

00591
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo de investigación.
NOMBRE: RUBEN PAUL GAYTAN COLIN
FECHA: 13 FEB 03
FIRMA: RUBEN PAUL GAYTAN.

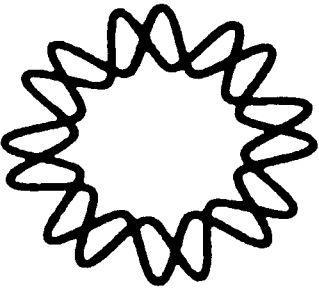
NUEVAS ESTRATEGIAS DE SINTESIS DE DNA PARA LA EVOLUCION DIRIGIDA DE PROTEINAS: GENERACION Y ENRIQUECIMIENTO DE BIBLIOTECAS CON MUTANTES DE BAJA MULTIPLICIDAD.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A:
RUBEN PAUL GAYTAN COLIN

Cuernavaca, Morelos.

Febrero de 2003.

A





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A Sara y Nancy con todo mi amor y respeto.

B

**Esta tesis se realizó en la Unidad de Síntesis
del Instituto de Biotecnología (UNAM), bajo la
asesoría del Dr. Francisco Xavier Soberón
Mainero.**

C

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Virginia Colín[†] y Lucio Gaytán, quienes literalmente sacrificaron la vida por sus siete proyectos. Un verdadero ejemplo a seguir.

A mis hermanos, por su plena solidaridad y cariño incondicional.

A Gaby Flores porque sin su amistad y enseñanzas este proyecto hubiese demorado unos cuantos años más.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Eugenio López, J. Arturo Yañez, Santiago Becerra y Tere Hernández por su paciencia hacia mi neurosis crónica, pero sobretodo por su invaluable amistad y ayuda técnica.

A los Dres. Xavier Soberón, Lorenzo Segovia y Roberto Martínez (Instituto de Química) por sus críticas y sugerencias como tutores.

A mi jurado revisor de tesis integrado por los Dres. XS (nuevamente), Baltazar Becerril, Guillermo Delgado, Patricia García, Jesús Silva, Brenda Valderrama y Gloria Saab. Con esos amigos para que quiero enemigos.

A Joel Osuna, Ricardo Grande, Angel Dago, Luis del Pozo, Gaby Montero, Martha Argüello y Enrique Morett por creer en mi tecnología y ayudarme a valorar algunos de mis métodos de mutagénesis. Aun estoy en deuda con ellos, pero no lo olvido.

A René Hernández, Timoteo Olamendi y Maricela Olvera por su amistad, pero también por su valioso soporte en la secuenciación de las clonas resultantes de este proyecto. Por cierto, fueron muchas.

A Filiberto Sánchez por su amistad y valiosa ayuda técnica. Aunque le sugiero ponerse las pilas.

Al Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM (Morelos) por proporcionarme análisis de resonancia de buena calidad para confirmar la veracidad de los compuestos sintetizados. Especialmente a Marcela López y Gaby Vargas.

Al Instituto de Biotecnología (UNAM) por permitir mi superación profesional.



INDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	3
Ingeniería y evolución de proteínas	3
Propiedades proteicas alterables	5
Construcción de bibliotecas	6
Monitoreo y selección de mutantes	7
Síntesis química de DNA	9
Síntesis de DNA en fase sólida	9
Grupos protectores usados en síntesis de DNA en fase sólida	10
Método de ensamble	10
Recapitulación	12
Antecedentes	15
Objetivos	20
Resultados y discusión	21
<i>Mutagénesis basada en trinucleótidos</i>	21
Selección del grupo protector de fosfatos internucleotídicos	21
Síntesis de Fmoc-trinucleótido fosforamiditos	28
Evaluación biológica	35
<i>Mutagénesis basada en dinucleótidos</i>	41
Síntesis de Fmoc-dinucleótido fosforamiditos	41
Evaluación biológica	45
Discusión de las mutantes de la β -lactamasa TEM-1 resistentes a ceftazidima	53
Discusión de la variabilidad generada con dinucleótidos	56
Conclusiones Generales	63
Materiales y Métodos	65
Consideraciones generales	65
Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidina (DMTr-dT)	65
Síntesis de 5'-O-(9-fluorenilmetoxycarbonil)monómeros (Fmoc-dT, Fmoc-dA ^{bz} , Fmoc-dC ^{bz} , Fmoc-dG ^{iBu})	66

Síntesis de 3'-O-(4,4'-dimetoxitritil)monómeros (dT-DMTr, dA ^{bz} -DMTr, dC ^{bz} -DMTr, dG ^{iBu} -DMTr)	66
Síntesis de alquildiclorofosfitos	68
Síntesis de Alquil-N,N-diisopropilaminoclorofosforamiditos	69
Síntesis de 2-trimetilsililetil-N,N-diisopropilaminoclorofosforamidito	69
Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)timidin-3'-O- (N,N-diisopropilamino)-alquilfosforamiditos	70
Síntesis de pentadecatimidilatos parcialmente protegidos	70
Síntesis del monómero Fmoc-dG etilamidito	72
Síntesis del dímero completamente protegido Fmoc-dGC-DMTr	73
Síntesis del monómero Fmoc-dA etil amidito	74
Síntesis del monómero dT-DMTr etil amidito	74
Síntesis del trímero Fmoc-dAGC	75
Síntesis del trímero Fmoc-dGCT –ruta 1)	76
Síntesis del trímero-fosforamidito Fmoc-dAGC etilamidito	76
Síntesis del trímero-fosforamidito Fmoc-dGCT etilamidito	77
Síntesis del dímero dCT-DMTr	77
Síntesis del trímero Fmoc-dGCT –ruta 2-	78
Síntesis del trímero Fmoc-dGCT etil amidito en forma cruda	79
Reactividad del trímero Fmoc-dGCT etilamidito	79
Ensamble del oligo mutagénico GAFTGA	80
Amplificación y clonación del oligo mutagénico GAFTGA	81
Purificación de plásmidos y secuenciación de DNA	82
Bibliografía	83
Artículo de mutagénesis basada en Fmoc-dinucleótidos	90

F

RESUMEN

Actualmente existe un arsenal de estrategias mutagénicas para generar diversidad genética *in vitro* e *in vivo* con el fin de optimizar proteínas naturales a nuevos escenarios de acción. Las modificaciones se pueden realizar a lo largo de todo el gen en forma aleatoria, o bien en regiones específicas que pudieran tener alguna implicación funcional. Las mutaciones pueden ser puntuales o basadas en la sustitución de codones completos. En el caso de sustitución por codones, éstos son introducidos a través de oligonucleótidos sintéticos en dos posibles esquemas: saturación y contaminación. En términos generales, los esquemas de mutagénesis a saturación sólo permiten explorar un espacio de secuencia máximo de 5 aminoácidos por oligonucleótido, favoreciendo las sustituciones múltiples y dificultando en consecuencia el análisis de la relación entre la estructura y función de la proteína de interés. En cambio, en los métodos por contaminación el tipo de mutantes favorecidas es directamente proporcional a la tasa de mutagénesis empleada en el experimento, generando una distribución binomial de variantes predecible. Es decir, una tasa de mutagénesis baja generará preferencialmente mutantes con pocos reemplazos, facilitando el análisis de la relación entre la secuencia de aminoácidos y la proteína modificada.

Sin embargo, a pesar de los avances en los esquemas de mutagénesis basados en codones, hasta antes de este proyecto todavía era obligatorio contender con toda la mezcla de mutantes en los experimentos de clonación, obligando a generar bancos grandes de mutantes con el fin de incluir en la biblioteca biológica todas las variantes. Dado el gran número de clonas modificadas, la aplicación de métodos de monitoreo –screening- elaborados prácticamente estaba limitado. Por tanto, en el trabajo que aquí referimos, se desarrolló la tecnología necesaria para conjuntar por primera vez en el campo de la mutagénesis, a nivel de oligonucleótidos, dos variables pilares de la evolución, **variación** y **selección**. Este concepto permitirá generar bibliotecas depuradas más fáciles de analizar. Basados en esta tecnología, se desarrollaron dos métodos de mutagénesis combinatoria, donde los oligonucleótidos sintéticos fueron aleatorizados a través de trímeros o dímeros y ambos fueron evaluados en distintas proteínas modelo.

El resultado del primer método, basado en el uso de un Fmoc-trinucleótido amidito, fue un mayor enriquecimiento de las mutantes dobles con respecto a las esperadas en la distribución binomial de variantes del banco crudo. Sin embargo, una vez que este método sea optimizado, permitirá generar bancos exclusivos y completos de mutantes sencillas, dobles o triples en

ventanas de hasta 15 aminoácidos. Por ejemplo, si se requiriera hacer un barrido de alaninas de 15 residuos silvestres y se contara con un banco exclusivo de mutantes sencillas en esta región, bastaría analizar sólo 43 clonas para tener una certeza de 95% de encontrar todas las variantes. Al contrario, por el método convencional, habría que sintetizar 15 oligonucleótidos y realizar 15 experimentos de clonación, representando una ardua labor.

El segundo método, basado en el uso de 5 Fmoc-dinucleótido amiditos, permitió generar cocteles de 20 trinucleótidos al combinarse durante el ensamble del oligo con una mezcla de los 4 DMTr-nucleósido amiditos convencionales (A, G, C y T). Esta mezcla codifica a 18 de los 20 posibles aminoácidos, un codón de paro y sólo una redundancia para serina. El proceso de separación de variantes sólo se demostró para oligos de 15 nucleótidos, aunque la frecuencia de cada una de ellas fue plenamente estudiada a través de 5 bibliotecas. Dos de estas bibliotecas se utilizaron para mutagenizar 6 aminoácidos de la enzima β -lactamasa TEM-1, seleccionando mutantes resistentes al antibiótico ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación utilizada en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Algunas de las mejores mutantes obtenidas en los dos experimentos coincidieron con mutantes clínicas y con mutantes de laboratorio previamente descritas. Por tanto, este método de mutagénesis podría aplicarse para evaluar el riesgo de surgimiento de mutantes contra nuevos antibióticos, inclusive antes de las pruebas clínicas.

INTRODUCCION

Sin duda alguna, el siglo XX fue el periodo de las grandes transformaciones químicas que cambiaron el mundo para siempre -bajo la premisa de desarrollar insumos para una mejor calidad de vida- pero también cambiaron el medio ambiente a través de la contaminación del aire, agua y tierra en forma cada vez mas alarmante. Una importante contribución a la solución de este problema de contaminación está en manos de la Biotecnología, para cambiar del uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y sustratos tóxicos a grandes volúmenes de agua como medio de reacción y sustratos biodegradables, usando enzimas como motores de las transformaciones químicas. Sin embargo, la mayoría de enzimas naturales que podrían ser usadas en Biotecnología han evolucionado a través de millones de años para funcionar óptimamente en un organismo localizado en un hábitat, bajo condiciones específicas de presión de selección. De esta manera, si se pretende extrapolar una reacción química intracelular a condiciones *in vitro* [1], será necesario modificar la enzima responsable de tal transformación para lograr la mejor eficiencia en el proceso químico requerido en sus nuevas condiciones de trabajo. Esto representa generar enzimas mutantes con propiedades mejoradas con respecto a las enzimas silvestres, por ejemplo, enzimas con resistencia térmica [2], estabilidad a pHs extremos [3] o bien disolventes orgánicos [4]. Tal tarea se puede abordar a través de ingeniería de proteínas si se cuenta con antecedentes de proteínas homólogas a la de interés, estructuras tridimensionales determinadas por rayos-X y mecanismos finos de reacción propuestos por mutaciones sistemáticas. De otra manera, la mejor opción es a través de Evolución dirigida, la cual se basa en los conceptos claves de la evolución natural, variación al azar, recombinación y selección.

INGENIERIA Y EVOLUCION DIRIGIDA DE PROTEINAS

Uno de los problemas mas importantes y de mayores implicaciones en Biología Molecular, es la comprensión de la relación que existe entre la función de las proteínas, su estructura tridimensional y su secuencia de aminoácidos. Las proteínas son un elemento de estudio de suma importancia, debido a que juegan un papel central en los procesos biológicos, consecuencia directa de su carácter polifuncional. Pueden presentar una actividad meramente estructural, como en el caso de las partículas virales o la queratina del pelo, una actividad catalítica como en el caso de las enzimas, una actividad protectora como en el caso de los anticuerpos o bien una actividad

reguladora como en el caso de muchas hormonas y elementos de control genético como los reguladores transcripcionales [5].

En la literatura existe una vasta información en cuanto a las propiedades físicas, químicas y biológicas de las proteínas en general y de muchas proteínas específicas. Sin embargo, aún es limitada la capacidad de formular nociones suficientemente generales, con capacidad predictiva, sobre las relaciones entre la estructura y función de estas moléculas. En forma simplificada, las preguntas por resolver son:

- Dada su secuencia de aminoácidos, ¿cuál es la estructura tridimensional de la proteína?
- Dada la estructura tridimensional de la proteína, ¿cuál es su función?
- Para una función requerida, ¿qué secuencia generaría una proteína que la cumpliera?

Es paradójico, pero en plena era genómica, cuando ya se descifraron los genomas de un gran número de organismos, incluyendo el nuestro, la solución a las preguntas recién formuladas aún se encuentra distante y requiere la acumulación de más trabajo. De hecho, los avances ocurridos en la tecnología del DNA recombinante han generado una acumulación exponencial de datos en los bancos de secuencias de proteínas, pero al parecer no es suficiente

En el terreno químico, todos sabemos que las enzimas son catalizadores maravillosos caracterizados por presentar especificidades y actividades elevadas. Sin embargo, la evolución sólo ha seleccionado enzimas útiles para sostener el desarrollo de células que viven en su ambiente natural.

Gracias a la tecnología del DNA recombinante se originó la Ingeniería de Proteínas, esto es, la modificación racional del gen que codifica a una proteína, permitiendo generar variantes que presenten uno o más residuos modificados [6]. En este enfoque se estudia primero las propiedades de una proteína de estructura conocida, y posteriormente se proponen alteraciones específicas para probar hipótesis concretas. Las modificaciones se ejecutan a través de una reconstrucción del gen, utilizando oligonucleótidos específicos en los cuales se ha sustituido el codón silvestre por el mutante, denominando a esta metodología mutagénesis sitio-dirigida. Una segunda alternativa, denominada Ingeniería Evolutiva de Proteínas o mutagénesis regional [7], consiste en generar colecciones de variantes que incorporen diversidad con gran eficiencia en zonas preseleccionadas de la proteína, sin necesidad de hipótesis precisas respecto a las implicaciones de cada cambio particular, pero sí con una idea de la importancia de la región. Una tercera opción, radicalmente opuesta a la Ingeniería de proteínas y en consecuencia la más aleatoria de todas, se denomina Evolución Dirigida de Proteínas. Esta metodología consiste en

modificar al azar, a través de mutaciones puntuales todo el gen, buscando seleccionar la mejor variante en forma similar a como ocurre en la naturaleza [8].

En vista del todavía pobre entendimiento en la relación estructura-función en las proteínas, los mejores resultados en la adecuación de proteínas naturales a nuevas o mejores actividades, se han conseguido precisamente a través de ingeniería evolutiva y evolución dirigida. En este contexto, los buenos resultados dependen de la calidad de las bibliotecas de mutantes, combinadas con buenos métodos de selección o bien métodos de monitoreo rápidos y confiables.

PROPIEDADES PROTEICAS ALTERABLES

Las enzimas pueden ejecutar intrincadas reacciones quimiosselectivas, regioselectivas y enantioselectivas, a velocidades de reacción sumamente elevadas, todo bajo condiciones de reacción muy suaves [1]. Aunque son muy atractivas para síntesis química, las enzimas casi siempre presentan problemas para su uso industrial. Entre las principales limitantes se encuentran, catálisis atenuadas sobre sustratos no naturales, baja estabilidad o poca tolerancia a cambios operacionales, baja actividad en medios no acuosos y el requerimiento de cofactores costosos.

En este contexto, un ejemplo muy interesante está representado por la enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, la cual es utilizada a nivel industrial, en combinación con la enzima glucoamilasa para producir glucosa a partir de almidón [1]. El papel de la α -amilasa consiste en fragmentar las cadenas de almidón a oligosacáridos de glucosa, que a su vez son hidrolizados hasta glucosa por la enzima glucoamilasa. Sin embargo, las α -amilasas usadas en los procesos, están restringidas a funcionar a temperaturas elevadas y pH 6 o superior, siendo inestables a pHs bajos [1]. En cambio, el funcionamiento óptimo de las glucoamilasas se da a temperaturas y pHs más bajos, por lo que las condiciones de operación deben modificarse continuamente. A fin de simplificar el proceso, se están haciendo reiterados intentos para generar enzimas mutantes que funcionen óptimamente en las mismas condiciones de reacción. Por ejemplo, a través de repetidos ciclos de mutagénesis al azar, Declerk y colaboradores encontraron que la mutante cuádruple M15T:H133Y:N188S:A209V, a pH 5.0 y 83°C, presentó una estabilidad 23 veces mayor con respecto a la proteína silvestre, es decir, se hizo más estable a menor pH [9] y en consecuencia más compatible con las condiciones de funcionamiento de la glucoamilasa.

Desde un punto de vista químico, resulta interesante citar también el trabajo de Arnold y colaboradores, los cuales han evolucionado artificialmente proteínas naturales para funcionar en

disolventes orgánicos, en razón de que muchos sustratos son insolubles en condiciones acuosas. Por ejemplo, modificaron la subtilisina E -una proteasa- a través de varios ciclos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa y PCR por sus siglas en inglés) mutagénica, para generar una enzima mutante que presentó una eficiencia catalítica 471 veces mayor que la enzima silvestre en 60% de dimetilformamida contra el sustrato peptídico succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide [4]

En la literatura están apareciendo de manera continua una vasta cantidad de ejemplos, donde se cambian las propiedades de proteínas naturales de manera artificial, dependiendo muchas veces el éxito de la calidad de las bibliotecas de mutantes contruidas y de la posibilidad de muestrear un gran número de variantes.

CONSTRUCCION DE BIBLIOTECAS

Actualmente existe una variedad amplia de técnicas para construir bibliotecas de proteínas mutantes, a través de la diversificación del gen silvestre que las codifica. Dicho tema será revisado en la sección de antecedentes. Sin embargo, el primer factor a considerar antes de aventurarse en tal labor, es el tamaño de las bibliotecas, tanto química como biológica. La biblioteca química representa el número de genes modificados que se pueden crear *in vitro*, mientras que la biblioteca biológica representa el número de variantes que realmente se pueden expresar en células, a fin de unir fenotipo y genotipo [10]. Generalmente se pretende que toda la biblioteca química sea incorporada en la biblioteca biológica, a fin de completar el análisis con respecto a la mutante menos representada en la población. Si la técnica utilizada para crear la biblioteca biológica es la **electroporación** de células con DNA plasmídico [11], la eficiencia práctica es de 10^7 variantes [10], y por tanto es inútil que la biblioteca química contenga más de 4.3×10^6 variantes, si se desea completar el análisis con un 90% de certeza de encontrar la mutante menos representada.

