y sus interfaces

Las proteínas fosforilables se encuentran involucradas en procesos de reconocimiento molecular que coordinan las respuestas celulares, la colaboración de la síntesis y plegamiento de proteínas mediada por chaperonas activadas por ATP (Cong et al., 2012), y enzimas (Larsena et al., 1997; Schlessman et al., 1998). Sea de proteínas fosforilables o no, las interacciones proteína-proteína juegan un papel crucial en un gran número de procesos biológicos, como el auto-ensamblado de cápsides virales, proliferación celular, crecimiento, diferenciación, transducción de señales y muerte celular programada (Toogood, 2002). Los resultados obtenidos en este proyecto son un esfuerzo por aumentar nuestro conocimiento acerca del diseño-redirección de las propiedades funcionales de las proteínas partiendo del sistema PTS de *E. coli* como modelo básico.

Conclusiones

De HPr/NPr

- La variante de CPr14 fue capaz de utilizar los azúcares PTS de glucosa, manosa, manitol, glucitol, galactitol y fructosa en un fondo genético BW15113 Δ *ptsI* en aerobiosis y consumir ácido ascórbico bajo condiciones de anaerobiosis.
- La sustitución de 14 residuos (K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, F25K, Q28K, V49L, I50K, L53Q, M54T, D56G y A58T) en la interface de contacto de NPr es capaz de transformarla en una HPr funcional.
- Existe un subconjunto al menos de seis sustituciones (K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, F25K) sobre el alfa hélice 1 de la cara catalítica (His15) que le permiten a NPr reconocer a los componentes IIA del sistema PTS.
- CPr14 permitió mayor crecimiento que HPr en ensayos de complementación en M9 con manosa como única fuente de carbono.
- CPr14 consumió más galactitol que HPr y la cepa parental en una mezcla de fuentes de carbono.
- Las construcciones con HPr y CPr14 fueron capaces de complementar el crecimiento utilizando fructosa como fuente de carbono, a través del sistema de permeasas para manosa.
- Parece ser que el reconocimiento de HPr por sus proteínas compañeras está condicionado a una combinación de diferentes conjuntos de residuos, como se observó para CPr6, la cual mostró un crecimiento diferencial respecto a CPr14 y HPr.
- El orden preferencial de consumo de azúcares PTS obtenido para las diferentes construcciones fue: glucosa > manosa > manitol > galactitol > glucitol.
- El sistema PTS permite el consumo combinado de un azúcar PTS y la xilosa no-PTS.
- Nuestros resultados sugieren que HPr podría no tener la mayor afinidad por todas sus proteínas compañeras, ya que CPr14 exhibió una mayor capacidad para reconocer al componente IIA^{Man}. Probablemente producto de una presión normalizadora que favorece la versatilidad general a la máxima afinidad.

De quimeras de EI

-Ninguna de las quimeras construidas y probadas fue capaz de permitir el crecimiento de la cepa de *E. coli* BW25113 Δ *ptsI* en medio mínimo M9 con manitol como única fuente de carbono.

-Nuestro diseño racional de interfaces proteína-proteína sin rondas de mutación y evolución dirigida fue insuficiente para generar quimeras capaces de reemplazar a EI silvestre.

-El domino central de EI al parecer no posee puntos calientes en las interfaces DC-barril TIM y DC-alfa hélices.

-Las interfaces formadas por el DC de EI en *E. coli* presentan diferencias significativas que las separan de la mayoría de las interacciones proteína-proteína analizadas en el presente trabajo.

Referencias

1. Aboulwafa, M. y Saier M. H., Jr. (2002) Dependency of sugar transport and phosphorylation by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system on membranous phosphatidyl glycerol in *Escherichia coli*: studies with a *pgsA* mutant lacking phosphatidyl glycerophosphate synthase. *Research in Microbiology* **153**,667–677
2. Aboulwafa M y Saier M.H., Jr. (2004) Characterization of soluble enzyme II complexes of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology* **186**,8453–8462
3. Alonso-Casajús, N., Dauvillée, D., Viale, A. M., Muñoz, F. J., Baroja-Fernandez, E., Morán-Zorzano, M. T., Eydallin, G., Ball, S. y Pozueta-Romero, J. (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **188**, 5266-5272
4. Armon, A., Graur, D. y Ben-Tal, N. (2001) ConSurf: An Algorithmic Tool for the Identification of Functional Regions in Proteins by Surface Mapping of Phylogenetic Information. *Journal of Molecular Biology* **307**, 447-463
5. Baba T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B.L. y Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **Doi:10.1038/msb4100050**. Article number: 2006.0008
6. Bahr T., Luttmann, D., Marz, W., Rak, B. y Gorke, B. (2011) Insight into bacterial phosphotransferase system-mediated signaling by interspecies transplantation of a transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* **193**, 2013-2026
7. Barabote, R.D. y Saier, M. Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the Bacterial Phosphotransferase system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 608-634
8. Bachler, C., Schneider, P., Bahler, P., Lustig, A. y Erni, B. (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO Journal* **24**, 283-293
9. Berman, K.M. y Cohn, M. (1970) Partial reaction studied with adenosine triphosphate analogues and inorganic phosphate-H18 O exchange reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **245**, 5319-5325
10. Bogan, A. A. y Thorn, K. S. (1998) Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces. *Journal of Molecular Biology* **280**, 1-9
11. Cases, I., Velazquez, F. y de Lorenzo, V. (2001) Role of *ptsO* in carbon-mediated inhibition of the *Pu* promoter belonging to the pWWO *Pseudomonas putida* plasmid. *Journal of Bacteriology* **183**, 5128-5133
12. Cases, I., Velazquez, F. y de Lorenzo, V. (2007) The ancestral role of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomics. *Research in Microbiology* **158**, 666-670
13. Cong, Y., Schro, G.F., Meyer, A.S., Jakana, J., Ma B., Dougherty, M.T., Schmid, M.F., Reissmann, E., Levitt, M., Ludtke, S.L., Frydman, J. y Wah Chiu. (2012) Symmetry-free cryo-EM structures of the chaperonin TRiC along its ATPase-driven conformational cycle. *EMBO Journal* **31**, 720-730
14. Cosenza, L.W., Bringaud, F., Baltz, T. y Vellieux, F.M. (2002) The 3.0 Å resolution crystal structure of glycosomal pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma brucei*. *Journal Molecular Biology* **318**, 1417-1432
15. Cornilescu, G., Lee, B.R., Cornilescu, C.C., Wang, G., Peterkofsky, A. y Clore, G.M. (2002) 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. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42289-42298
16. Datsenko, K. y Wanner, B. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **12**, 6640-6645
17. Delano, W. (2002) Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Current Opinion in Structural Biology* **12**,14–20

18. Deutscher, J., Francke, C. y Postma, P.W. (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 939-1031
19. Dimitrova, M. N., Szczepanowski, R. H., Ruvinov, S. B., Peterkofsky, A. y Ginsburg, A. (2002) Interdomain interaction and substrate coupling effects on dimerization and conformational stability of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **41**, 906-913
20. Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Maze, A., Deutscher, J., De Bolle, X. y Letesson, J.J. (2010) Functional Characterization of the incomplete Phosphotransferase System (PTS) of the Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One* **2010**;5
21. Eswar, N, Webb, B, Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U. y Sali, A. (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocol of Protein Science*; Chapter 2: Unit 2.9
22. Fomenkov, A., Valiakhmetov, A., Brand L. y Roseman, S. (1998) *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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 8491–8495
23. Garret, D.S., Seok, Y.J., Peterkofsky, A., Clore, G.M. y Gronenborn, A. M. (1997) Identification by NMR of the binding surface for the Histidine-containing phosphocarrier protein Hpr on the N-terminal domain of Enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Biochemistry* **36**, 4393-4398
24. Garret, D.S., Seok, Y.J., Peterkofsky, A., Gronenborn, A.M. y Clore, G. M. (1999) Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of the enzyme I and Hpr. *Nature structural biology* **6**, 166-173
25. Gajewski, E., Stekler, D. K. y Goldberg, R.N. (1986) Thermodynamics of the hydrolysis of Adenosine 5-triphosphate to adenosine 5-diphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 12733-12737
26. Görke, B. y Rak, B. (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO Journal*. **18**, 3370-3379
27. Guex, N. y Peitsch, M. C. (1997) Electrophoresis. **18**, 2714-2723
28. Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L.F., Baumann, U. y Erni B. (2001) The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *EMBO Journal* **20**, 2480-2486
29. Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. y Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* **177**, 4121-4130
30. Houot, L., Chang, S., Pickering, B.S., Absalon, C. y Watnick P.I. (2010) The Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System Regulates *Vibrio cholerae* Biofilm Formation through Multiple Independent Pathways. *Journal of Bacteriology* **192**, 3055-3067
31. Hvorup, R.N., Winnen, B., Chang, A.B., Jiang, Y., Zhou, X.F. y Saier M.H., Jr. (2003) The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *European Journal of Biochemistry* **270**, 799-813
32. Jones S. y Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 13-20
33. Kim, H.J., Lee, C.R., Kim, M., Peterkofsky, A. y Seok Y.J. (2011) Dephosphorylated NPr of the nitrogen PTS regulates lipid A biosynthesis by direct interaction with LpxD. *Biochemical Biophysics Research Community* **409**, 556-561
34. Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F. y Diep, D. B. (2010) An Extracellular Loop of the Mannose Phosphotransferase System Component IIC Is responsible for Specific Targeting by Class IIa Bacteriocins. *Journal of Bacteriology* **192**, 5906–5913
35. Komor, R.S., Romero, P.A., Xie, C.B. y Arnold, F. H. (2012) Highly thermostable fungal cellobiohydrolase I (Cel7A) engineered using predictive methods. *Protein Engineering, Design & Selection* **25**, 827–833
36. Koo, B.M., Yoon, M.J., Lee, C.R., Nam, T.W., Choe, Y.J. y Jaffe, H. (2004) A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 31613–31621

37. Kortemme, T. y Baker, D. (2002) A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 14116-14121
38. Kortemme, T., Kim, D. E. y Baker, D. (2004) Computational Alanine Scanning of Protein-Protein Interfaces. *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science [DOI: 10.1126/stke.2192004pl2]
39. Larsena, T.M., Benninga, M.M., Wesenberga, G.E., Raymentb, I. y Reedb, G.H. (1997) Ligand-Induced Domain Movement in Pyruvate Kinase: Structure of the Enzyme from Rabbit Muscle with Mg²⁺, K⁺, and l-Phospholactate at 2.7 Å Resolution. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **345**, 199-206
40. Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P. y Plumbridge, J. (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **19**, 5353-5361
41. Lee, C.R., Koo, B.M., Cho, S.H., Kim, Y.J., Yoon, M.J., Peterkofsky, A. y Seok, Y.J. (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IANtr for derepression of *Escherichia coli* K-12 ilvBN expression. *Molecular Microbiology* **58**, 334-344
42. Lee, C.R., Cho, S.H., Yoon, M.J., Peterkofsky, A. y Seok, Y.J. (2007) *Escherichia coli* enzyme IANtr regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 4124-4129
43. Li, X., Peterkofsky, A. y Wang, G. (2008) Solution structure of NPr, a bacterial signal-transducing protein that control the phosphorylation state of the potassium transporter-regulating protein IANtr. *Amino Acids* **35**, 531-539
44. Lin, Y., Lusin, J. D., Ye, D., Dunaway-Mariano, D. y Ames, J. B. (2006) Examination of the structure, stability, and catalytic potential in the engineered phosphoryl carrier domain of pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry* **45**, 1702-1711
45. Lo Conte, L., Chothia, C. y Èl Janin, J. (1998) The Atomic Structure of Protein-Protein Recognition Sites. *Journal Molecular Biology*. Academy Press **285**, 2177-2198
46. Lopez-de los Santos, Y., Chan, H., Cantu, V., Rettner, R., Sanchez, F., Zhang, Z., Saier, M.S. y Soberon, X. (2012) Genetic engineering of the phosphocarrier protein NPr of the *Escherichia coli* phosphotransferase system selectively improves sugar uptake activity. *Journal of Biological Chemistry*. published online July 5, 2012
47. Luttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I.S., Jung, K. y Gorke, B. (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **72**, 978-994
48. Lutz, R. y Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via LcR/O, the TetR/O and AraC/11-12 regulatory elements. *Nucleic Acids Research* **25**, 1203-1210
49. Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J.S., y Lengeler, J.W. (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-independent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 11583-11587
50. Marquez, J.A., Reinelt, S., Koch, B., Engelmann, R., Hengstenberg, W. y Scheffzek, K. (2006) Structure of the Full-length enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 32508-32515
51. Moreira, I.S., Fernandes, P.A., y Ramos, M. J. (2007) Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *InterScience Wiley* **68**, 803-812
52. Nakanishi, T., Nakatsu, T., Matsuoka, M., Skata, K. y Kato, H. (2005) Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion. *Biochemistry* **44**, 1136-1144
53. Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, J.H., Jeong, J.Y. y Lee, J.H. (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICBGlc recruits the global repressor Mlc. *EMBO Journal* **20**, 491-498
54. Naula, C.M., Logan, F.J., Wong, P.E., Barrett, M.P., Burchmore, R.J. (2010) A glucose transporter can mediate ribose uptake: definition of residues that confer substrate specificity in a sugar transporter. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 29721-29728

55. Nooren, I.M.A. y Thornton, J. M. (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO Journal* **22**, 3486-3492
56. Nguyen, T.X., Yen, M.R., Barabote, R.D., Saier, M.H., Jr. (2006) Topological predictions for integral membrane permeases of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **11**, 345-360
57. Oberholzer, A.E., Bumann, M. Schneider, P., Bächler, C., Siebold, C., Baumann, U. y Erni, B. (2004) Crystal structure of the phosphoenolpyruvate-binding enzyme I-Domain from the *Thermoanaerobacter tengcongensis* PEP: sugar phosphotransferase system (PTS). *Journal of Molecular Biology* **346**, 521-532
58. Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J., y Peterkofsky, A. (2006) *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 6448-6454
59. Patel, H.V., Vyas, K.A., Savtchenko, R. y Roseman, S. (2006) The Monomer/Dimer Transition of Enzyme I of the *Escherichia coli* Phosphotransferase System. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 17570-17578
60. Paulsen, I.T., Reizer, J., Jin, R.Z., Lin, E.C.C. y Saier, M. H., Jr. (2000) Functional genomic studies of dihydroxyacetone utilization in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**, 2343-2344
61. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. y Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605-1612
62. Peterkofsky, A., Wang, G., Garret, D. S., Lee, B.R., Seok, Y.J. y Clore, M. (2001) Three-dimensional structures of protein-protein complexes in the E. coli PTS. *Journal of Molecular and Microbiology Biotechnology* **3**, 347-354
63. Pieper, U. N., Eswar, B.M., Webb, D., Eramian, L., Kelly, David, T. Barkan, H., Carter, P., Mankoo, R., Karchin, M.A., Marti-Renom, F.P., Davis y Sali, A. (2008) MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Research* doi:10.1093/nar/gkn791.
64. Pflueger-Grau, K., Gorke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in Microbiology* **18**, 205-214
65. Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57**, 543-594
66. Postma, P.W., Lengeler, J.W. y Jacobson, G.R. (1996) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate Phosphotransferase systems. 1149-1174. En; Neidhardt F.C. Ed. 1996. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. ASM Press. 2da Edición. E.U.A. 1549
67. Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H. Jr., Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an era^{ts} mutant. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 4822-4839
68. Rabus, R., J. Reizer, I. Paulsen, y Saier, M. (1999) Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 26185-26191
69. Reichenbach, B., Breustedt, D.A., Stülke, J., Rak, B. y Görke, B. (2007) Genetic dissection of specificity determinants in the interaction of HPr with enzymes II of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **189**, 4603-4613
70. Reizer, J., Hoischen, C., Reizaer, A., Pham, T. N. y Saier, M. H., jr. (1993) Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Protein Science* **2**, 506-521
71. Reizer, J., Reizer, A., Merrick, M.J., Plunkett, III G., Rose D.J., y Saier, M. H., Jr. (1996) 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* **181**, 103-108
72. Reizer, J. y Saier, M. (1997) Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Current Opinion en Structural Biology* **7**, 407-415
73. Rephaeli, A.W., Saier, M.H., Jr. (1980) Substrate specificity and kinetic characterization of sugar uptake and phosphorylation, catalyzed by the mannose enzyme II of the phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 8585-8591
74. Ritchie, D.W. y Venkatraman, V. 2010. Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**, 2398-2405

