

00551
11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA UNAM

DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

TITULO DE LA TESIS:

**FRAGMENTACION DEL GENE DE LA ENZIMA FOSFORRIBOSIL
ANTRANILATO ISOMERASA (PRAI) DE *E. coli* Y REGENERACION
DE SU ACTIVIDAD MEDIANTE COMPLEMENTACION DE
FRAGMENTOS**

288286

PRESENTADA POR:

IBQ. **PATRICIA FUENTES GALLEGO**

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

REALIZADA EN EL LABORATORIO DEL DR. XAVIER SOBERON

EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CUERNAVACA MORELOS

TUTOR:

DRA. GLORIA SAAB RINCON

ENERO 2001.



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

OF/PMDCB/IBT/030/2000

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
P R E S E N T E

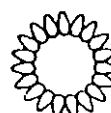
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del día 24 de octubre de 2000 se aprobó el siguiente jurado de Examen de Grado de Maestra en Ciencias, de la IBQ. PATRICIA FUENTES GALLEGO, con número de cuenta 98861527 con la tesis titulada. "Fragmentación del gene de la enzima fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) de E. coli y regeneración de su actividad mediante complementación de fragmentos " dirigida por la Dra. Gloria Saab Rincón.

PRESIDENTE	Dr. Lorenzo Segovia
SECRETARIO	Dra. Gloria Saab Rincón
VOCAL	Dra. Gabriel Moreno Hagelsieb
SUPLENTE	Dr. Baltazar Becerril Luján
SUPLENTE	Dra. Barbara Selisko

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., a 7 de diciembre de 2000


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ S
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Roberto Stock, Dr. Jean Louis Charli, Dr. Xavier Soberón y Dra. Gloria Saab, por sus valiosas sugerencias y comentarios.

A la Dra. Barbara Selisko por su asesoría acerca del sistema plásmido/fagémido.

Al Dr. Baltazar Becerril, por su tiempo y ayuda en el tema de fagémidos, fagos e infecciones.

A la Dra. Laura Camarena del Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M. por la asesoría brindada en el tema de conjugaciones bacterianas.

A los miembros del jurado conformado por el Dr. Baltazar Becerril, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Gabriel Moreno, Dra. Barbara Selisko y Dra. Gloria Saab, por la revisión de esta tesis.

A Filiberto Sánchez, Juanita Ferrel, Eugenio López, Paul Gaytán, Maricela Olvera, René Hernández por el apoyo técnico para realizar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio con quienes conviví por 3 años a veces hasta 10 horas diarias.

A CONACyT por la beca otorgada durante 15 meses para mis estudios de maestría.

Al Dr. Xavier Soberón por permitirme formar parte de su grupo y confiarme este proyecto

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Gloria Saab Rincón y la asesoría del Dr. Xavier Soberón Mainero, quien aportó la idea original de este proyecto.

A. INDICE GENERAL

B. Indice de figura	iii
C. Indice de tablas	iv
D. Nomenclatura y abreviaciones	v
ABSTRACT	1
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2.GENERALIDADES	
2.1 Ingeniería de proteínas	4
2.2 Evolución dirigida	5
2.3 Migración catalítica	6
2.4 Fagos y variabilidad	7
2.5 Complementación de fragmentos	8
2.6 Barriles TIM	9
2.6.1 La enzima fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI)	10
2.7 Antecedentes de estudios con barriles TIM	11
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivos Particulares	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Materiales	14
4.1.1 Enzima	14
4.1.2 Vector	14
4.1.3 Ceba	14
4.1.4 Sistema de Selección	14
4.1.5 Medios de Cultivo	14
4.2 Metodologías aplicadas en la ETAPA I	15
4.2.1 Obtención de DNA plasmídico	15
4.2.2 Secuenciación del gene de PRAI	15
4.2.3 Diseño de oligonucleótidos para obtención de las tres construcciones	16
4.2.4 Obtención de las 3 construcciones mediante PCR	18
4.2.5 Análisis y preparación de DNA por enzimas de restricción para clonación	19
4.2.6 Ligación de productos de PCR con el vector pUC18	20
4.2.7 Preparación de células electrocompetentes	20
4.2.8 Electroporación de las construcciones y obtención de mutantes	21

4.2.9 Cinéticas de Crecimiento	22
4.2.10 Clonación de $\beta 5\alpha 8$ en fagémido pM846	22
4.2.11 Clonación de $\beta 1\alpha 4$ en plásmido pbgs18	23
4.2.12 Electroporación de pbgs- $\beta 1\alpha 4$ en JMB9 y obtención de células electrocompetentes	23
4.2.13 Prueba de complementación: Electroporación de pM846- $\beta 5\alpha 8$ en $\beta 1\alpha 4$ -JMB9	24
4.2.14 Pruebas de complementación por infección	24
4.2.15 Pruebas iniciales de infección a la cepa JMB9	25
4.2.16 Conjugación bacteriana	25
4.2.17 Selección del genotipo	26
4.2.18 Prueba de la cepa JMB9 F' por infección	27
4.2.19 Electroporación de la primera mitad de PRAI en la cepa F'	27
4.2.20 Purificación de fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$	27
4.2.21 Obtención de DNA de cadena sencilla del fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$	28
4.2.22 Prueba de complementación: Infección con fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$	28

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ingeniería de proteínas para obtener las complementaciones policistrónicas con fragmentos separados entre $\alpha 2/\beta 3$, $\alpha 4/\beta 5$ y $\alpha 6/\beta 7$	29
5.2 Complementación de la función de PRAI a partir de los fragmentos	31
5.3 Cinéticas de crecimiento de la cepa JMB9 $\Delta trpF$ complementada con las diferentes construcciones	34
5.4 Expresión independiente de los fragmentos capaces de complementar actividad de PRAI	35
5.5 Cinéticas de crecimiento de la cepa JMB9 $\Delta trpF$ complementada con los fragmentos de PRAI clonados independientemente en 2 vectores	38
5.6 Prueba de complementación mediante infección	39
5.6.1 Resultados de la prueba inicial de infección	40
5.6.2 Conjugación bacteriana y selección de genotipo	40
5.6.3 Prueba de infección de la cepa F'	42
5.6.4 Pruebas de recuperación de la actividad	42
5.7 Discusión	43

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones	46
6.2 Perspectivas	46

7. BIBLIOGRAFÍA

B. INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de una complementación de fragmentos	9
Fig. 2. Esquema de reacción de la PRAI	10
Fig. 3. Estructura tridimensional de la PRAI de <i>E. coli</i> monomérica	11
Fig. 4. Esquema de obtención del gene de PRAI con inserto	18
Fig. 5. Secuencia del gene <i>trpF</i> monomérico de <i>E. coli</i>	29
Fig. 6. Megaprimers obtenidos mediante PCR para obtener fragmentos de PRAI con inserto	29
Fig. 7. Alineamiento de secuencias de PRAI silvestre y la construcción $\alpha 4\beta 5$ obtenida	33
Fig. 8. Cinéticas de crecimiento de construcciones policistrónicas en medio LB	34
Fig. 9. Cinéticas de crecimiento de construcciones policistrónicas en medio VB	35
Fig. 10. Geles con productos de PCR: $\beta 1\alpha 4$ en pbgs18 y $\beta 5\alpha 8$ en pM846	36
Fig. 11. Crecimiento de dobles transformantes y controles cajas LB	37
Fig. 12. Crecimiento de dobles transformantes y control PRAI en cajas VB	37
Fig. 13. Cinéticas de crecimiento en medio LB	38
Fig. 14. Cinéticas de crecimiento en medio VB	38
Fig. 15. Nueve colonias conjugantes en medio LB tc	41
Fig. 16. Nueve colonias conjugantes crecidas en medio VB tc	41
Fig. 17. Placas de lisis de células JMB9 F' infectadas con fago R408	42

C. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos suplementados al medio Vogel –Bonner (VB)	15
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados	17
Tabla 3. Componentes de la reacción PCR	19
Tabla 4. Condiciones de la reacción PCR para $\alpha 2/\beta 3$ y $\alpha 6/\beta 7$	19
Tabla 5. Resultados de la prueba inicial de infección	40
Tabla 6. Criterios de selección de genotipo	42

D. NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

amp = ampicilina

tc = tetraciclina

km = kanamicina

LB = medio Luria-Bertani (medio rico)

VB = medio Vogel-Bonner (carente de triptofano)

PRAI = enzima fosforribosil antranilato isomerasa

IGPS = enzima indol glicerol fosfato sintasa

$\alpha 2/\beta 3$ = PRAI policistrónica interrumpida entre alfa-2 y beta-3 clonada en pUC18

$\alpha 4/\beta 5$ = PRAI policistrónica interrumpida entre alfa-4 y beta-5 clonada en pUC18

$\alpha 6/\beta 7$ = PRAI policistrónica interrumpida entre alfa-6 y beta-7 clonada en pUC18

$\beta 1\alpha 4/\beta 5\alpha 8$ = fragmentos de PRAI separados en dos vectores distintos donde $\beta 1\alpha 4$ es el primer fragmento abarcando desde beta-1 hasta alfa hélice-4 y el segundo fragmento $\beta 5\alpha 8$ abarca desde beta-5 hasta alfa hélice-8.

pM846 = fagémido empleado en etapa II

pbgs18 = plásmido empleado en etapa II

pM846- $\beta 5\alpha 8$ = fagémido pM846 conteniendo la segunda mitad de PRAI

pbgs- $\beta 1\alpha 4$ = plásmido pbgs18 conteniendo la primera mitad de PRAI

JMB9 $\Delta trpF$ = cepa de *E. coli* usada como sistema de selección.

$\beta 1\alpha 4$ -**JMB9** = el plásmido pbgs18 conteniendo el fragmento $\beta 1\alpha 4$ de PRAI, en células
JMB9 $\Delta trpF$

JMB9 F' = cepa JMB9 $\Delta trpF$ del sistema de selección que contiene el episoma F' .

$\beta 1\alpha 4$ -**F'** = el plásmido pbgs18 con el fragmento clonado $\beta 1\alpha 4$ de PRAI, en células
JMB9 F'

p.b. = pares de base

Kb. = kilobases

nm = nanómetros

Trp = triptofano

ABSTRACT

The gene of the cytoplasmic TIM barrel enzyme, phosphoribosylanthranilate isomerase (PRAI) from *E. coli* was interrupted at three independent positions corresponding to the loops between α -helix 2 and β -strand 3, α -helix 4 and β -strand 5, and also between α -helix 6 and β -strand 7. The three constructions were expressed as polycistrons in a $\Delta trpF$ *E. coli* strain, where the construction involving the fragments $\beta 1$ - $\alpha 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 8$ presented *in vivo* fragment complementation. Each one of the complemented fragments was manipulated separately and double transformed in a plasmid/phagemid system, presenting complementation of both separated fragments and giving rise to a functional PRAI enzyme. These constructions will be starting points to generate numerous repertoires of variants, by means of recombination systems of phage and induced recombination, for protein directed evolution.

RESUMEN

Se fragmentó, en tres puntos independientes, el gene de la enzima citoplasmática fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) de *E. coli*, la cual tiene un plegamiento de barril TIM. Los puntos de corte corresponden en la estructura a las asas entre la α -hélice 2 y la hebra $\beta 3$, α -hélice 4 y hebra $\beta 5$ así como α -hélice 6 y hebra- $\beta 7$. La expresión policistrónica de cada una de las 3 construcciones en una cepa $\Delta trpF$ de *E. coli* dio como resultado la complementación *in vivo* de la función de PRAI con los fragmentos de $\beta 1$ - $\alpha 4$ y $\beta 5$ - $\alpha 8$. Posteriormente, cada uno de estos dos fragmentos complementantes fueron manipulados por separado y doble transformados en un sistema plásmido/fagémido, presentándose una vez más la complementación *in vivo* de ambos fragmentos separados para dar la función de PRAI. Estas construcciones serán puntos de partida para generar repertorios más numerosos de variantes mediante sistemas de recombinación por fago y recombinación inducida, con la finalidad de hacer evolución dirigida de proteínas.

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son los bloques constructores de la vida, ya que estas macromoléculas son el centro de acción de los procesos biológicos llevados a cabo por todo ser vivo. Pueden actuar como reguladores de las reacciones, directamente como catalizadores e indirectamente como mensajeros químicos y receptores. También participan en el transporte y almacenamiento de sustancias biológicamente importantes, tales como oxígeno, iones, glucosa, lípidos y muchas otras moléculas.

La descripción estructural de las proteínas consta de varios niveles de organización que son: la estructura primaria, que es la secuencia de aminoácidos de su cadena polipeptídica; la estructura secundaria compuesta de elementos representados por conformaciones regulares tales como estructuras de hélice, estructuras beta y estructuras no repetitivas (asas); la estructura supersecundaria se refiere al agrupamiento de elementos estructurales secundarios y a los ciertos patrones preferidos de plegamiento que adoptan estas estructuras; la estructura terciaria es el arreglo tridimensional de un péptido completo; y la estructura cuaternaria se refiere al arreglo espacial de las subunidades que pueda tener una proteína.

Por la importancia que tienen en todo ser vivo, las proteínas siempre han sido objeto de estudio. El tener un conocimiento más a fondo acerca de las diferentes estructuras y propiedades de las proteínas permite también el conocer más acerca de los mecanismos y/o funciones de las mismas así como de las formas en que se pueden modificar y en base a todo lo anterior, mejorarlas. Para esto se cuenta con la ingeniería de proteínas, tecnología usada para el diseño y construcción de proteínas (Blundell et al. 1989) mediante la cual, por ejemplo, se pueden modificar las proteínas naturales para fines industriales, clínicos o agrícolas.

La gran cantidad de estructuras de proteínas que se conocen actualmente sumado al enorme número de secuencias proteicas determinadas, han dado un nuevo auge al estudio de la evolución de la estructura y función de las proteínas. Estos análisis se han visto enriquecidos por las aportaciones de nuevas técnicas de biología molecular, las cuales permiten el diseño y la manipulación de secuencias hasta la obtención de actividades enzimáticas mejoradas.

Se ha encontrado que proteínas con actividades enzimáticas totalmente diferentes comparten un mismo armazón molecular. El ejemplo mejor conocido son las proteínas con estructura de barril TIM o $(\beta/\alpha)_8$. Aproximadamente un 10% de las proteínas pertenecen a esta familia estructural, abarcando una diversidad de actividades enzimáticas. Tal diversidad de función ha hecho de éstas un blanco para la ingeniería de proteínas (Farber & Reardon, 1995; Houbrechts, et al., 1995). Una proteína perteneciente a esta clase, la fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI), es a la que nos enfocaremos en este trabajo.

2. GENERALIDADES

2.1 Ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas es el estudio que involucra la modificación y diseño de cambios en las proteínas. Aunque este campo es joven, se ha llegado a desarrollar a tal nivel donde las macromoléculas se pueden modificar para llevar a cabo ciertas funciones preestablecidas. Sus aplicaciones tienen potencial ilimitado para dar avances en la ciencia, medicina e industria y van desde la prueba de teorías de plegamiento de proteínas hasta la modificación de enzimas capaces de sintetizar drogas de primera y segunda generación usadas para aplicaciones terapéuticas humanas o industriales (Cleland *et al.*, 1995).

La exitosa ingeniería de proteínas requiere de un entendimiento de los conceptos básicos, desde expresión hasta composición. Ahora bien, antes de modificar a la proteína de interés, se deben determinar las características de la proteína silvestre y saber el papel funcional de sus componentes. Una vez identificados los sitios funcionales, se deben definir los estudios de mutagénesis a realizar, elegir el huésped para su adecuada expresión, y empezar a evaluar las alteraciones en estos sitios, las cuales darán como resultado las nuevas propiedades deseadas (Cleland *et al.*, 1995).