Otra opción que permite analizar un gran número de variantes químicas es el despliegue en fagos [12]. Los bacteriófagos filamentosos de *E. coli*, tal como M13, son ideales como vehículos de selección *in vitro*, debido principalmente a las siguientes características:

- contienen genomas pequeños en los que fácilmente se pueden construir bibliotecas grandes;
- las partículas virales son estables a condiciones potenciales de elución, tal como pHs bajos;
- se acumulan con altos títulos (10^{12} /ml), de tal modo que cada clona de una biblioteca puede estar bien representada y

- las clonas extremadamente raras pueden ser enriquecidas a través de ciclos repetidos de selección por afinidad y crecimiento en cultivo.

El método original de despliegue en fagos, consiste en insertar una secuencia exógena de DNA entre los dos dominios del gen pIII de M13, sin destruir su función. El gen pIII codifica una proteína menor de superficie, la cual se localiza en uno de los extremos del fago. El dominio amino-terminal de pIII se une al pilus F de *E. coli* durante la infección, mientras que el dominio carboxilo está unido al virion y participa en la morfogénesis. De esta manera, la secuencia exógena es expresada en la superficie de la partícula viral, en forma inmunológicamente accesible y la mejor variante de una biblioteca puede ser seleccionada por cromatografía de afinidad contra un antígeno específico [12].

Una tercera opción, altamente prometedora para el análisis de un gran número de variantes químicas es el *despliegue en ribosomas* [13], capaz de unir genotipo y fenotipo en condiciones estrictamente *in vitro*. Este método permite seleccionar proteínas con propiedades mejoradas y su correspondiente RNA mensajero, a través del anclaje a un ribosoma. El método consiste en amplificar por PCR una genoteca de variantes –las cuales incluyen una región promotora y un sitio de unión a ribosoma-, transcribirlas a RNA y traducir estos materiales *in vitro* en un sistema libre de células, en presencia de diferentes factores que favorecen la estabilidad de los complejos ribosomales y mejoran el plegado de las proteínas nacientes. A continuación la traducción es detenida por enfriamiento y los complejos ribosomales son seleccionados por cromatografía de afinidad. En el siguiente paso, los complejos ribosomales con propiedades mejoradas son disociados, el mRNA es aislado y se sujeta a transcripción inversa –a través de una transcriptasa reversa- para generar cDNA. Este material es nuevamente amplificado por PCR y es usado para el siguiente ciclo de enriquecimiento. De acuerdo al reporte original de Josef Hanes [13], este método permite analizar bibliotecas de hasta 10^{13} variantes.

MONITOREO Y SELECCION DE MUTANTES

Los métodos de monitoreo de alto rendimiento –robotizados- están siendo cada vez más usados para rastrear proteínas con propiedades mejoradas, ya sea en bibliotecas naturales o artificiales. Sin embargo, el diseño del método de análisis para seguir una actividad particular puede ser un verdadero reto. Se requiere una alta sensibilidad, especificidad para la actividad buscada y una fácil detección de sustratos o productos. El mejoramiento del equipo y el diseño del ensayo son metas constantes en este campo. Generalmente se requiere usar equipo

automatizado o robótico costoso. Muchos reportes recientes ilustran el uso eficiente e ingenioso de técnicas sofisticadas. Por ejemplo, Manfred Reetz reportó el uso de una cámara de infrarrojo, altamente sensible para la detección de microreacciones exotérmicas, a fin de monitorear la acilación enantioselectiva de 1-feniletanol con acetato de vinilo. Esta biotransformación ocurre con un 99% de especificidad hacia el isómero R usando la lipasa de *Candida antarctica* como catalizador [14].

Otras técnicas de nanoanálisis, basadas por ejemplo en espectrometría de masas o electroforesis capilar han sido adaptadas para monitorear hasta 1000 ó 7000 muestras por día, respectivamente. Al montar un método de monitoreo, se prefieren los métodos fisicoquímicos que permitan correlacionar la actividad buscada con la absorción de luz o emisión de fluorescencia [15]. En caso de que el “screening” deba realizarse por métodos químicos, se prefieren las reacciones colorimétricas para una detección rápida.

Si bien en las estrategias de monitoreo o “screening” cada clona de una biblioteca tiene que ser analizada de manera individual, en los métodos de selección sólo las mejores mutantes que son capaces de pasar una prueba son consideradas. Por tanto, los métodos de selección representan la herramienta más poderosa para aislar rápidamente variantes mejoradas. Los métodos de selección *in vivo* dan fácil acceso a mutantes que producen enzimas nuevas, más activas o bien que producen mayores proporciones de ellas. Sin embargo, estos métodos de selección *in vivo* requieren que la enzima expresada confiera una ventaja biológica significativa sobre la ya existente. En vista de esta limitante se han desarrollado estrategias alternas de selección *in vitro*, todas basadas en la unión de fenotipo y genotipo, siendo el despliegue en fagos el sistema más conocido. Los métodos de selección *in vitro* prácticamente siempre recurren a técnicas de cromatografía de afinidad, inmovilizando análogos de estado de transición, anticuerpos, metales, inhibidores suicidas o cualquier molécula que permita separar físicamente las mejores mutantes.

Con respecto a la forma de generar mutantes, un método muy recurrente en biología molecular es a través de oligonucleótidos sintéticos que son incorporados al gen de interés por PCR. Los oligos pueden poseer secuencias específicas mutantes o bien pueden corresponder a mezclas de oligonucleótidos aleatorizados en ciertas bases con el fin de crear bibliotecas combinatorias. Por esta razón y sobretodo porque la tecnología que se desarrolló en el presente trabajo de tesis está basada en la síntesis química de estos materiales, se consideró necesaria la descripción del proceso para su preparación.

SINTESIS QUIMICA DE OLIGONUCLEOTIDOS

El ácido desoxirribonucleico o DNA por sus siglas en inglés, es un polímero biológico cuyos monómeros son los desoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina. Está compuesto por dos cadenas poliméricas antiparalelas, arregladas en forma de doble hélice, unidas a través de puentes de hidrógeno específicos entre las bases adenina-timina y guanina-citosina, haciéndolas complementarias. Cualquier modificación química en alguna de estas bases puede generar un cambio en el patrón de apareamiento y en consecuencia una mutación puntual durante el proceso de replicación.

El DNA es un material muy soluble en agua, consecuencia directa de la presencia de fosfatos ionizables en la cadena y grupos amino primarios en las bases de citosina, guanina y adenina. Sin embargo, su síntesis química requiere condiciones anhidras totales y la protección parcial o permanente de estos centros potencialmente reactivos, incluyendo los hidroxilos terminales 3' y 5' que permitan el acoplamiento internucleotídico específico de cualquier combinación de nucleótidos [16, 17]. En este punto es importante subrayar que el DNA preparado por síntesis química, realmente es DNA de cadena sencilla, representando una sola de las cadenas poliméricas y su preparación no requiere de una cadena templado como ocurre en la síntesis enzimática. El DNA compuesto desde unos cuantos nucleótidos hasta decenas es conocido como oligonucleótido, término que será reiteradamente usado a lo largo de este trabajo.

Aunque la síntesis de oligonucleótidos (oligos) se inició en fase líquida, a finales de la década de los 70 cayó en desuso debido principalmente a la complejidad que representa la purificación de cada producto intermedio por cromatografía en columna y al surgimiento de una poderosa tecnología basada en el ensamble en fase sólida [16].

La mayoría de las aplicaciones biológicas de oligonucleótidos requieren cantidades en el orden de picomolas, por lo que los métodos en fase sólida proporcionan material suficiente para estos ensayos.

SINTESIS DE DNA EN FASE SOLIDA

El ensamble de DNA está fundado en cuatro conceptos básicos [17]:

- El oligonucleótido es ensamblado uniéndose covalentemente a un soporte sólido, donde la síntesis procede en la dirección 3'→5', esto es, en dirección contraria a la síntesis enzimática.
- Los reactivos en solución son adicionados en exceso, dando lugar a reacciones casi cuantitativas.

-Todas las reacciones son realizadas en un solo dispositivo para evitar pérdidas mecánicas de material.

-Los procedimientos son fácilmente automatizados debido a que la elongación de la cadena se logra por medio de ciclos de reacciones repetitivos hasta completar la secuencia planeada.

GRUPOS PROTECTORES USADOS EN SINTESIS DE DNA EN FASE SOLIDA

Los grupos protectores utilizados en síntesis de DNA, pueden ser clasificados en dos tipos [17]:

- Grupos permanentes: aquellos que se mantienen intactos durante el crecimiento del oligo y son removidos solo hasta el final de la síntesis. En esta categoría caen los grupos protectores convencionales de las nucleobases -benzoilo para citosina y adenina e isobutirilo para guanina-, los grupos protectores de los fosfatos internucleotídicos -βcianoetilo- e inclusive el grupo succinilo que se encarga de unir el nucleósido 3'-terminal a través de su hidroxilo 3' con el soporte. Estos grupos son eliminados por hidrólisis básica con NH_4OH concentrado.
- Grupos temporales: son introducidos para asegurar la especificidad de reacción entre los hidroxilos 3' y 5', siendo eliminados en cada ciclo de síntesis. En esta clase cae el grupo dimetoxitritilo (DMTr), el cual se ha convertido en el grupo convencional utilizado para la protección del hidroxilo 5' de los monómeros. DMTr presenta dos ventajas claras sobre otros posibles grupos: 1) es muy voluminoso y por tanto protege selectivamente al hidroxilo primario de los nucleósidos, dejando libre al hidroxilo 3' para su posterior fosforilación; 2) su remoción en condiciones ácidas genera una solución anaranjada brillante que permite cuantificar la eficiencia de acoplamiento de cada uno de los nucleótidos que se van adicionando a la cadena oligomérica.

En la figura 1 se muestra un oligonucleótido completamente protegido, aún unido al soporte de síntesis y se indican los grupos protectores convencionales.

METODO DE ENSAMBLE

El método actual para la síntesis de oligonucleótidos se denomina "método de fosfito-triéster". La razón para llamarlo así, se debe a que uno de los intermediarios formados durante el acoplamiento internucleotídico corresponde a un átomo de fósforo trivalente enlazado a tres alcoholes, formando un fosfito-triéster.

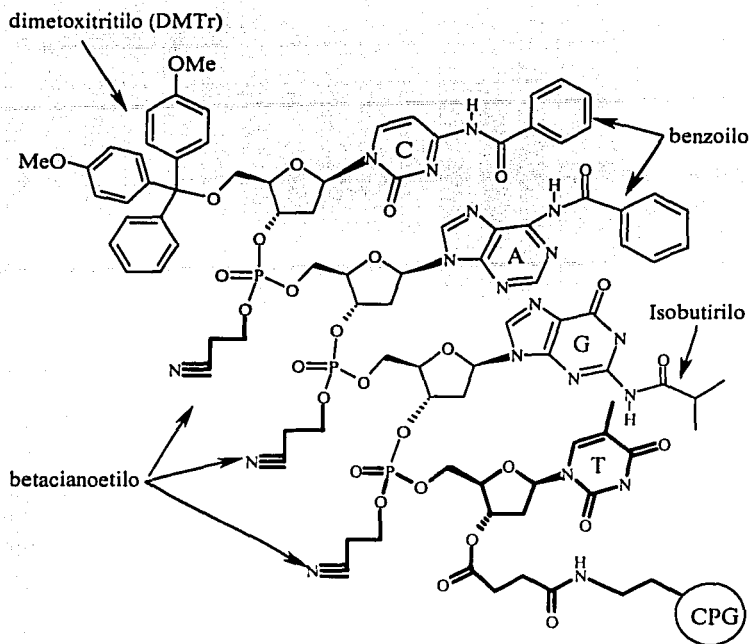


Figura 1. Oligonucleótido convencional, completamente protegido y ensamblado a base de DMTr- β -cianoetil-amiditos en la dirección 3' \rightarrow 5'. CPG representa el vidrio de poro controlado, utilizado como soporte sólido.

A diferencia de la síntesis enzimática de DNA, donde los sustratos son nucleósido-trifosfatos (dNTPs), los sustratos para ensamblar oligos son fosforamiditos, nucleósidos protegidos en el hidroxilo 5' con el grupo DMTr y derivatizados en el hidroxilo 3' con un átomo de fósforo trivalente, que a su vez tiene unido un radical alcohoxilo –normalmente β -cianoetanoetilo- y un grupo dialquilamino como grupo saliente.

Específicamente, la síntesis procede adicionando monómero por monómero, a través de los pasos que se indican en la figura 2 y que se detallan enseguida:

- 1) El grupo DMTr que se encuentra protegiendo al nucleósido inicial, unido al soporte, es removido por hidrólisis ácida.
- 2) El hidroxilo 5' del nucleósido recién desprotegido, se hace reaccionar con un fosforamidito específico (A, G, C o T) y tetrazol como catalizador de la reacción. Esta reacción genera un

dinucleótido enlazado por un grupo fosfito-triéster, procediendo con rendimientos promedio de 98%.

- 3) El 2% de nucleósidos que no reaccionaron, se bloquean por acetilación para evitar que continúen acoplándose con los monómeros que se adicionarán en los ciclos posteriores y evitar secuencias inespecíficas.
- 4) El grupo fosfito-triéster del dinucleótido es inestable a condiciones ácidas, por tanto, antes de verse expuesto a dicho tratamiento en el siguiente ciclo de síntesis es oxidado a fosfato-triéster más estable.
- 5) Los 4 pasos anteriores se repiten hasta completar la secuencia deseada. Finalmente el oligonucleótido es liberado del soporte de síntesis y de los grupos protectores por un simple tratamiento alcalino, quedando biológicamente activo y funcional sin mayor purificación.

El método se ha convertido en el protocolo convencional de síntesis de oligos, desde 1984 [18], debido a las siguientes características:

- Los DMTr-nucleósido fosforamiditos, sobre todo aquellos cuyo fósforo trivalente se encuentra funcionalizado con el grupo diisopropilamino y el grupo β -cianoetilo, son estables en acetonitrilo anhidro hasta por varias semanas.
- El rendimiento promedio por acoplamiento es muy alto.
- El tiempo total de síntesis por monómero es de 4 a 7 min dependiendo de la cantidad de soporte inicial (escala).
- La aparición de equipos completamente automatizados para síntesis de DNA.
- Los productos ensamblados, aun en su forma cruda, poseen una alta calidad para ser usados directamente en la mayoría de aplicaciones biológicas. Por ejemplo, pueden ser usados como "primers" en reacciones de secuenciación y amplificación de DNA, o bien en experimentos de mutagénesis sitio dirigida o regional.

RECAPITULACION

Las enzimas, proteínas que catalizan una gran cantidad de reacciones *in vivo* e *in vitro*, cada vez tienen mayor aplicación industrial debido a su conocida especificidad y acción catalítica, mismas que dependen de una estructura tridimensional bien definida, originada por su secuencia primaria de aminoácidos. Actualmente, el mejoramiento en la función de una proteína puede lograrse en forma ocasional a través de diseño racional, siempre y cuando exista una

estructura cristalográfica resuelta, suficientes datos de secuencias homólogas y se conozca un posible mecanismo de reacción.

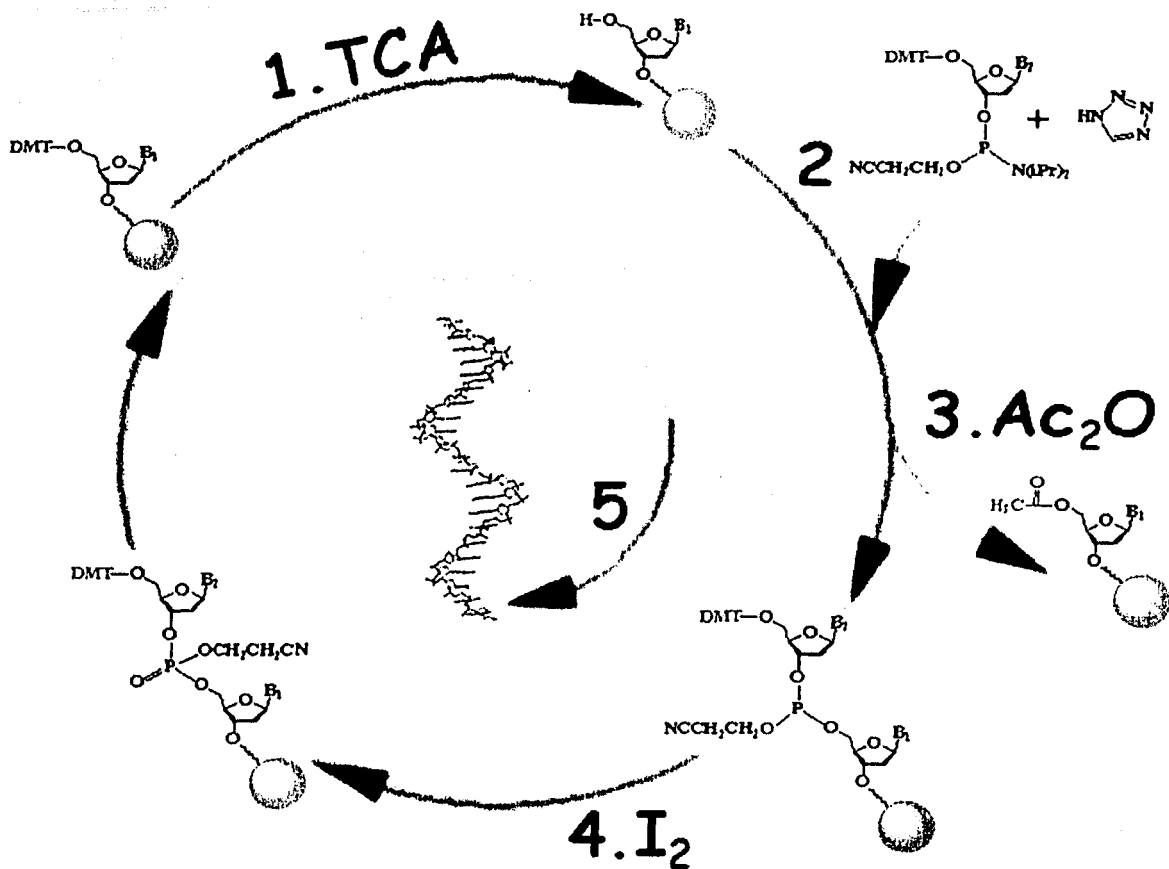


Figura 2. Ciclo de síntesis para el ensamble de oligonucleótidos en fase sólida, a través del método de fosfitotriéster. TCA: ácido tricloroacético, Ac₂O: anhídrido acético, I₂: Yodo, NH₃: amoniaco en agua. En el texto se describe el proceso.