75. Saier, M. (2001) The bacterial phosphotransferase system: structure, function, regulation and evolution. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3**, 325-327
76. Saier, M.H., Hvorup, R.N., Barabote, R.D. (2005) Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochemical Society Transactions* **33**, 220-224
77. Saier, M.H. Jr., Tran, C.V., Barabote, R.D. (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research* **34**, D181-186
78. Saier, M.H. Jr., Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G., Elkan, C. (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Research* **37**, D274-278
79. Sanchez-Lopez, R., Alexandern, C.M., Behrendtsenll, O., Breathnach, R., y Werbl, Z. (1993) Role of Zinc-binding- and Hemopexin Domain-encoded Sequences in the Substrate Specificity of Collagenase and Stromelysin-2as Revealed by Chimeric Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7238-7247
80. Schlessman, J.L., Woo, D., Joshua-Tor, L., Howard, J.B y Rees, D. C. (1998) Conformational variability in structures of the nitrogenase iron proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Molecular Biology* **280**, 669-685
81. Seok, Y.J., Sondej, M., Badawi, P., Lewis, M.S., Briggs, M.C., Jaffe, H., y Peterkofsky, A. (1997) High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 26511-26521
82. Sheinerman, F.B., Norel, R. y Honig, B. (2000) Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 153-159
83. Shen, M.Y. y Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science* **15**, 2507-2524
84. Siebold, C., García-Alles, L. F., Erni, B. y Baumann, U. (2002) A mechanism of covalent substrate binding in the x-ray structure of subunit K of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 8188-8192
85. Smirnov, M.D., Safa, O., Regan, L., Mather, T., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Rezaie, A.R., Esmon, N.L. y Esmon, C.T. (1998) A Chimeric Protein C Containing the Prothrombin Gla Domain Exhibits Increased Anticoagulant Activity and Altered Phospholipid Specificity. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9031-9040
86. Smith, M.A., Romero, P.A., Wu, T., Brustad, E.M. y Arnold, F. H. (2012) Chimeragenesis of distantly-related proteins by noncontiguous recombination. *Protein Science* **22**, 231-238
87. Sonhammer, .L.L. y Kahn, D. (1994) Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology. *Protein Science* **3**, 482-492
88. Tchieu J.H., V. Norris, J. S. Edwards y M. Saier Jr. 2001. The complete phosphotransferase in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3**, 329-346
89. Teplyakov, A., Lim, K., Zhu, P.P., Kapadia, G., Chen, C.C., Schwartz, J., Howard, A., Reddy, P.T., Peterkofsky, A. y Hezberg, O. (2006) Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 16218-16223
90. Thompson, J., Chassy, B.M. (1985) Intracellular phosphorylation of glucose analogs via the phosphoenolpyruvate: mannose-phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **162**, 224-234
91. Toogood, P.L. (2002) Inhibition of Protein-Protein Association by Small Molecules: Approaches and Progress. *Journal of Medical Chemistry* **45**, 1543-1558
92. Wang, G., Louis, J.M., Sondej, M., Seok, Y.J., Peterkofsky, A. y Clore, G.M. (2000) Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal transducing protein HPr and IIA^{Glucose} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *EMBO Journal* **19**, 5635-5649
93. Ye, D., Wei, M., McGuire, M., Huang, K., Kapadia, G., Hezberg, O., Martin, B. M. y Dunaway-Mariano, D. (2001) Investigation of the catalytic site within the ATP grasp domain of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 37630-37639
94. Yu, Y. y Lutz, S. (2010) Circular permutation: a different way to engineer enzyme structure and function. *Trends in Biotechnology* doi:10.1016/j.tibtech.2010.10.004

95. Waygood, E.B. (1998) The structure and function of Hpr. *Biochemistry and cell biology* **76**, 359-367
96. Zhu, P.P., Szczepanowski, R.H., Nosworthy, N. J., Ginsburg, A. y Peterkofsky, A. (1999) Reconstitution studies using the helical and carboxi-terminal domain of Enzyme-I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **38**, 15470-15479
97. Zhu, H., Domingues, F.S., Sommer, I. y Lengauer, T. (2006) NOXclass: prediction protein-protein interaction types. *BC Bioinformatics* **7**, doi.10.1186/1471-2105-7-27
98. Zimmer, B., A. Hillmann, y Görke, B. (2008) Requirements for the phosphorylation of the *Escherichia coli* EIIA^{Ntr} protein in vivo. *FEMS Microbiology Letters* **286**, 16-102

Anexos

Composición del medio M9

Solución 1.- (1,000 ml concentración 1X) Se prepara 10X para tener un “stock”

6 g Na₂HPO₄

3 g KH₂PO₄

1 g NH₄Cl

0.5 g NaCl

Solución 2.- (100ml)

1 ml de solución MgSO₄ 7H₂O 1M (1,000X)

Solución 3.- (100ml)

1 ml de solución CaCl₂ 0.1M (1,000X)

Solución 4.- (25ml)

1 ml de solución tiamina 1mg/ml (1,000X)

Solución 5.-

Fuente de carbono variable 1g/l (0.1% peso/volumen) a partir de una solución 10 X (1% de la fuente de carbono).

Solución 6.- IPTG 1 mM (1 ml 1M = 1,000 X)

Solución 7.- Ampicilina (300 mg/ml) 1,000x

Solución 8.- H₂O MQ esterilizada (se afora al final con agua para alcanzar 1litro)

Notas:

Una vez disueltas en agua destilada, las primeras 4 sales se esterilizan en autoclave, a 121°C por 15 minutos. Las soluciones del resto de las sales se esterilizan por separado. La tiamina se filtró (0.22 µm). Se utilizó un “stock” de cada una de las soluciones preparadas por separado. Se agregan en el orden de lista, y se hace el ajuste final aforando con agua al volumen de 1,000 ml (o el deseado).

Anexo Figuras.-

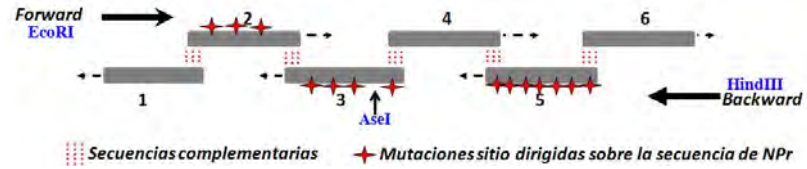


Figura S1.- PCR de traslape utilizada para armar las distintas variantes de NPR mutantes.

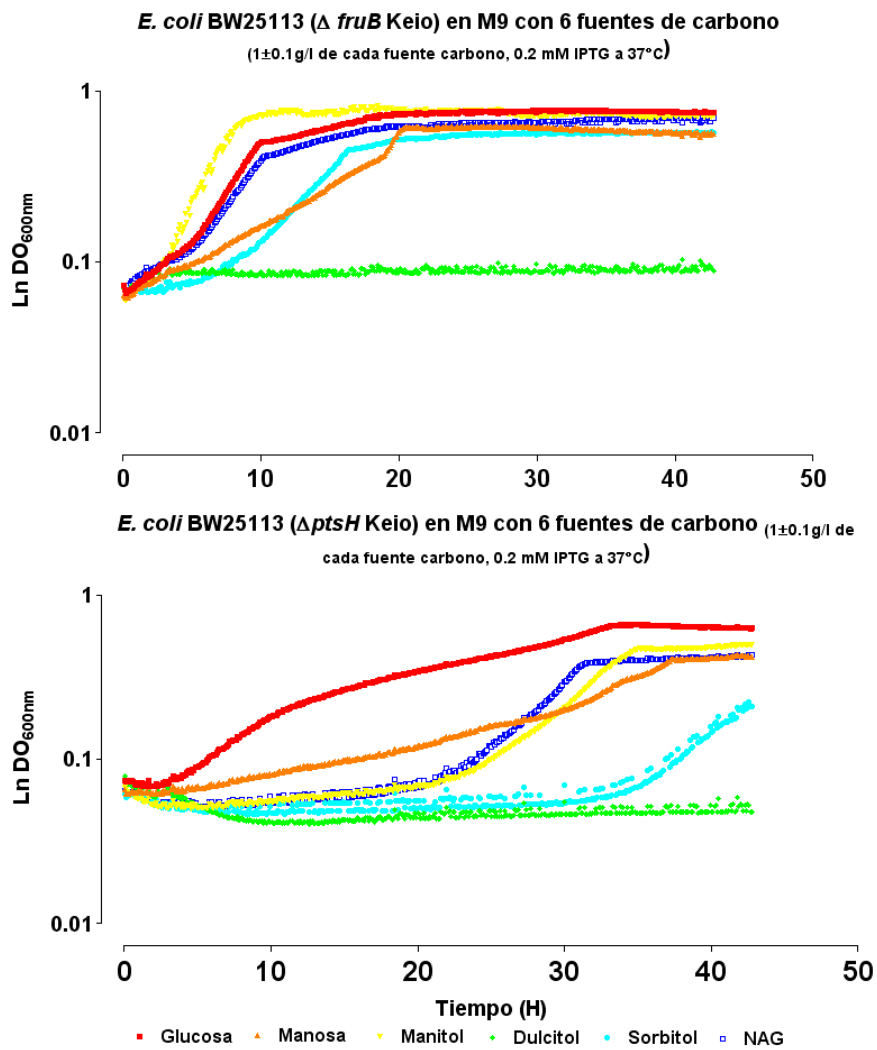


Figura S2.- Cinéticas de complementación de las cepas BW25113 $\Delta ptsH$ y $\Delta fruB$.

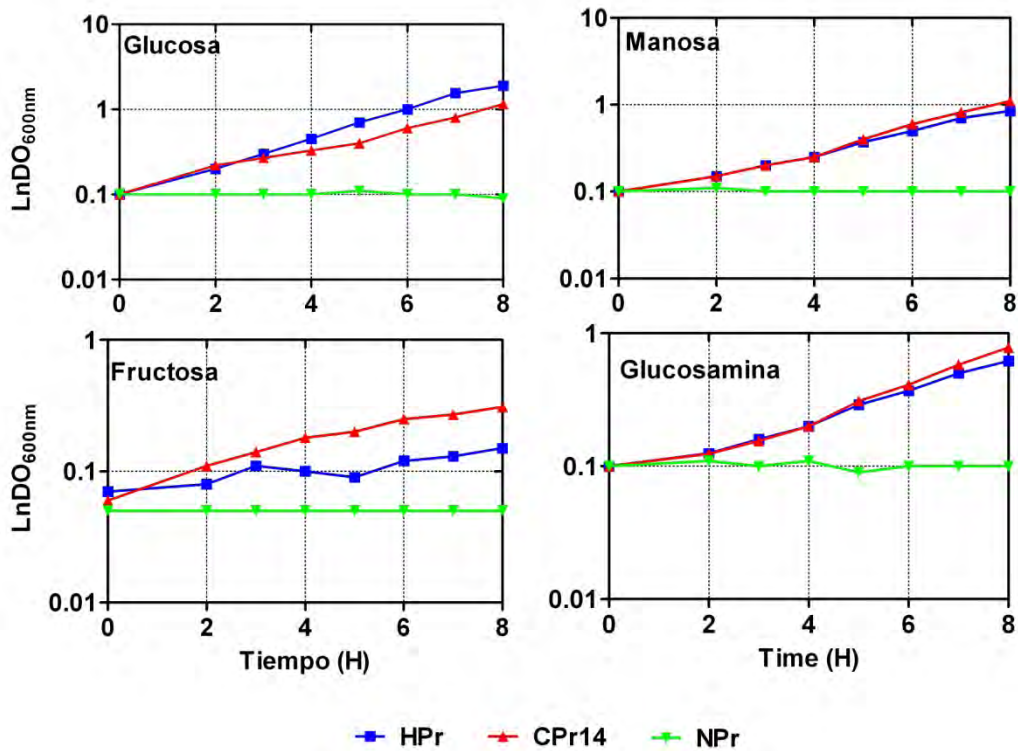


Figura S3.- Comparación del crecimiento de las construcciones con HPr, NPr y CPr14 (BW25113 $\Delta ptsH$, $\Delta fruB$; 2 Δ) Medio mínimo M9 usado con cuatro diferentes fuentes de carbono, cada una a 0.2% peso/volumen con 1 mM IPTG a 37°C. Los experimentos se realizaron por triplicado, los resultados presentan el promedio de los valores obtenidos, la desviación estándar es tan pequeña que no se muestra (**Experimento realizado por el grupo del Dr. Milton Saier Jr. En la UCSD**).

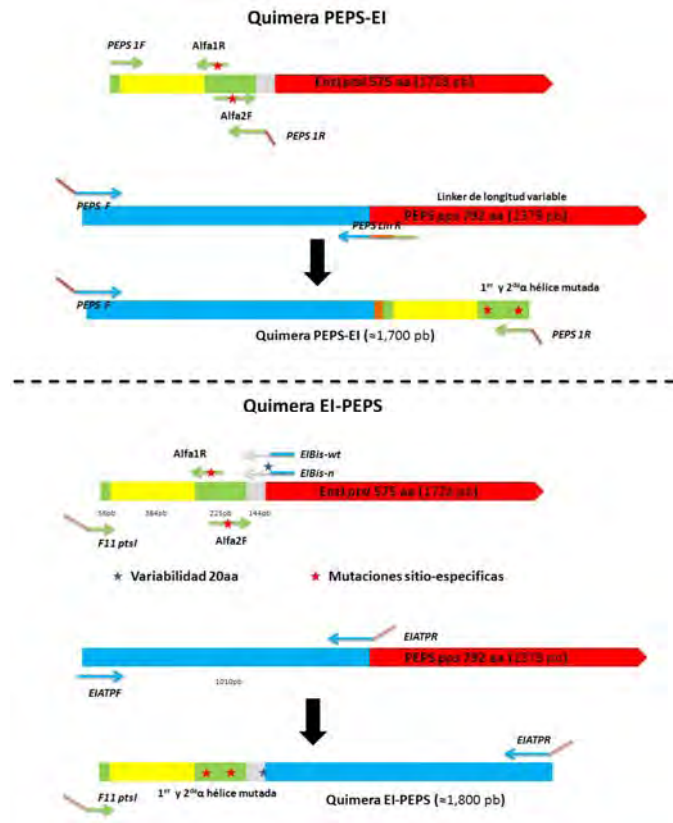


Figura S4.- Estrategias utilizadas para la construcción de los diferentes tipos de quimeras.