Los estudios de mutagénesis pueden estar enfocados en el área de modificación de la proteína para conferirle atributos deseados. Aquí la alteración más común incluye mutaciones que confieren mayor especificidad, mayor afinidad de unión al sustrato, mayores velocidades de reacción, estabilidad, entre otros, siendo para ello necesario un conocimiento amplio de la estructura de la proteína de interés.

La mayoría de la ingeniería de proteínas involucra técnicas de DNA recombinante, tales como mutagénesis al azar o sitio dirigida, con agentes mutagénicos (rayos X, UV, químicos) o auxiliada con otros métodos como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta última técnica tiene gran aplicación actual, tanto en la amplificación de genes para la secuenciación de ácidos nucleicos, como en todo tipo de clonaciones moleculares y análisis de material genético. Así, las secuencias de DNA pueden ser modificadas genéticamente para codificar proteínas rediseñadas con ciertas inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos de DNA (Cleland *et al.*, 1995).

En el análisis de estructura-función de una proteína, algunas metodologías empleadas son la sustitución de aminoácidos cargados por alaninas, que se lleva a cabo para ensayar el papel de las interacciones de las cargas en la función y la estabilización de la proteína (Cunningham *et al.*, 1989). Otras son las permutaciones circulares, lo cual consiste en modificar al DNA de manera que se exprese una proteína en la que el grupo carboxilo y el amino terminal están ligados covalentemente y se corta en otra posición para dar nuevos extremos terminales (Kirschner *et al.*, 1989; Luger *et al.*, 1989). También existe la complementación de fragmentos que consiste en hacer disecciones de las proteínas en fragmentos más pequeños (Miles *et al.*, 1982; Eder & Kirschner, 1992; Bertolaet & Knowles, 1995). Otro tipo de alteración que se hace es la sustitución de un “*cassette*”, es decir, el sustituir varios residuos adyacentes, con cada mutante conteniendo un grupo diferente de sustituciones (Gustin *et al.*, 1993; Dykxhoorn *et al.*, 1997).

2.2 Evolución dirigida

Para llevar a cabo la modificación de proteínas naturales se requiere un amplio conocimiento de secuencias, estructuras y funciones con el que muchas veces no se cuenta. De allí que en los últimos años la evolución dirigida ha sido utilizada como alternativa para la modificación genética de enzimas sin la necesidad de contar con un conocimiento profundo de la estructura (Arnold & Kuchner, 1997).

Una proteína que está bien adaptada a su función, es decir, una que no está sujeta a un mejoramiento fisiológico significativo, a pesar de todo, sigue evolucionando. La naturaleza azarosa de los procesos de mutación, en su momento, cambian a la proteína de maneras que no afectan significativamente su función (Cleland *et al.*, 1995). Estos cambios se dan a lo largo de millones años. De manera acelerada, la evolución dirigida intenta imitar el proceso evolutivo mediante cambios generados al azar para crear diversidad y luego someterlos a una presión selectiva. La evolución dirigida comienza con la creación de un banco de genes mutados, aplicando ciclos repetitivos de mutagénesis y selección, involucrando pocas o muchas generaciones, dependiendo de la meta a alcanzar y del método de selección con que se cuente. Generalmente se expresa la proteína en un huésped microbiano y se utiliza una selección fuerte y versátil de las propiedades deseadas (Arnold & Kuchner, 1997). En los casos en que se tiene que recurrir al tamizado *in vitro* (*screening*)

entre un gran número de mutantes, el análisis se vuelve laborioso e incluso imposible a menos que se cuente con equipo robotizado que permita el análisis de un gran número de muestras. También, es indispensable que la actividad de la enzima produzca un cambio visible (Gerlt, 2000).

2.3 Migración catalítica

Una migración catalítica se refiere al proceso de modificar una proteína para dar una nueva actividad enzimática, conservando su estructura original. Actualmente, el trabajo de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón está enfocado hacia la evolución dirigida de proteínas aplicada a la migración de actividades catalíticas sobre la estructura de barriles (β/α)₈, también llamados barriles TIM.

Tomando en cuenta que hay todo un universo de secuencias que pueden existir (espacio de secuencia), es importante generar la mayor cantidad posible de variantes para analizar una porción mayor del espacio de secuencia y aumentar la probabilidad de encontrar una variante que haya ganado la propiedad que se busca. La mutagénesis combinatoria de proteínas es capaz de generar un gran repertorio de secuencias, mismo que sólo podrá ser aprovechado mediante técnicas que permitan el análisis de un mayor número de proteínas variantes.

Actualmente han surgido grandes cambios en las metodologías disponibles para obtener proteínas con nuevas propiedades. La recombinación puede acelerar el mejoramiento de una función mediante la acumulación de mutaciones benéficas (Volkov *et al.*, 1999). El proceso llamado barajeo de DNA (*DNA shuffling*) es una de las técnicas usadas para llevar a cabo evolución dirigida. Consiste en una fragmentación al azar de un conjunto de variantes de un gene o genes de interés previamente seleccionados y reensamblaje de los mismos mediante PCR, generando una mayor diversidad al combinar las mutaciones útiles de genes individuales que lleven a la evolución acelerada de una función deseada (Stemmer, 1994; Cramer *et al.*, 1998).

Como ejemplos recientes de evolución de actividad catalítica tenemos primero el trabajo de Altamirano y colaboradores (2000), quienes lograron migrar la actividad catalítica de la enzima indol glicerol fosfato sintasa hacia la fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI), ambas de *E. coli* (Altamirano *et al.*, 2000).

Basados en los antecedentes de que estas enzimas son consecutivas en la ruta biosintética del triptofano y que ambas poseen la estructura de barril TIM con un 22% de identidad entre sus secuencias, usaron una estrategia combinada de diseño racional y mutación *in vitro*. Así se enfocaron en la mutagénesis de tres regiones de la enzima IGPS, que fueron el extremo amino terminal, el asa entre la hoja $\beta 1$ y $\alpha 1$ y el asa entre la hoja $\beta 6$ y $\alpha 6$. Luego emplearon la recombinación y selección *in vivo* para la actividad de PRAI, esto último basado en una cepa de *E. coli* deficiente del gene de PRAI e incapaz de crecer en ausencia triptofano, método que ofreció una identificación fácil y rápida de las clonas con la actividad de interés.

El otro trabajo reciente de evolución dirigida es el de Sterner y colaboradores (2000), quienes generaron variantes de la enzima N'-[5'-(fosforribosil)-formimino]-5-amino imidazol-4-carboxamida ribonucleótido isomerasa (HisA) de *T. maritima* que catalizan la reacción de la enzima PRAI tanto *in vivo* como *in vitro* incluyendo algunas variantes que aún retienen actividad de His A. Esto se logró aplicando mutagénesis al azar y selección *in vivo* con una cepa $\Delta trpF$, carente del gene de PRAI (Jürgens *et al.*, 2000).

A pesar de la poca similaridad entre sus secuencias (10%), ambas enzimas pertenecen a la familia estructural de barriles TIM y además catalizan un rearrreglo de *Amadori*, lo cual consiste en la isomerización de una aminoaldosa a una aminocetosa. Una variante de la His A conteniendo un solo cambio en un residuo catalítico (Asp127Val) pudo conferirle actividad de PRAI. Todo esto sugiere que han evolucionado de una enzima ancestral común (Jürgens *et al.*, 2000).

2.4 Fagos y variabilidad

El tamaño de las bibliotecas generadas, en su mayoría se ve limitado por la eficiencia de transformación de los genes que se encuentran en plásmidos. En bacterias, la eficiencia de transformación de plásmidos normalmente permite obtener alrededor de 10^8 mutantes por μg de DNA transformado, y en el caso de material genético proveniente de ligación permite obtener 10^6 variantes por μg de DNA transformado. El uso de fagos es una alternativa mucho más eficiente para introducir material genético en las bacterias. Normalmente se obtienen eficiencias de 10^{10-12} variantes por infección (Geoffroy *et al.*,

1994), pudiendo explorar así una mayor porción del espacio de secuencia que mediante una transformación bacteriana.

Cabe señalar que la aplicación de métodos con fagos implica el trabajar con cepas F^+ para llevar a cabo las infecciones. Estas células contienen el plásmido F que es portador de los genes que sintetizan el pili, estructura filamentosa de la superficie celular usada como sitio de adsorción para fagos (Miller, 1972). El plásmido F puede ser transferido mediante una conjugación bacteriana, a partir de una célula que lo contiene (donadora F^+) a una que no lo contiene (receptora F^-).

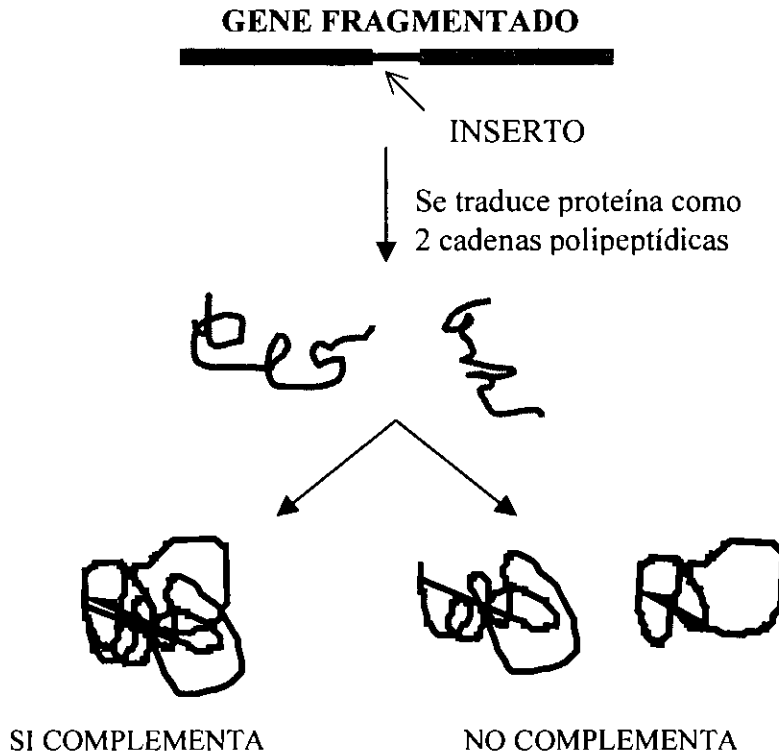
En un momento dado, en el presente proyecto se pretende echar mano de alguno de estos sistemas de fagos para la obtención de variantes de genes, esto encaminado a la evolución dirigida de proteínas. Lo anterior se llevaría a cabo en base a la proteína obtenida a partir de una metodología aplicada en la ingeniería de proteínas, conocida como complementación de fragmentos.

2.5 Complementación de fragmentos

La combinación de dos fragmentos de una proteína, en la cual se espera que se presente un plegamiento y ensamblaje correcto para restaurar la actividad, ha sido nombrado complementación de fragmentos de proteína. Tal complementación, la cual resulta de una conversión de monómero a heterodímero, es el inverso del proceso evolutivo en el cual las estructuras funcionales o dominios son reclutados y fusionados a nivel genético (Ostermeier *et al.*, 1999).

El estudio de sistemas de complementación de fragmentos da ideas básicas acerca de la estructura y función de una proteína. A la fecha, existen varios trabajos de fragmentos de proteínas que se combinan para generar actividad catalítica. Están los trabajos de Alan Fersht y colaboradores, quienes fragmentaron el inhibidor 2 de la quimotripsina (de Prat Gay & Fersht, 1994), así como el grupo de Benkovic quienes trabajaron en la fragmentación de la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (Ostermeier *et al.*, 1999). También tenemos al grupo de Kirschner, quienes fragmentaron el gene de la enzima PRAI de *S. cerevisiae*, el cual tomamos como antecedente para este trabajo (Kirschner & Eder, 1992).

Figura 1. Esquema de una complementación de fragmentos



2.6 Barriles Tim

Aproximadamente un 10% de las proteínas presentan el tipo de plegamiento llamado barril TIM o barril $(\beta/\alpha)_8$, el cual ocupa el cuarto lugar de plegamientos más comunes presentes en eucariontes y el tercero en bacterias y archaea (Wolf *et. al.*, 1999). Esta estructura consiste de 8 hebras- β paralelas conectadas mediante un segmento no estructurado (asa) a 8 α -hélices que las rodean, tomando forma de un barril. También presenta otras características en común como son el tener el sitio activo en el extremo carboxilo terminal de las hebras β y en el caso de las que unen sustratos fosfatados, tienen un sitio común de unión a fosfato en las asas del carboxilo terminal entre las hebras beta-7 y beta-8 (Jansonius *et al.*, 1991).

En base a estas características, los argumentos sobre la historia evolutiva de la estructura de barril sugieren que estas proteínas se relacionan por evolución divergente, es decir, que provienen de un ancestro común (Farber & Petsko, 1990). Sin embargo, éstas

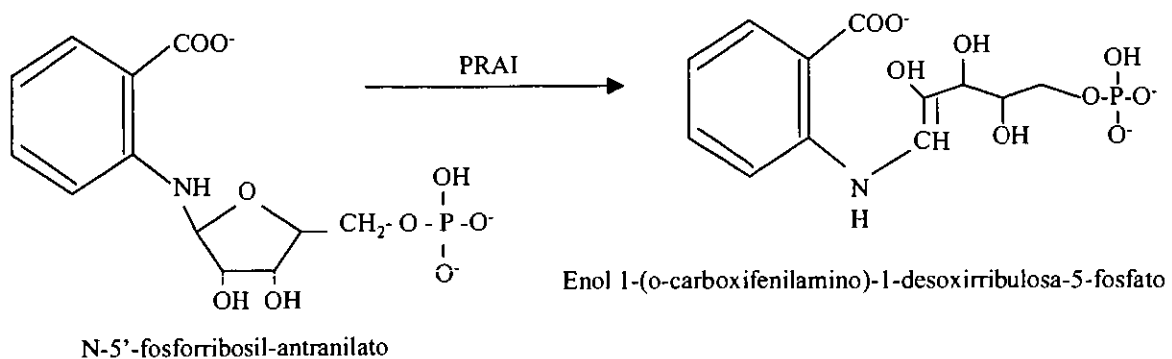
catalizan muy diversos tipos de reacciones, limitando la homología de secuencia entre algunos miembros de la familia. Tomando en cuenta que la estructura tridimensional evoluciona más lentamente que la estructura primaria, la falta de identidad de secuencias puede ser debida a la edad de la enzima ancestral (Farber & Reardon, 1995).

La diversidad de función de estas proteínas ha hecho de ellas un blanco para la ingeniería de proteínas (Farber & Reardon, 1995). Algunos ejemplos de barriles TIM son la enzima triosa fosfato isomerasa, que fue la primera proteína de esta familia cuya estructura cristalina fue determinada, la piruvato cinasa, mandelato racemasa, fosfolipasa C, alfa-amilasa, beta-galactosidasa, indol glicerol fosfato sintasa, fosforribosil antranilato isomerasa, subunidad α de triptofano sintasa, por mencionar algunas.