De no ser el caso, los métodos de evolución *in vitro* basados principalmente en la generación de mutaciones puntuales al azar, a lo largo de todo el gen, generan buenos resultados en períodos de tiempo cortos. Desafortunadamente, las mutaciones puntuales solo pueden explorar un espacio muy reducido de secuencia, ya que los aminoácidos codificados por los

codones silvestres, sólo podrán cambiar hacia aquellos aminoácidos localizados a un nucleótido de distancia y siempre se favorecerán las mutaciones de transición sobre las de transversión. A fin de explorar todo el espacio de secuencia en pequeñas regiones de aminoácidos, se ha utilizado de manera recurrente mezclas de oligonucleótidos degenerados que representan a los 20 aminoácidos, aunque con frecuencias heterogéneas, dando lugar preferentemente a mutaciones múltiples. Estos tipos de mutagénesis se denominan “estrategias a saturación” o “estequiométricas”. En nuestra línea de trabajo, hemos desarrollado un método de mutagénesis basado en el empleo de trinucleótido-fosforamiditos como unidades mutagénicas, usados durante el ensamble convencional de oligonucleótidos a fin de generar bibliotecas de variantes enriquecidas con mutantes de baja multiplicidad, esto significa, variantes con pocos reemplazos de aminoácidos por proteína.

Por tanto, en previos trabajos hemos logrado eliminar la redundancia del código genético a través del uso de trinucleótidos y también reducir la proporción de mutantes múltiples. En el presente proyecto pretendemos refinar aún mas el método de mutagénesis, incluyendo “selección” *in vitro* a nivel de oligonucleótidos a fin de crear bibliotecas pequeñas y completas con respecto a cierto tipo de mutantes, con el objetivo de facilitar la aplicación de estrategias de monitoreo elaboradas.

Por tanto, antes de contar con métodos teóricos altamente predictivos en cuanto a la función de las proteínas, tendrá que acumularse una mayor cantidad de datos experimentales. Por el momento (y quizá por un buen tiempo todavía) el uso de colecciones combinatorias de variantes será una avenida importante para la investigación y la biotecnología de proteínas.

ANTECEDENTES

Muchos métodos han sido desarrollados para acelerar la evolución artificial de las proteínas, ya sea por mutagénesis enzimática de los genes que las codifican o por amplificación de oligonucleótidos mutantes. Los métodos enzimáticos están basados principalmente en técnicas de PCR, como por ejemplo, la PCR mutagénica [19], el DNA-shuffling [20] y el StEP [21], las cuales se basan en la pobre fidelidad de algunas DNA-polimerasas termoestables bajo condiciones específicas de reacción. Estas condiciones pueden ser la adición de sales de manganeso [22], proporciones distintas de los dNTPs [22], el uso de análogos de nucleósidos en su forma trifosfatada [23, 24], o bien el ensamble de fragmentos provenientes de genes homólogos para crear una recombinación *in vitro* [20]. Sin embargo, estos métodos están limitados a generar principalmente mutaciones puntuales y cada aminoácido (aa) silvestre podrá cambiar a solo una fracción de los otros 19 aa, como se ilustra en la tabla I diseñada por Karl Sirotkin [25], donde las celdas vacías representan reemplazos de aa inaccesibles a través de sustituciones de 1 nucleótido en cualquiera de las posiciones del codón silvestre.

Tabla I. Reemplazos posibles de aminoácidos a través de mutaciones puntuales, ejemplificado para 5 residuos. Los aminoácidos silvestres y sus respectivos trinucleótidos codificantes se localizan en la primera columna. Una intersección marcada con "x" significa un reemplazo posible.

CODONS/ AMINO ACIDS		GGGG CCCC TCAG	CCCCAA GGGGGG TCAGAG	GG AA TC	AA AA TC	TT GG TC	GG AA AG	CC AA AG	GGGG GGGG TCAG	CC AA TC	AAA TTT TCA	TTCCCC TTTTT AGTCAG	AA AA AG	A T G	TT TC	CCCC CCCC TCAG	TTTTAA CCCCGG TCAGTC	TTT AAG AGA	AAAA CCCC TCAG	T G G	TT AA TC	GGGG TTTT TCAG	
		A l a	A r g	A s p	A s n	C y s	G l u	G l n	G l y	H i s	I l e	L e u	L y s	M e t	P h e	P r o	S e r	T h r	T h r	T r p	T y r	V a l	
GCT	Ala	xxx		x					x							x	x						x
GCC		x xx														x	x						x
GCA		xx x					x		x							x	x						x
GCG		xx					x		x							x	x						x
CGT	Arg		xxx			x		x	x			x				x	x						
CGC			x xx						x			x				x	x						
CGA			xx xx					x				x				x	x						
CGG			xxx x						x							x	x						
AGA			x x						x									xx	x				
AGG		xx						x									xx						
GAA	Glu	x		xx			x	x	x									x					x
GAG		x		xx			x	x	x									x					x
GGT	Gly	x	x	x		x			xxx								x						x
GGC		x	x	x		x			x xx								x						x
GGA		x	x	x		x			xx x									x					x
GGG		x	x	x		x			xxx										x				
TCT	Ser	x				x									x	x	xxx						x
TCC		x				x									x	x	xx						x
TCA		x														x	xx						
TCG		x															xxx						
AGT				x	xx					x								x					
AGC			x	xx					x								x						

Peor aún, en estos sistemas muchos de los reemplazos posibles de nucleótidos tienden a generar aminoácidos de características fisicoquímicas similares al aminoácido silvestre debido al efecto protector del código genético. Por ejemplo, cambios sencillos de bases en cualquiera de los codones de alanina –considerado un residuo hidrofóbico pequeño– generarán residuos pequeños, tales como glicina, treonina, valina, glutámico, aspártico y serina. A esto también debemos agregar la preferencia hacia las transiciones de bases sobre las transversiones. Es decir, las polimerasas tienen mayor capacidad de sustituir purinas por purinas y pirimidinas por pirimidinas que a la inversa [26]. Este último efecto se elimina con bibliotecas de oligonucleótidos “punteados” (spiked en inglés), donde cada nucleótido silvestre es contaminado con las otras tres bases [27, 28] durante el proceso de ensamble.

A fin de cubrir el espacio de secuencia –todas las combinaciones posibles de aminoácidos– en una región pequeña de aa, muchos esquemas de mutagénesis a saturación han sido descritos. Los más comunes son los métodos “NNN” y “NNG/C” que consisten en sustituir cada uno de los nucleótidos del codón silvestre con una mezcla equimolar de las cuatro bases (N) o bien una mezcla equimolar de las bases G/C en la tercera posición del codón. Estas estrategias generan mezclas de 61 y 31 trómeros codificantes respectivamente, que engloban a los 20 aa naturales [29] y solo permiten la exploración completa de un máximo de 4 aa debido a la restricción impuesta por la eficiencia de transformación práctica de 10^7 variantes. Por ejemplo, una mutagénesis NNG/C de cuatro residuos generaría una población de 32^4 (1.05×10^6) variantes nucleotídicas y para tener una certeza del 95% de que la mutante menos representada en la población estará incluida entre las transformantes, se necesita un banco de por lo menos 3.1×10^6 células transformadas. Adicionalmente, la frecuencia de mutantes generada con estos métodos a saturación está desviada hacia aquellas secuencias codificadas por codones redundantes; por ejemplo, una mutante cuádruple de serina estará 81 veces más representada que una mutante cuádruple de metionina usando el método NNG/C. El problema de redundancia se ha eliminado usando mezclas de DMTr-trinucleótido-fosforamiditos que codifican a los 20 aa [30] o sólo un subconjunto de ellos [31, 32]. En contraste con los métodos enzimáticos y oligos “punteados”, estas estrategias de mutagénesis a saturación generan bibliotecas enriquecidas con variantes que portan sustituciones múltiples de codones, donde es difícil encontrar mutantes con pocos reemplazos de codones si no hay acceso a un buen método de selección. Se ha demostrado que la frecuencia de variantes, es decir, la proporción de mutantes sencillas contra mutantes múltiples, en los métodos de mutagénesis basados en codones puede ser controlada por una contaminación

apropiada de los codones silvestres con un codón mutante específico o una mezcla de codones [33]. La frecuencia de variantes se puede predecir con la ecuación general de distribución binomial

$$P = [n!/x!(n-x)!]p^x(1-p)^{n-x}$$

donde P representa la proporción de cada conjunto de mutantes en la biblioteca, p el nivel de contaminación por codón, n el número de codones silvestres a explorar en la ventana y x el tipo de mutante en la biblioteca ($x=1$ para mutantes sencillas, $x=2$ para mutantes dobles, etc.) [29]

Hasta el momento, solo existen dos métodos de mutagénesis basados en codones, que pueden ser ejecutados en forma contaminante. Estos son los métodos de separación de resina [34-36] y los métodos basados en química ortogonal propuestos por David Shortle [37] y desarrollados independientemente por nuestro grupo [33, 38].

En el método de separación de resina, ilustrado en la figura 3, una vez que se desea contaminar uno de los codones silvestres se abre el reactor que contiene el soporte de síntesis y se transfiere una proporción de material a un segundo reactor. En el primer reactor se ensambla el codón silvestre mientras que en el segundo se ensambla un codón degenerado NNG/C o una mezcla de nucleótidos que genere solo cierto subgrupo de aminoácidos [39]. Completados ambos codones, los soportes son mezclados y nuevamente divididos si se desea continuar contaminando los siguientes codones silvestres.

En los métodos basados en química ortogonal [38], los codones silvestres son ensamblados a base de DMTr-monómeros convencionales y son contaminados en una sola columna con Fmoc-trinucleótidos. El proceso de contaminación es posible debido a la ortogonalidad química de los grupos protectores DMTr y Fmoc. DMTr es lábil a condiciones ácidas y estable a condiciones alcalinas, mientras que Fmoc es de características contrarias (Figura 4).

Ambos métodos de mutagénesis basados en contaminación por codones, generan bibliotecas donde todas las variantes -sencillas, dobles, triples, etc.- están mezcladas e inclusive contaminadas con la secuencia silvestre. Aún no se ha descrito ningún método de mutagénesis combinatoria que conjunte las dos variables pilares de la evolución -**variación y selección**- a nivel de oligonucleótidos sintéticos, que permita disectar las mutantes por su tipo, a fin de crear bancos más pequeños y en consecuencia más fáciles de analizar.

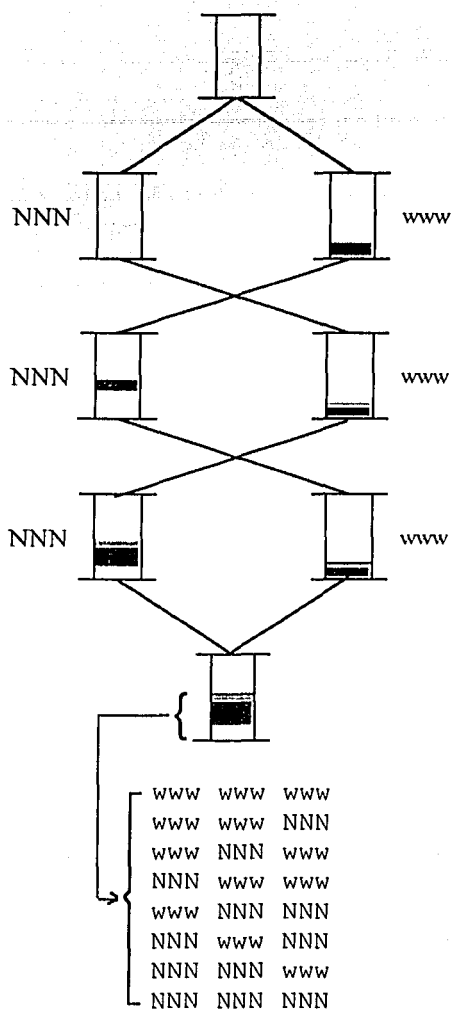


Figura 3. Método de separación de resina ejemplificado con la aleatorización de 3 codones. N representa una mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos, mientras que w a cada uno de los nucleótidos silvestres. Las intersecciones representan puntos de mezclado y separación de resina. Este método genera las variantes representadas en la parte inferior, en frecuencias dependientes de la tasa de mutagénesis.

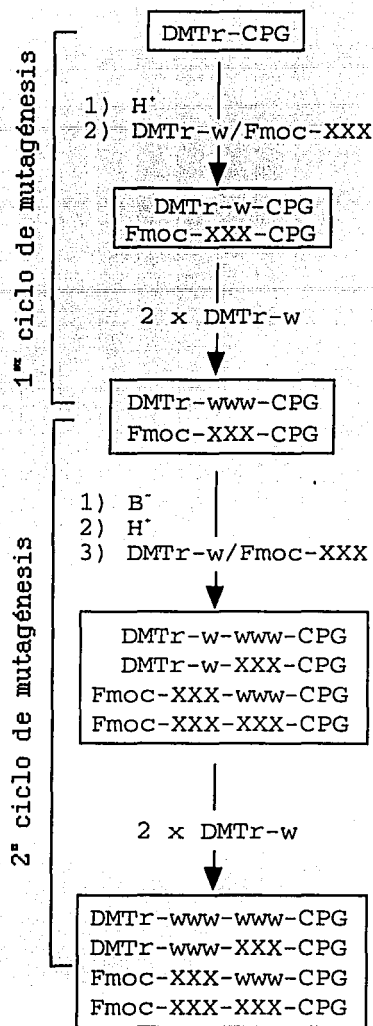


Figura 4. Método de mutagénesis basada en codones, usando Fmoc-trinucleótido-amiditos y ejemplificado para dos codones. DMTr-CPG representa al oligonucleótido creciente, ensamblado a base de nucleótidos convencionales (DMTr-w) y unido al soporte sólido CPG (vidrio de poro controlado). Los codones mutantes son ensamblados a través de Fmoc-trinucleótidos de secuencias específicas (Fmoc-XXX).

CON
FALLA DE ORIGEN

Por consiguiente, en el presente proyecto nos trazamos como objetivo sintetizar Fmoc-trinucleótido amiditos, cuyos fosfatos internucleotídicos estuvieran protegidos con grupos resistentes a condiciones básicas suaves y que al mismo tiempo pudieran utilizarse para contaminar codones silvestres durante el ensamble de oligonucleótidos. La hipótesis de trabajo es que dichos trinucleótidos al mezclarse con codones silvestres cuyos grupos protectores internucleotídicos son sensibles a álcali, generarán variantes que posean codones silvestres y mutantes alternados entre sí, con un contenido diferencial de carga que los hará separables por métodos cromatográficos de alta resolución o bien por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con base en esta idea, nos planteamos los siguientes objetivos.

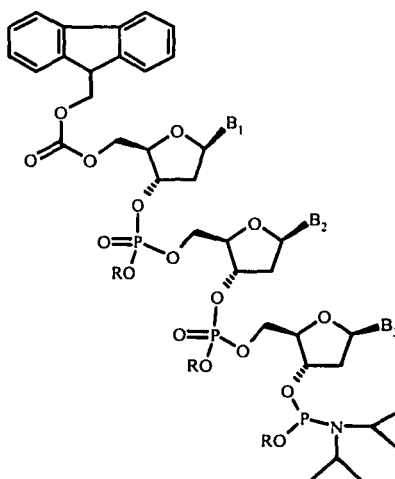
OBJETIVO GENERAL

Desarrollar la tecnología necesaria para generar un método de mutagénesis a nivel de codón, que conjugue variación y selección *in vitro* a través de bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estudiar la estabilidad de varios grupos protectores de fosfatos, frente a distintas condiciones básicas que han sido utilizadas para la desprotección final de oligonucleótidos.
- 2) Estudiar condiciones selectivas de desprotección para los grupos protectores de fosfatos, ya que una vez separados los diversos componentes de la biblioteca, podría ser necesario liberar a los oligonucleótidos de estos grupos para obtener un material biológicamente activo.
- 3) Sintetizar químicamente un trinucleótido (figura 5) con las siguientes características:
 - Hidroxilo 5' protegido con el grupo Fmoc.
 - Hidroxilo 3' derivatizado con la función fosforamidito.
 - Fosfatos internucleotídicos y fosforamidito protegidos con el mejor grupo proveniente de los objetivos 1 y 2.
- 4) Evaluar rutas alternas de síntesis para optimizar el método de síntesis.
- 5) Evaluar la separación de variantes en oligonucleótidos mutagenizados con el trinucleótido.
- 6) Realizar la evaluación biológica a través de segmentos de genes modificados con bibliotecas particulares de oligos mutagénicos.

Figura 5. Trinucleótido objetivo. B₁, B₂ y B₃ representan a cualquiera de las bases nucleotídicas dT, dA^{bz}, dC^{bz} o dG^{ibu}. R es un grupo protector ortogonal al grupo β-cianoetilo.



RESULTADOS Y DISCUSION

El principal objetivo de este trabajo consistió en sintetizar al menos un trinucleótido que pudiera ser utilizado en esquemas de mutagénesis por contaminación, a través de su incorporación subestequiométrica a las cadenas silvestres de oligonucleótidos. Al mismo tiempo, dicho trinucleótido le debía inducir ciertas características fisicoquímicas a las cadenas modificadas, a fin de poder purificar las variantes por algún método de separación. De esta manera, sería posible clonar bancos específicos de mutantes sencillas, dobles, etc., e inclusive poder eliminar las secuencias silvestres que suelen causar confusión en los métodos de monitoreo de las mutantes, sobre todo cuando se buscan actividades enzimáticas vestigiales. Para generar variación basada en codones y selección a nivel de oligonucleótidos, el trinucleótido debía presentar dos características principales: 1) estar protegido en el hidroxilo 5' con el grupo Fmoc para poder contaminar la secuencia silvestre en una proporción predeterminada y 2) estar protegido en los fosfatos internucleotídicos y en el fosforamidito con un grupo ortogonal al β -cianoetilo, introducido con los DMTr-mononucleótidos convencionales, utilizados para ensamblar la secuencia silvestre de cada oligonucleótido. Tras el ensamble del oligo mutagénico, éste se sometería a un proceso de desprotección parcial para diferenciar las variantes por el contenido de fosfatos iónicos. Por ejemplo, las mutantes sencillas contendrían tres fosfatos iónicos menos con respecto a la secuencia silvestre, mientras que las mutantes dobles 6 y las mutantes triples 9. Basados en el contenido diferencial de fosfatos iónicos de las variantes, postulamos que sería posible su separación por técnicas de electroforesis o bien por HPLC de intercambio iónico.

Con fundamento en estas hipótesis y los objetivos bien planteados, iniciamos el desarrollo del proyecto.

MUTAGENESIS BASADA EN Fmoc-TRINUCLEOTIDOS.

Selección del grupo protector de fosfatos internucleotídicos.