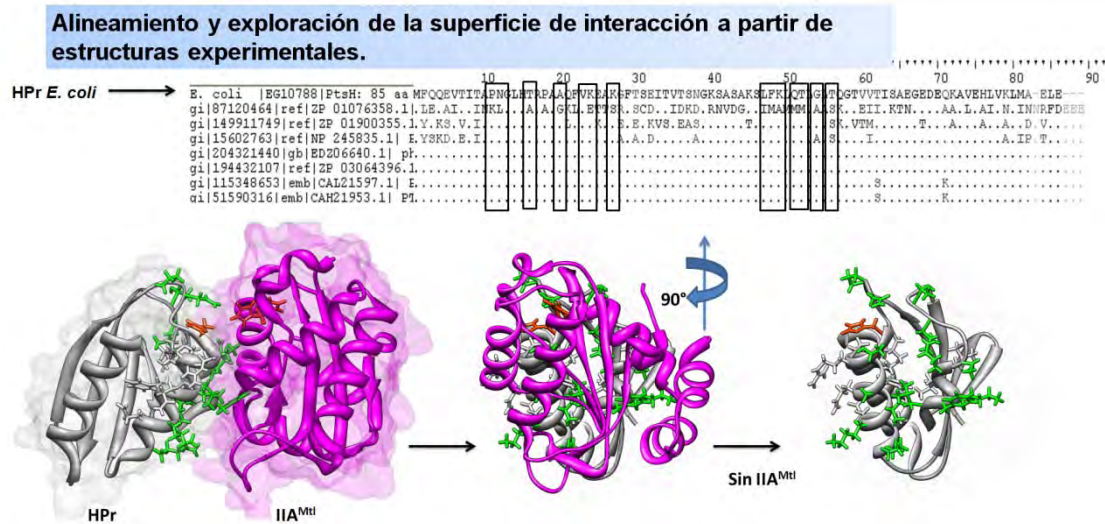


Figura S5.- Identificación de los residuos objetivos para trasplantar la cara de contacto de HPr a NPr.

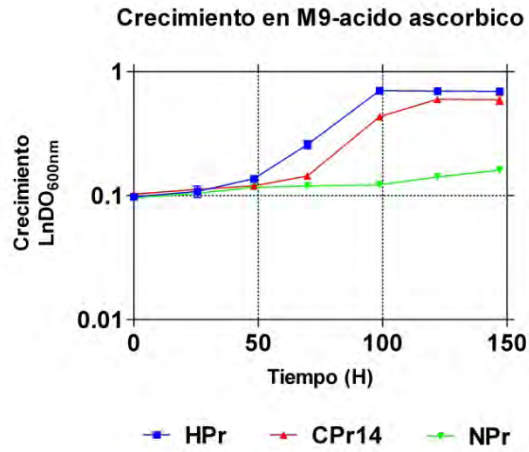


Figura S6.- Crecimiento de las construcciones HPr, NPr y CPr14 en las células 2Δ en M9 con ácido ascórbico como única fuente de carbono bajo condiciones de anaerobiosis. Los resultados que se muestran son el resultado de un experimento por triplicado (Trabajo realizado por el grupo del Dr. Milton Saier Jr. En la UCSD).

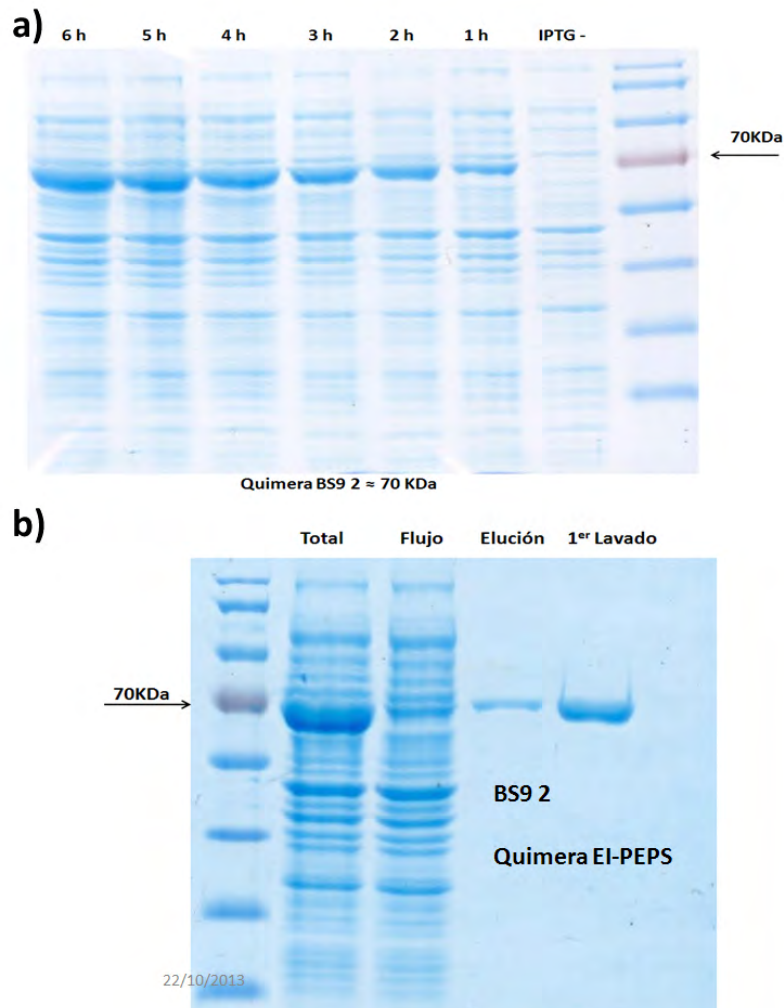


Figura S7.- Proteína BS9. **a)** Ensayo de expresión con inducción por IPTG de la proteína BS9 quimera tipo EI-PEPS usada como antígeno-inmunogénico con colas de histidina (6X). **b)** Purificación de la proteína BS9 a partir de extractos celulares inducidos con IPTG.

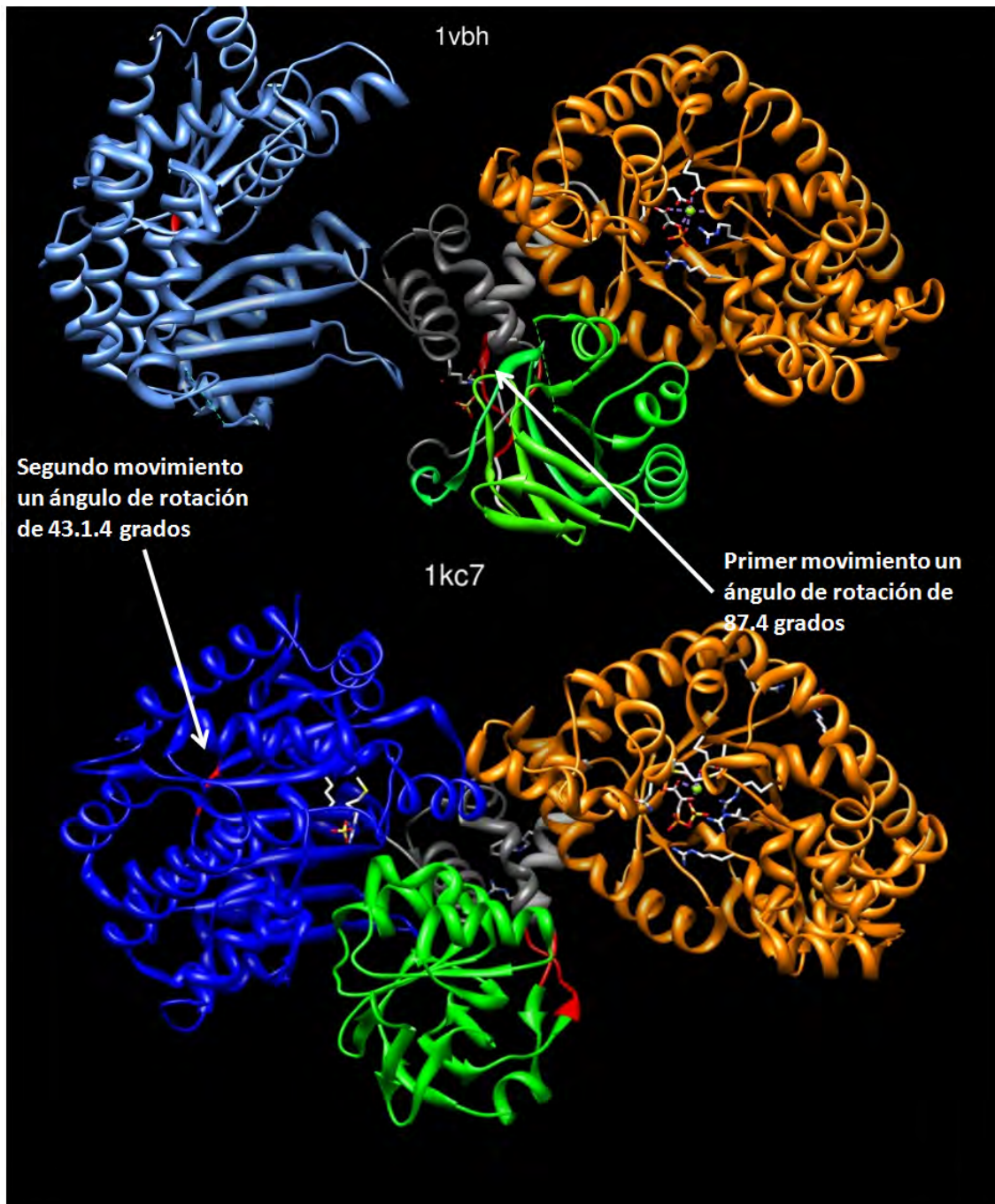


Figura S8.- Resultados de DynDom. Muestran los modelos de PDK pero en las dos posiciones unidas al barril TIM (naranja) y su traslación a el ATPgrasp (Azul). El dominio central se muestra en verde y las bisagras predichas por DynDom se muestran en rojo.

Anexos Tablas

Tabla SI.- Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Cepas/plásmidos / oligos	Características / polimerasa usada / secuencia 5-3`	Referencias / sitios de restricción
Cepas		
<i>E. coli</i> BW25113	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 y <i>hsdR</i> 514	Datsenko y Wanner, 2000.
<i>E. coli</i> BW25113 Δ2A	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>ptsH</i> and Δ <i>fruB</i>	En este trabajo
<i>E. coli</i> BW25113 Δ<i>ptsH</i>	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514 and Δ <i>ptsH</i>	Baba et al., 2006. Colección Keio
<i>E. coli</i> BW25113 Δ<i>fruB</i>	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514 and Δ <i>fruB</i>	Baba et al., 2006. Colección Keio
<i>E. coli</i> BW25113 Δ<i>ptsI</i>	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514 y Δ <i>ptsI</i>	“Keio collection” Baba et al., 2006.
<i>E. coli</i> MC1061	Usada como cepa para extracción de vectores como templado para posteriores ligaciones / <i>F</i> -, <i>araD</i> 139, Δ (<i>ara-leu</i>)7696, <i>galE</i> 15, <i>galK</i> 16, Δ (<i>lac</i>)X74, <i>rpsL</i> ,(<i>str</i> ^r) <i>hsdR</i> 2, (<i>r</i> _k ⁻), <i>mcrA</i> y <i>mcrB</i> 1	Wertman et al., 1986, Raleigh et al., 1988.
<i>E. coli</i> Top 10	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>nupG</i> <i>recA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE</i> 15 <i>galK</i> 16 <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA</i> 1 λ ⁻ Resistente a estreptomycin. Esta cepa la utilizamos para la clonación del vector pJet con las quimeras y genes utilizados.	Invitrogen / <u>Casadaban</u> y <u>Cohen (1980)</u> .
Plásmidos del proyecto de mutantes de NPR		
<i>pZE12</i>(NPr)	Gen de resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , Gen de la luciferasa interrumpido, <i>PllacO-1</i> y <i>ptsO</i> (gen de npr)	Este trabajo
<i>pZE12</i>(HPr)	Gen de resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de la luciferasa interrumpido, <i>PllacO-1</i> y <i>ptsH</i> (gen de HPr)	Este trabajo
<i>pZE12</i>(NPr6)	Gen de resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de la luciferasa interrumpido, <i>PllacO-1</i> y <i>ptsO</i> mutado (K12P, L13N, A17T, M21A, F24V y E25K).	Este trabajo
<i>pZE12</i>(NPr8)	Gen de Resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de la luciferasa interrumpido, <i>PllacO-1</i> y <i>ptsO</i> mutado (Q28K, V49L, I50F, A51K, L53K, M54T, D56G y A58T).	Este trabajo
<i>pZE12</i>(NPr14)	Gen de Resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de luciferasa interrumpido, <i>PllacO-1</i> y <i>ptsO</i> mutado (K12P, L13N, A17T, M21A, F24V, E25K, Q28K, V49L, I50F, A51K, L53K, M54T, D56G y A58T).	Este trabajo
<i>pZE12</i> (<i>ptsH-truncada</i>)	Resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de luciferasa interrumpido por gen <i>ptsH</i> truncado. <i>PLlacO-1</i> (RBSII). Usado como control para evaluar la carga metabólica de la expresión del vector en la cepa BW25113 Δ <i>ptsI</i> .	En este trabajo
<i>pKD4</i>	Templado con las secuencias <i>FRT</i> y la Resistencia a kanamicina	Datsenko y Wanner, 2000.
<i>pKD46</i>	Gen de resistencia a ampicilina y recombinasa roja λ	Datsenko y Wanner, 2000.
<i>pCP20</i>	Expresión inestable al calor de la recombinasa <i>FLP</i>	Datsenko y Wanner, 2000.
Plásmidos de proyecto de quimeras de EI		
<i>pZE12</i> (<i>ptsI</i>)	Resistencia a ampicilina, <i>ColE1</i> , gen de luciferasa	En este trabajo

	<i>interrumpido por el gen ptsI. pLlacO-1 (RBSII). Usado como templado y como control positivo y negativo para los ensayos in vivo e in vitro respectivamente.</i>	
pZE12 (pps)	<i>Resistencia a ampicilina, ColE1, gen de luciferasa interrumpido por el gen pps. pLlacO-1 (RBSII). Usado como templado y como control negativo y positivo para los ensayos in vivo e in vitro respectivamente.</i>	En este trabajo
pZE12 (Quimeras)	<i>Resistencia a ampicilina, ColE1, gen de luciferasa interrumpido por los genes armados de las quimeras. pLlacO-1 (RBSII). Usado como vector de expresión para las quimeras construidas.</i>	En este trabajo
pJet1.2/blunt	Usado como vector de clonación, es un sistema de clonación con selección positiva. Posee un sitio de clonación múltiple extendido, así como el promotor T7 para transcripción <i>in vitro</i> .	Fermentas CloneJet PCR cloning Kit (No. K1231)

Oligonucleótidos

Oligonucleótidos para armado de genes sintéticos (proyecto NPr)