2.6.1 La enzima fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI)

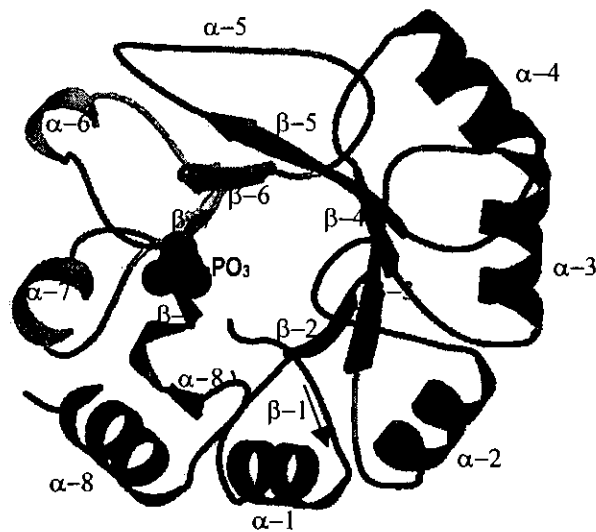
La enzima fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) forma parte de la ruta biosintética del triptofano, donde tres de las cuatro enzimas finales involucradas en este operón pertenecen a la familia de barriles $(\beta/\alpha)_8$. La PRAI, codificada por el gene *trpF*, cataliza el tercer paso en la síntesis de Trp produciendo un rearrreglo de tipo Amadori de N-(5-fosforribosil) -antranilato (PRA) a 1-(o-carboxifenilamino)-1-desoxirribulosa-5-fosfato (CdRP) (Fig. 2).

Figura 2. Esquema de reacción de la enzima PRAI



Según la especie, PRAI puede presentarse en forma monomérica como es el caso en *S. cerevisiae* o dimérica como en *Termotoga maritima*. En el caso de *E. coli* se encuentra fusionada a la Indol-3-glicerol-fosfato sintasa (*trpC*), la enzima consecutiva en el operón del triptofano, ocupando del residuo 256 al 452. Sin embargo los sitios activos de ambas enzimas funcionan independientemente (Priestle *et al.*, 1987). Cabe señalar que estas dos enzimas ya han sido separadas a nivel genético, expresándose como proteínas monofuncionales y activas (Kirschner *et al.*, 1995).

Figura 3. Estructura tridimensional de la PRAI de *E. coli* monomérica



2.7 Antecedentes de estudios de complementación con barriles TIM

Las enzimas de barril (β/α)₈ han sido objeto de varios estudios, entre ellos la complementación de fragmentos. Así tenemos el gene de la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI) de músculo de pollo, que fue cortado (en cortes independientes) en los límites exon/intron e intron/exon. Estos sitios corresponden en la estructura después de la hebra β -6, en medio de la α -hélice 4 y también de la α -hélice 6, los cuales fueron funcionales *in vivo* (Knowles & Bertolaet, 1995).

Por otro lado, para identificar unidades o dominios de plegamiento, se han hecho estudios de complementación de la enzima PRAI de *S. cerevisiae*, la cual complementa *in vitro* al ser cortada entre α -hélice 6 y hebra β 7 (Kirschner & Eder, 1992). Cabe mencionar

que la complementación *in vivo* no permitió el crecimiento de una cepa de *E. coli ΔtrpF*. Estos datos han sido corroborados por estudios posteriores con esta misma enzima (Jasanoff, et al., 1994).

La subunidad α de la enzima triptofano sintasa también fue sujeta a complementación de fragmentos, obtenidos mediante mutagénesis con codones de paro, para dar fragmentos desde 105 hasta 214 residuos (Matthews *et al.*, 1999).

Los trabajos antes mencionados han sido enfocados al entendimiento de la función de unidades de plegamiento y de la estructura de los barriles TIM. En el presente proyecto se pretendió utilizar la complementación de fragmentos como herramienta para la futura obtención de variantes de fragmentos de proteína y posteriormente llevar a cabo la recombinación de un gran número de mutantes mediante técnicas con el uso de fagos para la generación de variabilidad.

Técnicas de este tipo incluyen el despliegue en fagos, el cual tiene gran aplicación en la generación de bibliotecas multicombinatorias de anticuerpos. Como ejemplos, tenemos el sistema de Sodoyer y colaboradores, donde usando el sitio de recombinación del fago lambda y la proteína *Int* recombinasa, se lleva a cabo una asociación física irreversible entre un plásmido que carga la cadena ligera y un fagémido (plásmido que carga el origen de replicación de un bacteriofago filamentoso) que carga la cadena pesada, generando hasta 10^{12} clonas (Geoffroy *et al.*, 1994; Sodoyer *et al.*, 1996). Otro sistema consiste en el empleo de un solo fagémido que lleva a cabo la recombinación y generación de muchas nuevas combinaciones *in vivo*, aprovechando la multiplicidad de infección, mediante los sitios *lox* y la *Cre* recombinasa, arrojando una diversidad de hasta 3×10^{11} (Sblattero & Bradbury, 2000).

Con estos antecedentes y por la gran similitud entre las secuencias de PRAI de *E. coli* y *S. cerevisiae* (28% de identidad de secuencia y 46% de cambios conservativos) (Kirschner & Eder, 1992), se pretende hacer un diseño de fragmentación de la PRAI de *E. coli*, haciendo tres posibles cortes para la complementación de fragmentos dirigida en las asas inferiores entre hebras- β y α -hélices puesto que en las asas superiores están los residuos importantes para la catálisis (Nichols, Winkler *et al.*, 1990). Estos cortes caen a la mitad de las asas entre α -6 y β -7, α -2 y β -3 y α -4 y β -5, correspondiendo a los aminoácidos A303/P304, P350/A351, S398/L399, respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Identificar los sitios donde se puede interrumpir el gene *trp F* para expresar fragmentos que complementen la función de PRAI en una cepa de *E. coli* (JMB9 $r^- m^+ \Delta trpF$) y manipular los fragmentos complementados de tal manera que permitan posteriormente la generación de variabilidad.

3.2 Objetivos Particulares

- ◆ Aplicar ingeniería de proteínas para obtener las complementaciones de fragmentos, separados en una manera bicistrónica de tal forma que los cortes en el gene de PRAI se den a la mitad del asa inferior de la estructura del barril. Estos cortes caen entre la α -hélice 2/hebra- β 3, α -hélice 4/ hebra- β 5 y α -hélice 6/ hebra- β 7.
- ◆ A partir de las complementaciones obtenidas, probar un sistema de expresión por separado de los fragmentos complementados para su manipulación de manera independiente.
- ◆ Probar la complementación de los fragmentos separados en dos vectores mediante la introducción de uno de ellos en la cepa de selección por proceso infeccioso (para ello se necesita que la cepa usada como sistema de selección sea F^+).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Enzima

Se partió de la enzima PRAI monomérica de *E. coli* donada por el Dr. Kasper Kirschner.

4.1.2 Vector

La enzima PRAI ya existente en el laboratorio fue clonada en el plásmido multicopia pUC18 bajo el promotor lac, en los sitios EcoRI-HindIII. Originalmente consta de 2.69 Kb, por el replicón derivado del plásmido pMB1, tipo ColE1, es de alto número de copias, contiene el gene de resistencia a ampicilina como marcador de selección y el gene *lac Z* (Messing, 1983).

4.1.3 Cepa

Para la generación de bancos, el plásmido pUC18 conteniendo el gene de PRAI fue electroporado en la cepa de *E. coli* JM101 *supE thi Δ(lac-proAB) F'*, dada su mayor eficiencia de transformación.

4.1.4 Sistema de Selección

Como sistema de selección, se contó con la cepa de *E. coli* gentilmente donada por el Dr. Kasper Kirschner, JMB9 *r⁻ m⁺ ΔtrpF*, que tiene deletado el gene codificante para IGPS-PRAI y en su lugar tiene la versión monofuncional de IGPS.

4.1.5 Medios de Cultivo

- ❖ En general se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) sólido y líquido (Sambrook *et al.*, 1989).
- ❖ Para la cepa de selección se usa el medio Vogel-Bonner (VB) (Sambrook *et al.*, 1989) preparado como se indica en la siguiente tabla, por cada 235 ml de medio sólido (preparado con 4g de agar noble) (Sterner *et al.*, 1995):

Volumen	Reactivos
5 ml	glucosa al 20%
5 ml	hidrolizado de casaminoácidos al 20%
5 ml	sales 50X pH 7 preparadas con: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 10g. Mg₂SO₄.7H₂O ▪ 100g. ácido cítrico anhidro ▪ 500g. K₂HPO₄ Na₂HPO₄.2H₂O ▪ agua c.s.p. 1 lt.
125 µl	FeCl ₃ a 5mg/ml
62.5 µl	Tiamina a 20mg/ml

Tabla 1. Reactivos suplementados al medio Vogel –Bonner (VB)

- ❖ Antibióticos para suplementar a ambos medios (LB y VB) según el plásmido a usar: Ampicilina (amp) 200µg/ml, Kanamicina (km) 25µg/ml y Tetraciclina (tc) 10 µg/ml.

4.2 Metodologías

4.2.1 Obtención de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se purifica a partir de un cultivo líquido de células bacterianas, utilizando el kit de Boehringer-Mannheim para purificación de plásmidos: *High Pure Plasmid Isolation Kit*. En general, la metodología consiste en lisar las células (medio alcalino) y remover el RNA (con enzima RNAsa) y los restos celulares (por centrifugación). Los plásmidos presentes en la fracción soluble se retienen al pasar por las columnas de afinidad y finalmente este es el DNA que se recupera, previa eliminación de sales, proteínas y otras impurezas celulares, por elución de las columnas con agua destilada o *buffer* bajo en sales.

4.2.2 Secuenciación del gene de PRAI

La secuenciación de DNA de los plásmidos purificados se realizó con el apoyo de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. utilizando un secuenciador automatizado modelo 377-18 de Perkin-Elmer, el cual funciona mediante la

Nombre de oligo	Secuencia de 5' → 3'
A $\alpha 2/\beta 3$	TCA-ACA-CCC-CTC-CTG- <u>ACT-ATC-ATT-ATG-CCG-CAG-CCA-TCA-CTT-C</u>
B $\alpha 2/\beta 3$	AGT-CAG-GAG-GGG-TGT-TGA- <u>TGC-TCG-AGC-CGT-TGC-AGT-ATG-TTG-GC</u>
A $\alpha 4/\beta 5$	TCA-ACA-CCC-CTC-CTG- <u>ACT-ATC-ATT-ATG-GCA-GAG-CTT-CAC-GCA-G</u>
B $\alpha 4/\beta 5$	AGT-CAG-GAG-GGG-TGT-TGA- <u>TGC-TCG-AGG-CAC-ATG-TTG-CCA-TCT-GG</u>
A $\alpha 6/\beta 7$	TCA-ACA-CCC-CTC-CTG- <u>ACT-ATC-ATT-ACG-TTT-GAC-CAT-TTA-ATA-GTG-AC</u>
B $\alpha 6/\beta 7$	AGT-CAG-GAG-GGG-TGT-TGA- <u>TGC-TCG-AGC-TTG-GCA-ACG-TTC-TGC-TG</u>
Fagémido1	CAT-AAG-GAT-CCT-CAG-GAG-GGG-TGT-TGA-TGC Sitio <i>BamHI</i>
Fagémido2	CTA-CGG-AAT-TCT-TAA-TAT-GCG-CGC-AGC-GTC Sitio <i>EcoRI</i>
P-II	ATC-CTG-AAA-GCT-TAT-CAT-TAT-GGC-AGA-GCT-TCA Sitio <i>HindIII</i>
NOTA:	Las bases indicadas en letra azul corresponden a la secuencia de unión a ribosoma, en letra verde están los codones de inicio y en rojo los codones de término. Las bases están subrayadas por color de región identificable en la figura 4.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados

4.2.4 Obtención de las tres construcciones mediante PCR

Para obtener la enzima PRAI con el inserto de codón de término-*Shine Dalgarno*-codón de inicio, se llevaron a cabo *PCRs* utilizando los oligos diseñados combinados con los oligos universales Reverso y *Forward*, que reconocen los sitios al inicio y final del gene de PRAI respectivamente. Tomando los productos de las primeras 2 *PCRs* como templados, se amplifica el gene con los oligos Universales que flanquean los extremos. Estos pasos se muestran en la figura 4 a continuación:

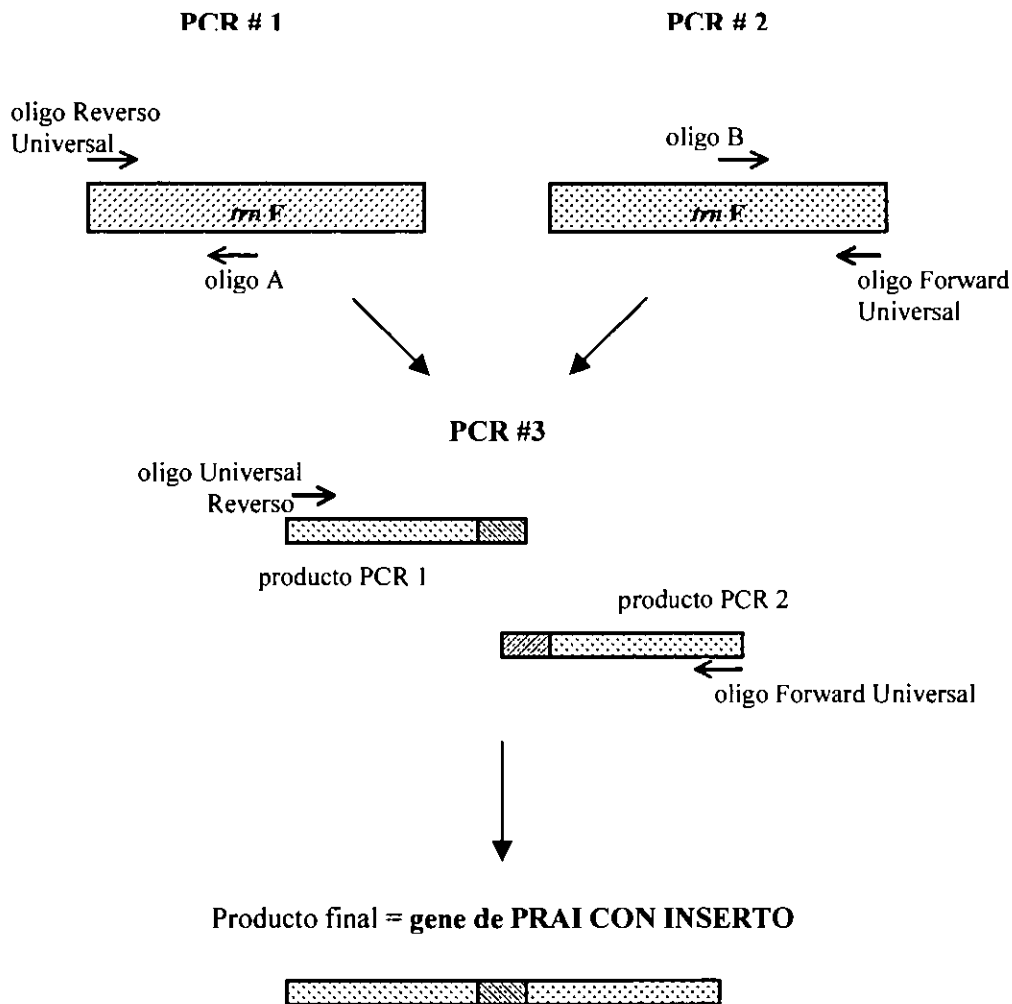


Figura 4. Esquema de obtención del gene de PRAI con inserto

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo Robocycler™ 40 de Stratagene bajo las siguientes condiciones de concentraciones y temperaturas:

DNA 200-250 ng/μl	2 μl
Oligo A o B 20pmol/μl	1 μl
Oligo Universal <i>Forward</i> o <i>Reverso</i> 20pmol/μl	1 μl
dNTPs 10X	10 μl
Buffer PCR 10X	10 μl
MgCl ₂ 25mM	8 μl
Enzima DNA polimerasa (2.5U)	2 μl
H ₂ O destilada c.s.p.	100 μl

Tabla 3. Componentes de la reacción PCR.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo(min.)
1	94°C	5
25	94°C	1
	50°C */ 48°C	1
	72°C	2
1	72°C	10

Tabla 4. Condiciones de la reacción PCR para α2/β3 y α6/β7

*para α4/β5 sólo cambia esta temperatura a 48°C

4.2.5 Análisis y preparación de DNA por enzimas de restricción para clonación

Para la verificación del gene de PRAI silvestre o del gene interrumpido con el inserto se pone a digerir el DNA plasmídico con las enzimas *EcoRI* y/o *HindIII* (10 U de c/u) en *buffer* B (Boehringer-Mannheim), incubando a 37°C durante un tiempo mínimo de 2 horas. Para la confirmación mediante peso en Kb de los fragmentos y vectores se usaron geles al 1% -2% de agarosa preparados con TBE (Sambrook, et al., 1989), teñidos con bromuro de etidio, vistos y fotografiados bajo luz UV en un aparato Eagle Eye™ de Statagene.