En razón de que uno de los principales objetivos de este trabajo consistía en sintetizar Fmoc-trinucleótidos cuyos fosfatos internucleotídicos y función fosforamidito estuvieran protegidos con un grupo resistente a las condiciones normales de síntesis de DNA y también a condiciones básicas suaves, el primer paso en este proyecto consistió en analizar la estabilidad de

varios grupos protectores de fosfatos, buscando sobre todo que fueran resistentes a las condiciones hidrolíticas de oligos convencionales, hidróxido de amonio concentrado por 12h a 55°C o bien 72 h a 25°C [40]. Estas condiciones son suficientes para hidrolizar el grupo éster que une al soporte sólido con el hidroxilo 3' del oligo y los enlaces amida formados entre las aminas exocíclicas de dA, dC y dG formadas con los grupos benzoilo e isobutirilo como se muestra en la figura 1. De hecho, en la exposición a álcali, el primer grupo en ser removido es el β -cianoetilo [18] que protege los fosfatos internucleotídicos, a través de un mecanismo de β -eliminación, favorecido por la extrema acidez de los protones vecinos al grupo nitrilo y la capacidad de acomodar una carga negativa por parte de los grupos fosfatos. Sin embargo, con otros grupos protectores distintos al β -cianoetilo, el ataque hidrolítico ocurre en el fósforo y en caso de fosfotriésteres se favorece la ruptura hacia los sustituyentes que tengan la mejor capacidad de acomodar una carga negativa. Tal capacidad está relacionada con el pKa de los sustituyentes: a menor pKa (mayor Ka) será mayor la capacidad del compuesto para acomodar la carga y en consecuencia será mejor grupo saliente, pero menos resistente a las condiciones de hidrólisis. Basados en este precepto, decidimos analizar los alcoholes metílico [41] (Me, pKa 15.3), etílico [42] (Et, pKa 15.9), isopropílico [43, 44] (ⁱPr, pKa 16.1), isobutílico [45] (ⁱBu, pKa \approx 16.1) y 2-trimetilsililetilico [46] (TMSE, pKa desconocido) como grupos protectores de fosfatos frente a distintas condiciones hidrolíticas alcalinas que han sido utilizadas en la desprotección final de oligonucleótidos, adicionales a las mencionadas arriba. Además del pKa, los primeros cuatro grupos se escogieron por haber sido utilizados en la preparación de oligonucleótidos parcialmente protegidos. El quinto grupo, TMSE, se escogió como grupo potencial, a pesar de no conocer su pKa, porque ha sido utilizado en síntesis convencional de oligos, es resistente a NH_4OH y es fácilmente removido por β -eliminación a través de algún fluoruro en condiciones de reacción suaves.

Para determinar la estabilidad de los grupos, se sintetizaron los 5 dinucleótidos de timidina que se muestran en la figura 6, a fin de utilizarlos como compuestos modelo para medir la estabilidad por cinética química a través de análisis por HPLC. El análisis se inició con los compuestos T(Me)T y T(ⁱPr)T frente a distintas condiciones básicas a 50°C. En el caso de T(Me)T su vida media frente a NH_4OH 4M en acetonitrilo:agua (1:1) y NH_3 1.8M en metanol:acetonitrilo (9:1) fue de 2.3 y 10.7 hr respectivamente, mientras que T(ⁱPr)T mostró una vida media superior a 12 días para ambas condiciones de reacción.

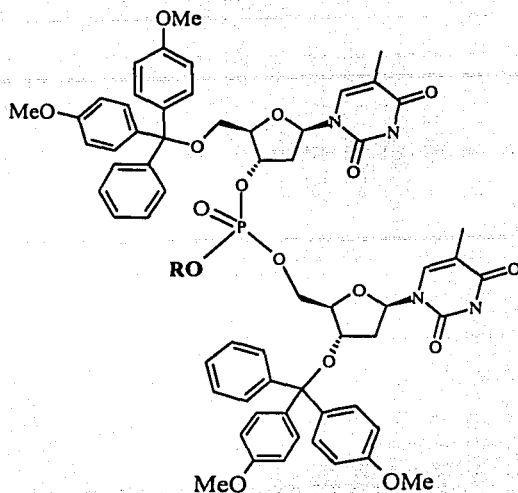


Figura 6. Dinucleótidos modelos de timidina. R= Me, Et, ⁱPr, ^tBu, TMSE.

Aunque este tipo de análisis permite separar y cuantificar los productos y sustratos a distintos tiempos de reacción en forma precisa, los análisis fueron prolongados y costosos por requerir una gran cantidad de acetonitrilo y se suspendieron.

Como alternativa, decidimos evaluar la estabilidad de los diversos grupos protectores a partir de oligómeros de timidina parcialmente protegidos en distintos fosfatos. Estos análisis podían ser realizados de manera múltiple por electroforesis en geles de poliacrilamida y al mismo tiempo permitirían comprobar la eficiencia del proceso para la separación de las variantes.

Se sintetizaron 5 juegos de pentadecatimidilatos conteniendo distintas combinaciones de fosfodiésteres y fosfotriésteres:

TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT	Clave: T ₁₂ X ₃ -R
TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT	Clave: T ₉ X ₆ -R
TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT	Clave: T ₆ X ₉ -R

donde R= Me, Et, ⁱPr, ^tBuTMSE; p representa un grupo fosfodiéster y **p** representa un grupo fosfotriéster protegido con el grupo R. En las claves asignadas a cada pentadecatimidilato, el

número de "Xs" representa el número de fosfotriésteres por cadena. La síntesis de estos pentadecatimidilatos requirió la combinación de un fosforamidito convencional de dT (DMTrdT-βCE-amidito) para generar los fosfodiésteres y cada uno de los cinco fosforamiditos modificados de dT (DMTrdT-alquil-amiditos) para ensamblar los fosfotriésteres. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la figura 7. El único compuesto que adquirimos de una fuente comercial fue el DMTrdT-βCE-amidito, mientras que los otros cinco fueron sintetizados en el laboratorio, obteniéndose con al menos 90% de pureza.

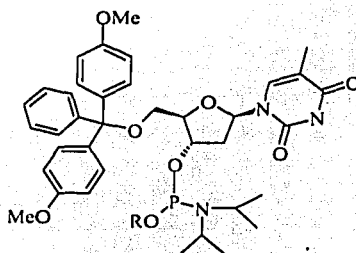


Figura 7. DMTr-alquil amiditos. R = Me, Et, ⁱPr, ^tBu, TMSE, βCE

Los oligonucleótidos fueron sintetizados de manera automatizada a través de un ciclo normal, a escala de 0.5 μmol, combinando de manera selectiva el DMTrdT-βCE-amidito y cada uno de los DMTrdT-alquil-amiditos. Los oligonucleótidos completamente protegidos y unidos al soporte de síntesis fueron alicuotados y evaluados frente a las siguientes condiciones de desprotección:

NH₃ 2M en MeOH, 25°C, 5 min, 1 hr

NH₄OH 28%, 25°C, 10 min, 1 hr, 4 hr, 26 hr, 72h

Tiofenol:trietilamina 3:1, 25°C - 1 hr, 55°C - 1 hr, 60°C - 12 hr

Etilendiamina:etanol 1:1, 25°C - 2 hr, 55°C - 7 hr,

Hidracina 0.5 M en piridina:ácido acético 4:1, 25°C - 24 hr

Tras múltiples análisis realizados por electroforesis, como se muestra en la figura 8 para cada uno de los grupos protectores, llegamos a las siguientes conclusiones.

Figura 8. Análisis electroforético de pentadecámeros de timidina parcialmente protegidos en algunos fosfatos.

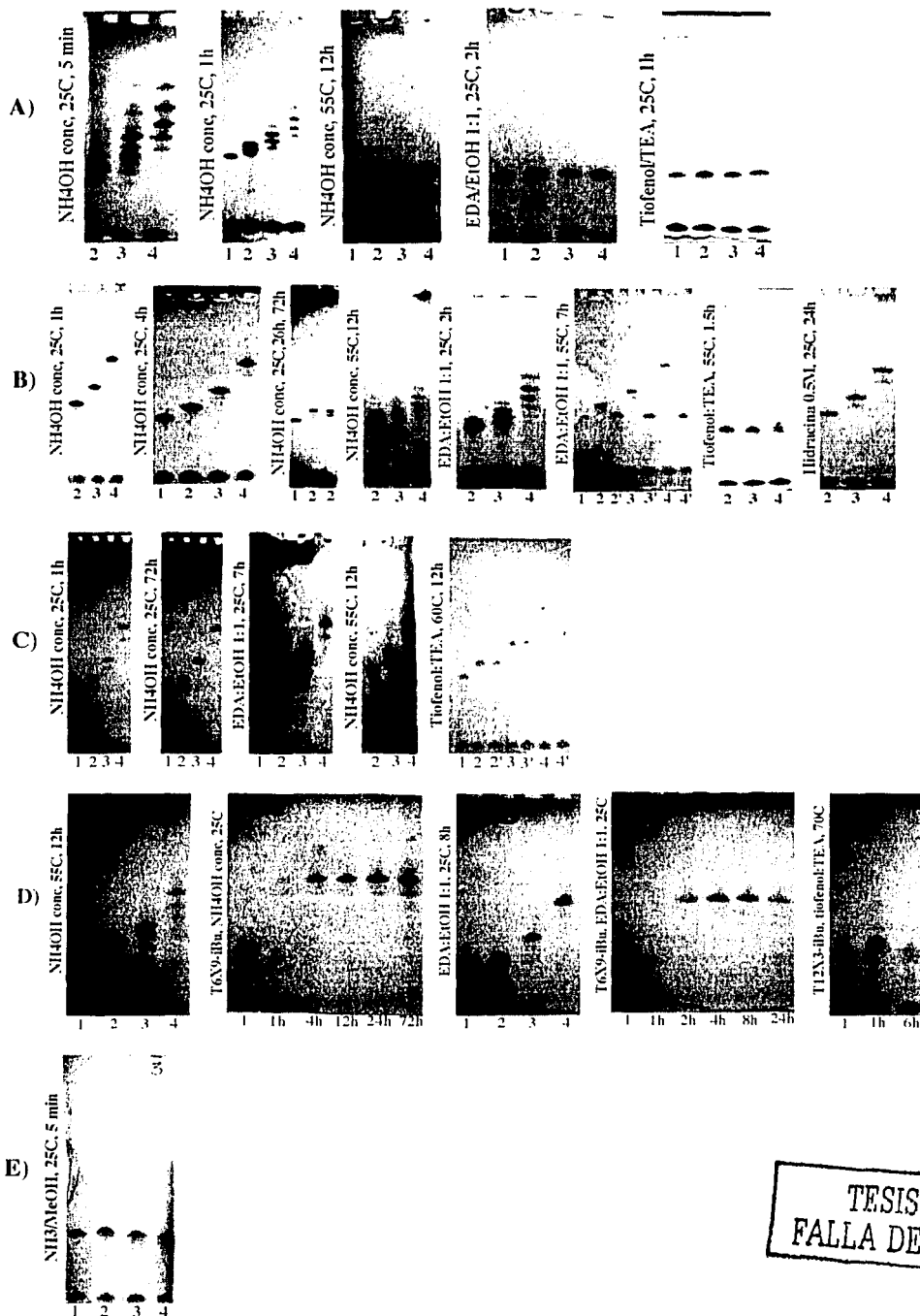


Figura 8. Análisis electroforético de pentadécámeros de timidina parcialmente protegidos en algunos fosfatos. A) Grupo Metilo; B) Grupo Etilo; C) Grupo Isopropilo; D) Grupo Isobutilo; E) Grupo Trimetilsililetilo. Las condiciones de desprotección se muestran en la parte lateral izquierda de cada gel. Carril 1: T₁, control, carril 2: T₁₂X₃-R, carril 3: T₉X₆-R, carril 4: T₆X₉-R. En los gels donde aparecen números prima, las muestras se trataron primero con NH₄OH, 25°C, 4h (carriles 2,3,4) y una fracción de ellas se evaporó y trató con las condiciones indicadas en la parte lateral del gel, etiquetándolas con el número prima.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 1 A juzgar por la figura 8A, el grupo metilo resultó lábil a hidróxido de amonio en sólo 5 min, condiciones que son incapaces de remover los grupos acilo (benzoilo o isobutirilo) que protegen las nucleobases. Sería posible obtener oligonucleótidos parcialmente metilados, sólo si se modifica el esquema de protección de las bases a grupos más sensibles, como por ejemplo el grupo Fmoc [41] o 2-acetoximetilbenzoilo [47], utilizando condiciones hidrolíticas muy suaves (K_2CO_3 en MeOH) para la remoción de los mismos. Sin embargo, a pesar de estas modificaciones es inevitable la formación de un porcentaje significativo de desmetilación. En un trabajo publicado por Letsinger [47], éste demostró que la reacción de desmetilación era originada por el yodo utilizado en el proceso de la síntesis automatizada para la oxidación de los fosfitotriésteres internucleotídicos.
- 2 Celebuski [48] demostró que el grupo TMSE acoplado a un fosfato terminal es estable a NH_4OH concentrado durante 12 hr a $55^\circ C$, condiciones que remueven el grupo benzoilo e isobutirilo, mientras que Wada [46] describió el uso exitoso de TMSE como grupo protector de fosfatos internucleotídicos en la síntesis convencional de oligonucleótidos sin considerar que este grupo fuera resistente o no al tratamiento amoniaco final para tratar de generar oligonucleósido-fosfotriésteres. Sin embargo, nosotros a pesar de utilizar tratamientos básicos muy suaves (e.g. NH_3 /metanol, 5 min) para la remoción de los oligos $T_{12}X_3$ -TMSE, T_9X_6 -TMSE y T_6X_9 -TMSE del soporte de síntesis, obtuvimos materiales con al menos 90% de desprotección en los fosfatos internucleotídicos como se observa en la figura 8E. Mas adelante confirmamos que tal desprotección es catalizada por el tratamiento ácido utilizado en cada ciclo de síntesis, ya que al tratar de desritilar el dinucleótido modelo de timidina portando TMSE que se muestra en la figura 6, con ácido acético, generó el dinucleótido de timidina completamente desprotegido. Este resultado correlaciona con la observación de Chao [49] de que el grupo TMSE es lábil al ácido trifluoroacético utilizado en la síntesis de péptidos.
- 3 El grupo isopropilo [43, 44] resultó muy estable a la mayoría de las condiciones de desprotección utilizadas para desacilar las nucleobases. De hecho, pensamos que éste sería el grupo ideal para nuestra estrategia, pero cuando utilizamos las condiciones sugeridas por Yamana [43] para la desisopropilación selectiva (tiofenol:trietilamina, $60^\circ C$), obtuvimos solo una remoción parcial. Por otra parte, las condiciones de desisopropilación en buffer de

boratos propuestas por Gallo [50] no son prácticas, ya que el grupo tiene una vida media de 2.13 días y remover el grupo completamente tomaría al menos 8 días de reacción.

- 4 El grupo isobutilo [45] también fue muy estable, resistiendo etilendiamina:etanol hasta por 24 h e NH_4OH por 72 h, condiciones suficientes para remover todos los grupos protectores convencionales de oligonucleótidos, pero al igual que el grupo isopropilo no encontramos las condiciones apropiadas para removerlo selectivamente, sin causar daño a la cadena fosfatada.
- 5 Finalmente, el grupo etilo fue ligeramente lábil al tratamiento con etilendiamina:etanol (1:1) durante 2 hr a 25°C , generándose una gran cantidad de productos parcialmente etilados, en contra a los resultados de estabilidad descritos por Gallo [50]. Inclusive, un tratamiento más severo a 55°C durante 7 hr generó exclusivamente el pentadecámero completamente desprotegido, mostrando idéntica movilidad al control completamente desprotegido T_{15} preparado por el método convencional. El grupo etilo también fue fácilmente removido por el ion tiofenolato a 55°C , durante 2 hr. Por otra parte, experimentos adaptados por nosotros, demostraron que el grupo etilo es prácticamente estable a NH_4OH concentrado, por 4 hr a 25°C , condiciones suficientes para liberar al oligonucleótido del soporte y eliminar los grupos β -cianoetilo que generan los grupos fosfodiéster, pero insuficientes para remover los grupos benzoilo e isobutirilo. Este problema fue afrontado a través de una desprotección en dos pasos [51]: primero una desprotección con hidracina amortiguada para remover los grupos benzoilo y posteriormente un tratamiento amoniacal para liberar al oligonucleótido del soporte. Los oligonucleótidos enlazados al soporte a través de succinilo-sarcosilo [52] resultaron estables a hidracina 0.5 M en piridina:ácido acético 4:1 durante 24 hr a 25°C . Tras remover los oligonucleótidos del soporte con NH_4OH por 2 hr a 25°C , el análisis electroforético evidenció la completa resistencia del grupo etilo a ambos pasos de desprotección. En un tercer paso, el grupo etilo fue removido con etilendiamina:etanol por 2 h a 55°C .
- 6 El análisis electroforético permitió separar cada tipo de variante en base a su contenido diferencial de fosfatos iónicos como se muestra en la figura 8, para los pentadecámeros de timidina protegidos con los grupos Et, ^iPr e ^iBu .
- 7 Como conclusión final a esta primera etapa, se propuso la síntesis de dos Fmoc-trinucleótido-fosforamiditos, correspondientes a un codón y un anticodón para alanina, protegidos en sus fosfatos internucleotídicos con el grupo etilo y un esquema de desprotección de los oligonucleótidos mutantes en tres pasos.

Síntesis de Fmoc-trinucleótido fosforamiditos.

Desde 1992 han aparecido en la literatura varios trabajos relacionados con la síntesis de trinucleótido-fosforamiditos y su uso en la generación de bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos. Sin embargo, en la mayoría de ellos hacen uso del grupo DMTr [30-32, 53] para la protección del hidroxilo 5', y sólo en uno, reportado por nuestro grupo de trabajo se hace uso del grupo Fmoc [33].

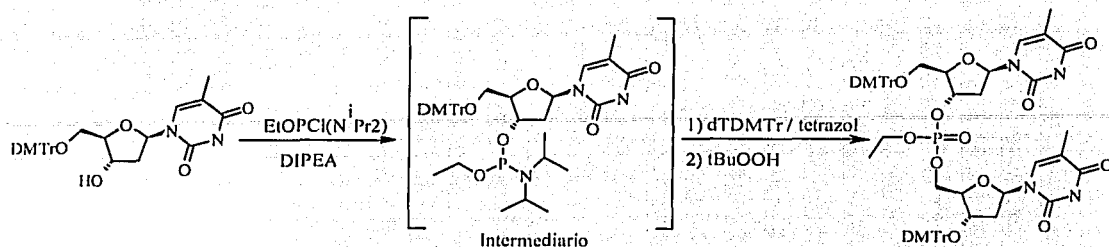
Con base en los antecedentes, puede apreciarse que los acoplamiento internucleotídicos para el ensamble de Fmoc-trinucleótidos, precursores de los trinucleótido-fosforamiditos que se deseaban sintetizar, podía realizarse por varias rutas. Por ejemplo, por el método de fosfito o fosfatotriéster, esquemas completamente protegidos o semiprottegidos, dirección 3'→5' ó 5'→3', y finalmente a través de intermediarios aislados o generados *in situ*.