Forward	CGAGAATTGTGAGCGGATAAC	<i>Este trabajo</i>
F2	GACCGTCAAGCAAACCTGTTGAAATCACAAACCCGA ACGGCATGCATACCCGGCCTGCA	<i>Este trabajo</i>
F4	AGTGCTCTTACGTAATGACGAAGGCACCGAGGCTG AAGCCAAC	<i>Este trabajo</i>
F6	ACGGCAGATTGAAGTTGAAGCGACCGGTCCACAGG AAGAGGAAGCACTGGCCG CCGTT	<i>Este trabajo</i>
Reverse	GACAAACAACAGATAAAACGAAAGG	<i>Este trabajo</i>
R1	CTTGACGGTCATGGTACCTTTC	<i>Este trabajo</i>
R3	TAAGAGCACTTCAGCGTCAAACCCCTTC <u>ATTAATT</u> TTACCAGCTTGGCTGCAGGCCG	<i>Este trabajo /AseI</i>
R5	AATCTGCCGTCTTTAGTAGAGCCCAAAGTCTGCA GTTTAAACAGGCTGT TGGCTTCA	<i>Este trabajo</i>

Oligonucleótidos usados para la delección y construcción de la cepa 2Δ

ptsH-P1	GTTCCACAACACTAAACCTATAAGTTGGGGAAATAC AATGTTCCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (Mutación cromosomal de HPr)	<i>Este trabajo</i>
ptsH-P2	CTTACTTGTGACTGATTTTTAAAGAACCCGGGAAA TTACTCGAGCATATGAATATCCTCCTTAG (Mutación cromosomal de HPr)	<i>Este trabajo</i>
ptsH3	GCTAACAATACAGGCTAAAGTCG (Verificación de la mutación de HPr)	<i>Este trabajo</i>
ptsH4	GCCTTGGCAGCACCCTGTCAG (Verificación de la mutación de HPr)	<i>Este trabajo</i>
fruB-P1	CGGGCGAAAAGGCCGGAGACAAAGAAGAGGCGAT TCGCCAGGTCGCTGCGTGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC (Mutación cromosomal de FPr)	<i>Este trabajo</i>
fruB-P2	AGCAGCGATAGCGTCGCCGATTGCTTTCAGCGCCTG TTCAGCATCTGCACCATATGAATATCCTCCTT AG (Mutación cromosomal de FPr)	<i>Este trabajo</i>
fruB3	AATCGTTTCAATTTCAGCAAGAGAG(Verificación de mutación de FPr)	<i>Este trabajo</i>
fruB4	GGCAGAAACCAACAAGGTCATAAGC (Verificación de mutación de FPr)	<i>Este trabajo</i>
hpr-Nco	AAACCATGGCAATGTTCCAGCAAGAAGTTACC (Clonación de HPr dentro de pBAD24)	<i>Este trabajo</i>
hpr-Hind	AGTAAGCTTACTCGAGTTCCGCCATCAG (Clonación de HPr dentro de pBAD24)	<i>Este trabajo</i>
npr-Kpn	AAAGGTACCATGACCGTCAAGCAAACCTG (Clonación de NPr dentro de pZE12)	<i>Este trabajo</i>
npr-Hind	ATGAAGCTTAATCTTCATCAAACCAG (Clonación dentro de pZE12)	<i>Este trabajo</i>

Oligonucleótidos para generación de quimeras y genes del proyecto de EI		
F11ptsIExt	Extracción de ptsI / Pfu y Taq / tctgacgggtaccatgatttcaggcatttttagcatcc	En este trabajo / KpnI
R10ptsIEx2	Extracción de ptsI y eliminación de secuencia de restricción KpnI / Pfu y Taq / gagaggtgacgctacgtgtaccacgatagc	En este trabajo
F9ptsIExt2	Extracción de ptsI y eliminación de secuencia de restricción KpnI / Pfu y Taq / gctatcgtgggtacaggttagcgtcaccctctc	En este trabajo
R6ptsIExt	Extracción de ptsI y eliminación de secuencia de restricción HindIII / Pfu y Taq / atgcaagttccgcatctcgtgattagcag	En este trabajo / HindIII
FcppsExt	Extracción de pps / Pfu / agtgaattcattaaagaggagaaaggtaccatgtccaacaatggctcgtcac	En este trabajo / EcoRI y KpnI
ReppsExt	Extracción de pps / Pfu / atgcaagcttttatttcttcagttcagccagg	En este trabajo / HindIII
FIntpps	Secuenciación interna pps / tgcggttaacccggatgag	En este trabajo
RIntpps	Secuenciación interna pps / tgcggttaac ccggatgag	En este trabajo
Alfa1R	Modificación de la cara de contacto / Pfu y Taq / acggccaccgcgctcggtgatgaaaccagcaccttcttcaggttcagttcggttcggttc tcatccggcgtcaggtcagcggc (81pb)	En este trabajo
Alfa2F	Modificación de la cara de contacto / Pfu y Taq / gggttcatcaccgacgcgggtggccgtactcccacacctatcattgcgcgtgaa ctggaactacctgctatcg (77)	En este trabajo
EIBis-wt	Unión de ambos dominios / Pfu y Taq / accaaagcaccagcggtagcagccattgttgacat- agctggcagatctttcagtttagc	En este trabajo
EIBis-n	Unión y variabilidad en la bisagra conectora entre dominios / Pfu y Taq / accaaagcaccagcggtagcagccattgttgacat- snnsnncagatctttcagtttagc	En este trabajo
EIATPF	ATPgrasp de quimera EI-PEPS / Pfu / atgtccaacaatggctcg	En este trabajo
EIATPR	Final de ATPgrasp de PEPS / Pfu y Taq / atgcaagcttttattatccggacgcgcctgcac	En este trabajo / HindIII
F int EI-PEPS	Secuenciación quimeras EI-PEPS (N y C terminal) / tgacgactatctgattctggatg	En este trabajo
F int PEPS-EI	Secuenciación de quimeras PEPS-EI / catcatctggcgtgatgttctc	En este trabajo
R e his	Extracción de PEPS con histidinas / atgcaagcttttattagtgtgatggtgatggtgattttcttcagttcagccagg	En este trabajo / HindIII
Chi EI-PEPS H	Extracción quimeras EI-PEPS / Pfu y Taq / atgcaagcttttattagtgtgatggtgatggttccggacgcgcctgcac	En este trabajo / HindIII
Chi PEPS-EI H	Extracción quimeras PEPS-EI / Pfu y Taq / atgcaagcttttattagtgtgatggtgatggtatccagaatcagatagtcgtc	En este trabajo / HindIII
PEPS1F	Dominio C terminal de EI / Pfu / attttagcatccccgggtatc	En este trabajo
PEPS1R	Dominio C terminal de EI / Pfu y Taq / atgcaagcttttattaatccagaatcagatagtcgtc	En este trabajo / HindIII
PEPS F	Extracción de ATPgrasp de PEPS / Pfu y Taq / tctgacgggtaccatgtccaacaatggctcg	En este trabajo / KpnI

PEPSLinR	Unión entre dominios con variabilidad en la longitud y composición de un “linker” de 10 aa / Pfu y Taq / accgaaagcgatacccggggatgctaaaatgctaccgccaccgccgctaccgcca ccgccttccggacgcgcctgcac	En este trabajo
Forward	Oligo externo a los insertos para secuenciar y revisar la estructura de las construcciones / cgagaattgtgagcggataac	En este trabajo
Reverse	Oligo externo a los insertos para secuenciar y revisar la estructura de las construcciones / ctgtttgtgtctattttgctttcc	En este trabajo
Alfa 1 wt R	Para completar la PCR de traslape de las versiones de quimeras 1/2 / Pfu y Taq / acggccaccgcgctcggatgaaaccc (28pb)	En este trabajo
H=A QF	Para quitar la histidina catalítica en las quimeras versión Forwad / Pfu y Taq caccgacgcgggtggcctactccgccacctccatcattgcgcgtg (47pb)	En este trabajo
H=A QR	Para quitar la histidina catalítica en las quimeras versión reversa / Pfu y Taq ggcggagtagcggccaccgcgcgtcgggtg	En este trabajo
PEPS-EI Histag N	Para purificar quimeras PEPS-EI con Histag en la región N-terminal / Pfu y Taq tctgacggtagcatcaccatcaccatcactccaacaatggctcgtcacc	En este trabajo / KpnI
Rgrasp VQ	Para eliminar a los aa valina y glutamina del ATP grasp de PEPS / Pfu y Taq aaaactcatccgggtaaccgcaccggcccgaccatctaccaaggccccatcgcg (57pb)	En este trabajo
grasp1	Para eliminar a los aa del ATP grasp de PEPS / Pfu y Taq gcggtaaccggatgagt (19pb)	En este trabajo
RgraspDE	Para eliminar los aa ácido aspártico y ácido glutámico de ATP grasp de PEPS / Pfu y Taq gaacagttaccggtgtggccatctttcgccacgcaatggccatcggcgaccgtagtgtttctc (66pb)	En este trabajo
Fgrasp QR	Para eliminar glutamina y arginina del ATPgrasp de PEPS / Pfu y Taq ggccacaccgtaaaactgttcattgtggcgcgccaccggaaggcgtagcggtatt (57pb)	En este trabajo
RgraspVQ-AN	Para cambiar valina y glutamina de ATPgrasp por alanina y asparagina / Pfu y Taq aaaactcatccgggtaaccgcaccgttcggaccatctaccaaggccccatcgcg (57pb)	En este trabajo
RgraspDE-NH	Para cambiar ácido aspártico y ácido glutámico por asparagina e histidina en ATPgrasp de PEPS / Pfu y Taq gaacagttaccggtgtggccatctttcgccagtgatgttcacatcggcgaccgtagtgtttctc (66pb)	En este trabajo
Frgrasp2	Para cambiar los aa de ATPgrasp de PEPS por aa equivalentes / Pfu y Taq ggccacaccgtaaaactgttc (21pb)	En este trabajo
Rgrasp3	Para cambiar aa de ATPgrasp por aa equivalentes / Pfu y Taq gaacagttaccggtgtggcc (21pb)	En este trabajo
Fgrasp QR-NL	Para cambiar glutamina y arginina por asparagina y leucina en el ATPgrasp / Pfu y Taq ggccacaccgtaaaactgttcattgtgaacgcgctcccgaaggcgtagcggtatt (57pb)	En este trabajo
FrepEZptsI	Para quitar mutación puntual extra en ptsI / Pfu y Taq CGAAGGTCAGGCTTCTGCCCTGGAAGAGCTGG (32pb)	En este trabajo

RrepEZptsI	Para quitar mutación puntual extra en <i>ptsI</i> / Pfu y Taq CCAGCTCTTCCAGGGCAGAAAGCCTGACCTTCG (32pb)	En este trabajo
Oligonucleótidos para PCR de diagnóstico de cepas derivadas de BW25113 de Keio		
K2	Forward utilizado por Datsenko y Wanner para la ver la sustitución de genes / CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Datsenko y Wanner, 2000.
DRptsHKeio	Diseñado para revisar la delección de <i>ptsH</i> / ttcgtttgatcgtttccagc	En este trabajo
DRptsIKeio	Diseñado para revisar la delección de <i>ptsI</i> / accatcaccaacgatttttcc	En este trabajo
DRfruBKeio	Diseñado para revisar la delección de <i>fruB</i> / gtcacttcgccgtcttttcc	En este trabajo

Variabilidad se encuentra resaltada con gris (donde smn = cual quiera de los 20 aminoácidos), las secuencias de restricción en negritas y la unión entre dominios de distintos orígenes con (-).

Tabla SII. – Fenotipos de crecimiento de las construcciones del proyecto de NPr y sus variantes.

Fondo genético	Vector/gen	“Fenotipo de crecimiento en M9 con diferentes Fuentes de carbono μmax (tiempo tardado en llegar a la fase estacionaria en horas):										
		Glc	Man	Mtl	Gat	Gut	Sal	NAG*	Fru*	GlcN	Asc	Xil
<i>E. coli</i> BW25113		0.184 h ⁻¹ (9)	0.127 h ⁻¹ (10)	0.189 h ⁻¹ (10)	0.18 h ⁻¹ (9)	0.141 h ⁻¹ (11)	-	ND	0.15 h ⁻¹ (15)	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)		-	-	-	-	-	-	0.276 h ⁻¹ (39)	0.185h ⁻¹ (40)	ND	ND	0.257 h ⁻¹ (40)
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)	pZE12(NPr)	-	-	-	-	-	-	0.214 h ⁻¹ (30)	0.143 h ⁻¹ (34)	-	-	0.286 h ⁻¹ (37)
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)	pZE12(CPr14)	0.224 h ⁻¹ (8)	0.178 h ⁻¹ (9)	0.151 h ⁻¹	0.102 h ⁻¹ (15)	0.143 h ⁻¹ (16)	-	0.204 h ⁻¹ (22)	0.061 h ⁻¹ (30)	+	+	0.256 h ⁻¹ (20)
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)	pZE12(CPr6)	0.143 h ⁻¹ (11)	0.1 h ⁻¹ (1)	-	-	-	-	0.241 h ⁻¹ (28)	0.184 h ⁻¹ (48)	ND	ND	0.082 h ⁻¹ (48)
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)	pZE12(CPr8)	-	-	-	-	-	-	0.136 h ⁻¹ (25)	0.083 h ⁻¹ (48)	ND	ND	0.117 h ⁻¹ (33)
<i>E. coli</i> BW25113 ($\Delta ptsH$ $\Delta fruB$)	pZE12(HPr)	0.501 h ⁻¹ (14)	0.264 h ⁻¹ (15)	0.387 h ⁻¹ (15)	+	+	-	0.144 h ⁻¹ (22)	0.09 h ⁻¹ (47)	+	+	0.322 h ⁻¹ (16)

Nota. - No Determinado (ND), crecimiento (+) y sin crecimiento (-). Abreviaciones: glucosa (Glc), manosa (Man), manitol (Mtl), galactitol o dulcitol (Gat), sorbitol o glucitol (Gut), salicilina (Sal), N-acetilglucosamina (NAG), fructosa (Fru), glucosamina (GlcN), ácido ascórbico (Asc) y xilosa (Xyl). **Nota 2*** Crecimiento positivo para todos estas combinaciones.

Tabla SIII (Experimento realizado por el grupo del Dr. Milton Saier Jr UCSD). La fermentación de los azúcares es indicada por la intensidad del color rojo para las colonias que crecen en placas de agar MacConkey. Incluso aunque las colonias de la construcción con NPr crecieron no causaron la fermentación de ninguno de los azúcares probados. HPr y CPr14 fueron capaces de fermentar los azúcares probados. Se observó que CPr14 fermentó más este azúcar más que HPr.

Fermentación con placas de agar MacConkey (Cambio de color en 24 horas)				
Azúcar	Porcentaje	Placa	Color	Intensidad de color rojo
Glucosa	0.20%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
	0.50%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
	1.00%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
Manitol	0.20%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo / Blanco	+
		NPr	Blanco	--
	0.50%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
	1.00%	HPr	Rojo	+++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
Manosa	0.20%	HPr	Rojo / Blanco	+
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
	0.50%	HPr	Rojo	++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--
	1.00%	HPr	Rojo	++
		CPr14	Rojo	++
		NPr	Blanco	--

Tabla SIV.- Algunas de las interfaces encontradas en el experimento teórico que comparten un nivel similar de energía de unión.