En cuanto a los productos de PCR, se lleva a cabo una purificación de los genes mediante geles de agarosa al 1 o 2%, cortando la banda del tamaño indicado visto bajo luz UV y purificando la misma mediante extracción fenol:cloroformo 50:50 y precipitación del DNA de la fase acuosa recuperada, con butanol-etanol 70%.

Para su clonación, tanto los productos de PCR purificados como el vector pUC18 se digieren con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Boehringer-Mannheim) para generar los extremos compatibles con cada inserto.

Después de digeridos los vectores, se tratan con fosfatasa alcalina (Sambrook, et al., 1989) para evitar la religación en caso de que se haya dado una digestión incompleta por parte de una de las enzimas. Finalmente se purifican mediante una extracción fenol-cloroformo 0.5:0.5 para eliminar proteína y la fase acuosa se recupera para precipitar el DNA con butanol y etanol al 70%, como se describió anteriormente. El vector y los genes quedan listos para ligarse.

4.2.6 Ligación de productos de PCR con el vector pUC18

Una vez digeridos y conocida su concentración, los insertos se ligan al vector en una proporción molar vector:inserto de 1:8 con ligasa T4 y *buffer* de ligasa (Boehringer-Mannheim). Se incuban a 16°C por un lapso de 2 a 12 hrs, luego del cual se concentran las reacciones de ligación mediante precipitación con butanol- etanol 70%, resuspendiendo con agua destilada en la mitad del volumen original.

4.2.7 Preparación de células electrocompetentes

El siguiente método se aplicó para obtener células electrocompetentes tanto de *E. coli* JM101 como de *E. coli* JMB9 $\Delta trpF$:

- Seleccionar una colonia grande y aislada de las células deseadas y estriar en medio sólido. Repetir 3 veces.
- Dejar creciendo por la noche una colonia de caja fresca en 10-15 ml de medio líquido LB
- Inocular 1:100 al día siguiente 1 lt. de cultivo líquido LB.
- Dejar crecer aproximadamente 3 horas o hasta una D.O._{600nm} de 0.6 ó de 0.9

- Pasar cultivo a botellas estériles de 250 ml y dejar reposar en hielo por 30 minutos.
- Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- Tirar sobrenadante dejando unos 5 ml de medio. Resuspender el precipitado suavemente, dejando las botellas en hielo. Si hay grumos tirar y comenzar de nuevo.
- Agregar la mitad del volumen original (125ml/botella) de glicerol al 10% frío; pasar de las 4 botellas a 2 botellas.
- Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- Tirar sobrenadante dejando unos 5 ml.
- Resuspender en 10ml de glicerol al 10% frío y pasar a dos tubos estériles de 15 ml.
- Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- Tirar todo el sobrenadante y resuspender todo en 0.5 ml de glicerol al 10 % frío y 0.5ml de GYT (Glicerol 10%, Extracto de levadura 0.125%, triptona 0.25%)
- Tomar alícuotas de 60 µl y poner en hielo seco/etanol.

Las células así obtenidas se mantienen competentes por lo menos durante un período de dos meses si se almacenan a -70°C.

4.2.8 Electroporación de las construcciones y obtención de mutantes.

Por separado, cada una de las construcciones fue electroporada a 1.8 Volts , 20 Ω y 400mA. Se colocaron 2µl de producto de ligación en un tubo con células competentes y la mezcla se transfirió a una celda para electroporación con separación de electrodos de 1 mm.

Primero fueron electrotransformadas en la cepa JM101 para verificar su viabilidad y recuperadas en medio SOC (ver Sambrook *et al.*, 1989) por incubación durante una hora a 37°C con agitación. De aquí se tomaron 200 µl para ser sembrados en medio LB sólido e incubados a 37°C por aproximadamente 10-12 horas. Se seleccionaron 5 colonias al azar y se purificó su plásmido para verificar mediante secuenciación que tuvieran el inserto correspondiente.

Posteriormente éstos fueron electroporados en la cepa de selección JMB9 $\Delta trpF$, las células fueron recuperadas en medio SOC y pasada una hora, fueron lavadas tres veces con

medio de selección VB líquido. Se platearon 200 μl en medio VB sólido e incubaron a 37°C hasta observar crecimiento. Se seleccionaron clonas que crecieron en medio de selección VB, se extrajo plásmido y se secuenció para confirmar la existencia de la interrupción del gene y descartar que el crecimiento se debiera a posible contaminación con la enzima silvestre.

4.2.9 Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento de las construcciones se realizaron en medio líquido tanto LB como VB suplementados con el antibiótico correspondiente. Se emplearon tres colonias de cada muestra dejándose crecer como preinóculos en medio LB líquido durante una noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces para eliminar cualquier traza de LB y se inoculó aproximadamente en una relación 1:100 tratando de que el volumen de células fuera suficiente para que todas presenten la misma $D.O._{600\text{ nm}}$ (entre 0.03 y 0.06) al tiempo cero, en tubos con 3 ml de medio fresco VB y LB teniendo finalmente 3 tubos de cada muestra. Las lecturas de la densidad óptica se hicieron a una longitud de onda de 600 nm. cada hora en un fotocolorímetro Spectronic 2000 por un período de 12 a 24 horas dependiendo del crecimiento de las muestras.

Las curvas de crecimiento se graficaron con el promedio de cada variante. Como control se utilizó la cepa JM101 con el vector pUC18, la cepa JMB9 con el vector pUC18 y/o las cepas solas, así como la cepa JMB9 con el vector que contiene la enzima PRAI silvestre.

4.2.10 Clonación de $\beta 5\alpha 8$ en fagémido pM846

El fagémido pM846 consta de 4144 p.b., promotor *P cat*, fl ori, gene para resistencia a ampicilina, P15a ori de bajo número de copias y el gene *lacZpo*.

Para obtener la segunda mitad de PRAI ($\beta 5\alpha 8$) por PCR a partir de la secuencia del gene fragmentado y clonado en pUC 18 se diseñaron el par de oligonucleótidos nombrados fagémido 1 y fagémido 2 (ver secuencia en tabla 2).

La PCR se llevó a cabo en las condiciones descritas en las tablas 3 y 4, excepto que la temperatura de hibridación fue de 55°C *(ver tabla 4). El producto de PCR se purificó

mediante un gel de agarosa al 1% y se extrajo mediante el kit de Qiagene™ de la manera antes descrita. Una vez purificado, se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* en *buffer* B (Boehringer-Mannheim), así como el vector pM846. Este último, después de la digestión se desfosforiló con fosfatasa alcalina y se purificó de la misma manera. El vector y el producto de PCR purificados se ligaron bajo las condiciones descritas en el apartado 4.2.6. El producto de ligación se electroporó en células XL1-BLUE de *E. coli* en la forma previamente descrita en la sección 4.2.8. Se sembró en cajas con medio sólido LB suplementado con los antibióticos tetraciclina y ampicilina.

4.2.11 Clonación de $\beta 1\alpha 4$ en plásmido pbgs18

Se escogió el plásmido pbgs18, el cual es un plásmido multicopia, derivado de pUC18, originalmente tiene 4376 p.b., promotor *lac*, *ori* (derivado de pUC18) y contiene el gene para resistencia a kanamicina como marcador de selección, por lo que es compatible con el fagémido para llevar a cabo una doble transformación.

Se utilizó el oligonucleótido P-II (ver tabla 2) para obtener mediante PCR el fragmento $\beta 1\alpha 4$ del vector pUC18 que tiene clonado el gene de PRAI, bajo las condiciones de temperatura descritas en la tabla 4.

Este oligo en combinación con el oligo Universal Reverso permitió obtener como producto de PCR el fragmento $\beta 1\alpha 4$ y clonarlo en el plásmido pbgs18 a través de los sitios *EcoRI* y *HindIII*, mediante los métodos descritos en los puntos 4.2.5 y 4.2.6. Posteriormente se electroporó en células JM101 y se sembró en medio sólido LB suplementado con ampicilina.

4.2.12 Electroporación de pbgs- $\beta 1\alpha 4$ en JMB9 y obtención de células electrocompetentes

Una vez comprobado por secuencia que el fragmento estaba correctamente clonado en el plásmido pbgs18, se procedió a electroporar éste en la cepa de selección JMB9 $\Delta trpF$ en la forma descrita anteriormente y las células electrocompetentes conteniendo este plásmido fueron preparadas según el protocolo descrito en la sección 4.2.7.

4.2.13 Prueba de complementación: Electroporación de pM846- $\beta 5\alpha 8$ en $\beta 1\alpha 4$ - JMB9

Habiendo verificado el DNA clonado en el fagémido pM846 por análisis de restricción y por su secuencia, se purificó fagémido y se electroporó en las células $\beta 1\alpha 4$ - JMB9 para llevar a cabo la prueba de complementación. Las células fueron sembradas en medio LB más los antibióticos km, amp y tc. Las células previamente lavadas con medio de selección VB fueron sembradas en medio sólido VB suplementado con los mismos 3 antibióticos.

4.2.14 Pruebas de complementación por infección

Uno de los objetivos al emplear un fagémido, era la posibilidad de usarlo en forma infecciosa, lo cual incrementa la eficiencia de introducción de material genético de manera exponencial.

Para ello se hicieron pruebas iniciales de infección a la cepa JMB9, puesto que fue donada y no se conoce a fondo su genotipo.

Para poder realizar las infecciones iniciales, se prepararon células infecto-competentes de la cepa JMB9 y de XL1-BLUE como control, de la siguiente forma:

- Crecer una colonia de la cepa deseada en medio sólido LB durante la noche
- Al día siguiente tomar una colonia aislada e inocular 10 ml de medio fresco LB
- Crecer durante 7-8 horas o hasta una D.O._{600nm} de 1.0 a 37°C con agitación 250 r.p.m.
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000g a 4°C
- Extraer el medio y lavar con 10ml de MgSO₄ 10mM frío
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000g a 4°C
- Extraer el medio y resuspender la pastilla con 5 ml de MgSO₄ 10mM frío
- Realizar diluciones 1:2, 1:4, 1:8 en MgSO₄ 10mM
- Identificar la dilución a la cual la D.O._{600nm} está entre 0.6 y 0.8 y usar esas células como infecto-competentes.
- Guardar en refrigerador a 4°C por un máximo de un mes.

4.2.15 Pruebas iniciales de infección a la cepa JMB9 $\Delta trpF$

Para comprobar si la cepa JMB9 $\Delta trpF$ contiene el plásmido F' se llevó a cabo una prueba inicial de infección con los fagos ExAssist™ y R408 de Stratagene, ambos con titulación inicial del orden de 10^{10} . Se siguió el protocolo sugerido en el manual de Stratagene del Zap Express™ Undigested Vector Kit.

Los pasos a seguir fueron:

- ❖ Diluir el fago a concentraciones entre 10^4 y 10^7 en *buffer* TE (preparado según Sambrook, et al., 1989) y combinar 1 μ l de cada dilución con 200 μ l de células infecto-competentes.
- ❖ Incubar la mezcla de fago-células durante 15 minutos a 37°C sin agitación
- ❖ Agregar 3ml de NZY top agar previamente fundido y enfriado a 48°C y vaciar inmediatamente sobre cajas con NZY agar precalentadas a 37°C.
- ❖ Invertir las cajas de petri e incubar a 37°C durante la noche.

4.2.16 Conjugación bacteriana

El plásmido F, además de portar genes que regulan su replicación y genes para sintetizar el pilli, carga los genes para mediar su transferencia de una célula que lo contiene (F^+) a una célula que no lo contiene (F^-). A este proceso se le conoce como conjugación bacteriana. La presencia del episoma F' permite la infección por fago filamentoso, el cual se une al pilli para después poder hacer la infección.

La conjugación bacteriana requiere contacto célula-célula donde la transferencia de plásmido se da en 4 etapas:

- Contacto efectivo, que requiere la formación de pilli en la célula donadora
- Movilización, donde se prepara el DNA para su transferencia (una cadena)
- Transferencia de DNA
- Formación de plásmido replicativo funcional en la célula Receptora

El protocolo usado para llevar a cabo la conjugación fue el siguiente:

Se dejan preinóculos creciendo por la noche, tanto las células receptoras como las donadoras.

Al día siguiente se diluye el preinóculo de la siguiente manera:

Donadora 1:40

Receptora 1:20

Se dejan crecer a 37°C llegando a la fase exponencial (unas 2 ó 3 X 10⁸ céls/ml).

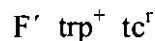
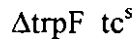
Después en medio líquido se prepara una mezcla de volúmenes iguales de donadora y receptora, por ejemplo, 0.5 ml de cada una; se ponen en un tubo de ensaye y se dejan en agitación durante una hora a 37°C a 30 r.p.m. Alternativamente esto se puede hacer en baño maría a 37°C y en un matraz de 250 mL se pone 1 ml (o una cantidad pequeña) y se agita manualmente durante una hora con movimientos suaves. Después se diluye este cultivo desde 10⁻² a 10⁻⁵ y se siembran 0.1 ml de cada dilución en cajas de petri con medios selectivos, así como también se siembran los controles que son la célula donadora y receptora por sí solas. Se dejan crecer a 37°C durante una noche (Miller, 1972).

4.2.17 Selección del genotipo

Haciendo la conjugación de XL1-BLUE con la cepa JMB9 :



puede resultar lo siguiente:



Es necesario seleccionar el genotipo deseado, que es F' $\Delta \text{trpF } tc^r$. Para ello se usó medio rico LB (con triptofano) y medio de selección VB carente de triptofano, ambos con tetraciclina, que es el marcador de selección del plásmido F'. Primero se tomaron al azar 200 colonias conjugantes crecidas en medio LB tc para ser estriadas en caja con medio sólido LB tc.

Al día siguiente se tomó una muestra de 25 de esas 200 colonias y se re-estriaron en medio sólido LB tc. De allí, se pusieron a crecer las 25 colonias en medio líquido LB tc durante una noche y al día siguiente se inoculó 1:100, previamente lavadas tres veces con medio VB para eliminar restos de triptofano del LB, cada una de las 25 colonias en medio líquido LB tc y VB tc. Se incubaron a 37 °C y se hizo un seguimiento de su crecimiento

durante 24 horas haciendo lecturas de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. en un fotocolorímetro Spectronic 2000.