El método de fosfatotriéster requiere el uso de grupos arilo para la protección de los fosfatos internucleotídicos, debido a que éstos estabilizan los intermediarios activados con triazoles a través de un efecto electroattractor, mientras que los grupos alquilo los desestabilizan. En nuestro caso particular, dado que los fosfatos deben ser protegidos con el grupo etilo (un alquilo), optamos por el método de fosfito-triéster para ensamblar los Fmoc-trinucleótidos.

En cuanto al esquema de protección, se decidió utilizar un sistema completamente protegido -combinando un nucleósido protegido en la terminal 5' y otro en la terminal 3'- debido a que en un trabajo previo [54], la ruta de síntesis semiprottegida -combinando un nucleósido protegido en el hidroxilo 5' con un nucleósido completamente desprotegido-, dió lugar a varios subproductos de polaridad similar al compuesto esperado, dificultando su purificación cromatográfica.

Para decidir el tipo de intermediarios a usar, es decir fosforamiditos aislados o generados *in situ*, se realizó la síntesis del compuesto modelo T(Et)T por dos rutas distintas (Esquema I) y los productos de las mezclas crudas fueron desprotegidos y analizados por HPLC, comparándolos contra dinucleótidos control preparados en fase sólida que contenían enlaces 3'-5', 3'-3' y 5'-5' (Figura 9). El mejor resultado se obtuvo con el método denominado "fosforamidito aislado", en el que se observó casi exclusivamente el acoplamiento 3'-5'. En cambio, en el método denominado "fosforamidito *in situ*" se obtuvo entre 5 y 10% del subproducto 3'-3'.

Con base en estos resultados, se decidió sintetizar los trómeros por el método de fosforamidito aislado, a pesar de requerir un mayor esfuerzo por la purificación de los fosforamiditos intermediarios.



Esquema I. Rutas alternas de acoplamiento internucleotídico. En la ruta *fosforamidito aislado*, el intermediario es sintetizado, aislado por cromatografía y usado en forma pura para la siguiente reacción. En la ruta *fosforamidito in-situ*: el fosforamidito intermediario se hace reaccionar en el mismo matraz con el nucleósido 3' terminal.

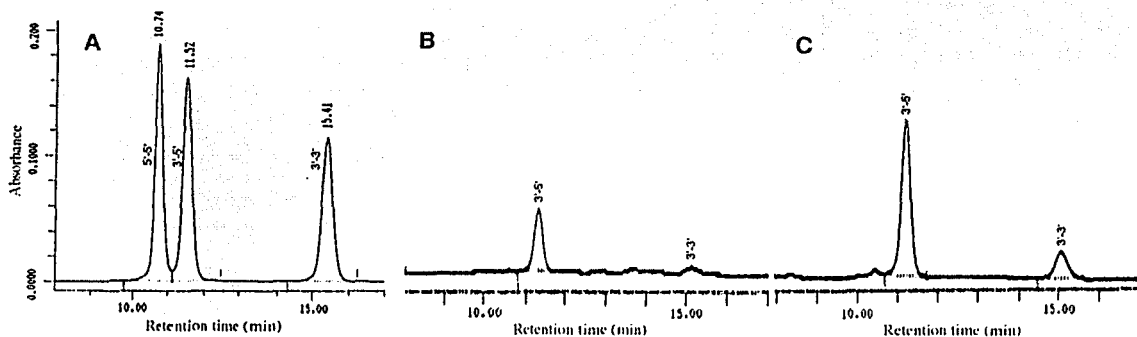


Figura 9. Análisis por HPLC de los productos obtenidos en la preparación de dinucleótidos de timidina por dos rutas sintéticas. A) Mezcla control de dinucleótidos de timidina, preparados por química convencional y enlazados por los hidroxilos 3'-5', 3'-3' y 5'-5'. B) Productos obtenidos en la ruta de fosforamidito aislado. C) Productos obtenidos en la ruta de fosforamidito *in situ*.

En ingeniería de proteínas, una técnica muy utilizada para detectar aminoácidos críticos para una determinada función, consiste en hacer sustituciones sencillas de alanina por cada uno

de los residuos silvestres que se infiere pudieran estar involucrados. Esto puede realizarse por mutagénesis sitio dirigida (sustituyendo aminoácido por aminoácido) a través de múltiples experimentos o bien en un esquema completamente combinatorio [55] en un sólo experimento. Por tanto, en este trabajo decidimos sintetizar el codón GCT, uno de los codones preferenciales en *E. coli* para este aa y su respectivo anticodón AGC, para poder mutagenizar regiones de la cadena codificante o la cadena templado de los genes a evaluar.

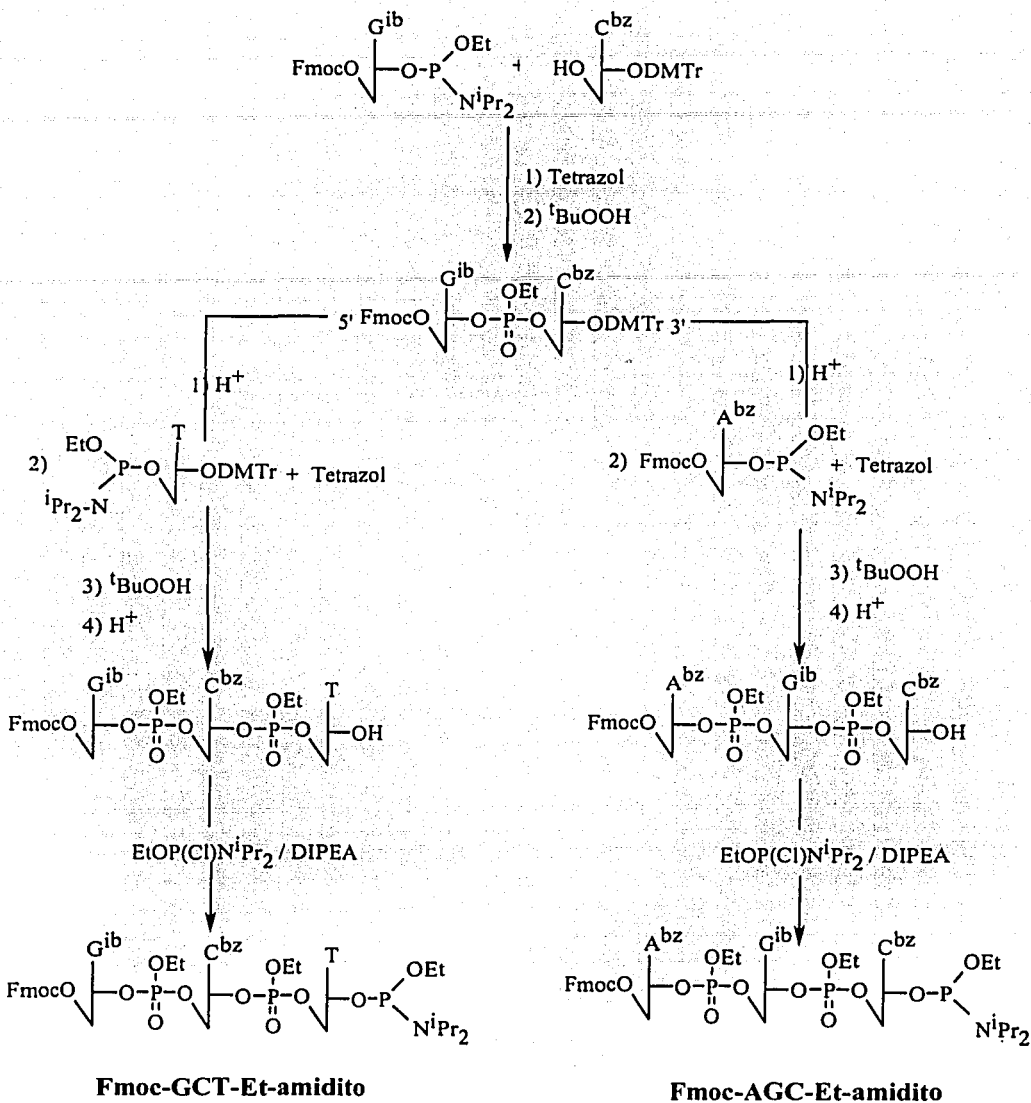
De estas secuencias nucleotídicas, es claro que ambas comparten una misma combinación, GC, por lo que ideamos la estrategia sintética que se muestra en el esquema II, a fin de preparar los dos Fmoc-trinucleótidos a partir de un solo dímero, ya sea extendiendo la secuencia hacia la terminal 3' o bien hacia la 5' (esquema II).

En total, la síntesis de los dos Fmoc-trinucleótido-fosforamiditos requirió la síntesis de 12 compuestos: Fmoc-dG^{ib}, Fmoc-dG^{ib}-etil-amidito, Fmoc-dA^{bz}, Fmoc-dA^{bz}-etil-amidito, dC^{bz}-DMTr, dT-DMTr, etil-amidito-dT-DMTr, el dímero Fmoc-dG^{ib}(Et)dC^{bz}-DMTr, los dos trímeros Fmoc-dG^{ib}(Et)dC^{bz}(Et)dT y Fmoc-dA^{bz}(Et)dG^{ib}(Et)dC^{bz} y los dos trimeros fosfitilados.

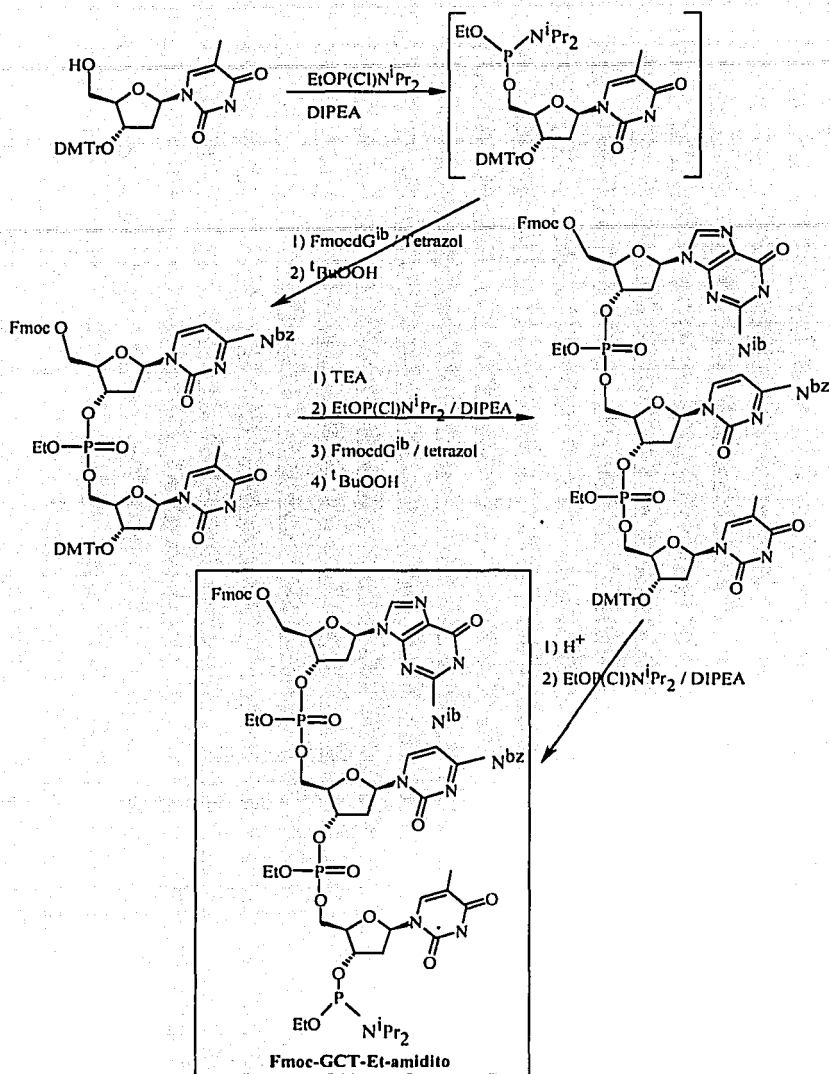
Tras purificación en cromatografía en columna y precipitación, los trinucleótido-fosforamiditos fueron obtenidos con una pureza superior a 80%, según el análisis por HPLC, aunque con rendimientos finales muy pobres (10-30%).

El paso crítico en la preparación final de los trinucleótido-fosforamiditos correspondió a su purificación, ya que una gran parte del material reaccionó covalentemente con los silanoles que componen la silica gel, a pesar de utilizar condiciones ligeramente básicas para la elución de los compuestos.

Con base en estos pobres resultados, se reintentó la síntesis del trímero GCT, pero ahora a través del método de "fosforamidito *in situ*", a fin de evitar el aislamiento de las especies reactivas. Esta síntesis se realizó en la dirección 3'→5', iniciando con la fosfitilación del nucleósido 3'-dimetoxitritilado, acoplado el intermediario formado con el nucleósido 5'-florenilmetoxicarbonilado y oxidando el fosfito-triéster internucleotídico a su forma más estable de fosfato-triéster con hidroperóxido de terc-butilo (esquema III). Se removió el grupo Fmoc y se repitió el proceso para adicionar la 5'-O-Fmoc-desoxiguanosina y completar el trímero GCT en



Esquema II. Síntesis de Fmoc-trinucleótido-etil-amiditos en solución por el método de “fosforamidito aislado”. ^tBuOOH = hidroperóxido de terc-butilo, TEA = trietilamina, H⁺ = ácido tricloroacético, DIPEA = N,N-diisopropiletilamina, G^{ib}= 2N-isobutirilguanina, C^{bz}= 4N-benzoilcitosina, A^{bz}= 6N-benzoiladenina, T= timina, ^{iPr}= isopropilo, Et= etilo.



Esquema III. Síntesis del Fmoc-trinucleótido-etil-amidito GCT por el método de “fosoramidito *in situ*” en la dirección 3'→5'. ^tBuOOH = hidroperóxido de terc-butilo, TEA = trietilamina, H^+ = ácido tricloroacético, DIPEA = N,N-diisopropiletilamina, ib= isobutirilo, bz= benzoilo, T= timina, ⁱPr= isopropilo, Et= etilo

forma protegida. El grupo DMTr fue removido por hidrólisis ácida y el trímero Fmoc-GCT fue purificado por cromatografía en columna, obteniéndose con al menos una pureza de 95%. El compuesto fue finalmente fosfitado para dar lugar al Fmoc-GCT-etil amidito, recuperándose en forma cruda por precipitación. El compuesto se obtuvo con una pureza de 66% y un rendimiento superior a 90%. El principal subproducto de la síntesis correspondió al H-fosfonato del trímero, el cual es inocuo a las condiciones de reacción de acoplamiento para fosforamiditos y por tanto el trímero-fosforamidito es útil para los ensayos de mutagénesis.

A fin de determinar la reactividad del trinucleótido en fase sólida, se prepararon 4 soluciones de este compuesto a distintas concentraciones en acetonitrilo anhidro y se hicieron reaccionar por duplicado con un dinucleótido DMTr-dTA, unido al soporte de síntesis a través del hidroxilo 3' de dA. De esta manera, el acoplamiento del trinucleótido con el dímero daría lugar al pentámero d(GCTTA). A fin de medir la eficiencia de acoplamiento del trinucleótido, éste se incorporó a través de un ciclo de síntesis que carecía de los pasos de acetilación, oxidación y destrilación para evitar el bloqueo de los hidroxilos 5' que no reaccionaron. En el siguiente ciclo de síntesis, los dímeros dAT que no reaccionaron con el trímero, se saturaron con el nucleótido DMTrdT-βcianoetil-amidito, generando el trinucleótido DMTr-dTTA. La eficiencia de acoplamiento en cada uno de los experimentos se calculó por la diferencia de absorbancia a 416 nm del catión DMTr, liberado de las especies DMTr-dTA y DMTr-dTTA. Al graficar las eficiencias de acoplamiento contra las concentraciones de trinucleótido utilizadas, como se muestra en la figura 10, se observó una correlación lineal entre ambas variables, indicando por tanto que la tasa de mutagénesis experimental podría controlarse por una selección adecuada de la concentración del trinucleótido. De manera adicional, dos de las muestras ensambladas con el trinucleótido 10 mM y 40 mM fueron completamente desprotegidas y analizadas por HPLC (figura 11C y 11D respectivamente), generando exclusivamente las especies esperadas GCTTA y TTA, permitiendo confirmar la autenticidad del trinucleótido por comparación con especies control sintetizadas de forma convencional.

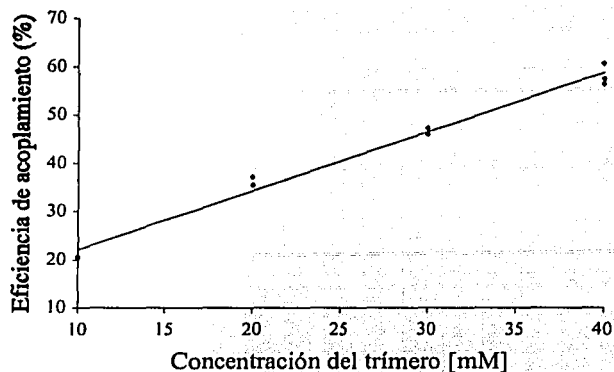


Figura 10. Reactividad del Fmoc-trinucleótido-amidito GCT en fase sólida.

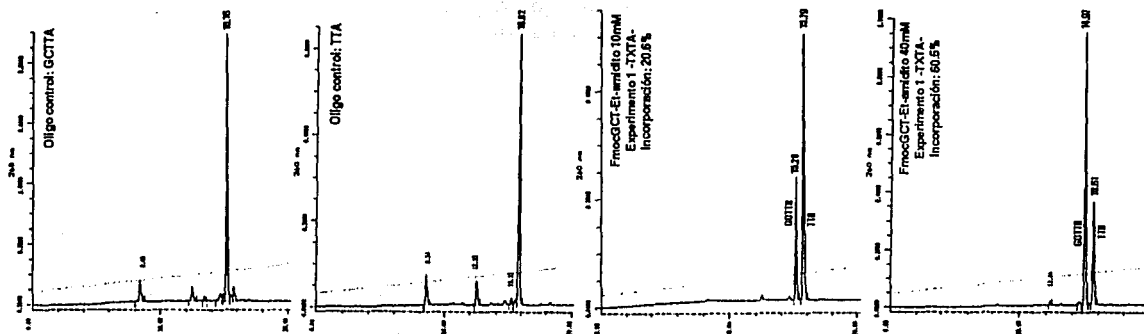


Figura 11. Análisis del pentámero GCTTA ensamblado con el Fmoc-trinucleótido-amidito GCT a dos concentraciones distintas y comparados contra controles sintetizados por química convencional.