PDB	Energía de Unión	Nombre	Descripción	Grupo
1vbh	-0,80	PPDK <i>Zea mays</i> DC-TIMbarrel		PTS
2hro	-1,98	DC-alfas en EI <i>Staphylococcus carnosus</i>		PTS
2ols	-4,56	PEPS DC-ATPgrasp de <i>Neisseria meningitidis</i>		PTS
3cv2	-4,92			A
1g2y	-5,43	HNF-1 dominio alfa de dimerización		EC
2wci	-5,96			A
2wci	-5,96	Monotiol glutaredoxina	Homodimero de <i>E. coli</i> , usa azufre	A
1el9	-7,78	Complejo de sarcosina oxidasa con su inhibidor	trabaja con iones de fosfatos	EC
2xdf	-7,81	DC-alfas en EI		PTS
1gyo	-8,20	Citocromo C3	tetramero	A
2gm4	-8,36			A
2gm4	-8,36	Resolvasa con interacción en el ADN	tetramero	A
3kg5	-9,48	Antígeno receptor de células B (CCR).		A
3kgs	-9,48	Ig-beta humana	antígeno receptor	A
1msp	-9,78	MSP la isoforma alfa		O
1msp	-9,78	Proteína de esperma	recombinante	A
3cv2	-9,92	Malato sintasa	Interacción de estados fosforilados donde intervienen fósforos e histidinas	A
1b3a	-11,16	Proteína anti-HIV		O
2x0s	-11,36	PPDK de <i>Trypanosoma brucei</i>		PTS
1cp2	-11,90	Proteína Nitrogenasa de hierro de <i>Clostridium pasteurianum</i>	8ferrodoxinas+8H+N ₂ +16ATP+16H ₂ O=8 ferrodoxinas oxidadas+H ₂ +NH ₃ +16ADP+16fosfatos	O
1o2f	-11,93	IIAGlc-IIBCgIc		PTS
1ggr	-12,02	HPr-IIAGlc		PTS
1f6b	-12,53	Complejo SAR1-GDP	difosfato de guanosina	EC
4sgb	-12,62	Complejo de proteínasa B / inhibidor-1 quimi tripsina	hidrólisis de proteínas con especificidad tipo tripsina	A
4sgb	-12,62	Complejo de proteínasa B y el polipeptido inhibidor de <i>Streptomyces griseus</i>		NO
2hwg	-15,06	DC-TIM barrel EI		PTS
1gle	-15,09			A
1gle	-15,09	Proteína específica para glucosa IIIgIc	ATP + glicerol = ADP + glicerol 3- fosfato	A
1lfd	-15,09	Complejos de dominios RALGDS	Mg y acido fosfoaminofosfonico	NO
1aro	-16,4			NO
1aro	-16,40	T7 RNA polimerasa/lisosima complejo	Nucleósido trifosfatado+RNAn=difosfato+RNAn+1	A
2sic	-17,29	Complejo de subtilisina con inhibidor BPN	hidrolisa amidas peptidicas	A
2sic	-17,29	Subtilisina BPN y el inhibidor de <i>Streptomyces</i> sp.		NO
2pzg	-17,91	Primer dominio de unión a nucleotidos NBD1.		A
2gzu	-18,23	Homodimero CyLR2.		A
1avz	-18,5	Complejo de la proteína V-1 NEF V-1 NEF y el dominio silvestre de FYN SH3.		NO
1agr	-18,63		Mg y GDP	NO
1stf	-20,45	Stefina B humana recombinante		NO
1stf	-20,45	Complejo de estefina B / proteínasa papaina para cisteína con actividad de inhibidor		A
1ijy	-20,56	MFZ8 de ratón		EC
1kmi	-22,45	Proteína quimiotáctica CHEZ		A
1kmi	-22,45			EC
1dtd	-23,69	carboxipeptidasa A2 / inhibidor		A
1smq	-23,72			A
1smq	-23,72	ribonucleosida difosfato reductasa	interviene fósforo, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A
1jr5	-24,05	Factor anti-sigma AsiAa		A
3eza	-24,08	EI-HPr		PTS
2ok2	-25,02	Tetramero de proteín Muts		A
1cse	-25,05	Complejo de subtilisina y el inhibidor de elastasa	Iones de calcio	NO

Ingeniería de las proteínas del sistema PTS en *Escherichia coli*

2ptc	-25,39	Tripsina, tripsinogeno y complejos con	Ion de calcio	NO
4a0o	-26,03	Chaperonina Tri-C	Función ATPasa en conformación cíclica, hidrólisis de ATP, 16 cadenas interactuantes	A
1kbl	-26,21	PPDK		PTS
1k20	-26,46	Fosfatasa inorganica de <i>Streptococcus gordonii</i>	Glicerol, Mg y sulfato ionico	EC
1eq9	-26,74	Complejo de quimiopripsina y PMSF		EC
1ct4	-27,74	Variante de OMTKY3 P1 en complejo con SGPB		EC
1m7g	-28,13	APS kinasa de <i>Penicillium Chrysogenum</i>	Glicerol, ADP y ion sulfato	EC
1zbd	-28,28	Proteina G en complejo con RAB3A y el dominio efector de rabfilina 3A	Mg, Zinc y GTP	NO
2atp	-28,57	Ectodominios de CD8 alfa-beta de ratón.		A
1aof	-32,81	Citocromo CD1 de nitrito reductasa		O
1aom	-35	Sustrato y producto del CD1 de Citocromo de nitrito reductasa		O
1aom	-35,00	Nitrito reductasa de citocromo CD1	Grupo hemo, proporfirina con Fe, oxido nitrico	A
1g8q	-35,38	Dominio extracelular CD81 humano como receptor del virus de la hepatitis.		EC
1n2e	-38,63	Pantotenato Sintetasa de <i>M. tuberculosis</i> en complejo con MPCPP	Mg, Glicerol y ion sulfato	EC
3d24	-39,64	Dominio de unión al ligando		A
1e9g	-39,92	Pirofosfatasa inorgánica		EC
1coz	-40,51	Citidililtransferasa de glycerol 3 fosfato de <i>Bacillus subtilis</i>		O
1gve	-41,01	Adenilato reductasas de riñón de rata	Acido citrico, NAP, Glicerol	EC
1pp2	-42,62	Dimero de fosfolipasa		O
3qtl	-45,37	Serine		A
2ypi	-50,73	Complejo entre triosafosfato isomerasa y 2 fosfoglicolato		A
1vrc	-57,58	HPr-IIAMan		PTS
1dce	-84,67	Geraniltransferasa de cerebro de rata		O
1cnz	-91,42	3-isopropil malato dehidrogenasa de <i>Salmonella typhimurium</i>		O
1luc	-92,72	Luciferasa bacteriana		O
1b9m	-92,73	Regulador de <i>E. coli</i>		O
1one	-95,52	Complejo de enolasa de levadura y fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato	PEP, Mg y acido fosfoglicerico	O
1brm	-126,75	Aspartato beta- semialdehido dehidrogenasas de <i>E. coli</i>		O
1jkm	-128,4	Esterasa		O
1efv	-150,38	Flavoproteina		O
1pnk	-295,68	Acilasa de penicilina		O

Nota: EC= Empaquetamiento Cristalino, NO= No Obligadas, O= Obligadas, PTS= PTS, PPDK y PEPS, A= Azarosas (son aquellas interfaces elegidas de manera azarosa antes de realizar en experimento teórico).

Nota: Las unidades de energía se encuentran dadas en kcal/mol.

Tabla SV.- PDB utilizados para calcular el paisaje energético de los componentes de PTS.

3EZA	2HWG	2OLS	1DIK	1KC7	1H6Z	1VBG	1VBH	3EZE	2HRO
1GGR	1O2F	1VRC	1B98	1I4V	1JRS	1MYS	1OY3	1QXN	1SMQ
1SMS	1SUC	1WYB	1XKJ	1ZK9	2ATP	2GZU	2H3N	2HVI	2IMS
2PZG	2Q3A	2VCI	2ZII	3D24	3KG5	3I2D	3QLT	3T1S	3ZY7
4A00	1ASU	2BG5	2EOE	3CV2	3HQN	3HQP	3N25	3QQW	1AQF
1D8C	2E28	1KKM	1KKL	1GLC	1KFL	1YE9	2EBG	2GM4	2GM5
2NOX	2OK2	3VIS	1AM2	1B9B	1IIG	1I2O	1M7P	1MO0	1NEY
1TIM	2J27	2VOM	2YPI	1DMH	1E9G	1EL9	1ELV	1F58	1GVE
1GYO	1IAT	1JKE	1KHI	1K20	1K75	1KLI	1KMI	1KKQP	1K2K
1M7G	1M7Y	1MXR	1NZE	1N31	1QIP	1UAL	1B82	1B67	1CT4
1DTD	1E58	1ED9	1EQ9	1ES9	1EUV	1EXQ	1EYV	1F6B	1F72
1FLM	1G2Y	1G8Q	1G60	1GY7	1HQS	1HT9	1I2M	1I4U	1ICH
1IHR	1IJY	1IL2	1IOD	1IQ6	1IQV	1IWB	1J79	1JAT	1JI0
1JLT	1JP3	1JR8	1JTG	1JZL	1K9U	1K55	1K94	1KIC	1LD8
1LQP	1MZD	1M9F	1MH9	1MXI	1MY7	1NMS	1NRU	1N57	1NXM
1OCK	1OZU	1QF8	1VAQ	1UBK	2BTC	3LYN	1ATN	1BML	1D09
1DHK	1DNL	1EAI	1EG9	1ETH	1FRV	1FSS	1GLA	1I8L	1QAV
1TAB	1WQL	1AHY	1AGR	1AK4	1ARO	1AVA	1AVM	1AVZ	1B6C
1BI7	1BKD	1BUH	1BVN	1CMX	1COF	1CQI	1CSE	1CVS	1DOW
1EMV	1EUV	1F34	1FGO	1FIN	1HLV	1I2M	1ITB	1JTD	1KAC
1KXQ	1LFD	1PDK	1QBK	1RRP	1SMP	1STF	1TGS	1TMQ	1TX4
1UEA	1YCS	1ZBD	2CCO	2PCB	2PTC	2SIC	3HHR	4SGB	1AT3
1B5E	1B8A	1B8J	1B34	1BYF	1C7N	1CLI	1CP2	1F6Y	1GPE
1H2A	1KPE	1NSE	1QBI	1QFE	1QU7	1REQ	1JMT	1SOX	2AAI
2HDH	2NAC	2PFL	1A4I	1AFW	1AHJ	1AJ8	1AJS	1AOF	1AOM
1AQ6	1B3A	1B7B	1B9M	1BJN	1BOL	1BRM	1BYK	1CMB	1CNZ
1COZ	1DCE	1DOR	1EFV	1GUX	1HGX	1HJR	1HSS	1ISA	1JKM
1LUC	1MSP	1ONE	1PNK	1PP2	1QAE	1QAX	1QFH	1QOR	1SPV
1TCO	1TRK	1VLT	1VOK	1WGJ	1XIK	1XSO	1YPI	1YVE	2AE2
2HHM	2VTG	3TMK	4MDH						

Genetic Engineering of the Phosphocarrier Protein NPr of the *Escherichia coli* Phosphotransferase System Selectively Improves Sugar Uptake Activity^{*[5]}

Received for publication, January 23, 2012, and in revised form, July 2, 2012. Published, JBC Papers in Press, July 5, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.345660

Yossef Lopez-de los Santos[‡], Henry Chan[§], Vito A. Cantu[‡], Rachael Rettner[§], Filiberto Sanchez[‡], Zhongge Zhang[§], Milton H. Saier, Jr.^{§1}, and Xavier Soberon^{‡¶2}

From the [‡]Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenue Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, México, P. C. 62210, the [§]Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, México, D. F., P. C. 14610, and the [¶]Department of Molecular Biology, Division of Biological Sciences, University of California at San Diego, La Jolla, California 92093-0116

Background: HPr and NPr phosphorylate different proteins of the PTS system with negligible cross-reactivity.

Results: Transplanting a few residues from HPr into NPr transferred HPr-like specificity with wild type efficiencies and differential activities.

Conclusion: Few changes were needed to produce a functional chimera, showing a straightforward instance of protein evolution.

Significance: These results further our understanding of the protein-protein recognition mechanisms regulating protein phosphorylation.

The *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in prokaryotes mediates the uptake and phosphorylation of its numerous substrates through a phosphoryl transfer chain where a phosphoryl transfer protein, HPr, transfers its phosphoryl group to any of several sugar-specific Enzyme IIA proteins in preparation for sugar transport. A phosphoryl transfer protein of the PTS, NPr, homologous to HPr, functions to regulate nitrogen metabolism and shows virtually no enzymatic cross-reactivity with HPr. Here we describe the genetic engineering of a “chimeric” HPr/NPr protein, termed CPr14 because 14 amino acid residues of the interface were replaced. CPr14 shows decreased activity with most PTS permeases relative to HPr, but increases activity with the broad specificity mannose permease. The results lead to the proposal that HPr is not optimal for most PTS permeases but instead represents a compromise with suboptimal activity for most PTS permeases. The evolutionary implications are discussed.

Often, paralogous proteins in a cell play different roles, particularly when sequence divergence is substantial. For most proteins, it is not known which evolutionary pathways gave rise to this functional distinction. By studying their evolution, structure, and function through genetic engineering and bioinformatic analyses, we hope to understand the complex relationships between representative paralogs. Protein engineering

approaches, such as the ones performed in this study, illustrate the utility of such studies.

We have compared two structurally similar homologous proteins, HPr and NPr, of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS)³ (1). These proteins are paralogs but have different functions; HPr is an essential phosphoryl transfer protein in the sugar-transporting PTS (2), whereas NPr is part of a distinct nitrogen (Ntr) regulatory phosphoryl transfer chain that influences nitrogen metabolism by regulating gene expression (3). NPr cannot substitute for HPr in promoting sugar transport and phosphorylation, and HPr cannot substitute for NPr in coordinating nitrogen metabolism with carbon metabolism (4). These two phosphoryl transfer chains are as shown in Scheme 1.

E. coli possess a complex PTS with numerous constituent proteins, many of which are still functionally uncharacterized. For example, in *E. coli*, there are five Enzyme I (EI) proteins, six HPr homologs, and 21–22 Enzyme II (EII) complexes (5). The EII complexes generally consist of EIIA, EIIB, and IIC, but the EII complexes of the mannose family additionally have an IID constituent. All are required for function.

As described in the Transporter Classification Database (TCDB) (6, 7), there are three evolutionarily distinct families of sugar-transporting PTS EII complexes: the glucose-fructose-lactose (GFL) superfamily, the ascorbate-galactitol (AG) superfamily, and the mannose-fructose-sorbose (Man) family (8). Additionally, there is one nontransporting EII complex: the dihydroxyacetone (DHA) family (9, 10). The GFL superfamily contains the transport pathways for glucose, α -glucosides, β -glucosides, fructose, mannitol, lactose, *N,N'*-diacetylchito-

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant GM077402 from the NIGMS (to M. H. S.). This work was also supported by Grant 83039 from CONACyT and by the sabbatical Grant 060021 from University of California Institute for Mexico and the United States-CONACyT.

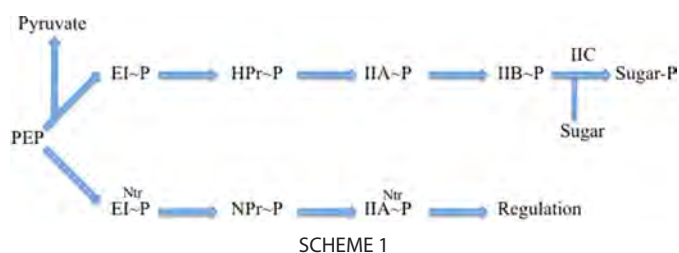
[5] This article contains supplemental Tables S1–S3 and Figs. S1–S3.

¹ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 858-534-4084; Fax: 858-534-7108; E-mail: msaier@ucsd.edu.

² To whom correspondence may be addressed. Tel.: 52-55-5350-1902; Fax: 52-777-172388; E-mail: soberon@ibt.unam.mx.