Al término de este tiempo se seleccionaron las muestras que aparentemente no presentaban crecimiento en medio VB tc, puesto que esto nos indicaba que las células no pudieron crecer en un medio sin triptofano por lo que seguían siendo $\Delta trpF$.

Las células de las muestras seleccionadas se recuperaron de los tubos con medio LB tc y se lavaron 3 veces con medio líquido VB. De éstas se tomaron 5 μ l de cada una para sembrar, en forma de gota, en caja con medio sólido LB tc y VB tc. Se incubaron a 37°C y al día siguiente se seleccionaron como portadoras del genotipo deseado las muestras que a la vez presentaron crecimiento en medio sólido LB tc y que no presentaron crecimiento en medio sólido VB tc.

4.2.18 Prueba de la cepa JMB9 F' por infección

Una vez seleccionadas las células F' $\Delta trpF$ tc^f, se infectaron de nuevo, de acuerdo a los procedimientos descritos en los puntos 4.4.2 y 4.4.3, con fagos R408 y *ExAssist* para verificar que efectivamente ahora sí permiten infección debido a la presencia del F'.

4.2.19 Electroporación de la primera mitad de PRAI en la cepa F'

Una vez comprobado que las células permiten infección, se electroporó el plásmido pbgs18- β 1 α 4 en la cepa de selección JMB9 F', para su posterior infección con el fagémido conteniendo el segundo fragmento (β 5 α 8).

4.2.20 Purificación de fagémido pM846- β 5 α 8

La infección de células portadoras de un fagémido con fago *helper* produce partículas de bacteriófago que contienen copias de cadena sencilla del genoma del fagémido.

Se amplificó fagémido pM846- β 5 α 8 así como pM846 sin inserto con la ayuda de *helper phage* R408 mediante el método descrito por Sambrook *et al.*, 1989 en las secciones 4.25 y 4.29 hasta el paso número 6.

4.2.21 Obtención de DNA de cadena sencilla del fagémido pM846-β5α8

Para obtener fagémido de cadena sencilla, se siguió el procedimiento a partir del paso N° 7. descrito en la sección 4.29 según Sambrook *et al.*, 1989.

4.2.22 Prueba de complementación: Infección con fagémido pM846-β5α8

Para probar si sería posible la complementación de los fragmentos en dos sistemas por separado, dentro de la misma célula, se siguió el siguiente procedimiento:

- ❖ Crecer un cultivo por la noche de las células β1α4 – F' en medio LB
- ❖ Al día siguiente hacer una dilución 1:100 en un cultivo líquido fresco
- ❖ Incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar una D.O. _{600nm} entre 0.7 y 1.0
- ❖ Mezclar cantidades iguales (por ejemplo 100μl) de células y de diluciones de fagémido (10^{-3} a 10^{-8}) y completas con medio 2xYT a 1 ml.
- ❖ Incubar durante 20-30 minutos a 37°C sin agitación
- ❖ Platear 100 μl de cada dilución en medios LB y VB con antibióticos.

El siguiente paso es ver la capacidad del sistema de selección de rescatar un pequeño número de mutantes con actividad, es decir que complementan para dar la función de PRAI, entre un gran número de mutantes sin actividad.

Esto se llevó a cabo infectando a la cepa JMB9 $\Delta trpF$, conteniendo el primer fragmento β1α4 clonado en el plásmido pbgs18, con el fagémido pM846-β5α8 más el fagémido pM846 solo, es decir sin inserto. Así pM846 sería la mutante sin actividad y con ella presente esperaríamos obtener una complementación entre pM846-β5α8 y pbgs18-β1α4 dentro de la célula.

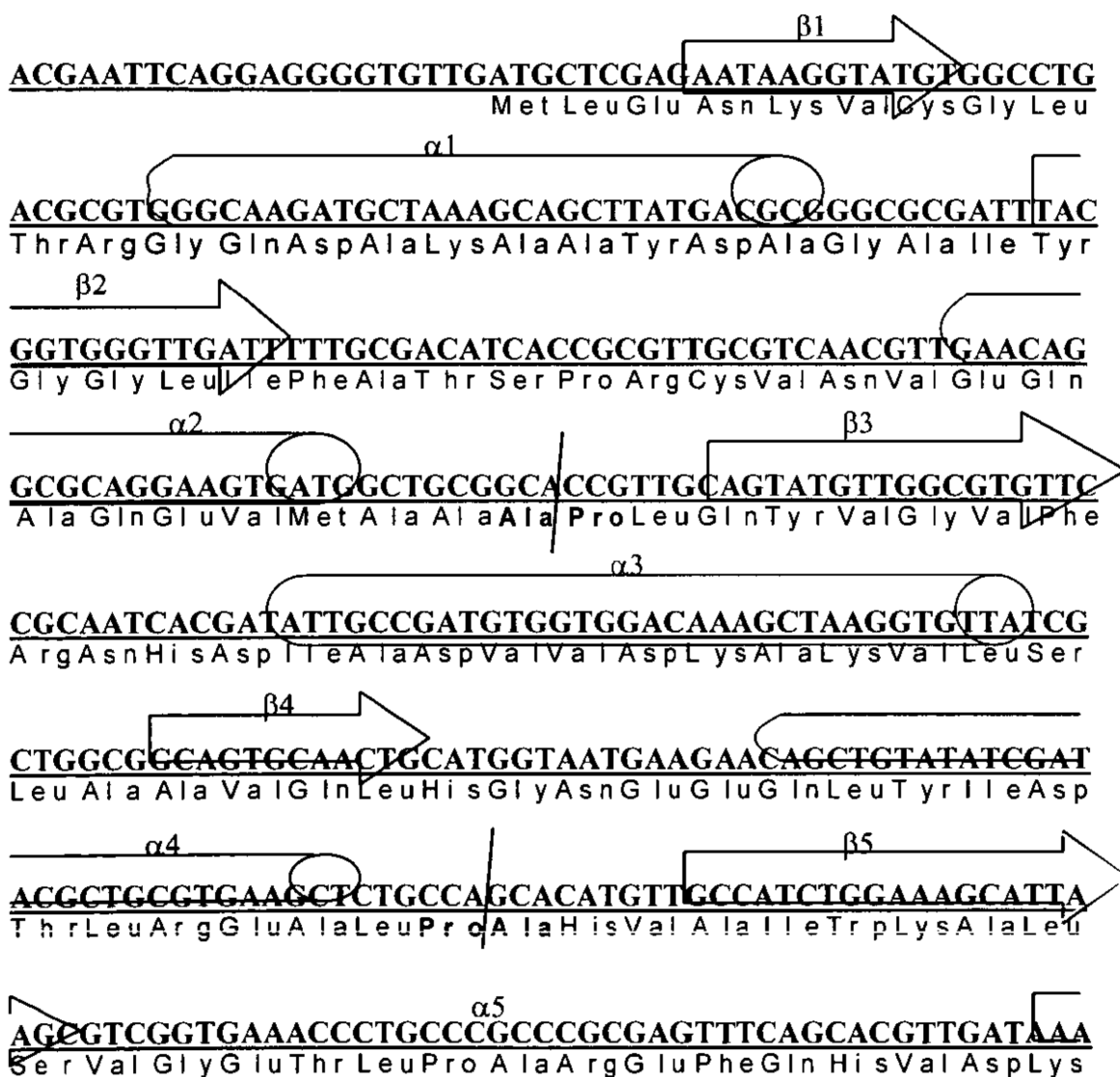
De esta forma se procedió a infectar las células β1α4 – F' con

- Diluciones de pM846-β5α8 + diluciones de pM846 solo
- Diluciones de pM846 solo como control negativo
- Diluciones de pM846 β5α8 como control positivo

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ingeniería de proteínas para obtener las construcciones policistrónicas con fragmentos separados entre α_2/β_3 , α_4/β_5 y α_6/β_7

Como primer paso, se obtuvo la secuencia completa del gene de PRAI, el cual consta de 594 bases, y se identificaron las posiciones en las que sería interrumpido el gene. A continuación se muestra la secuencia del gene, donde las bases en color rojo rodeadas de un cilindro representan las estructuras de alfa-hélices, las verdes encerradas en una flecha representan a las beta-plegadas, las azul fuerte son las asas y las posiciones de los tres cortes están marcados entre los residuos de color azul claro y rosa.



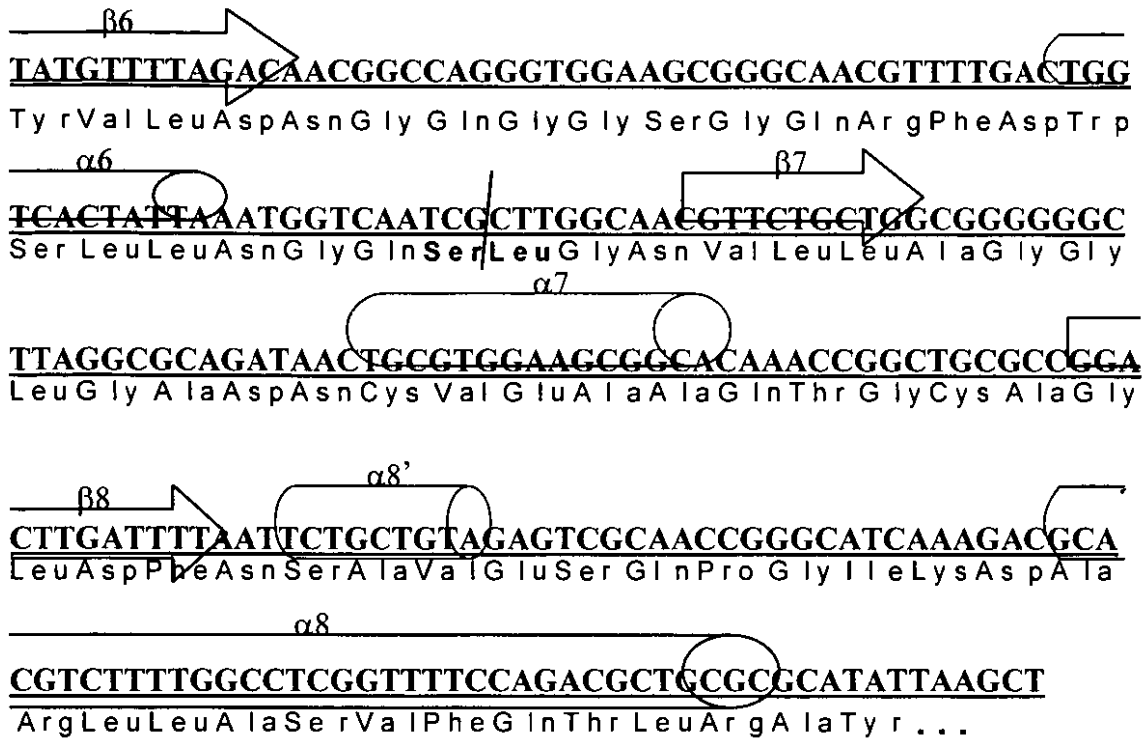


Figura 5. Secuencia del gene *trpF* monomérico de *E. coli*

Una vez diseñados los oligos para cada sitio de fragmentación, se generó cada construcción mediante tres PCRs. En la figura 6 se muestran los productos obtenidos de las primeras 2 PCRs (para más referencias ver sección 4.2.4 de materiales y métodos).

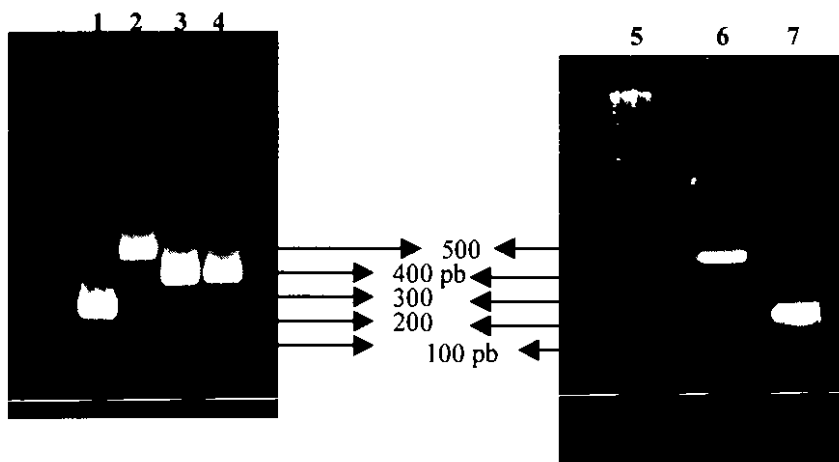


Figura 6. Megaprimers obtenidos mediante PCR para obtener fragmentos de PRAI con inserto.

Las muestras están en el siguiente orden: Carril 1. Fragmento $\beta 1-\alpha 2$ de aprox. 190 pb, obtenido con oligos Reverso y A; Carril 2. Fragmento $\beta 3-\alpha 8$ de aprox. 480 pb, obtenido con oligos B y *Forward*; Carril 3. Fragmento $\beta 1-\alpha 4$ de aprox. 330 pb, obtenido con oligos Reverso y A; Carril 4. Fragmento $\beta 5-\alpha 8$ de aprox. 340 pb, obtenido con oligos B y *Forward*; Carril 5. Marcador de peso molecular 1 Kb ladder; Carril 6. Fragmento $\beta 1-\alpha 6$ de aprox. 480 pb, obtenido con oligos Reverso y A; Carril 7. Fragmento $\beta 7-\alpha 8$ de aprox. 175 pb, obtenido con oligos B y *Forward*.

Estos productos se tomaron como template para amplificar el gene mediante una tercera PCR, logrando insertar 33 bases que interrumpen la secuencia de PRAI con un codón de paro, sitio de unión a ribosoma y un codón de inicio, haciéndolo policistrónico (ver ejemplo de secuencia en fig. 7).

De esta manera se obtuvieron las tres construcciones que fueron clonadas, cada una por separado, en el vector pUC18. Inicialmente fueron transformadas en la cepa JM101 de *E. coli*. de donde, luego de crecer en medio LB, se extrajo plásmido para analizar su secuencia y ver que tuviera el inserto correspondiente.

Posteriormente, para llevar a cabo la prueba de complementación, estos plásmidos fueron re-electroporados en la cepa JMB9 $\Delta trpF$. Se seleccionaron clonas que crecieron en medio de selección VB y en medio LB, se extrajo plásmido y se secuenció para confirmar la existencia de la interrupción del gene y descartar que el crecimiento en medio VB se debiera a posible contaminación con la enzima silvestre, así como para verificar que no existieran mutaciones adicionales.

5.2 Complementación de la función de PRAI a partir de los fragmentos

Debido a que los medios ricos de cultivo contienen triptofano, se probaron varias condiciones de recuperación de las células provenientes de la electrotransformación de las construcciones en JMB9 $\Delta trpF$ para verificar su crecimiento y selección:

a) Recuperación en medio SOC de células provenientes de electroporación.

El medio SOC contiene triptofano proveniente de la peptona y extracto de levadura que componen al medio. Al sembrar las células provenientes de un medio líquido SOC directamente en medio sólido de selección VB se observó el crecimiento entre 12 y 24

horas después, de mutantes de todas las construcciones y de PRAI silvestre, no así de pUC18 (control negativo). En este caso, esa mínima cantidad de triptofano las ayudó a crecer puesto que si las células son lavadas 3 veces con medio mínimo no crecen todas las construcciones. En el caso del pUC18, esa mínima cantidad de triptofano no fue suficiente para que la célula creciera, durante ese lapso de tiempo.

b) Uso de medio SOC para recuperación de células provenientes de electroporación y lavado posterior de las mismas con medio mínimo líquido.