Por tanto, en esta etapa se logró desarrollar una ruta de síntesis reproducible para la preparación de Fmoc-trinucleótidos, misma que procede en la dirección 3'→5' y fue planeada de tal manera que los reactivos utilizados en exceso, esto es, los Fmoc-nucleósidos, siempre sean los más fáciles de preparar (esquema III). El método es robusto porque el compuesto expuesto a las condiciones de fosfitilación, las cuales son ligeramente básicas debido al uso de diisopropiletilamina, es el nucleósido 3'-dimetoxitritilado, estable a condiciones alcalinas. En el segundo paso de la reacción, el nucleósido 5'-fluorenilmtoxycarbonilado estable a ácido, es

coevaporado con tetrazol, un compuesto ligeramente ácido que actúa como catalizador en la reacción internucleotídica, pero que no afecta la estabilidad del grupo Fmoc. En el esquema de síntesis basado en la protección total, el compuesto determinante en la preparación de trinucleótidos es el nucleósido 3'-dimetoxitritilado, porque su síntesis es laboriosa. En la ruta reproducible que se desarrolló en este proyecto, sólo se usa un sustrato de este tipo, mientras que en la ruta en dirección inversa, 5'→3', se deben usar dos.

Finalmente se demostró que la tasa de contaminación, durante el ensamble de oligos mutagénicos, puede ser controlada por una selección apropiada de la concentración del trinucleótido.

Evaluación Biológica

Como proteína modelo para estudiar el barrido combinatorio de alaninas, a través del uso del Fmoc-trinucleótido-amidito GCT descrito arriba, se decidió utilizar el activador transcripcional PspF [56], una proteína de 324 aa que regula la expresión del operón *psp* (siglas en inglés provenientes de "phage shock protein"). PspF pertenece a una gran familia de proteínas de unión a "enhancers", capaces de activar la transcripción de DNA a través de sitios distantes [57]. En especial, PspF es responsable de activar genes involucrados en la respuesta celular al ataque de fagos filamentosos, proponiéndose que una región conservada denominada C3, compuesta por los aminoácidos Gly83, Ala84, Phe85, Thr86, Gly87 y Ala88, abreviada como GAFTGA, está involucrada en el reconocimiento de la subunidad sigma 54 (σ^{54}), cuando ésta forma parte de la holoenzima de RNA-polimerasa.

El barrido combinatorio de alaninas se planeó para los aa Gly83, Phe85, Thr86 y Gly87, por lo cual el primer paso consistió en sintetizar un oligonucleótido mutagénico con la secuencia:

5' G TTQ GGT CAC GAA GCG GGG/X GCG TTT/X ACC/X GGT/X GCG CAA AAA CGT CAT 3'

a través de un programa de síntesis que omite los pasos de "capping", oxidación y destritolado para la adición correspondiente al vial X, lugar donde se colocó una solución diluida del Fmoc-trinucleótido-amidito GCT que serviría para contaminar la secuencia silvestre con el codón de alanina. De hecho, la concentración utilizada en este experimento (8 mM) generó una contaminación promedio de 24.5% por codón. Los codones marcados con negritas representan a

los aa silvestres citados arriba y el nucleósido subrayado representa un cambio silencioso de C→T, ideado para diferenciar las secuencias silvestres generadas con el banco de oligos mutagénicos de aquellas provenientes del templado. Aquí, es importante recordar que la síntesis automatizada de DNA es realizada en la dirección 3'→5' y que después de contaminar la secuencia silvestre con el trómero, el codón silvestre es ensamblado con tres acoplamientos consecutivos de los DMTr-nucleósido-β-cianoetilamiditos apropiados. En este punto, cuando el codón silvestre ha alcanzado el nivel previamente logrado con el trómero, se remueven los dos grupos protectores de manera sucesiva y se completa el primer ciclo de mutagénesis como se ilustra en la figura 2. Este oligonucleótido se denominó GAFTGAmut. Adicionalmente, también se sintetizó el mismo oligonucleótido con la secuencia silvestre, denominándolo GAFTGAWt a fin de utilizarlo como control en los experimentos de electroforesis.

Una pequeña fracción del oligo GAFTGAWt fue desprotegida completamente con NH₄OH concentrado (12 hrs, 55°C) y fue semipurificado por electroforesis en gel de poliacrilamida para utilizarlo como control. El resto de este oligo, así como el oligo mutagénico GAFTGAmut fueron tratados con hidracina 0.5M en piridina:ácido acético 4:1 durante 24 hrs para desbenzoilar las nucleobases adenina y citosina. Después de esto, el soporte que contenía a cada oligo fue lavado y tratado con NH₄OH concentrado, 2 hr a temperatura ambiente, condiciones que dejan intactos los grupos etilo internucleotídicos, pero que son suficientes para remover el oligonucleótido del soporte, hidrolizar los grupos β-cianoetilo internucleotídicos de los codones silvestres e hidrolizar el grupo fenoxiacetilo que se usó en este experimento para la protección de las guaninas.

El experimento de electroforesis mostró que el oligo GAFTGAWt, sometido a los dos tratamientos de desprotección dió lugar al mismo patrón de bandas, siendo esto indicativo del cumplimiento hidrolítico descrito en el párrafo anterior (resultado no mostrado). En cambio, GAFTGAmut se observó como una mancha ancha ligeramente retardada, que se extendía principalmente desde el oligo silvestre (figura 12A), pero no se observaron bandas bien definidas correspondientes a cada una de las variantes generadas en la biblioteca (silvestres, sencillas, dobles, triples y cuádruples), como se esperaba de su contenido diferencial de fosfatos iónicos y que de hecho fue posible con los homopolímeros de timidina (figura 8B). Se probaron distintas concentraciones de geles, obteniendo la mejor resolución con acrilamida al 12%. La mancha fue disectada en dos fracciones, llamando a la de menor migración GAFTGAmutup y a la de mayor migración GAFTGAmutdown (Figura 12B) por su posición en el gel. Cada una de estas

fracciones fue posteriormente desetilada con una mezcla tiofenol/ NH_4OH -condiciones implementadas en nuestro laboratorio, en razón de que la mezcla tradicional tiofenol/trietilamina no generó desprotección por la insolubilidad de los sustratos-, generando especies con la misma migración que el oligo control GAFTGAwt (Figura 12C).

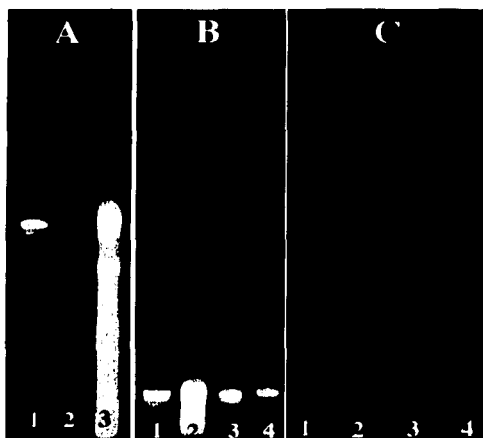
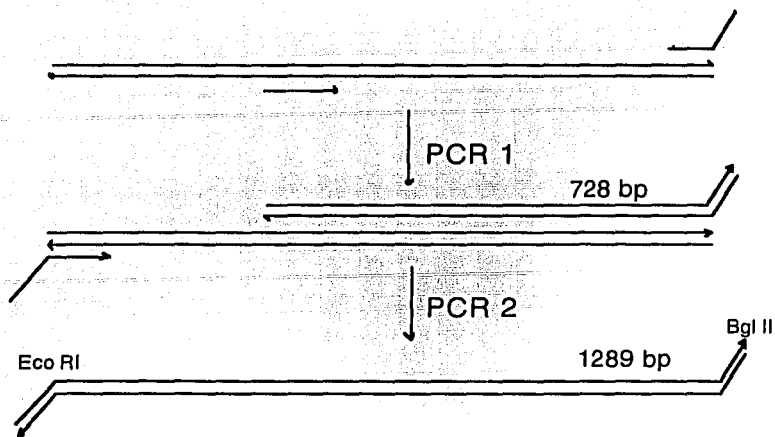


Figura 12. Análisis del oligo mutagénico GAFTGAmut por electroforesis. Gel A): carril 1: oligo GAFTGAwt semipuro, carril 2: oligo GAFTGAmut parcialmente etilado (1/500), carril 3: oligo GAFTGAmut parcialmente etilado (5/500). Gel B): carril 1: oligo GAFTGAwt semipuro, carril 2: oligo GAFTGAmut parcialmente etilado (5/500), carril 3: oligo GAFTGAmutup, carril 4: oligo GAFTGAmutdown. Gel C): carril 1 y 2 igual que gel B, carril 3: GAFTGAmutup desetilado, carril 4: GAFTGAmutdown desetilado.

Debido a que la fracción GAFTGAmutdown parecía estar más contaminada con secuencia silvestre (figura 12B) que la fracción GAFTGAmutup, se decidió realizar la evaluación biológica de solo ésta última. Esta labor fue realizada por el Dr. Ricardo Grande en el laboratorio del Dr. Enrique Morett, ubicado en este instituto. Primero se generó un megaprimer por PCR, utilizando como oligos amplificadores a GAFTGAmutup y un oligo llamado *Bgl*II localizado “río abajo” de la terminal 3’ del gene *pspF*, que a su vez se usó como templado. Este gene se encuentra clonado en el plásmido pMJ15. El megaprimer fue purificado por gel de agarosa y utilizado junto con otro oligo (*Eco*RI) localizado “río arriba” del gene *pspF* para amplificar y generar la genoteca de variantes. La genoteca fue digerida con las enzimas de restricción *Eco*RI-*Bgl*II y clonada en el mismo plásmido previamente digerido con este juego de enzimas (figura 13).

Para la transformación se usó la cepa *E. coli* JM101. A fin de estudiar la variabilidad del banco, las transformantes fueron plateadas sobre medio LB sólido, sin selección de función. Tras crecimiento a 37°C, se inocularon 17 colonias y se purificó el plásmido de cada una de ellas para analizar el banco por secuenciación de DNA (Tabla II).



Plásmido: PMJ15; Cepa: *E. coli* JM101

Figura 13. Amplificación de la biblioteca de oligonucleótidos GAFTGAmutup por PCR doble.

Tabla II. Secuencias nucleotídicas de la región GAFTGA del gene *pspF*, mutagenizada con el trimero Fmoc-GCT-Et-amidito.

	G83	F85	T86	G87													
wt	G	TTT	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9347	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GCT	ACG	TTT	GCT	GGT	GCG	CTA	ATA	CGT	CAT	
9350	G	TTT	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9351	G	TTC	AGT	CAC	GAA	GCG	GCT	GCG	TTT	ACC	GCT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9353	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	GCT	GCT	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9354	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GCT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9355	G	TTC	GGT	CACGGAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GGT	GCG	CA	AAA	TCG	TCA		
9357	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GCT	GCG	GCT	ACC	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9358	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCC	GCT	GCG	TTT	GCT	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9360	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GCT	GTG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9361	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GCT	GCG	TTT	ACC	GCT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9363	G	TTT	GGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GGT	GTG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9362	G	TTT	GT	CAC	GAA	GCG	GG	CG	TTT	ACC	GGC				A	CGT	CAT
9356	G	TTC	TGT	CAC	GAA	GCG	GGG	CG	TTT	ACC	GGT	GTG	CAA	AAA	CGT	CAT	
9348	G	TTCGGGT	CAC	GAA	GCG	GGG	GTG	TTT	ACC	GGT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT		
9349	G	TTC	GGG	CCC	CAA	ACG	GGG	GCCGTTA	ACC	GGG	CCC	CAA	AAC	CGT	ATT		
9352	G	TTC	GGT	CACGGAA	GCG	GGG	GCG	TTT	ACC	GCT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT		
9359	G	TTC	GGT	CAC	GAA	GCG	GCT	GCG	GCT	ACC	GCT	GCG	CAA	AAA	CGT	CAT	

El análisis de tales secuencias nos permitió plantear las siguientes conclusiones parciales:

- De acuerdo al nivel de mutagénesis experimental promedio de 24.5% por codón, la frecuencia esperada de variantes —calculada en la tabla III por la ecuación de distribución binomial— en la biblioteca de oligonucleótidos debería estar sesgada hacia las mutantes sencillas. En este punto debemos aclarar que la frecuencia experimental, calculada en la misma tabla III, no se consideraron las secuencias silvestres 9350, 9362 y 9363 por ser contaminaciones del templado, las cuales fueron identificadas por la presencia de T en vez de C en la cuarta posición a partir de la terminal 5'. Estos resultados indicaron que el proceso de selección electroforético, a pesar de no haber sido tan fino, generó un enriquecimiento hacia las mutantes dobles de 20.5% hacia 42.9% y un empobrecimiento de las sencillas de 42.2% hacia 21.4%. Este resultado indicó que el método realmente es selectivo, aunque es necesario optimizarlo para que sea efectivo para cualquier tipo de oligonucleótido. Así, la fracción GAFTGAmutup, a pesar de la muestra analizada tan pequeña (17 clonas), fue capaz de representar 5 de las 6 posibles mutantes dobles. Este resultado también indicó que los oligonucleótidos grandes pierden resolución tanto por electroforesis como HPLC de intercambio iónico (resultado no mostrado), a pesar de poseer un contenido diferencial de fosfatos no iónicos bastante significativo. La razón de esta pobre separación probablemente sean los tipos de diastereoisómeros que se forman en las mezclas.

Tabla III. Frecuencia esperada ($P_{teórica}$) y experimental (P_{exp}) de variantes en la biblioteca GAFTGA y GAFTGAmutup respectivamente.

x	$P_{teórica} (%)$	$P_{exp} (%)$
0	32.5	28.6
1	42.2	21.4
2	20.5	42.9
3	4.4	7.1
4	0.4	0.0

- La mutagénesis mapeó todos los aminoácidos que comprendieron la ventana de mutagénesis y en consecuencia dicho método debe generar todas las posibles variantes para explorar apropiadamente el espacio de secuencia correspondiente a mutantes sencillas y dobles.
- Se obtuvieron varias inserciones, sustituciones y deleciones de bases que probablemente se generaron durante la síntesis del oligo. Las inserciones solo se explican por el uso de DMTr-β-cianoetil amiditos parcialmente destritilados, de tal manera que durante un acoplamiento se

pudieran adicionar dos nucleótidos en lugar de uno solo. Las sustituciones probablemente se generaron por bases modificadas durante alguno de los procesos de desprotección. Finalmente, las deleciones están bien documentadas y se generan ya sea por acetilaciones o destrilados incompletos en cada uno de los ciclos de síntesis [58-60]. Sin embargo, tampoco descartamos la posibilidad de que tales modificaciones se hayan generado durante el proceso de PCR debido a un apareamiento incompleto de los oligos mutagénicos con el templado y de manera particular, en este caso el problema se pudo haber magnificado por la existencia del "mismatch" cercano a la terminal 5' del oligo mutagénico.

Por tanto, basados en estos resultados no concluyentes, nos planteamos las siguientes perspectivas:

- ◆ Determinar el límite de resolución electroforética para oligonucleótidos parcialmente protegidos, analizando como principales variables el tamaño y la relación fosfato-triésteres/fosfatos-iónicos con respecto a la separación.
- ◆ Repetir el análisis de diversidad en bibliotecas pre-seleccionadas y clonadas.
- ◆ Abordar el origen de las clonas inesperadas, por ejemplo, aquellas que presentan deleciones e inserciones de nucleótidos, para tratar de generar exclusivamente variantes con marcos de lectura correctos.

MUTAGENESIS BASADA EN Fmoc-DINUCLEOTIDOS

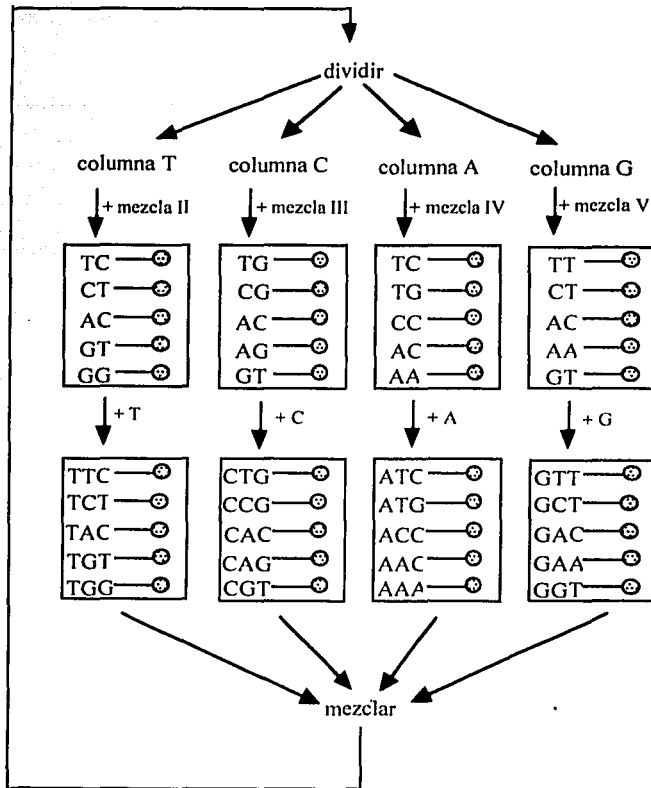
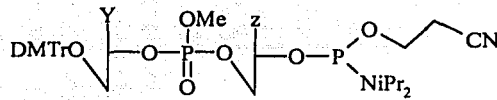
-ESTRATEGIA ALTERNA-

Síntesis de Fmoc-dinucleótido fosforamiditos

A pesar de haber desarrollado una ruta de síntesis reproducible para la preparación de Fmoc-trinucleótido amiditos mostrada en el esquema III, es evidente que completar un juego de 20 trímeros que codifiquen a los aminoácidos comunes y poder aplicarlos en barridos múltiples de aminoácidos es una labor compleja, sobre todo por requerirse una gran cantidad de sustratos no comerciales. Por tanto, se vislumbra que la aplicación más práctica de estos compuestos estará enfocada en el barrido específico de ciertos aminoácidos (alanina, glicina, cisteína, lisina, aspártico, etc.) para tratar de resolver preguntas específicas, como por ejemplo posiciones óptimas para formar puentes disulfuro, puentes salinos, catalizar una reacción, etc.

En 1998, Philippe Neuner [61] describió un método muy ingenioso para realizar mutagénesis a saturación a nivel de codón (Figura 14). Esta estrategia combina el uso de DMTr-dinucleótido amiditos y el enfoque de separación de resina, como una forma de eliminar la redundancia de codones en las bibliotecas de oligonucleótidos. Consiste en generar subconjuntos de diferentes codones con secuencia $B_1B_2B_3$, a través de separar la resina que contiene al oligo creciente, y hacer reaccionar cada fracción con una mezcla específica de DMTr-dinucleótido amiditos, portando la secuencia B_2B_3 correspondiente a la segunda y tercer posición nucleotídica de los codones mutantes. Los codones mutantes son completados por la adición de un monómero específico a cada una de las fracciones para definir la primer posición nucleotídica B_1 . Desafortunadamente este esquema de mutagénesis requiere el uso de once DMTr-dinucleótido amiditos y sobre todo, requiere separar la resina para cada codón a explorar, un proceso tedioso, laborioso y difícil de automatizar.