³ The abbreviations used are: PTS, phosphotransferase system; EI, Enzyme I; EII, Enzyme II; GFL, glucose-fructose-lactose; AG, ascorbate-galactitol; Man, mannose-fructose-sorbose; DHA, dihydroxyacetone; IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside.

Chimeric NPr Protein



biose, and glucitol (11). The AG superfamily includes the proteins specific for galactitol and L-ascorbate (8, 12). The manose family transporters transport a wide variety of aldo- and ketohexoses (13). The sole substrate of DHA family Enzyme II is DHA (10).

Transporters within these superfamilies are generally quite specific for their target sugars, but as noted above, the Man family consists of members with broad specificity. The *E. coli* EII^{Man} transports all hexoses of the D-glucose configuration with promiscuity at the 2 position (14). They are the only PTS proteins in *E. coli* known to appreciably transport mannose, glucosamine, and the nonmetabolizable sugar analog, 2-deoxy-D-glucose, and they also transport glucose as their preferred substrate as well as N-acetyl glucosamine and N-acetyl mannosamine as low-affinity substrates (13).

One well characterized PTS phosphoryl transfer chain used by *E. coli* and many other bacteria uses phosphoenolpyruvate and IIA^{Ntr}. It functions in nitrogen regulation and is not known to provide phosphoryl groups to any of the sugar-transporting EII complexes. The functions of the nitrogen regulatory branch of the PTS are not as well understood as the sugar-translocating branch. However, regulatory functions include control of nitrogen metabolism (4, 15–17), lipid A biosynthesis (18), K⁺ transport (19), β -glucoside utilization (20), toluene degradation (21), pathogenesis (22), and biofilm formation (23). IIA^{Ntr}, and perhaps NPr, are transcription factors for many operons, particularly those involved in nitrogen metabolism. These two PTS phosphoryl transfer chains show less than 1% overall enzymatic cross-reactivity (4).

In the analyses reported here, genetic engineering was used to create a “chimera” of HPr and NPr, derived from the *E. coli npr* gene. This chimera includes the NPr backbone but with 14 site-specific amino acid substitutions, rendering it more similar to HPr. Analysis of this chimeric NPr protein, which we will refer to as CPr14, provided clues as to how the distinct specificities of HPr and NPr arose. It also revealed the surprising fact that HPr is not optimal for all sugar-transporting Enzyme II complexes.

CPr14 proved to be more active than the native HPr when assayed for IIA^{Man} activity *in vivo*. Growth, fermentation, and transport assays led to the conclusion that the synthetic chimera, CPr14, is superior to HPr with this one Enzyme II complex. CPr14 functioned less effectively than HPr with other EIIs, indicating that wild type HPr is not optimized for its activities with IIA^{Man}. It may instead have suboptimal activity with some of its IIA interaction partners, thus representing an attempt at average optimization for interaction with several of the different IIA partners.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Strains—The pZE12 plasmid was used in the majority of the experiments, although pBAD24 was also used. pZE12 contains a *lac* promoter that is induced by IPTG (24). pBAD24 contains a promoter that is induced by L-arabinose (25, 26). The strains employed were derivatives of BW25113 (27). See supplemental Table S1.

Construction of NPr Variant Proteins—To determine whether converting interfacial residues of NPr into those of HPr would confer HPr function on NPr, we chemically synthesized and constructed the entire gene (supplemental Fig. S2). This was achieved using six oligonucleotides, three of which code for the desired amino acid changes. The synthetic gene (CPr14) was cloned into vector pZE12 (24). During this process, we also preserved, as separate clones, two constructs with either the first 6 (CPr6) or the last 8 (CPr8) amino acid replacements.

HPr and FPr Double Knock-out—Growth analyses on the HPr/FPr knock-out (2 Δ) confirmed the results of the study of Feldheim *et al.* (28), which showed that these cells are unable to utilize any PTS sugar. It should be noted that the knock-out of FPr involved knocking out *fruB*, which encodes the FPr-IIA^{Fru} fusion protein. Studies on M9 minimal medium sugar plates showed that the 2 Δ phenotype is rescued by expression of HPr or CPr14 but not by expression of NPr (supplemental Table S2). The complementation analyses were confirmed by MacConkey fermentation analyses on glucose, mannose, and mannitol (supplemental Table S3).

Cloning HPr and NPr—The *ptsH* (*i.e.* HPr) structural gene was amplified from the BW25113 genomic DNA using primers ptsH-Nco and ptsH-Hind (supplemental Table S1). The PCR products were digested with NcoI and HindIII, gel-purified, and then ligated into the same sites of pBAD24 (26), yielding pBAD24-hpr where *hpr* expression is under the control of the *araBAD* promoter. To induce expression of *hpr* in pBAD24-hpr, 1 mM L-arabinose was added to the medium. Similarly, the *ptsN* (*i.e.* npr) structural gene (encoding NPr) was amplified from the genomic DNA using primers npr-Kpn and npr-Hind (supplemental Table S1) and then cloned between KpnI and HindIII of pZE12 (24).

Aerobic Growth Experiments in Liquid Media—All growth experiments were performed in liquid M9 minimal media (1 mM IPTG and 100 μ g/ml ampicillin); all incubations were in a 37 °C water bath. Sugars were added at 0.6% unless otherwise specified. Cultures from strains 2 Δ HPr, 2 Δ NPr, and 2 Δ CPr14 were first grown from single colonies in liquid LB with ampicillin overnight. LB cultures (0.5 ml) were used to inoculate 24 ml of M9 minimal medium, and cultures were grown overnight. One milliliter of overnight M9 minimal medium was added to 24 ml of fresh M9 medium for the HPr and CPr14 strains at an optical density reading (600 nm) close to 0.2. For the NPr strain, 14 ml of overnight M9 minimal medium culture was added to 11 ml of fresh M9 minimal medium for an A₆₀₀ reading close to 0.2.

HPLC Analysis—A carbohydrate column capable of discrimination between the six carbon sources (glucose, mannose, mannitol, galactitol, sorbitol, and xylose) was used on an HPLC

machine. The machine was calibrated using concentrations of 1.5, 1.0, 0.5, or 0.1 g/liter for each carbon source. Carbohydrates in the supernatants were analyzed by HPLC using the following components: Waters equipment; 600E quaternary bomb; 717 automatic injector; and 2410 refraction index detector. An Aminex HPX 87P column (Bio-Rad) was connected. Running conditions for the mobile phase were as follows: H₂O; flow, 0.6 ml/min; and temperature, 85 °C.

Radioactive Uptake Assays—CPr14, HPr, and NPr 2Δ cells were grown overnight in 5 ml of LB with 0.2% mannitol, 1 mM IPTG, and 100 mg/ml ampicillin in a 37 °C shaking water bath. One milliliter of the overnight culture was added to 35 ml of LB with 0.2% mannitol, 1 mM IPTG, and 100 mg/ml ampicillin. This was incubated in a 37 °C shaking water bath until the cells reached log phase (A_{600} of ~0.5). Cells were washed three times by centrifugation at 10,000 rpm at 0 °C for 5 min and resuspended in 20 ml of cold M9 salts solution. The final resuspension was performed using 10 ml of cold M9 salts solution. Cells were then diluted to an A_{600} of 1 ± 0.1 with an M9 salts solution. An aliquot of 4.5 ml of cells was then given 0.5 ml of LB, and the suspension was incubated at room temperature for 10 min. Cells were given 50 μl of a 1 mM radioactive sugar solution at 5 microcuries/μM for a final concentration of 10 μM sugar at 5 microcuries/μM. Cells were incubated at room temperature or at 37 °C with shaking, and samples of 100 μl each were removed at the designated time intervals and passed through 0.45-μm Whatman filters. The filters were washed three times with 10 ml of a cold M9 salts solution. Filters were then dried under a heat lamp for 10 min and dissolved in 10 ml of scintillation fluid NA.

Modeling of Proteins—Using four known structures (HPr, HPr-EI, HPr-EIIA^{glc}, HPr-EIIA^{mtl}, and HPr-EIIA^{man}; Protein Data Bank (PDB): 3EZA, 1GGR, 1J6T, and 1VRC, respectively) as templates, structural modeling of CPr14 and NPr was conducted using the methods align2d and automodel from MODELLER9v7 (29). NPr has 26.4% identity to HPr, and the partial structure suggests an equivalent folding. Furthermore, the 14th mutation in CPr takes this identity to 41.8%. Those models were assayed for quality using the DOPE (30) scores method of MODELLER9 version 7 (supplemental Fig. S3). Before the docking procedure, the HPr structure and NPr CPr14 models were structurally aligned to HPr in the corresponding crystal using Swiss PDB-viewer v4.0.1 (31). All combinations of HPr, NPr, CPr14 with EIIA^{glc}, HPr-EIIA^{mtl}, and HPr-EIIA^{man} were constructed for a total of nine hybrid crystal models.

Hex6.1+CUDA (32) were used for molecular docking with default parameters except for the following: correlation type, shape + electrostatics; compute device, central processing units + graphics processing units; post processing, molecular mechanics minimization; twist range, 180, and distance range, 10 Å. This is to limit the search space to conformations close to the crystal model. As a control for the docking procedure, the root mean square deviation of the HPr crystal against the docked model was calculated. It was less than 2 Å for all models, showing that hex6.1 is capable of reproducing known interactions and conformations.

RESULTS

Identification of Specificity Residues within the Contact Surfaces—Based on the experimental structure of the HPr-IIA^{mtl} complex (Cornilescu *et al.* (40); PDB ID: 1J6T), 14 HPr residues at the interaction surface were identified as candidates for specificity determination (Fig. 1). These residues are all well conserved among the HPrs and among the NPrs but not between these two functionally distinct families of homologs. These NPr residues were converted into those found in the HPrs based on a multiple alignment of HPrs with NPrs. Three mutant chimeric *npr* genes were synthesized using overlap extension PCR. One had all 14 mutations (CPr14); one had the first six N-terminal mutations (CPr6); and one had the last 8 C-terminal mutations (CPr8) (Fig. 1).

Construction of the Structural Models for NPr and CPrs—Until now, a model for the NPr protein did not exist despite the partial structure of NPr determined by Li *et al.* (33) and considering a 0.33 identity between both proteins for *E. coli*. We decided to use a homology modeling strategy for the construction of the NPr model. The MODBASE server (34) was used for modeling an NPr structure using an HPr template (PDB 1POH).

The computed models were tested with the different types of indexes provided by the MODBASE server (E-value, the final model score, and ModPipe Protein Quality Score). All models selected and used in the next analysis passed the reliability tests provided by the MODBASE server (data not shown).

The resulting models highlight the differences between the interacting surfaces of HPr and NPr. Of note are the different protrusions, crevices, and charge distributions and the formation of a cavity very similar to that observed in the HPr model (Fig. 1).

Experimental HPr PTS Complexes and Modeled Complexes for CPr14—Protein modeling analyses were performed to compare the experimental complexes of HPr and its IIA proteins with those predicted for CPr14 and the IIA proteins (Fig. 2). It is noteworthy that the complexes for HPr are similar to those predicted for CPr14. Both show similar calculated ΔG binding values and predicted distances between the two phosphorylatable histidines on the IIAs and HPr or CPr14.

In Vivo Functional and Complementation Analyses—Experiments in this study were performed in the *E. coli* BW25113 parental strain with the *fruB* (FPr-IIA) and *ptsH* (HPr) genes deleted, hereafter referred to as 2Δ cells (35). Strains were created by electroporation of the HPr, NPr, CPr14, CPr6, or CPr8 genes in the pZE12 vector (inducible by IPTG) into the 2Δ cells. A detailed description can be found in the supplemental data.

Liquid growth studies were performed using 2Δ-HPr, 2Δ-NPr, and 2Δ-CPr14 cells in glucose, mannitol, *N*-acetylglucosamine, mannose, glucosamine, and fructose M9 minimal media (Fig. 3 and Table 1). 2Δ-HPr and 2Δ-CPr14 cells grew in all these media, whereas the 2Δ-NPr cells did not show significant growth in any medium. Interestingly, for the sugars transported solely by II^{Man}, mannose, glucosamine and fructose, 2Δ-CPr14 cells consistently outgrew the 2Δ-HPr cells, suggesting that CPr14 is more efficient for sugar uptake via the mannose Enzyme II complex. Growth rates and doubling times in

Chimeric NPr Protein

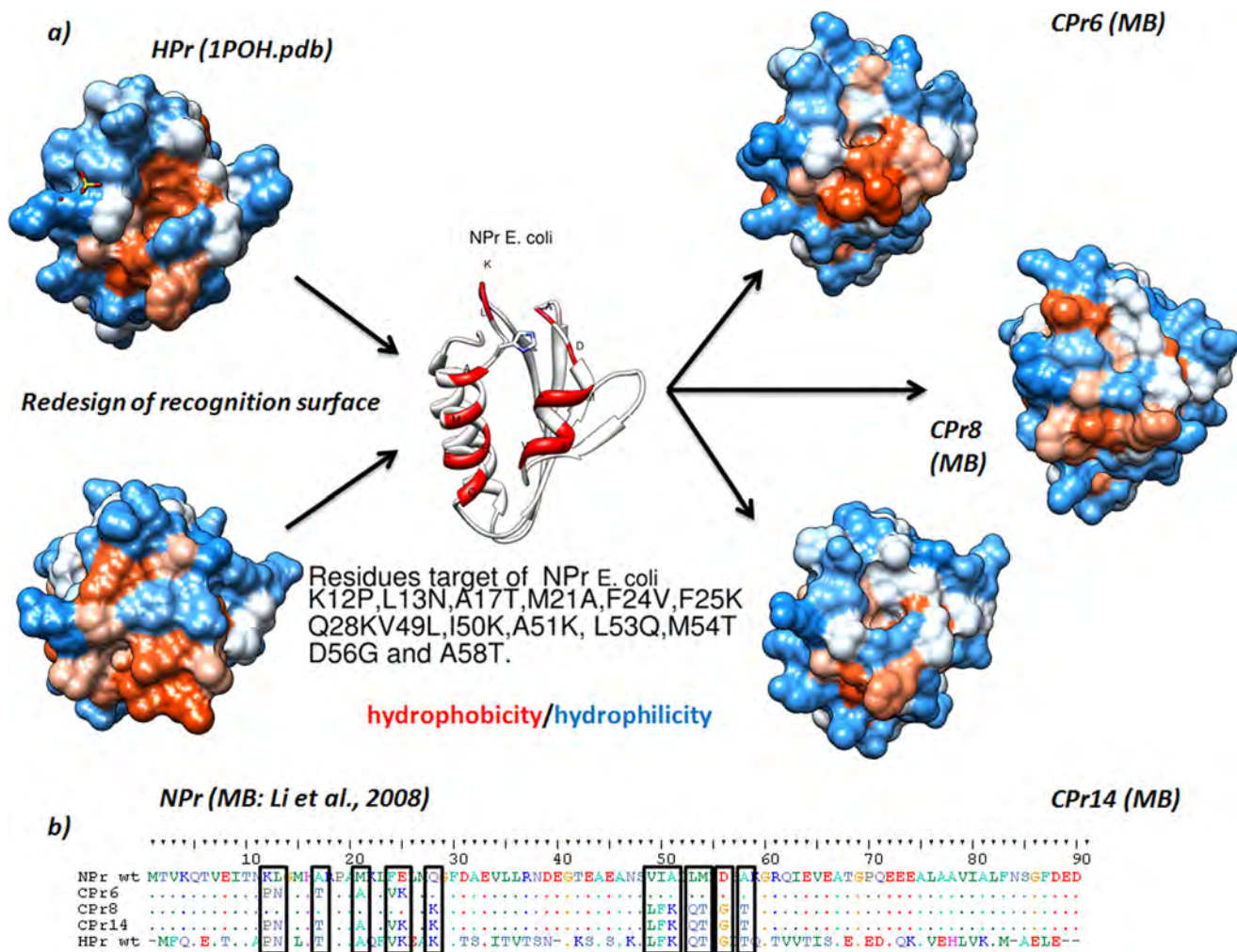


FIGURE 1. **Redesign of the recognition surface of NPr protein.** *a*, different recognition surfaces of HPr (WT), NPr (WT), and the various CPrs in the same spatial orientation. Coordinates for NPr and the three chimeric proteins were obtained by comparative modeling from the MODBASE (MB) database (Pieper *et al.* (34)). *b*, alignment of NPr, HPr and CPrs; mutated residues are highlighted by rectangles.

each medium are listed in Table 1. It should be noted that fructose is utilized much more efficiently by CPr14 cells than by HPr cells. Because the fructose-specific Enzyme II complex is nonfunctional, fructose enters the cell only via the mannose system. Because fructose is a poor substrate relative to glucose, mannose, and glucosamine, we can explain this observation by assuming that some intracellular fructose-6-P is lost via phosphatase activities. Anaerobic growth in M9-ascorbate was also examined, with CPr14 performing slightly worse than HPr. Insignificant growth of 2Δ cells expressing NPr was observed (supplemental Fig. S1).