Las células fueron lavadas 3 veces con una cantidad similar de medio de selección VB líquido mediante centrifugaciones a 2000-3000 r.p.m.-desecho de sobrenadante-resuspensión en medio mínimo, para de allí resuspender en un volumen ajustado a una dilución final de 1:10.

Usando este método de recuperación, se observó que células con la enzima fragmentada entre $\alpha 4/\beta 5$ y la enzima silvestre fueron las únicas que presentaron crecimiento sin triptofano. Cabe señalar que el crecimiento de la mutante fue mucho más lento, tardando alrededor de 3 días en mostrar colonias mientras que las células transformadas con el gene silvestre de PRAI presentaron colonias visibles desde las 6-8 horas. Esta diferencia se puede observar en las cinéticas de crecimiento.

c) Recuperación en medio mínimo VB líquido de células electroporadas.

Las células electroporadas fueron recuperadas en medio VB líquido, quedando listas para sembrarse directamente en medio sólido VB. De esta forma, se observó únicamente crecimiento de mutantes conteniendo PRAI silvestre y de $\alpha 4/\beta 5$.

Así, utilizando el sistema de selección, en general se observó que:

- En medio LB todas las mutantes crecieron incluyendo los controles (PRAI y pUC18).
- En medio de selección VB, sin triptofano en el medio, crecieron las células con PRAI silvestre y con la construcción $\alpha 4/\beta 5$. No se observó crecimiento de células con construcciones $\alpha 2/\beta 3$, $\alpha 6/\beta 7$ ni de pUC18 .

Este crecimiento se puede ver en las cinéticas de crecimiento, figuras 8 y 9.

Es importante señalar que pUC18 contiene el promotor *lac* inducible por IPTG y que, el adicionar 0.05 mM IPTG al medio sólido VB contribuyó a un crecimiento más rápido de colonias visibles. Así $\alpha 4/\beta 5$ presenta crecimiento en menos tiempo (1-2 días) que sin la adición de IPTG (3 días).

➤ Por lo tanto el gene *trpF* fragmentado en el asa que separa la α -hélice 4 de la hebra- β 5 complementa para dar la función de PRAI como se pudo observar utilizando el sistema de selección.

En la figura 7 se observa la secuencia de $\alpha 4/\beta 5$ (arriba, en azul) y las 33 bases insertadas en el gene original, las cuales permitieron su fragmentación, alineada con la secuencia de la PRAI silvestre (abajo en negro). En rojo están las bases representando el codón de paro, en verde las del codón de inicio y en rosa las del Shine-Dalgarno.

```

15 atgctcgagaataaagtatgtggcctgacgcgtgggcaagatgctaaagcagcttatgac 75
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1   ctcgagaataaagtatgtggcctgacgcgtgggcaagatgctaaagcagcttatgac 60

76 gcgggcgcgatttacgggtgggttgatTTTTgTTgcgacatcaccgcgttgcggtcaacggt 135
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
61 gcgggcgcgatttacgggtgggttgatTTTTgTTgcgacatcaccgcgttgcggtcaacggt 120

136 gaacaggcgaggaagtgatggctgcggcaccgTTgcagtatgTTggcgTgTtccgcaat 195
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
121 gaacaggcgaggaagtgatggctgcggcaccgTTgcagtatgTTggcgTgTtccgcaat 180

196 cacgatattgccgatgtggtggacaaagctaaggTgTtatcgctggcggcagtgcaactg 255
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
181 cacgatattgccgatgtggtggacaaagctaaggTgTtatcgctggcggcagtgcaactg 240

256 catggtaatgaagaacagctgtatatacgatacgctgcgtgaagctctgccA . tgatag 315
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
241 catggtaatgaagaacagctgtatatacgatacgctgcgtgaagctctgccA..... 300

316 tc      ggtgTtg      ctcgaggcacatgTtgccatctggaaagcattaagcgTcggt 375
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
301 .....gcacatgTtgccatctggaaagcattaagcgTcggt 360

376 gaaaccctgcccgcocgcgaqTTtcagcacgTtgataaaatgTtttagacaacggccag 435
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
361 gaaaccctgccccocgcgagTttcagcacgTtgataaaatgTtttagacaacggccag 420

436 ggtggaagcgggcaacgTtttgactggtcactatTaaatggtcaatcgctTggcaacgTt 496
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
421 ggtggaagcgggcaacgTtttgactggtcactatTaaatggtcaatcgctTggcaacgTt 480

```

```

496 ctgctggcggggggcttaggcgcagataactgcggtggaagcgggcacaaaccggctgcgcc 555
    |||
481 ctgctggcggggggcttaggcgcagataactgcggtggaagcgggcacaaaccggctgcgcc 540

556 ggacttgattttaattctgctgtagagtcgcaaccgggcatcaaagacgcacgtcttttg 610
    |||
541 ggacttgattttaattctgctgtagagtcgcaaccgggcatcaaagacgcacgtcttttg 600

611 gcctcggttttccagacgctgcgcgcataattaa
    |||
601 gcctcggttttccagacgctgcgcgcataat
    
```

Figura 7. Alineamiento de secuencias de PRAI silvestre y la construcción $\alpha 4\beta 5$ obtenida

5.3 Cinéticas de crecimiento de la cepa JMB9 $\Delta trpF$ complementada con las diferentes construcciones

A continuación se muestran las cinéticas de crecimiento en medio rico y medio de selección, para las tres construcciones policistrónicas y sus controles: pUC18 negativo, PRAI positivo, todas electroporadas en células JMB9 $\Delta trpF$.

Figura 8. Cinéticas de crecimiento de construcciones policistrónicas en medio LB

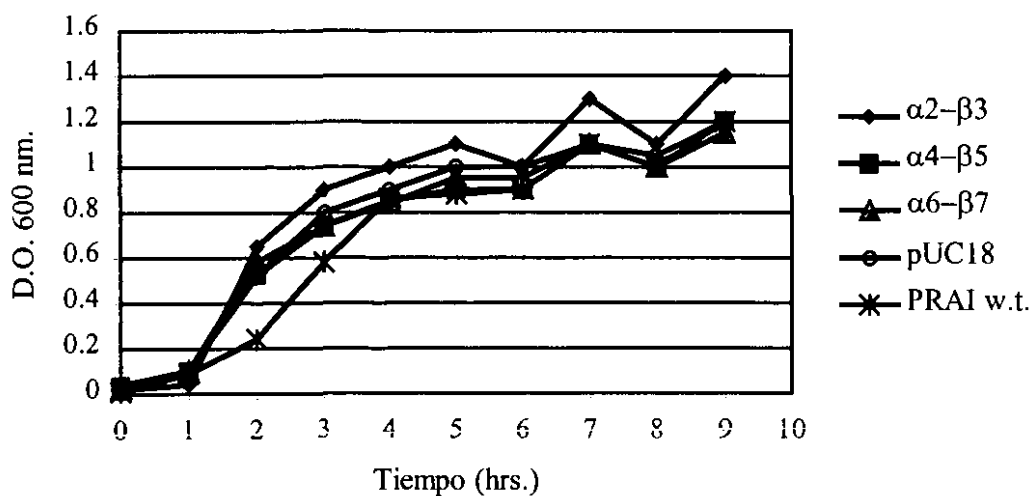
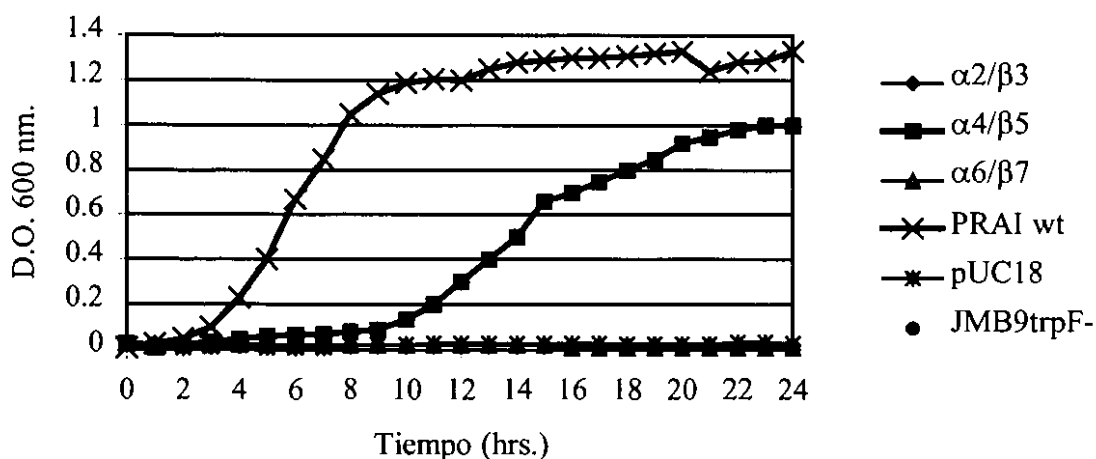


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de construcciones policistrónicas en medio VB



Aquí se observa que el crecimiento de las construcciones y los controles en medio rico es parecido, mientras que en medio VB se presentan diferencias notorias de crecimiento entre las mutantes con enzima silvestre y las que contienen la construcción $\alpha 4/\beta 5$.

5.4 Expresión independiente de los fragmentos capaces de complementar actividad de PRAI

En base a los primeros resultados obtenidos, el siguiente paso era demostrar que los fragmentos producidos de la transcripción y traducción de vectores independientes eran capaces de ensamblarse *in vivo*. Por ello se clonaron independientemente, una mitad de PRAI en un plásmido y la otra mitad en un fagémido.

Mediante PCR y con los oligos diseñados se obtuvieron los fragmentos $\beta 1-\alpha 4$ y $\beta 5-\alpha 8$, para clonarlos en el plásmido pbg18 y el fagémido pM846, respectivamente. Para confirmar que el plásmido contenía la inserción del gene se hizo una PCR de colonia usando los oligos empleados para hacer las construcciones, tomando 3 colonias al azar de las cuales 2 contenían el fragmento. A su vez, fue confirmado por secuenciación. El fragmento $\beta 5\alpha 8$ se clonó en pM846 y se verificó la existencia del inserto mediante PCR de 5 colonias al azar, de las cuales todas contenían el inserto, lo cual se confirmó mediante la secuencia. Estos resultados se pueden observar en las figuras 10 a) y b).

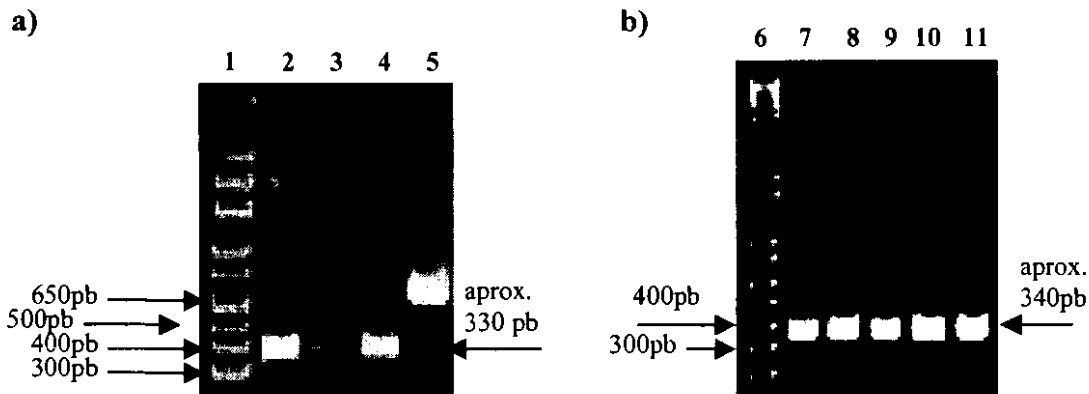


Figura 10. Geles con productos de PCR: a) $\beta 1\alpha 4$ en *pbgs18* y b) $\beta 5\alpha 8$ en *pM846*

Las muestras están en el siguiente orden: Carril 1. Marcador de peso molecular de 1kb ladder plus; Carril 2. PCR control $\beta 1\alpha 4$ de *pUC18*; Carril 3. PCR colonia A *pbgs- $\beta 1\alpha 4$* ; Carril 4. PCR colonia C *pbgs- $\beta 1\alpha 4$* ; Carril 5. PCR control PRAI de *pUC18*; Carril 6. Marcador de peso molecular 1kb ladder plus; Carriles 7. al 11. PCR de 5 colonias de *pM846- $\beta 5\alpha 8$* .

Una vez obtenidas las clonaciones de los fragmentos, se electroporó primero el plásmido *pbgs18- $\beta 1-\alpha 4$* en la cepa *JMB9 $\Delta trpF$* y se obtuvieron células electrocompetentes conteniendo a este plásmido. Posteriormente se llevó a cabo la electroporación del fagémido *pM846- $\beta 5\alpha 8$* en la misma cepa con el plásmido *pbgs18- $\beta 1-\alpha 4$* .

La existencia de ambos plásmido y fagémido dentro de la cepa de selección, la cual ya era segura por la selección a los dos antibióticos (amp y km), se confirmó por PCR de DNA de colonias tomadas al azar usando los 4 oligos que son los que flanquean cada inserto (2 para el plásmido, 2 para el fagémido), así como por restricción y por secuenciación. Las secuencias obtenidas correspondieron a la construcción diseñada, sin mutaciones, ni deleciones ni inserciones.

Las células resultantes de la doble transformación y previamente lavadas, se platearon en medio sólido VB más los antibióticos correspondientes (amp y km). En medio de selección se observó crecimiento de $\beta 1\alpha 4/\beta 5\alpha 8$ luego de 3-4 días de incubación a 37°C, así como del control positivo PRAI silvestre. Esto nos indica que hay complementación de fragmentos aún cuando éstos están en 2 sistemas por separado dentro de la misma célula. En medio rico, la construcción $\beta 1\alpha 4/\beta 5\alpha 8$ y todos los controles crecen en un periodo de

12 a 24 horas debido a que no hay limitación por la falta de triptofano. Esto se puede observar en las figuras 11 y 12.