Con base en este antecedente, tomamos el concepto de dímeros, junto con el hecho de que los grupos Fmoc y DMTr son químicamente ortogonales para desarrollar un método de mutagénesis también basado en codones, donde los codones mutantes son ensamblados a base de Fmoc-dímeros y los codones silvestres a base de DMTr-monómeros. Esta idea se vió reflejada en el artículo de investigación que acompaña la presente tesis.



Neumer, P. et al (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 1223-1227.

Figura 14. Método de mutagénesis a nivel de codón ejecutado con mezclas de DMTr-dinucleótido amiditos y separación de resina en 4 columnas.

La diversidad del método se fundamenta en la combinación de cinco Fmoc-dinucleótido amiditos y cuatro DMTr-monómero amiditos para generar 20 trinucleótidos que codifican a un conjunto de 18 aa, como se ilustra en la figura 15. En esta mezcla se excluyen codones para metionina y triptofano, porque su inclusión hubiese requerido dos Fmoc-dinucleótido amiditos

adicionales, generando un incremento en la redundancia. La racionalización del método, se basa en la contaminación del oligonucleótido creciente con una mezcla diluida de Fmoc-dinucleótido amiditos; en términos estrictamente contaminantes, solo una fracción muy pequeña de cadenas reaccionarán con los Fmoc-dinucleótidos y permanecerán “detenidas”, mientras que la mayoría de cadenas que no reaccionaron son saturadas con el codón silvestre ensamblado a base de 3 acoplamiento secuencial de DMTr-monómero amiditos convencionales. En este punto, estas cadenas silvestres se detienen, se remueve el grupo Fmoc y se completan los codones mutantes a través de una mezcla G/C/T/A de DMTr-monómero amiditos. Este proceso denominado ciclo mutagénico, se repite para cada codón silvestre a explorar.

B ¹				B ² B ³	
T	C	A	G		
TAA	CAA <i>Gln</i>	AAA <i>Lys</i>	GAA <i>Glu</i>	AA	
TTT <i>Phe</i>	CTT <i>Leu</i>	ATT <i>Ile</i>	GTT <i>Val</i>	TT	
TAT <i>Tyr</i>	CAT <i>His</i>	AAT <i>Asn</i>	GAT <i>Asp</i>	AT	
TGC <i>Cys</i>	CGC <i>Arg</i>	AGC <i>Ser</i>	GGC <i>Gly</i>	GC	
TCG <i>Ser</i>	CCG <i>Pro</i>	ACG <i>Thr</i>	GCG <i>Ala</i>	CG	

Figura 15. Mezclas de dímeros y monómeros que pueden dar lugar a subconjuntos de codones que representan aminoácidos de distintas propiedades.

A fin de evaluar esta estrategia, sintetizamos los cinco Fmoc-dinucleótido amiditos, AA, TT, AT, GC y CG que se muestran en la figura 16, a través de la ruta de síntesis previamente optimizada para trímeros (esquema III) y los DMTr-etil-fosoramiditos de dA^{bz}, dG^{ib}, dC^{bz} y dT. Los resultados concernientes a la síntesis de estos compuestos fueron concentrados en la tabla IV, así como información de su caracterización espectroscópica y su análisis de calidad por HPLC. En términos generales, los Fmoc-dinucleótidos se obtuvieron con buena calidad (>90%) y rendimientos regulares debido al proceso de purificación cromatográfico, mientras que sus respectivos fosoramiditos fueron recuperados sólo por precipitación en forma cruda.

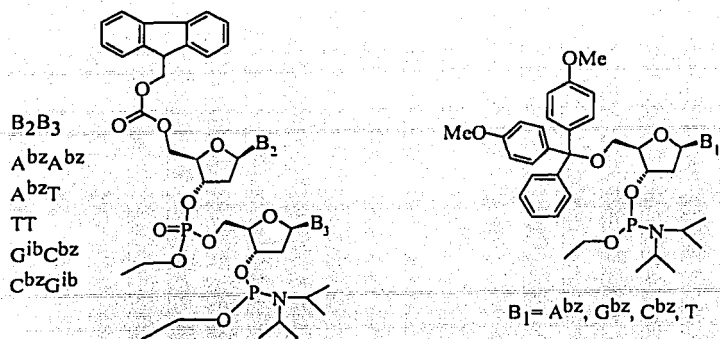


Figura 16. Fmoc-dinucleótido-etil-fosforamiditos y DMTr-nucleósido-etil-fosforamiditos sintetizados para el barrido múltiple de aminoácidos.

Tabla IV. Resultados de la síntesis y análisis de los Fmoc-dinucleótido-fosforamiditos sintetizados para el barrido múltiple de aminoácidos, así como de sus correspondientes precursores.

Compuesto	Materias primas	Rendimiento (%)	Pureza (%)	t_r (min)	^{31}P NMR (ppm)
Fmoc-TT	5'-O-Fmoc-dT 3'-O-DMTr-dT	55.2	95.6	4.34 4.59	-0.483 -1.216
Fmoc-TT-amidito	Fmoc-TT	90.5	82.4	18.78, 18.95 19.65	148.399, 147.998 -0.671, -0.695, -0.718
Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$	5'-O-Fmoc-d A^{bz} 3'-O-DMTr-d A^{bz}	50.6	94.5	7.07 7.45	-0.896 -1.135
Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$ -amidito	Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$	79.4	82.1	24.32, 24.58 24.71, 24.91	148.210, 148.190, 148.178 -0.695, -0.900
Fmoc- $A^{bz}T$	5'-O-Fmoc-d A^{bz} 3'-O-DMTr-dT	61.9	93.2	5.69 5.98	-0.567 -1.098
Fmoc- $A^{bz}T$ -amidito	Fmoc- $A^{bz}T$	71.5	91.2	21.48 22.21	148.30, 148.00 -0.668, -0.685, -0.705
Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$	5'-O-Fmoc-d G^{iBu} 3'-O-DMTr-d C^{bz}	89.6	97.9	6.95 7.94	0.092 -1.683
Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$ -amidito	Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$	89.0	82.1	24.01, 24.29 25.27, 25.48	149.10, 148.70, 148.30 -0.530, -0.607, -0.705, -0.718
Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$	5'-O-Fmoc-d C^{bz} 3'-O-DMTr-d G^{iBu}	48.2	98.0	8.29	-1.263 -1.656
Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$ -amidito	Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$	82.4	54.5	25.19, 25.38 26.90, 27.07	148.452, 147.968, 147.656 -1.545, -1.697, -1.828

Evaluación biológica

Las β -lactamasas son enzimas ampliamente distribuidas en las bacterias, siendo responsables de la resistencia de estos microorganismos a antibióticos β -lactámicos, como penicilinas y cefalosporinas de uso muy común en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin lugar a duda, son uno de los mejores modelos proteicos para estudiar aspectos tan diversos como especificidad, catálisis y plegamiento, debido principalmente a su pequeño tamaño (263 aa), a la presencia de estructuras cristalográficas resueltas [62], al conocimiento de su mecanismo catalítico [63], a la existencia de una gran variedad de sustratos que comparten el mismo núcleo básico pero cuyas cadenas laterales confieren un amplio espectro de especificidades. Además, se conoce con cierto detalle el papel que desempeñan muchos de sus residuos [64]. De manera particular, nosotros decidimos trabajar con la β -lactamasa TEM_{pUC19} porque se localiza en el vector de clonación pUC19 ampliamente difundido en los laboratorios de investigación y es funcionalmente equivalente a la enzima TEM-1 (figura 17), clínicamente importante. El sustrato natural de TEM-1 es la penicilina-G o bien el análogo de ella, la ampicilina, causando la ruptura del anillo β -lactámico. Estos dos antibióticos, mostrados en la figura 18 pertenecen a las penicilinas de primera generación. En cambio TEM-1 es susceptible a **ceftazidima**, un antibiótico que pertenece al grupo de las cefalosporinas. Aquí cabe mencionar que el esqueleto básico de las penicilinas está formado por dos heterociclos fusionados entre sí, un anillo β -lactámico y un anillo tiazolidina, mientras que en el caso de las cefalosporinas el anillo tiazolidina es reemplazado por un anillo dihidrotiazina. Por tanto, aunque ambos tipos de antibióticos están agrupados como β -lactámicos, las cefalosporinas son moléculas más voluminosas que las penicilinas.

Para valorar el método de mutagénesis, se aleatorizó la región 237-243 de la enzima β -lactamasa TEM_{pUC19}, que incluye los aa Ala237, Gly238, Glu240, Arg241, Gly242 y Ser243, numerados con base en la clasificación de Ambler [65]. En la literatura se ha descrito que cambios sencillos de G238→S y E240→K en la enzima silvestre, incrementan su eficiencia hidrolítica hacia el antibiótico **ceftazidima** aproximadamente 70 veces, mientras que la mutación doble G238→S + E240→K la incrementa 2668 veces y la mutación triple G238→S + E240→K + R241→G 5794 veces [66]. Por tanto, esta región proteica contiene determinantes importantes para el cambio de especificidad desde ampicilina hacia ceftazidima y resulta un buen modelo para valorar si tales residuos estarán representados en las bibliotecas ensambladas con Fmoc-dinucleótidos, en ventanas de mutagénesis superiores a aquellas ya exploradas.

el codón silvestre con 2 acoplamiento de DMTr-monómeros, se removió el grupo Fmoc de las cadenas modificadas y los codones mutantes se completaron con una mezcla equimolar de los cuatro DMTr-monómeros (N). El ciclo mutagénico se repitió cinco veces más hasta completar la ventana de prueba.

Análisis previos de los Fmoc-dinucleótidos, habían mostrado que éstos compuestos poseían distinta reactividad relativa, por lo que el coctel se preparó con diferentes concentraciones de cada uno de ellos para tratar de compensar dichas diferencias, normalizando con respecto al dímero TT que resultó la especie más reactiva (TT:AA:AT:GC:CG → 1.00:1.03:1.10:1.75:2.32).

Es importante mencionar que la concentración total del coctel de Fmoc-dímeros fue 41 mM, mientras que los DMTr-monómeros utilizados para ensamblar la secuencia silvestre fueron utilizados a concentración 100 mM. Asumiendo que tanto los DMTr-monómeros, como los Fmoc-dímeros debían poseer una reactividad similar, se esperaba obtener una contaminación promedio de 29.2%, sin embargo el nivel experimental de contaminación fue de 40.5%, 11.3% arriba del valor esperado. Tal resultado es indicativo de una mayor reactividad de los dímeros con respecto a los monómeros y correlaciona con la observación general de que los alquil-fosforamiditos [40] son más reactivos que los β-cianoetil fosforamiditos, debido a un efecto electroatractor por parte del grupo β-cianoetilo sobre el fósforo trivalente, desfavoreciendo la salida del radical diisopropilamino. A pesar de esto, el nivel de mutagénesis fue cercano al predicho.

Este oligonucleótido mutagénico se denominó **Blamut42** por su contenido de nucleótidos y al igual que en el barrido de alanina, también se sintetizó el oligonucleótido silvestre **Blawt42** a fin de usarlo como control en los experimentos electroforéticos.

Una pequeña fracción del oligo mutagénico blamut42 se trató igual que el oligo GAFTGAmut, pero ahora debido al mayor número de variantes en la población, se observó un barrido de productos de menor migración con respecto a blawt42. Al tratar una pequeña fracción del oligo semidesprotegido con tiofenol/NH₄OH para desetilar los fosfatos internucleotídicos de los codones mutantes, se generó una banda con migración idéntica al oligonucleótido silvestre (figura 19). Por tanto, en vista de que no sería posible realizar la separación de variantes (a pesar de que con mezclas de pentadecámeros de timidina si lo fue), el resto del oligo blamut42 todavía

enlazado al soporte de síntesis, fue primeramente desetilado con tiofenol/trietilamina y luego fue completamente desprotegido con NH_4OH concentrado y purificado por gel de poliacrilamida.



Figura 19. Análisis del oligo mutagénico blamut42 por electroforesis en gel de poliacrilamida. Carril 1: oligo control blawt42 semipuro; carril 2: oligo blamut42 parcialmente etilado; carril 3: oligo de carril 2 tratado con tiofenol/ NH_4OH para eliminar los etilos internucleotídicos.

La amplificación y clonación de la biblioteca Blamut42 se realizó de manera similar al barrido de alaninas. Se creó primero un megaprimer de 195 bp por PCR, utilizando el plásmido pUC19 como templado, y los oligos Blamut42 y tailendXho como iniciadores de la reacción de polimerización. El oligo tailendXho de secuencia 5'agccgtggatcgtggctcgcagtcattaccaatgcttaacag3' es parcialmente complementario a la terminal 3' del gen bla_{pUC19} localizado en el plásmido pUC19 y contiene el sitio de restricción *Xho* I. En una segunda reacción de PCR utilizando nuevamente el plásmido pUC19 como templado, la mezcla de megaprimers y el oligo SPNco se utilizaron para generar fragmentos de 873 bp conteniendo los genes mutantes completos. El oligo SPNco de secuencia 5' cgggccatggctattcaacattccgtg-cgcccttattcccttttttggggcattt 3' es parcialmente complementario a la terminal 5' del gen bla_{pUC19} y contiene el sitio de restricción *Nco* I. Los fragmentos fueron digeridos con la mezcla de enzimas *Nco*I/*Xho*I y ligados al vector pT4 previamente linearizado y conteniendo el promotor natural *bla* de la β -lactamasa TEM-1. La ligación vector-inserto fue electroporada en la cepa *E.coli* XL1-Blue y una milésima parte fue plateada sobre LB con kanamicina para recuperar solo las células transformadas, ya que el plásmido pT4 contiene el gene que confiere resistencia a este antibiótico no-penicilínico. El tamaño del banco de mutantes, crecido sin selección hacia un antibiótico

penicilínico se denominó **banco 1** y fue de 10^6 variantes. El resto de la electroporación se diluyó con LB líquido y se recuperó como una genoteca de plásmidos. Se analizó la diversidad de éste banco por secuenciación de DNA de 20 clonas escogidas al azar (Tabla V), observando un mapeo completo de toda la ventana de mutagénesis.

Tabla V. Banco de mutantes (banco 1) crecidas sin selección hacia un antibiótico penicilínico y generado con el oligo mutagénico Blamut42. Secuencias nucleotídicas de la región 237-243 del gene *bla_{pUC19}*. Las celdas vacías representan a los codones silvestres. Las clonas silvestres (8) no se incluyeron en la tabla.

Clona	Secuencia nucleotídica					
Wt	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
B1mut1			GTG	TCG		TCG
B1mut7	CGC				AGG	GAT
B1mut10		CGC	GCG		GAA	
B1mut12			GAA	GAA		AGC
B1mut13	ACG		GGG	GGC		
B1mut15			GCG	TGC	AGC	GAT
B1mut19						TTT
B1mut20	GCT		TCG	GAT		GCG
B1mut3	ATT	___A		GGC	CCG	AAT
B1mut9				C__T		TCG
B1mut17		TGC	CTT			AAA

De estas clonas, una resultó contaminada con otras y fue eliminada, mientras que otras tres resultaron con deleciones y 8 fueron clonas silvestres. Las deleciones de un nucleótido, al menos en los casos de las clonas B1mut9 y B1mut17 cayeron en regiones silvestres ensambladas a base de DMTr-monómeros convencionales y solo se explican a través de pasos de capping o destrilados incompletos [58]. En este banco se obtuvieron principalmente mutantes triples y aparecieron 15 de los 18 posibles aminoácidos. Sin embargo, un análisis más detallado de las secuencias, permitió determinar que el banco presentaba sesgo hacia codones generados con el dímero CG. Este resultado correlacionó con la reactividad relativa de la mezcla de dímeros utilizada para este experimento, determinada por HPLC a través de la síntesis de una mezcla de trímeros CGA, GCA, AAA, ATA y TTA (figura 20A). De manera adicional, aparecieron cuatro codones mutantes que fueron generados con los dímeros TG, GT, y GG, los cuales no forman

parte del coctel utilizado y debieron generarse por error de la enzima Taq-DNA-polimerasa durante las reacciones de amplificación [22], o bien por modificaciones químicas de algunos de los nucleótidos durante el ensamble o tratamiento del oligonucleótido mutagénico.

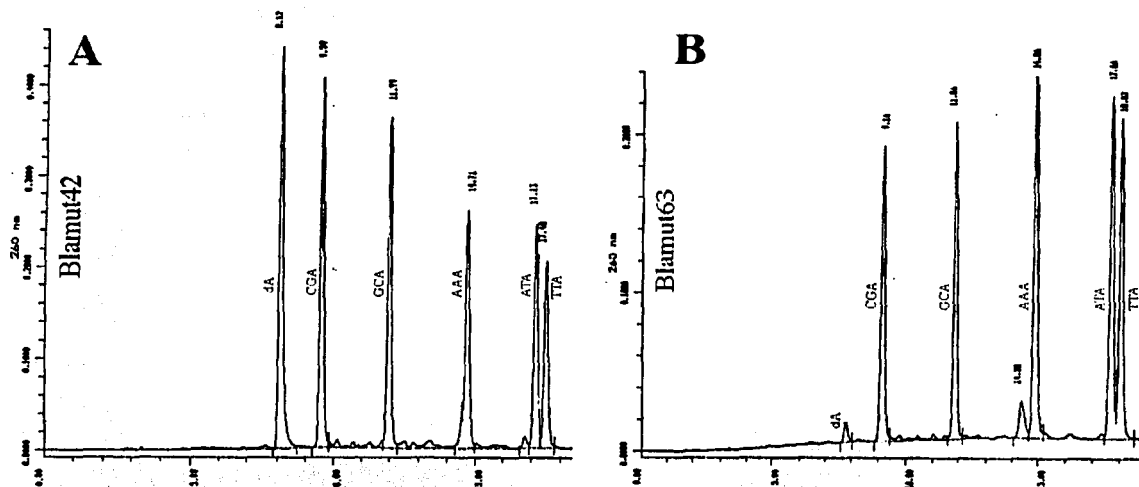
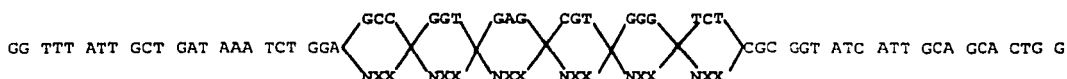


Figura 20. Frecuencia de trinucleótidos generada con las mezclas de Fmoc-dinucleótido amiditos utilizadas para ensamblar las bibliotecas de oligos Blamut42 y Blamut63.