The two other CPr variants with partial substitutions were tested for growth in parallel with the HPr-, NPr-, and CPr14-producing strains in M9 medium with seven different PTS sugars and one non-PTS sugar (xylose). When compared with CPr14, CPr6 restored a significantly lower level of growth, with a more robust rescue in glucose, *N*-acetylglucosamine, and mannose. The CPr8 variant was unable to restore growth in the genetic background of the 2Δ cells (Fig. 4).

HPLC was used to determine the preferential use of the different carbon sources in a mixture of five different PTS sugars in M9 medium (Fig. 5). The order of consumption for the

BW25113 parental 2Δ-HPr and 2Δ-CPr14 cells was approximately the same: glucose > mannose > xylose = mannitol > galactitol > glucitol. Sugar usage by 2Δ-CPr6 cells was in agreement with the data obtained for growth in liquid media (Fig. 4). Consistent with earlier findings (36), other sugars, PTS-dependent or otherwise, were only utilized after glucose had been depleted from the medium. Interestingly, xylose (a non-PTS sugar) was used before the PTS polyols, mannitol, galactitol, and glucitol. 2Δ-NPr cells were unable to grow in or utilize any of the sugars included in the HPLC analysis (data not shown). It is worth mentioning that to the best of our knowledge, this is the first report determining the sequence of PTS sugar consumption in the presence of glucose for *E. coli*.

Radioactive uptake assays performed with 2Δ-HPr, 2Δ-NPr, and 2Δ-CPr14 cells using [¹⁴C]glucose and 2-deoxy-D-[¹⁴C]-glucose showed that the 2Δ-HPr cells took up glucose more readily than the 2Δ-CPr14 cells, but as shown in Fig. 6, the 2Δ-CPr14 cells took up 2-deoxy-D-glucose better. Because 2-deoxy-D-glucose, transported only by the mannose Enzyme II complex, is nonmetabolizable, the accumulation observed must be a reflection of the uptake rate unaffected by subsequent metabolism. 2Δ-CPr14 cells plateaued at ~2000–2500 cpm,

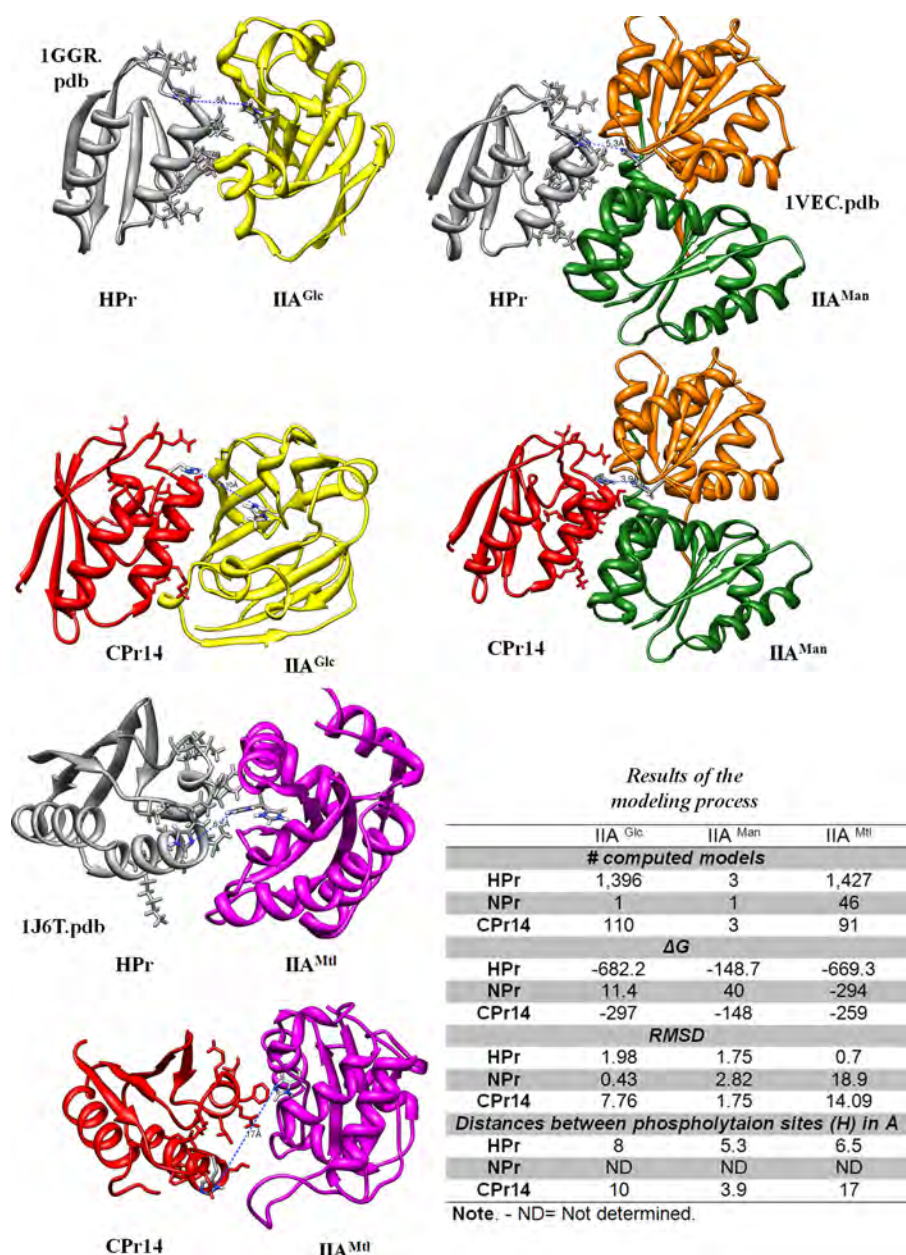


FIGURE 2. Comparison among experimental complexes (HPr and its partner IIA proteins) and the modeling complexes (CPr14 and the IIA proteins). Only side chains of residues on the recognition surfaces are shown. For each of the nine dockings, the table shows the number of calculated models that had less energy than the default threshold (or the best model if none were better than the threshold), the ΔG of binding for the best model (in Hex units), the root mean square deviation (*RMSD*) of the best docking model against the crystal model, and the distance between phosphorylation sites.

whereas 2 Δ -HPr cells plateaued at \sim 1500 cpm. These results confirm that II^{Man} prefers CPr14 to HPr.

DISCUSSION

Uses and Limits of an Interaction Model Based on Homologous Complexes—The remarkable efficiency with which CPr14 was able to allow for growth in the absence of HPr indicates that this chimera retained sufficient structure and stability to allow function. Although none of the 14 residues modified seemed to be critical to the structure of the protein, it is possible that they reduced the stability and normal function of NPr. The success of these experiments can be attributed to the fact that HPr and NPr are structurally similar homologs. Indeed, similar results

were obtained when sequence changes introduced diversity present in other sets of homologous proteins (37).

Comparison between the Models and Experimental Structures—In the phosphorylation chain of the PTS, HPr involves the formation of two interfaces (EI and IIA^{Glc}). It is noteworthy that one of the key interactions with the interface between HPr and its partners was presented in the models of our mutants (Fig. 1). Despite the fact that both HPr and NPr have very similar scaffolds (33), HPr has a convex region (helices 1 and 2) that serves as a complementary fit in the protein-protein interaction with EI and IIA^{Glc} (38, 39). This common convex binding surface (for EI and IIA^{Glc}) has a central hydrophobic core surrounded by a ring of polar and positively

Chimeric NPr Protein

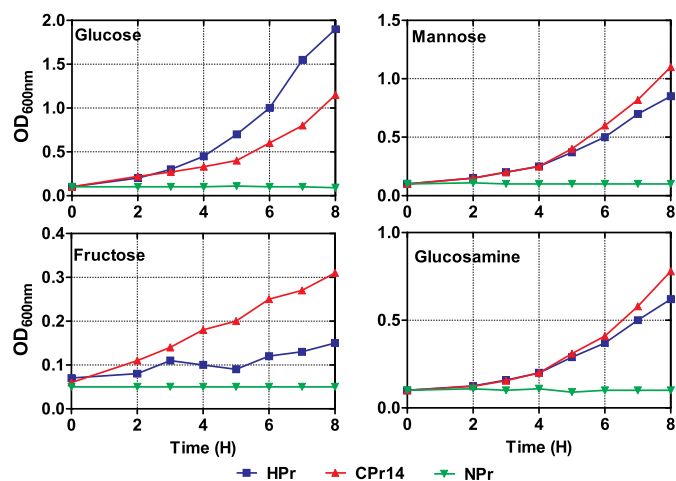


FIGURE 3. Comparative growth of 2Δ-BW25113 ($\Delta ptsH$, $\Delta fruB$; 2Δ) with HPr, NPr, or CPr14 expressed from pZE12. Liquid M9 minimal medium was used with one of four different carbon sources: glucose, mannose, glucosamine, or fructose, each at 0.2% with 1 mM IPTG at 37 °C. Experiments were performed in triplicate, and the results presented are the average values. Standard deviations were too small to be displayed. OD, optical density.

TABLE 1

Rates of growth of 2Δ-HPr and 2Δ-CPr14 cells in liquid M9 sugar media

Doubling times were calculated using the data from the logarithmic growth phases of the cells, as indicated by a linear growth phase in a logarithmic graph (A_{600}) as a function of time (Fig. 3). Growth rate is expressed as the percentage of the wild type rate in glucose medium.

M9 minimal medium	Growth rate		Doubling time	
	HPr	CPr14	HPr	CPr14
	%		h	
Substrate				
Glucose	64	45	1.4	1.9
Mannitol	38	37	2.2	2.2
Sorbitol	40	37	2.1	2.2
Mannose	32	42	2.5	2.0
Glucosamine	31	41	2.5	2.0
Fructose	13	19	5.5	4.0

charged residues. In our protein models, we can see that this attribute is shared by HPr and mutants CPr14 and CPr6 but is absent in CPr8 and NPr. It is possible that this convex surface is needed to help the formation of the complex with EI and IIA^{Glc}. Although we have experimental evidence supporting the notion that CPr6 and CPr14 have the capacity to restore growth in the complementation assays, it is necessary to compare the models with experimental data obtained with structural studies (NMR or x-ray crystallography).

In Silico Analyses and Experimental HPr PTS Complexes versus Modeled CPr14 Complexes—Protein modeling and docking analyses were performed to compare the experimental complexes for HPr and its IIA proteins with those predicted for CPr14 (or NPr) and the IIA proteins (Fig. 2). It is noteworthy that CPr14, despite being more similar in sequence to NPr, formed a predicted complex closely resembling those of HPr (Fig. 2).

Although the results for mannitol are not as expected (perhaps NPr interacts with the EIIA^{mtl} but does not transfer its phosphate), the calculated ΔG binding values (in “Hex units”) show that HPr and CPr14 interact with both EIIA^{Glc} and EIIA^{Man}, whereas NPr interacts with neither. Moreover, the HPr-EIIA^{Glc} interaction is stronger than that of CPr14-EIIA^{Glc},

whereas HPr-EIIA^{Man} and CPr14-EIIA^{Man} are roughly equivalent as shown by our experimental data.

Behavior of the Phosphotransfer Protein Variants and Specificity versus Promiscuity—2Δ-HPr cells best utilized sugars that are transported by the Enzyme II of the GFL superfamily, whereas the sugars that were better utilized by CPr14 were substrates of IIA^{Man} of the Man family. These results were unexpected because the targets that were chosen for site-specific mutagenesis were residues thought to participate in the interaction between HPr and IIA^{mtl} (a GFL family protein) (40). Whether these findings apply to other members of the Man family has yet to be determined.

Because HPr and CPr14 were expressed at near saturating levels, the differences in the rates of uptake are likely to be due to differential interactions with the IIA proteins. However, these interactions could influence the conformations of any of the constituents of an Enzyme II complex and thereby influence the V_{max} of the coupled phosphoryl transfer and transport reactions. Because the differential results obtained with HPr versus CPr14 on mannose/glucosamine/fructose growth and transport are not likely to be due to a differential interaction with Enzyme I, it follows that phosphoryl transfer from HPr to IIA^{Man} must be a rate-limiting step. In this respect, it is interesting to note that sugar transport can be uncoupled from sugar phosphorylation by various mechanisms (41, 42). *In vitro* sugar phosphorylation assays using variable amounts of purified HPr or chimera, saturating amounts of Enzyme I, and limiting amounts of Enzyme II proteins should prove illuminating.

An unexpected finding resulted from growth studies with fructose (Fig. 3 and Table 1) where CPr14 vastly outperformed HPr. Fructose was taken up by the Man EII complex, but the activity of this enzyme for fructose is low (13). We hypothesize that when a sugar appears in the cytoplasm slowly, phosphatases may have more time to hydrolyze a larger fraction of the cytoplasmic sugar phosphate than when the sugar accumulates more rapidly. Thus, we propose a mechanism involving competition for the sugar phosphate substrate by the glycolytic process and intracellular phosphatases.

CPr6, with only 6 of the N-terminal residue changes, was able to support growth relatively well in media containing any one of the several PTS sugars tested (Fig. 4). These few N-terminal mutations in the *npr* gene must have allowed it to fit into the active site of several IIAs and catalyze phosphoryl transfer. However, although these N-terminal residues appear to be critical, they proved not to be sufficient for growth in mannitol, glucitol, or galactitol media. Interestingly, these sugars are all exclusive substrates of their respective Enzyme IIs and are not capable of being transported via IIA^{Man}. Thus, it appears that these 6 residue changes to NPr are critical for optimal interaction with IIA^{Man}, but they are not sufficient for interaction with the polyol IIAs of the GFL and AG families. It is interesting to note that because these 6 N-terminal residues surround the phosphorylation site in both NPr and HPr, they probably affect catalytic function as well as affinities for their respective Enzyme I and IIA partner proteins.