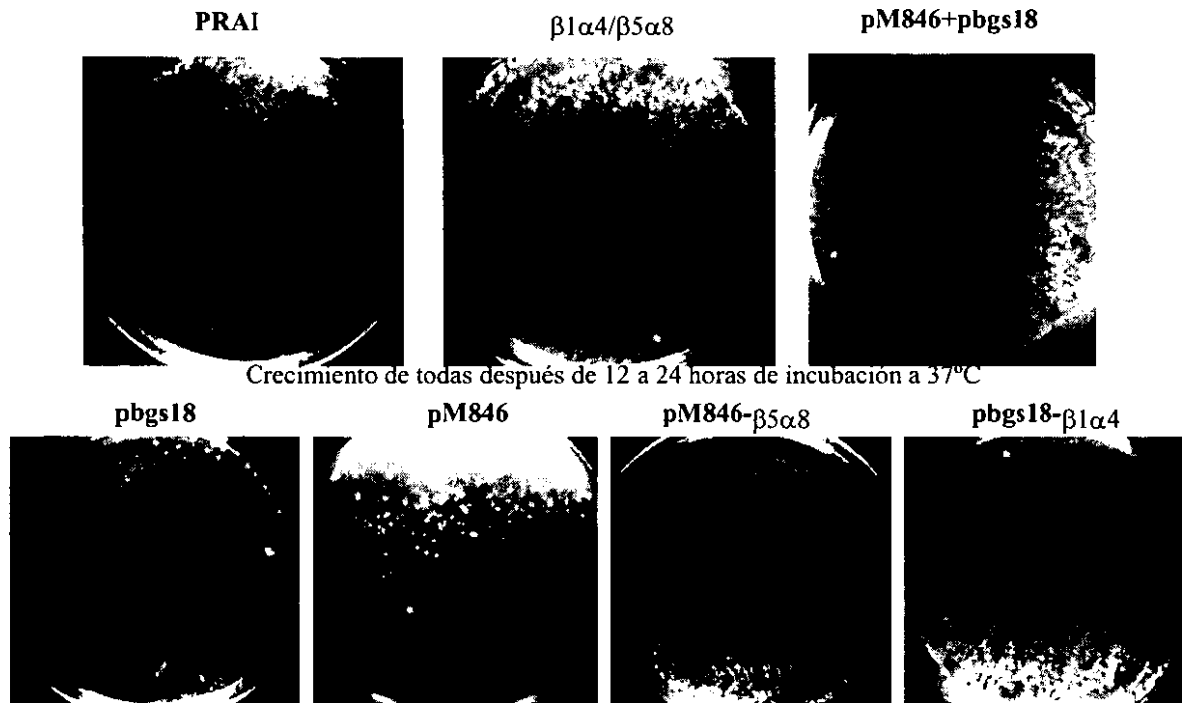


Figura 11. Crecimiento de dobles transformantes y controles en cajas LB

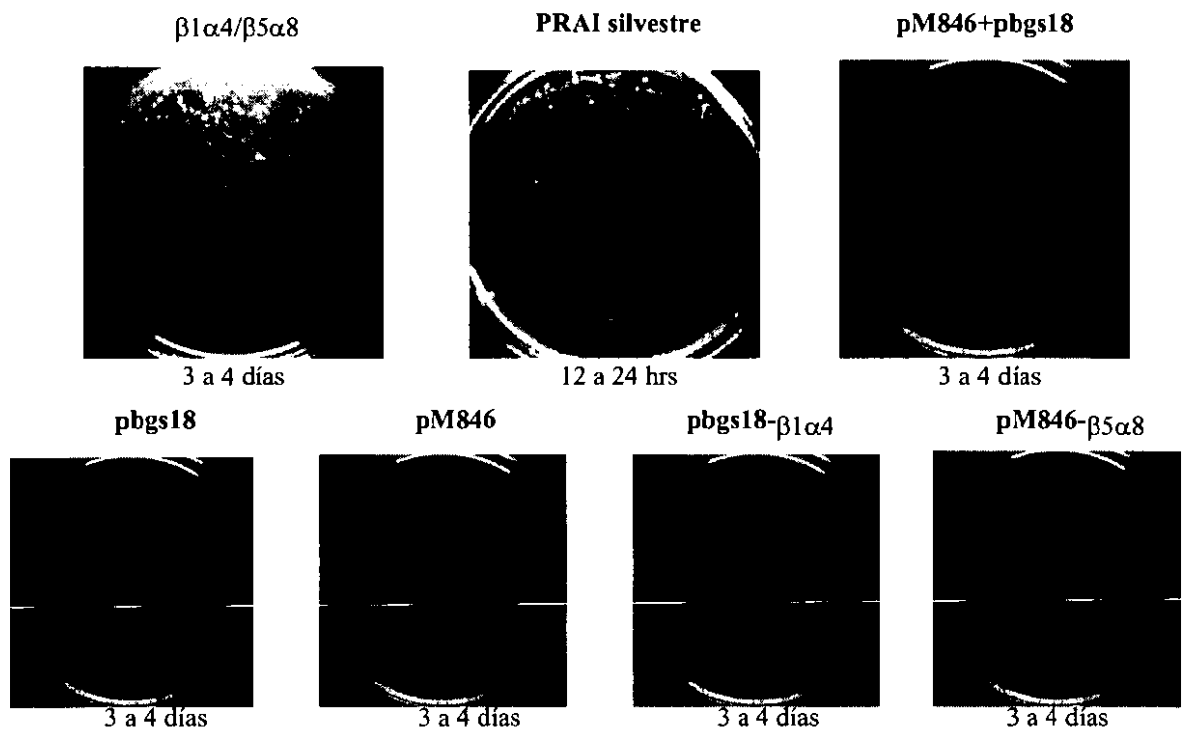
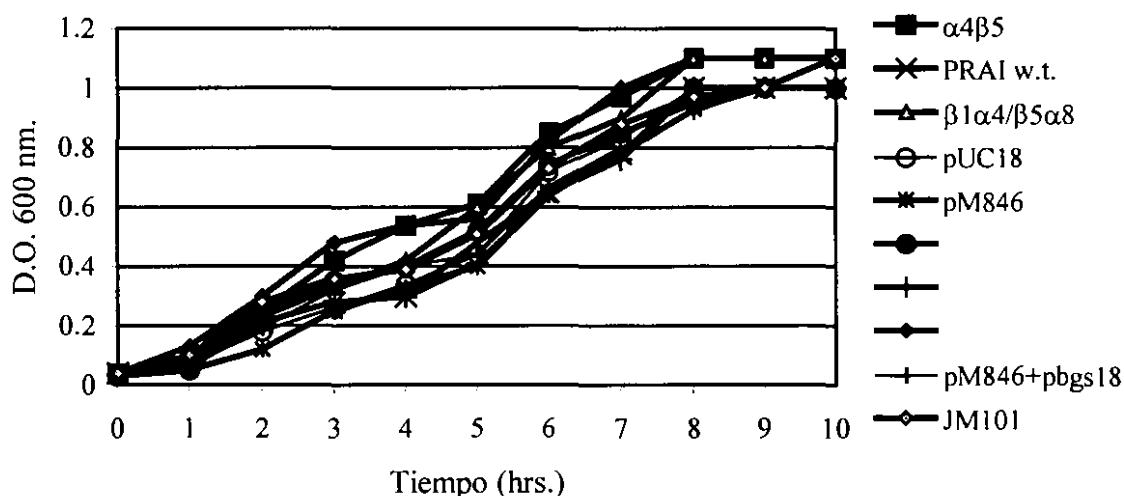


Figura 12. Crecimiento de dobles transformantes y control PRAI en cajas VB

5.5 Cinéticas de crecimiento de la cepa JMB9 $\Delta trpF$ complementada con los fragmentos de PRAI clonados independientemente en 2 vectores

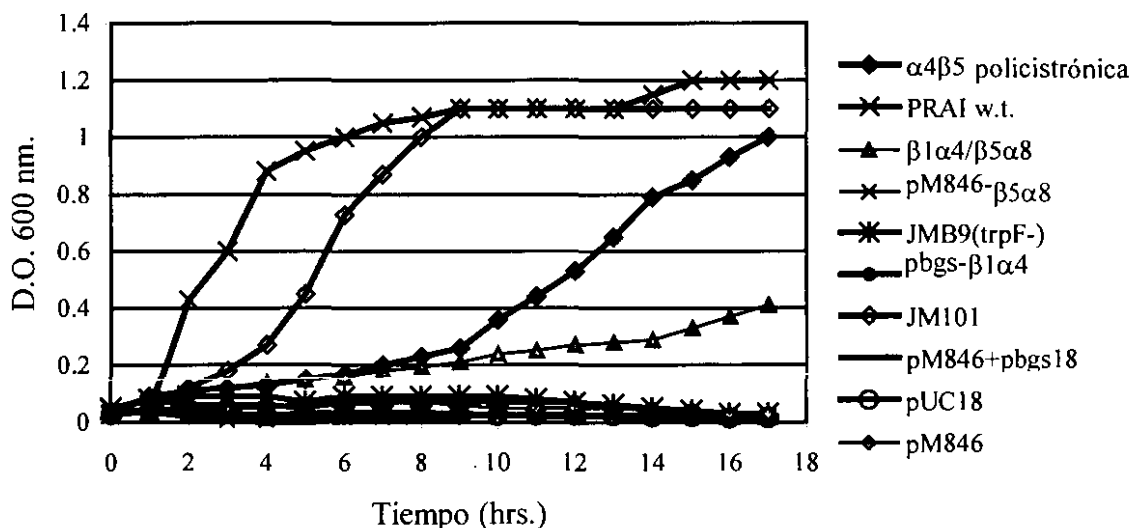
Se estudió la cinética de crecimiento de células JMB9 $\Delta trpF$ conteniendo la construcción pbgs- $\beta 1\alpha 4$ /pM846- $\beta 5\alpha 8$ y otros controles, tanto en medio LB como en medio selectivo VB. Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14.

Figura 13. Cinéticas de crecimiento en medio LB



* $\alpha 4/\beta 5$ se refiere a la construcción de PRAI policistronica en pUC18 y $\beta 1\alpha 4/\beta 5\alpha 8$ son las mitades de PRAI en 2 vectores.

Figura 14. Cinéticas de crecimiento en medio VB



Como se pudo observar en la figura 13, en medio LB, en el cual no existe limitación por triptofano, tanto las células conteniendo las construcciones como las que contienen los controles crecen en forma parecida. En medio de selección VB se observa sólo el crecimiento de $\beta 1\alpha 4/ \beta 5\alpha 8$ lo cual indica que si hay complementación de fragmentos aún estando en 2 sistemas por separado dentro de la misma célula. Aunque, como se puede observar en las gráficas, se ve un retardamiento en la velocidad de crecimiento comparada con la construcción en que los dos fragmentos forman parte de un policistrón. Esta diferencia quizás se debe a que en el gene policistrónico, los fragmentos se están produciendo en el mismo ribosoma, lo que probablemente permite que se encuentren y se unan de manera más rápida que teniendo el gene separado en dos vectores distintos, donde ahora son traducidos en ribosomas diferentes, lo cual podría impedir un encuentro rápido de ambos fragmentos traducidos.

Cabe mencionar que ninguno de los plásmidos conteniendo los fragmentos por sí solos presentaron actividad de PRAI.

- Por lo tanto la construcción de 2 fragmentos por separado $\beta 1\alpha 4/ \beta 5\alpha 8$ complementa para dar la función de PRAI como se pudo observar utilizando el sistema de selección.

5.6 Prueba de complementación mediante infección

Se sabe que mediante fagos, las frecuencias de infección son mucho más eficientes que otros medios de transformación de material genético. Al expresar uno de los polipéptidos en un fago donde se pueden obtener hasta 10^{10} variantes y otro en un plásmido donde obtenemos otra cantidad similar de variantes (10^6), al hacer la transfección se puede obtener una mayor variabilidad (10^{12}).

Para llevar a cabo una infección con fago filamentoso se requiere la presencia del pili, codificado en el plásmido F' y que interviene en la adsorción de los fagos a la superficie celular. Para determinar si la cepa JMB9 $\Delta trpF$ del sistema de selección es F⁺ o F⁻ se hicieron pruebas iniciales de infección.

5.6.1 Resultados de la prueba inicial de infección

Usando diluciones de fagos R408 y ExAssist de 10^{-3} a 10^{-13} se obtuvieron los siguientes 4 resultados:

Fago \ Cepa	Fago R408 * 10^{-3} a 10^{-13} (2 veces)	ExAssist 10^{-3} a 10^{-13} (1 vez)
JMB9	-	-
XL1-BLUE	+	+

→ Cero placas

Tabla 5. Resultados de la prueba inicial de infección

- No hay formación de placas por lo que la cepa JMB9 no es infectable por fago, es una cepa F^- .

Debido a estos resultados, fue necesario hacer una conjugación bacteriana para que nuestra cepa JMB9 sea F^+ .

5.6.2 Conjugación bacteriana y selección de genotipo

Ya que es necesario contar con una cepa F^+ para poder llevar a cabo la infección, se llevó a cabo una conjugación bacteriana entre la cepa de selección JMB9 $r^- m^+ \Delta trp F$ de *E. coli* y la cepa XL1-BLUE $MRF^+ tc^r$ de *E. coli*. Se sembraron en medio sólido LB más antibiótico tc, diluciones de conjugación desde 10^{-2} hasta 10^{-5} , además XL1-BLUE y JMB9 como controles.

Para seleccionar el genotipo deseado, $F^+ \Delta trp F tc^r$, de las cajas sembradas con las diluciones de conjugación 10^{-4} y 10^{-5} se repicaron 200 colonias al azar en medio rico LB con antibiótico tc que es el marcador de selección que posee el plásmido F^+ . De estas 200 colonias se tomaron las primeras 25 y se pusieron a crecer por duplicado, en medio líquido tanto VB como LB ambos con antibiótico tc. Lo que se esperaría es que un 33.3% de las colonias fueran $F^+ \Delta trp F tc^r$ como se muestra en la tabla siguiente, donde + significa que hay crecimiento y - que no hay crecimiento:

Genotipo	$F' \Delta trpF tc^r$	$F' trp^+ tc^r$	$\Delta trpF tc^s$
Medio de cultivo			
Medio LB + tc (con trp)	+	+	-
Medio VB + tc (sin trp)	-	+	-

Tabla 6. Criterios de selección de genotipo

Como control negativo se tomó a la cepa original JMB9 $\Delta trpF$ y como control positivo a la cepa XL1-BLUE. Aparentemente 9 de las 25 colonias morían en medio VB tc líquido, obteniéndose un valor muy cercano al 33% esperado. De estos nueve cultivos se tomaron 5 μ l, previamente lavados con medio líquido VB, para sembrar una gota en caja tanto con medio sólido VB como LB, más antibiótico tc. Finalmente 8 de las 9 muestras no presentaron crecimiento en medio VB indicando que presentan el genotipo deseado (ver figuras 15 y 16). Posteriormente se tomó una de estas colonias del medio LB para aislarla y probarla como cepa JMB9 $F' \Delta trp F$.



Figura 15. Nueve colonias conjugantes en LB tc

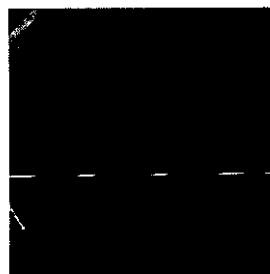


Figura 16. Nueve colonias conjugantes en VB tc

5.6.3 Prueba de infección de la cepa F'

Una vez seleccionadas las células F' $\Delta trpF$ tc^r se infectaron de nuevo con el fago R408 logrando verificar que permiten infección, debido a la presencia del F'. Esto se muestra en la siguiente figura:



Figura 17. Placas de lisis de células JMB9 F' infectadas con fago R408

5.6.4 Pruebas de recuperación de la actividad

Una vez obtenida la cepa de selección JMB9 F' $\Delta trpF$, se electroporó en ella al plásmido pbgs18- $\beta 1\alpha 4$ y se procedió a hacer las pruebas de infección con mezclas de fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$ + fagémido pM846 sin inserto así como solamente con pM846- $\beta 5\alpha 8$ como control positivo y con pM846, como control negativo.

Cada vez que se llevó a cabo la infección de las células $\beta 1\alpha 4$ -JMB9, se plateó en medio sólido LB y en VB con antibióticos tc , km y amp . En todas las ocasiones se observó la presencia de colonias en medio sólido LB. La presencia de crecimiento bajo estas condiciones indica la existencia del fagémido dentro de la célula por la resistencia que presenta a la ampicilina, por lo que la inserción del material genético mediante infección sí se llevó a cabo.

Sin embargo, al infectar con pM846- $\beta 5\alpha 8$ + pM846 así como con el fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$ solo, en ninguno de los dos casos se observó crecimiento en medio VB.

Ahora bien, antes de infectar se secuenciaron tanto el plásmido pbgs18- $\beta 1\alpha 4$ como el fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$ por separado y después de la infección se seleccionaron algunas colonias tomadas al azar de las cajas de medio LB. Estas últimas fueron secuenciadas dos veces y por ambas cadenas.