The presence of selective IIA-HPr function in CPr6 and the strong performance of CPr14 with IIA^{Man} suggest that some C-terminal NPr residues might interact more favorably with

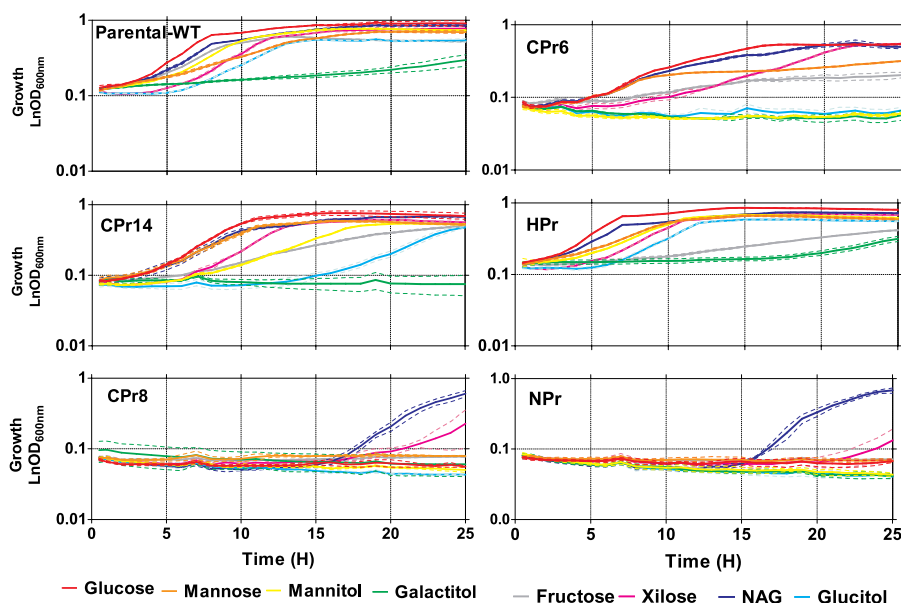


FIGURE 4. Growth of 2Δ with HPr, NPr, CPr14, CPr8, or CPr6 expressed in pZE12. Liquid M9 minimal medium was used with eight different carbon sources at 0.1%, 37 °C. Additionally, 0.2 mM IPTG was uniformly present. The dotted lines indicate S.D. OD, optical density.

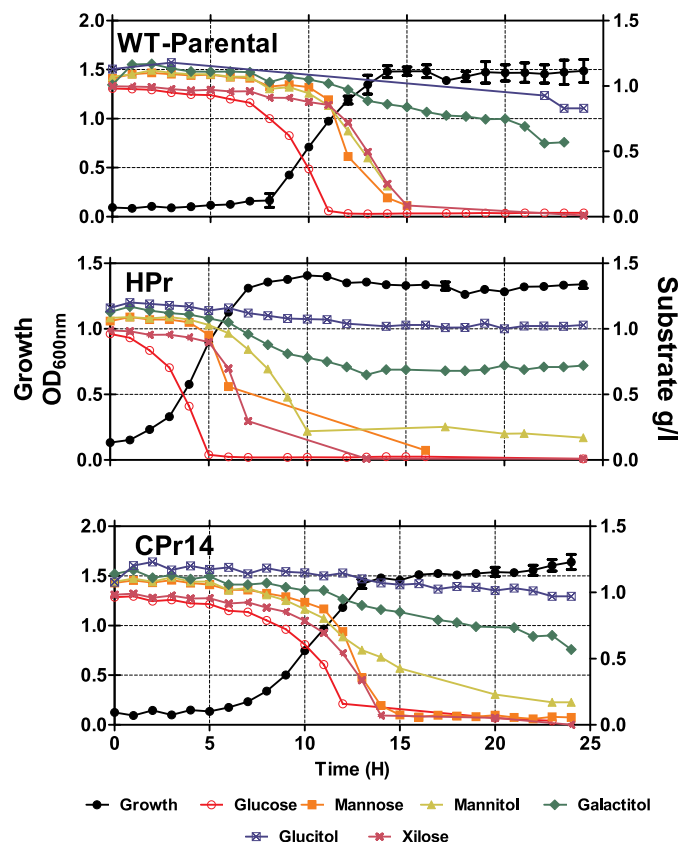


FIGURE 5. Growth and consumption of a mixture of PTS sugars by 2Δ with HPr, NPr, and CPr14. The parental BW25113 (WT) strain is shown for comparative purposes. All strains were grown in triplicate using M9 minimal medium with a mixture of six different sugars as carbon sources (0.1%; 0.2 mM IPTG at 37 °C). OD, optical density.

IIA^{Man} than those of HPr. A possible explanation for this is that HPr may be optimized for phosphoryl transfer to the various IIA proteins *on average* but not for any one protein in particular. Assuming this to be true, our protein engineering therefore

produced a higher performance phosphocarrier protein than HPr, specifically when the phosphoryl acceptor was IIA^{Man}. This possibility had never previously been considered by us or other researchers in the PTS field. The results presented here thus suggest that wild type HPr may not be optimal for phosphoryl transfer to at least several of the IIA proteins.

We have shown that with just a few substitutions, it is possible to convert NPr into a functional HPr. The fact that a mere six point mutations (possibly fewer) in NPr bridge the difference in function between these two proteins highlights the ease with which protein evolution can occur. Computer-assisted analyses shed some light on the possible interactions among the NPr mutants and the targets of HPr. An in-depth understanding of these interactions, however, will require structural studies of the chimeric proteins by NMR and/or x-ray crystallography.

It will be interesting to examine three possible new activities for CPrs. First, potential NPr activity of CPrs should be examined. Due to the subtlety of the *in vivo* NPr mutant phenotype, an *in vitro* NPr activity assay may have to be developed. This might be possible using a phosphorylation assay with purified NPr mutants using IIA^{Ntr} as the substrate. Phosphorylation might also be measured using TrkA, a potassium receptor that binds to IIA^{Ntr} but not to phosphorylated IIA^{Ntr} (43). If CPr has NPr activity, we would have created a dual function protein, a potential snapshot of the protein as an evolutionary intermediate. Second, it should be investigated whether these CPr variants are able to allosterically activate the enzyme glycogen phosphorylase, resulting in the release of individual glucose units akin to HPr in *E. coli* (44, 45). Third, as HPr participates in the co-regulation of expression of the *bglG* operon through phosphorylation of a transcriptional anti-terminator (46), the possibility of some CPr variants to perform the same function should be examined.

Finally, we envisage that the development of NPr mutants able to replace HPr in the transport of PTS sugars may have

Chimeric NPr Protein

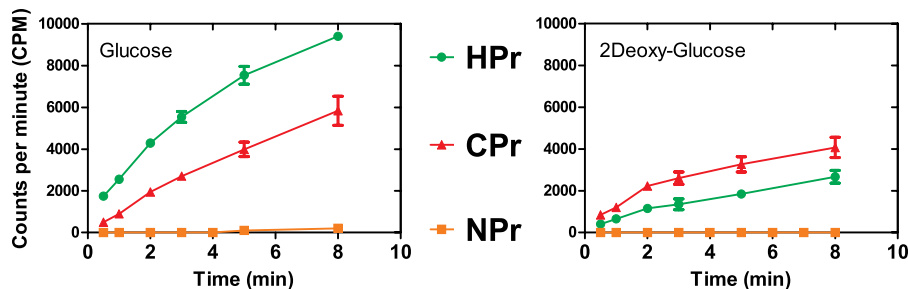


FIGURE 6. Uptake of 2-deoxy-D-[^{14}C]glucose by 2 Δ -HPr and 2 Δ -CPr14 cells. The results represent the average of experiments performed in quadruplicate; S.D. values are indicated by error bars.

biotechnological applications, for example, the simultaneous utilization of mixed sources of PTS and non-PTS sugars or the selective and efficient utilization of specific PTS sugars, whereas leaving others underutilized. Thus, strains expressing different mutant CPrs, each specific for a particular EII, might allow the selective removal/enrichment of specific sugars, a process that could facilitate the production of some sugars for biotechnological purposes as well as the removal of other sugars for bioremediation purposes. It is interesting that nature may have had the same idea; several uncharacterized *E. coli* PTS EII complexes (e.g. Frw and Fry; Ref. 5) have their own EIs and HPrs. The characterization of these self-contained PTS complexes will be relevant to the present studies.

Acknowledgments—We thank Dr. Guillermo Gosset (Instituto de Biotecnología) for advice with planning the sugar preference consumption experiment. We also thank M.Sc. Georgina Hernandez Chavez (Instituto de Biotecnología) for the HPLC assays.

REFERENCES

- Barabote, R. D., and Saier, M. H., Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 608–634
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 543–594
- Pflüger-Grau, K., and Görke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol.* **18**, 205–214
- Rabus, R., Jack, D. L., Kelly, D. J., and Saier, M. H., Jr. (1999) TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology* **145**, 3431–3445
- Tchieu, J. H., Norris, V., Edwards, J. S., and Saier, M. H., Jr. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 329–346
- Saier, M. H., Jr., Tran, C. V., and Barabote, R. D. (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* **34**, D181–D186
- Saier, M. H., Jr., Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G., and Elkan, C. (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res.* **37**, D274–278
- Saier, M. H., Hvorup, R. N., and Barabote, R. D. (2005) Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 220–224
- Bächler, C., Schneider, P., Bähler, P., Lustig, A., and Erni, B. (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J.* **24**, 283–293
- Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L. F., Baumann, U., and Erni, B. (2001) The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *EMBO J.* **20**, 2480–2486
- Nguyen, T. X., Yen, M. R., Barabote, R. D., and Saier, M. H., Jr. (2006) Topological predictions for integral membrane permeases of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 345–360
- Hvorup, R. N., Winnen, B., Chang, A. B., Jiang, Y., Zhou, X. F., and Saier, M. H., Jr. (2003) The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **270**, 799–813
- Rephaeli, A. W., and Saier, M. H., Jr. (1980) Substrate specificity and kinetic characterization of sugar uptake and phosphorylation, catalyzed by the mannose Enzyme II of the phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **255**, 8585–8591
- Thompson, J., and Chassy, B. M. (1985) Intracellular phosphorylation of glucose analogs via the phosphoenolpyruvate: mannose-phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **162**, 224–234
- Lee, C. R., Koo, B. M., Cho, S. H., Kim, Y. J., Yoon, M. J., Peterkofsky, A., and Seok, Y. J. (2005) Requirement of the dephospho-form of Enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol. Microbiol.* **58**, 334–344
- Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., Jr., and Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*: Enzyme IIA^{Ntr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *era*^{ts} mutant. *J. Biol. Chem.* **270**, 4822–4839
- Zimmer, B., Hillmann, A., and Görke, B. (2008) Requirements for the phosphorylation of the *Escherichia coli* EIIA^{Ntr} protein *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**, 96–102
- Kim, H. J., Lee, C. R., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y. J. (2011) Dephosphorylated NPr of the nitrogen PTS regulates lipid A biosynthesis by direct interaction with LpxD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 556–561
- Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K., and Görke, B. (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **72**, 978–994
- Bahr, T., Lüttmann, D., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2011) Insight into bacterial phosphotransferase system-mediated signaling by interspecies transplantation of a transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* **193**, 2013–2026
- Cases, I., Velázquez, F., and de Lorenzo, V. (2001) Role of *ptsO* in carbon-mediated inhibition of the *Pu* promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid. *J. Bacteriol.* **183**, 5128–5133
- Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Mazé, A., Deutscher, J., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2010) Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One* **5**, e12679
- Houot, L., Chang, S., Pickering, B. S., Absalon, C., and Watnick, P. I. (2010) The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J. Bacteriol.* **192**, 3055–3067
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997) 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.* **25**, 1203–1210
- Chung, Y. J., and Saier, M. H., Jr. (2002) Overexpression of the *Escherichia coli* *sugE* gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammo-

- nium compounds. *J. Bacteriol.* **184**, 2543–2545
26. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130
 27. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645
 28. Feldheim, D. A., Chin, A. M., Nierva, C. T., Feucht, B. U., Cao, Y. W., Xu, Y. F., Sutrina, S. L., and Saier, M. H., Jr. (1990) Physiological consequences of the complete loss of phosphoryl-transfer proteins HPr and FPr of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and analysis of fructose (*fru*) operon expression in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 5459–5469
 29. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., and Sali, A. (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 2:Unit 2.9
 30. Shen, M. Y., and Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* **15**, 2507–2524
 31. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723
 32. Ritchie, D. W., and Venkatraman, V. (2010) Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors. *Bioinformatics* **26**, 2398–2405
 33. Li, X., Peterkofsky, A., and Wang, G. (2008) Solution structure of NPR, a bacterial signal-transducing protein that controls the phosphorylation state of the potassium transporter-regulating protein IIA^{Ntr}. *Amino Acids* **35**, 531–539
 34. Pieper, U., Eswar, N., Webb, B. M., Eramian, D., Kelly, L., Barkan, D. T., Carter, H., Mankoo, P., Karchin, R., Marti-Renom, M. A., Davis, F. P., and Sali, A. (2009) MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D347–D354
 35. Sutrina, S. L., Alleyne, L., Hoyte, K., and Blenman, M. (2002) Effect of replacing the general energy-coupling proteins of the PEP:sugar phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium* with their fructose-inducible counterparts on utilization of the PTS sugar glucitol. *Microbiology* **148**, 3857–3864
 36. Lengeler, J. (1975) Mutations affecting transport of the hexitols D-mannitol, D-glucitol, and galactitol in *Escherichia coli* K-12: isolation and mapping. *J. Bacteriol.* **124**, 26–38
 37. Naula, C. M., Logan, F. J., Wong, P. E., Barrett, M. P., and Burchmore, R. J. (2010) A glucose transporter can mediate ribose uptake: definition of residues that confer substrate specificity in a sugar transporter. *J. Biol. Chem.* **285**, 29721–29728
 38. Wang, G., Louis, J. M., Sondej, M., Seok, Y. J., Peterkofsky, A., and Clore, G. M. (2000) 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.* **19**, 5635–5649
 39. Peterkofsky, A., Wang, G., Garrett, D. S., Lee, B. R., Seok, Y. J., and Clore, G. M. (2001) Three-dimensional structures of protein-protein complexes in the *E. coli* PTS. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 347–354
 40. Cornilescu, G., Lee, B. R., Cornilescu, C. C., Wang, G., Peterkofsky, A., and Clore, G. M. (2002) 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.* **277**, 42289–42298
 41. Aboulwafa, M., and Saier, M. H., Jr. (2002) Dependency of sugar transport and phosphorylation by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system on membranous phosphatidyl glycerol in *Escherichia coli*: studies with a *pgsA* mutant lacking phosphatidyl glycerophosphate synthase. *Res. Microbiol.* **153**, 667–677
 42. Aboulwafa, M., and Saier, M. H., Jr. (2004) Characterization of soluble enzyme II complexes of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **186**, 8453–8462
 43. Lee, C. R., Cho, S. H., Yoon, M. J., Peterkofsky, A., and Seok, Y. J. (2007) *Escherichia coli* Enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4124–4129
 44. Seok, Y. J., Sondej, M., Badawi, P., Lewis, M. S., Briggs, M. C., Jaffe, H., and Peterkofsky, A. (1997) High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J. Biol. Chem.* **272**, 26511–26521
 45. Alonso-Casajús, N., Dauvillée, D., Viale, A. M., Muñoz, F. J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M. T., Eydallin, G., Ball, S., and Pozueta-Romero, J. (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 5266–5272
 46. Görke, B., and Rak, B. (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* **18**, 3370–3379