La secuencia del plásmido pbgs18- β 1 α 4 previa a la infección coincide perfectamente con la secuencia obtenida del mismo, después de la infección. La secuencia de la cadena sencilla extraída del fagémido pM846- β 5 α 8 previa a la infección es correcta y completa. Las secuencias de las muestras tomadas después del proceso de introducción de pM846- β 5 α 8 en forma de fago a la célula están incompletas y muestran secuencias desconocidas y diferentes a lo que es en realidad la secuencia del fragmento β 5 α 8; otras presentan mezclas de secuencia del final de β 5 α 8 seguida de una secuencia del fagémido pM846 que corresponde a una región 600 bases abajo del codón de término del fragmento β 5 α 8. Basada en esto, pienso que esta mezcla o cambio de secuencias que aparecen se puede deber a posibles fenómenos de recombinación.

- Por lo tanto, usando este sistema en particular de plásmido pbgs18/fagémido pM846, no obtuve complementación de los fragmentos de la enzima PRAI mediante la introducción de uno de ellos por proceso infeccioso.

5.7 DISCUSION

En el presente trabajo se fragmentó el gene de la proteína fosforribosil antranilato isomerasa de *E. coli* en tres sitios dirigidos para probar la complementación de sus fragmentos *in vivo*. En este caso, el gene de la proteína queda expresado como un policistrón, ya que en la secuencia original se inserta un codón de término, sitio de unión a ribosoma y codón de inicio entre los dos fragmentos que se desean separar, expresándose en dos partes. Así se obtuvieron las tres mutantes fragmentadas entre α 2 y β 3, α 4 y β 5, y α 6 y β 7 respectivamente, de las cuales la construcción separada en el asa entre α 4 y β 5 complementa para dar un gene de PRAI funcional.

En referencia al antecedente de complementación de fragmentos de PRAI, cabe señalar que el trabajo realizado con la PRAI de *S. cerevisiae* fragmentada entre α 6 y β 7 (Kirchner, et al. 1992), a pesar de intentarse *in vivo*, nunca pudo darse una complementación con la suficiente afinidad para que la célula sobreviviera.

Asímismo no se puede saber con certeza hasta qué punto pueden ser afectadas las interacciones entre el primer fragmento traducido y el segundo, de tal forma que se pueden

hacer inestables, susceptibles a degradación o no se llega a un plegamiento correcto. Y quizás debido a esto no se pudo presentar un encuentro de los fragmentos no complementantes $\alpha 2/\beta 3$ y $\alpha 6/\beta 7$.

Se decidió seguir trabajando con el resultado de $\alpha 4/\beta 5$, donde ahora la meta fue separar cada uno de los 2 fragmentos que complementan en dos sistemas por separado. Esto con la idea de generar mayor variabilidad, como se había mencionado en los antecedentes, en términos de aplicaciones a proyectos futuros de evolución dirigida y/o migraciones catalíticas a realizarse en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón, ya que al mutagenizar fragmentos y no el gene completo se puede obtener una mayor diversidad al hacer la combinación de cada mitad mutagenizada.

Se llevó a cabo la prueba de complementación de fragmentos mediante la doble transformación de dos vectores en la cepa de selección, cada uno portando una de los fragmentos de PRAI. En este caso, se usó el plásmido pbgs18 conteniendo la primera mitad y el fagémido pM846 contenía la segunda mitad de PRAI.

El resultado fue favorable al lograrse de nuevo la complementación de las mitades para dar la función de PRAI. Con éste se piensa llegar a la obtención futura de un gran número de variantes, mediante la aplicación de un método que permita obtener bancos de mutantes de cada fragmento separado, sabiendo que se cuenta con el sistema de selección y que se da la complementación de fragmentos.

Para ello, se hizo una última prueba de complementación usando al fagémido pM846 (con y sin fragmento) en forma infecciosa, esto por la mucho mayor eficiencia de introducción de DNA por infección, con miras a la obtención de una mayor variabilidad que por electroporación.

En este caso se tuvo que empezar por llevar a cabo una conjugación bacteriana, ya que después de algunas pruebas de infección con fagos, la cepa de selección JMB9 $\Delta trpF$ resultó ser F^- . Una vez obtenida y comprobada esta cepa como F^+ se procedió a intentar la complementación, infectando a la cepa de selección conteniendo el plásmido pbgs18- $\beta 1\alpha 4$ con el fagémido pM846- $\beta 5\alpha 8$ así como con el fagémido pM846 sin inserto, y también con mezclas de ambos. Después de varios meses de trabajo no logré ver esta complementación.

El hecho de obtener secuencias totalmente distintas a las del fragmento original $\beta 5\alpha 8$ clonado en el fagémido pM846 indican que algo sucede dentro de la célula y solamente cuando se introduce el material genético en forma de fago suceden estos fenómenos, ya que cuando se electroporaron ambos vectores nunca hubo cambios en las secuencias. Pienso que esto es debido quizás a posibles fenómenos de recombinación del fagémido y a otros factores que no son completamente entendibles aún. Ya que otros grupos que han trabajado con este sistema han reportado este tipo de problemas, este sistema (pM846) actualmente está en desuso.

Ahora bien, aún no se establece si es posible la complementación de fragmentos de la enzima PRAI introduciendo un fragmento mediante proceso infeccioso, por lo que la elección de un mejor sistema ya probado y comprobado será necesario.

Por otro lado, es bien sabido que para que dos plásmidos puedan coexistir de forma estable dentro de una misma célula bacteriana, deben tener distinto origen de replicación. En el caso del plásmido pbgsl8, este contiene el replicón derivado de pMB1 (relacionado con origen ColE1) el cual es de alto número de copias (de 500 a 700). El fagémido pM846, además de tener el origen de replicación fl de fago, contiene el origen p15a de plásmido que es de bajo número de copias (de 10 a 12).

Con esto se cumple el requisito de que sean distintos los replicones bajo una misma célula. Pero siendo así, en este caso hay una gran diferencia entre un fragmento y otro con respecto al número de copias, lo cual hace especular acerca de qué tanto afecta esto a la disponibilidad y acceso de una mitad con respecto a la otra. Diferencia que no se sabe si influye o no en el encuentro y correcta complementación de ambos fragmentos. Quizás por eso crece más lenta en medio de selección VB la célula conteniendo PRAI que viene de dos vectores que la construcción policistrónica.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

- El sitio de interrupción del gene de PRAI, para la expresión de fragmentos que complementan y permiten su actividad, fue identificado entre los residuos Prolina 350 y Alanina 351, sitios que en la estructura corresponden al asa entre la alfa hélice 4 y la hebra beta plegada 5 del barril. Esta complementación de los fragmentos para dar una proteína PRAI funcional se da *in vivo*, tanto con el gene dividido en forma policistrónica como con los dos fragmentos en dos sistemas por separado, ambos dentro de la cepa de selección.
- Cabe señalar que esta complementación *in vivo* de un barril TIM dividido a la mitad (en 2 fragmentos $(\beta\alpha)_4$) no ha sido reportado anteriormente.

6.2 PERSPECTIVAS

- Este trabajo es una parte de un proyecto que comprende el estudio de algunos barriles TIM con fines de hacer evolución dirigida, con miras a migraciones catalíticas. Por ello se debe partir de una enzima en la que la complementación de fragmentos no sea una limitante de la actividad. Es por ello que dado los resultados obtenidos en este trabajo, resulta imprescindible aumentar la “afinidad” o fuerza con que se complementan los fragmentos formados.

Una de las metas a alcanzar es reforzar esta unión basados en algunos trabajos como los de Pelletier y colaboradores, donde se tiene contemplado probar una estrategia alternativa de complementación de fragmentos ayudada con “*zippers*” de leucina para mejorar complementación y actividad (Pelletier, et al, 1998; Pelletier, et al, 1999), esto reflejado en un menor tiempo de aparición de colonias en medio de selección. Actualmente, en el laboratorio ya se está trabajando en esta estrategia.

- Es viable el pensar en mutagenizar cada fragmento por separado y buscar un sistema alternativo de fagémido-plásmido para generación de variabilidad.
- A esto se puede añadir el llevar a cabo la búsqueda al azar de posibles sitios que den fragmentos capaces de ensamblarse para dar una proteína funcional y no solo en la PRAI sino también en otros barriles TIM.
- Sería interesante intentar rescatar y probar las dos construcciones que no logran complementación ($\alpha 2/\beta 3$ y $\alpha 6/\beta 7$). Esto aplicando también una estrategia de complementación de fragmentos con “*zippers*” de leucina.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABI PRISM. Big Dye terminator cycle sequencing, Chemistry Guide Perkin Elmer. Part Number 903563. Version A. May 1995. Perkin Elmer Corp. USA.

Altamirano, M.M., Blackburn, J.M, Aguayo, C. & Fersht, A. 2000. Directed evolution of new catalytic activity using the α/β barrel scaffold. *Nature* 403:617-622.

Aujame, Luc, Sodoyer, Régis & Geoffroy, Frédérique. 1994. A new phage display system to control multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires. *Gene* 151:109-11.

Bertolaet, Bonnie L. & Knowles, Jeremy R. 1995. Complementation of Fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry* 34: 5736-5743.

Blundell, Elliot, Gardner, Hubbard, Islam, Johnson, Mantaounis, Murray-Rust, Overington, Pitts, Sali, Sibanda, Singh, Sternberg, Sutcliffe, Thornton & Travers. 1989. Protein engineering and design. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 324: 447-460

Cleland, J., Jones, A.. & Craik, C.S., Introduction to Protein Engineering. Protein engineering. Principles and Practice. Chapter 1, 1-3. 1995.

Cramer, A., Raillard, S., Bermudez, E. & Stemmer, W.P.C. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391: 288-291.

Cunningham, B. C. & Wells, J. A. 1989. High resolution epitope mapping h-GH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244:1081.

De Prat Gay, Gonzalo & Fersht, Alan. 1994. Generation of a Family of Protein fragments for structure-folding studies. 1. Folding complementation of 2 fragments of Chymotrypsin Inhibitor-2 formed by cleavage at its unique methionine residue. *Biochemistry* 33:7957-7970.

Dykhhoorn, D. M., St. Pierre, R., Van Ham, O. & Linn, T. 1997. An efficient protocol for linker scanning mutagenesis: analysis of the translational regulation of an *E. coli* RNAPol subunit gene. *Nucleic Acids Research* 25(21):4209-4218.

Eder, Jörg & Kirschner, K. 1992. Stable substructures of 8-fold $\alpha\beta$ -barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry* 31(14): 3617-3125

Farber, Gregory K. & Petsko, Gregory A. 1990. The evolution of α/β barrel enzymes. *TIBS* 15:228-234

Geoffroy, Frédérique, Sodoier, Régis & Aujame, Luc. 1994. A new phage display system to construct multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires. *Gene*, 151:109-113.

Gerlt, John A. 2000. New wine from old barrels *Nature Structural Biology* 7(3):171 - 173

Gustin, Kurt E. & Burk, Robert D. 1993. A rapid method for generating linker scanning mutants using PCR. *Biotechniques* 14:22-24

Jasanoff, Alan, Davis, Benjamin & Fersht, Alan 1994. Detection of an Intermediate in the Folding of the $(\alpha\beta)_8$ -Barrel N-(5'-Phosphoribosyl) anthranilate Isomerase from *E. coli*. *Biochemistry*, 33: 6350,-6355.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. & Sterner, R. 2000. Directed evolution of a $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. PNAS, 97(18): 9925-9930.

Kirschner, Hommel, Bolewska, K., Tsai-Pflugfelder, M. & Eberhard, M. 1995. Indolglycerol Phosphate Synthase-Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase : Comparison of the bifunctional enzyme from E. coli with Engineered Monofunctional Domains. Biochemistry, 34: 5419-5428.

Kuchner, O. & Arnold, F. H. 1997. Directed evolution of enzyme catalysts. TIBTECH 15:523-530

Lesk, A. M., Brandén, C. I. & Chothia, C: 1989. Structural principles of α/β barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. Proteins 5: 139-148

Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J. & Kirschner, K. 1989 Correct folding of circularly permuted variants of $\alpha\beta$ barrel enzyme in vivo. Science 243: 206-210

Matthews, R.C., Wasta, S.A, Perkons, I.A., Gualfetti, P.J. & Zitzewitz, J.A. 1999. Identifying the structural boundaries of independent folding domains in the α subunit of tryptophan synthase, a $(\beta/\alpha)_8$ barrel protein. Protein Science, 8: 1200-1209.

Miles, E.W., Yutani, K. & Ogasahara, K. 1982. Guanidine hydrochloride induced unfolding of the α subunit of tryptophan synthase and of the two α proteolytic fragments : Evidence for stepwise unfolding of the two α domains. Biochemistry, 21: 2586-2592.

Miller, Jeffrey H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.

Messing, J.B. 1983. New vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-78

Nichols, B.P., Winkler, M.E., Kaplan, J.B. & Ross, C.M. 1990. An evolutionary Comparison of *Acinetobacter calcoaceticus* *trpF* with *trpF* Genes of Several Organisms. *Mol. Biol. Evol.*, 7(1): 74-81.

Nihalani, D., Kumar, R., Rajagopal, K. & Sahni, G. 1998. Role of the amino-terminal region of streptokinase in generation of fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides. *Protein Science* 7:637-648

Ostermeier, M., Nixon A.E., SMI, J.H. & Benkovic, S.J. 1999. Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:3562-4567.

Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.X. & Michnick, S. 1998. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 12141-12146.

Pelletier, J.N., Arndt, K.M., Plückthun, A. & Michnick, S. 1999. An in vivo library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions. *Nature Biotechnology.* 17: 683-690

Priestle, J.P., Grutter, M.G., White, J.L., Vincent, M.G., Kania, M., Wilson, E., Jardetzky, T.S., Kirschner, K. & Jansonius, J.N. 1987. Three Dimensional structure of bifunctional enzyme N-5`phosphoribosyl anthranilate isomerase-indole-3-glycerol-phosphate synthase from *E. coli*.. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:5690-5694

Reardon, D., Farber, G. K. 1995. The structure and evolution of $(\beta\alpha)_8$ barrel proteins. *FASEB J.* 9: 497-503

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. eds. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y.

Sblattero, Daniel & Bradbury, Andrew. 2000. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology*. 18:75-80.

Sodoyer, R., Aujame, L., Geoffroy, F., Pion, C., Peubez, I., Montègue, B., Jaquemont, P. & Dubayle, J. 1996. Multicombinatorial Libraries and Combinatorial Infection: Practical considerations for vector Design. Chapter 12 in *Phage Display of Peptides and Proteins*. Edited by Kay, B., Winter, J. & McCafferty, J. Academic Press. 215-226

Stemmer, W.P.C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* (370), 389-391.

Sterner, R., Dahm, A., Darimont, B., Ivens, A., Liebl, W. & Kirschner, K. 1995. ($\beta\alpha$)₈-barrel proteins of tryptophan biosynthesis in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *EMBO Journal*. 18 (14): 4395-4402.

Wilmanns, M., Hyde, C., Davies, D., Kirschner, K. & Jansonius, J., 1991 Structural conservation in Parallel β/α - Barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of Tryptophan Biosynthesis. *Biochemistry*, 30: 9161-9169

Wilmanns, Matthias & Eder, Jörg. 1992. Protein Engineering of a Disulfide Bond in a β/α -Barrel Protein. *Biochemistry*, 31:4437-4444.

Wolf, Y.I., Brenner, S.E., Bash, P.A. & Koonin, E.V. 1999. Distribution of protein folds in the three superkingdoms of life. *Genome Research*. 9(1): 17-26.