Para tratar de solucionar el problema de sesgo hacia cierto tipo de codones y secuencias extrañas en los bancos, se resintetizó el oligonucleótido mutagénico utilizando ahora zonas flanqueantes más grandes para tratar de aumentar la especificidad de hibridación con el templado, además de una distinta proporción de dímeros (TT:AA:AT:GC:CG → 1.00:1.03:1.03:1.03:1.23). La nueva mezcla mutagénica de dímeros dió lugar a una frecuencia aproximada de 20% para cada uno de los trímeros generados con el nucleósido dA, según el análisis por HPLC (figura 20B).

Este segundo oligonucleótido mutagénico, **Blamut63**, fue ensamblado con la secuencia:



en forma similar a Blamut42. La tasa promedio de mutagénesis para este oligo fue de 29.1% por codón.

El experimento de clonación dió lugar a un banco sin selección hacia un antibiótico penicilínico, generando 1.5×10^6 variantes y denominándosele **banco 2**. A fin de analizar la diversidad introducida con el oligo Blamut63, se secuenciaron 20 clonas al azar de éste banco y los resultados se concentraron en la Tabla VI. Tres de las clonas resultaron contaminadas con otras y fueron descartadas, mientras que otras tres presentaron deleciones o inserciones de nucleótidos. De las 14 variantes restantes, 6 correspondieron a clonas silvestres y no fueron incluidas en la tabla. La distribución de mutantes mostró un mapeo casi completo de la ventana de mutagénesis, obteniendo principalmente mutantes dobles, que correlacionan con la tasa de mutagénesis experimental. El único codón que no apareció mutagenizado en este banco fue GGG, y la posible razón es que desde el punto de vista experimental dicho codón fue el que presentó menor incorporación de la mezcla mutagénica, siendo su nivel de contaminación de 17%, es decir, 12% menos que el nivel de mutagénesis promedio. La variación en los niveles de contaminación particular para cada codón, realmente refleja un problema técnico, que probablemente se solucionaría con una cámara premezcladora antes de llegar a la columna de síntesis o bien premezclando cada uno de los DMTr-monómeros con la mezcla mutagénica de Fmoc-dímeros.

Tabla VI. Banco de mutantes (banco 2) crecidas sin selección hacia un antibiótico penicilínico y generado con el oligo mutagénico Blamut63. Secuencias nucleotídicas de la región 237-243 del gene *bla_{pUC19}*. Las celdas vacías representan codones silvestres. Las clonas silvestres (6) no se incluyeron en la tabla.

Clona	Secuencia nucleotídica					
	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
Wt						
B2mut2		ATT				
B2mut4	CAT	GCG	TAA			
B2mut7				CGC		CTT
B2mut8	GCG		CAA			
B2mut9			AGC			
B2mut10	TTT					
B2mut11		GAT				GCG
B2mut12	GTT		TAT			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una fracción del banco de plásmidos proveniente del banco 2 y consecuentemente generado con el oligo Blamut63, fue retransformada y seleccionada sobre 4 cajas de ceftazidima a concentración de 12.25 µg/ml, a fin de seleccionar mutantes hacia esta cefalosporina con resistencia 100 veces mayor a la enzima silvestre. De este banco, denominado **banco 3**, sólo crecieron 13 colonias. Se recuperó plásmido de todas ellas (excepto la mutante B3cazmut10 que fue un falso positivo) y se secuenció la región mutagenizada, concentrándose los resultados en la Tabla VII. Estos datos mostraron que el oligo Blamut63 sólo era capaz de explorar el espacio de secuencia correspondiente a mutantes dobles y sencillas, pero no era capaz de explorar todas las mutantes triples, porque ninguna de las reportadas por Palzkill [66] fue recuperada.

Tabla VII. Banco de mutantes (banco 3) crecidas con selección hacia la cefalosporina CEFTAZIDIMA, generado con el oligo mutagénico Blamut63. Secuencias nucleotídicas de la región 237-243 del gene *bla_{pUC19}*. Las celdas vacías representan a los codones silvestres.

Clona	Secuencia nucleotídica (aminoácido)					
	GCC (A237)	GGT (G238)	GAG (E240)	CGT (R241)	GGG (G242)	TCT (S243)
B3CAZmut1			CGC (R)			
B3CAZmut2			AGC (S)			
B3CAZmut3		AGC (S)	AAA (K)			
B3CAZmut4			AAA (K)	GCG (A)		
B3CAZmut5			CGC (R)			
B3CAZmut6			CGC (R)			
B3CAZmut7		TCG (S)	CGC (R)			
B3CAZmut8		TCG (S)	CGC (R)			
B3CAZmut9			CGC (R)			
B3CAZmut11			AAA (K)	GCG (A)		
B3CAZmut12			AAA (K)	GCG (A)		
B3CAZmut13			CGC (R)	GAT (D)		

A fin de buscar las mutantes triples de Palzkill y sobretodo sabiendo que el banco 1 generado con el oligo Blamut42 estaba enriquecido con este tipo de variantes, se retransformó una fracción del banco de plásmidos generado con tal oligo y se seleccionó nuevamente sobre ceftazidima a 12.25 µg/ml. En este banco, denominado **banco 4**, crecieron 11 mutantes, de las cuales B4CAZmut3 fue un falso positivo, mientras que el resto de ellas fueron secuenciadas y los

resultados se concentraron en la tabla VIII. En este banco resurgió la doble mutante E240K:R241 que apareció por triplicado en el banco B3 y también surgió la mejor triple mutante de Palzkill (B4CAZmut6) [66].

Tabla VIII. Banco de mutantes (banco 4) recuperadas con selección hacia la cefalosporina CEFTAZIDIMA, generado con el oligo mutagénico Blamut42. Secuencias nucleotídicas de la región 237-243 del gene *bla_{pUC19}*. Las celdas vacías representan a los codones silvestres.

Clona	Secuencia nucleotídica					
	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
B4CAZmut1		AAT	AAA	CAA		
B4CAZmut2			GCG			
B4CAZmut4			CGC			
B4CAZmut5			GCG			
B4CAZmut6		AGC	AAG	GGC		
B4CAZmut7			CGC			
B4CAZmut8			AAA	GCG		
B4CAZmut9			AAG			
B4CAZmut10		AAT	AAG	GAA		
B4CAZmut11			GTT			

Las 22 mutantes provenientes de los bancos 3 y 4, fueron retransformadas, subclonadas y secuenciadas completamente para asegurar que los cambios de especificidad hacia ceftazidima se debían estrictamente a cambios en su secuencia primaria de aminoácidos y no a mutaciones cromosomales de la célula huésped [67]. Las clonas fueron secuenciadas completamente, se agruparon y se les analizó su resistencia contra ampicilina, ceftazidima y cefotaxima. Los resultados se concentraron en la tabla IX. Varias de ellas presentaron mutaciones puntuales del residuo 164, causadas por error de la polimerasa.

Discusión de las mutantes.

El primer punto a notar de las tablas VII y VIII es que los residuos Ala237, Gly242 y Ser243 siempre se conservaron bajo la selección de ceftazidima, indicando que son los aminoácidos óptimos de la región analizada para generar una hidrólisis eficiente de esta cefalosporina. Previamente se había encontrado un resultado similar para la Ala237 [68] a través

de mutagénesis convencional NNG/C de los tres residuos contiguos Ala237, Gly238 y Glu240, pero no habían sido descritos para los residuos Gly242 y Ser243. El método también fue capaz de reproducir las dobles mutantes G238S:E240R, G238S:E240K y la triple mutante G238S:E240K:R241G que surgieron en dos bibliotecas independientes [66, 68]. Las triples mutantes G238N:E240K:R241Q y G238N:E240K:R241E, aunque son nuevas, son esencialmente similares a la doble mutante G238N:E240K reportada por Cantu [68].

Tabla IX. Sustituciones de aminoácidos en mutantes resistentes a ceftazidima, obtenidas de las bibliotecas de oligos Bla-mut42 y Bla-mut63 y sus respectivas susceptibilidades frente a ampicilina (AMP), ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX).

Clonas	Aminoácidos (codones)				MIC (µg/ml)		
	AMP	CAZ	CTX				
wt	R164 (cgt)	G238 (ggt)	E240 (gag)	R241 (cgt)	2400	0.15	0.06
Palzkill	wt	S (agc)	K (aaa)	G (ggc)	1200	15	0.48
B3CAZmut7, B3CAZmut8	wt	S (tcg)	R (cgc)		2400	20	1.92
B3CAZmut3	wt	S (agc)	K (aaa)		1200	15	0.06
B4CAZmut6	wt	S (agc)	K (aag)	G (ggc)	1200	15	0.48
B4CAZmut1	wt	N (aat)	K (aaa)	Q (caa)	600	15	0.24
B4CAZmut10	wt	N (aat)	K (aag)	E (gaa)	600	15	0.48
B4CAZmut2, B4CAZmut5	wt		A (gcg)		2400	20	0.48
B4CAZmut9	H (cat)		K (aag)		2400	15	0.12
B3CAZmut1, B3CAZmut5 B3CAZmut6, B3CAZmut9	H (cat)		R (cgc)		1200	30	0.24
B3CAZmut2	H (cat)		S (agc)		1200	20	0.12
B4CAZmut11	H (cat)		V (gtt)		1200	10	0.12
B3CAZmut4, B3CAZmut11 B3CAZmut12, B4CAZmut8	H (cat)		K (aaa)	A (gcg)	600	50	0.48
B4CAZmut4, B4CAZmut7	C (tgt)		R (cgc)		1200	20	0.24
B3CAZmut13	C (tgt)		R (cgc)	D (gat)	600	10	0.12

Como se observa en la mitad inferior de la tabla IX, algunas mutantes muy interesantes, dobles y triples, aparecieron en ambas bibliotecas, donde los reemplazos están separados por al menos 74 aa. La sustitución de la arginina 164 por histidina o cisteína fue claramente generada por error de la enzima "Taq DNA polimerasa" [22], a través del reemplazo de una guanina por una adenina o una citosina por una timina respectivamente, en el codón silvestre. Estas mutaciones aparecieron en nuestras bibliotecas porque se ha demostrado que la sustitución del residuo Arg164 por cualquiera de los otros 19 aa incrementa la resistencia hacia ceftazidima [69].

Se ha sugerido que este cambio de especificidad de penicilinas hacia cefalosporinas se debe a la destrucción de un puente salino formado entre los residuos altamente conservados Arg164 y Asp179, lo cual relaja la estructura denominada Ω -loop, compuesta por la región 164-179 que cubre el sitio activo y por lo tanto permite un mejor acomodo de antibióticos voluminosos como las cefalosporinas [69]. De hecho, la mutación R164H ha surgido en 8 mutantes clínicas en combinación con reemplazos en otras posiciones. Un ejemplo es la doble mutante natural TEM-28 [70], portando los cambios R164H:E240K, la cual también surgió en nuestras bibliotecas como la mutante B4CAZmut9. La pregunta en este punto es, ¿porqué la Arg164 fue reemplazada por histidina o cisteína y no por asparagina o serina?. Vakulenko demostró que las mutantes sencillas de estos aa presentaron la mayor resistencia hacia ceftazidima. La razón es muy simple, un cambio de Arg hacia Asn requiere dos sustituciones nucleotídicas en el codón silvestre "cgt", un evento muy improbable en la mutagenesis puntual. Sin embargo, la mutación R164S si puede generarse por una mutación puntual, convirtiendo el codón "cgt" en "agt", pero en este caso se requiere una transversión de base, representando un evento mucho menos probable que las transiciones de bases que dieron lugar a los codones de histidina y cisteína.

Al analizar la región mutagenizada con las bibliotecas de oligonucleótidos, en todas las mutantes resistentes a ceftazidima se observó una sustitución preferencial del Glu240 por aminoácidos catiónicos como Lys y Arg, resultado que concuerda con un modelo propuesto para el cambio de especificidad hacia este antibiótico, el cual sugiere la formación de una interacción electrostática entre la cadena lateral de estos residuos y el grupo carboxilo de la cadena del antibiótico [71]. En este sentido, el incremento de la resistencia hacia ceftazidima por parte de las dobles mutantes R164H:E240K, R164H:E240R y R164C:E240R es el resultado de la combinación de dos efectos: expansión del sitio activo e interacción electrostática entre el sustrato y la enzima mutante.

La mejor de nuestras mutantes, R164H:E240K:R241A, mostró una resistencia hacia ceftazidima 333 veces mayor que la enzima silvestre y se recuperó en las dos bibliotecas de oligonucleótidos. Esta mutante combina los dos efectos recientemente citados, pero de manera adicional la sustitución de Arg241 por alanina generó un incremento de resistencia de 3 veces con respecto a la doble mutante R164H:E240K. De todas las mutantes que poseen un residuo catiónico en la posición 240, se asume que la cadena 7 β de ceftazidima debe estar acomodada en el surco que se forma entre el Ω -loop y la vuelta que une las cadenas- β B3 y B4. Por esa razón la

reducción de volumen de la cadena lateral del residuo 241 disminuye las interacciones estéricas y permite un mejor acomodo de este antibiótico.

Otra evidencia que sugiere un mejor acomodo de la cadena 7 β del antibiótico en el citado surco, es la mutante doblemente aislada B4CAZmut2 y B4CAZmut5, en la cual dos aa contiguos, Glu240 y Arg241, fueron sustituidos por una alanina, generándose la delección de un aminoácido. Esta mutación pudo haber generado la expansión del surco y haber sido la razón para el incremento de resistencia de 133 veces con respecto a la silvestre. Tal resultado también correlaciona con el cambio de especificidad hacia ceftazidima causado por la expansión del sitio activo debido al relajamiento [69], reducción [72] o alargamiento [73] del Ω -loop.

La doble mutante R164H:E240S es interesante porque el residuo más frecuente en la posición 240 de otras β -lactamasas clase-A es la serina [65]. Quizá esta mutante debe incrementar su afinidad hacia ceftazidima por la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de la cadena lateral y el carboxilo de la cadena 7 β del antibiótico.

Desde un punto de vista clínico, la doble mutante R164H:E240V es atractiva porque ambas mutaciones pueden generarse por mutaciones puntuales de los codones originales. Sin embargo el reemplazo de glutámico por valina requiere la transversión de adenina por timina, y esta es la razón por la cual aún no ha surgido de manera natural. Esta mutante claramente desarrolló resistencia a ceftazidima a través del modelo de expansión del sitio activo [74]. En mutantes G238S se ha propuesto que la expansión puede ser causada por repulsión estérica de la serina con los residuos Met69 or Asn170, ya sea desplazando la cadena B3 [74] o el Ω -loop [75]. Nosotros especulamos que, en contra al residuo polar silvestre Glu240 dirigido hacia la fase acuosa, la cadena lateral hidrofóbica de la valina se debe alejar del medio acuoso y generar una repulsión estérica con cualquiera de los residuos mencionados arriba, causando la expansión del sitio activo.

Discusión de la variabilidad.

Basado en las tasas experimentales de mutagénesis de los oligos Blamut42 y Blamut63, se calculó a través de la ecuación de distribución binomial la frecuencia esperada (P_{teor}) de cada tipo de mutante y se determinó en base a los datos de secuencia de las tablas V y VI la frecuencia experimental (P_{exp}) de las variantes obtenidas en cada uno de los bancos generados sin selección. Los resultados resumidos en la tabla X, evidenciaron un sesgo muy significativo hacia las

secuencias silvestres. Por ejemplo, en Blamut42 se esperaba un 4.7% de secuencia silvestre y se obtuvo 50%, 45.3% más de lo estimado. En lo que respecta a las mutantes, solo Blamut63 parece haber generado una distribución verdaderamente binomial, con el pico en las dobles mutantes. Con base en tales resultados, asumimos que el sesgo en la distribución de variantes debió haberse generado por el doble proceso de PCR usado para ensamblar cada biblioteca de oligos, probablemente como consecuencia de una mejor complementación de las secuencias más homólogas a la secuencia silvestre, tal como fue demostrado por Ward and Juehne [76].

Tabla X. Frecuencia teórica y experimental de las variantes obtenidas sin selección de las cinco bibliotecas de oligonucleótidos mutagenizados con el método de Fmoc-dímeros. α representa la tasa de mutagénesis, P_{teor} la frecuencia esperada y P_{exp} la frecuencia experimental.

Codones mutantes por variante	Blamut42 ($\alpha = 40.5\%$)		Blamut63 ($\alpha = 29.0\%$)		polylinker20 ($\alpha = 20.5\%$)		Polylinker49 ($\alpha = 48.9\%$)		polylinker100 ($\alpha = 100\%$)	
	P_{Teor}	P_{exp}	P_{Teor}	P_{exp}	P_{Teor}	P_{exp}	P_{Teor}	P_{exp}	P_{Teor}	P_{exp}
0	0.047	0.500 (8)	0.128	0.428 (6)	0.262	0.281 (9)	0.016	0.000 (0)	0.00	0.00 (0)
1	0.187	0.063 (1)	0.314	0.214 (3)	0.393	0.531	0.094	0.125 (4)	0.00	0.00 (0)
2	0.311	0.000 (0)	0.321	0.286 (4)	0.246	0.125 (4)	0.234	0.250 (8)	0.00	0.00 (0)
3	0.276	0.313 (5)	0.175	0.071 (1)	0.082	0.062 (2)	0.313	0.250 (8)	0.00	0.00 (0)
4	0.138	0.125 (2)	0.053	0.000 (0)	0.015	0.000 (0)	0.234	0.187 (6)	0.00	0.00 (0)
5	0.037	0.000 (0)	0.009	0.000 (0)	0.001	0.000 (0)	0.094	0.125 (4)	0.00	0.00 (0)
6	0.004	0.000 (0)	0.000	0.000 (0)	0.000	0.000 (0)	0.016	0.062 (2)	1.00	1.00 (32)
Secuencias analizadas		16		14		32		32		32

A fin de demostrar que la mutagénesis a nivel de codón basada en dímeros, sigue un comportamiento binomial predecible en la frecuencia de mutantes, se sintetizaron tres bibliotecas a tasas de mutagénesis de 20%, 49% y 100% con la secuencia:

5' agtgc~~caagctt~~gga-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-cgcgaatcgtaatc3'

aleatorizando cada uno de los codones marcados en mayúsculas con el conjunto de codones NXX. En los extremos flanqueantes se crearon sitios de restricción *HindIII* y *EcoRI* para clonar las bibliotecas de oligonucleótidos como "cassettes" en la zona del polylinker del plásmido pUC19 y evitar las reacciones de PCR. Por tanto, las bibliotecas se etiquetaron como polylinker20, polylinker49 y polylinker100. Los oligos mutagénicos fueron convertidos en sus

dobles cadenas por extensión del primer complementario 5'gattacgaattcgcg3' y acción de una polimerasa de DNA que funciona a 37°C –fragmento Klenow-. Cada banco fue secuenciado hasta completar 32 secuencias en fase de lectura (Tablas XI, XII y XIII), observándose una fuerte correlación entre la tasa de mutagénesis y el tipo de mutantes creadas: a mayor tasa mayor frecuencia de mutantes múltiples y viceversa. La frecuencia de mutantes para cada biblioteca fue también concentrada en la tabla X, correlacionando con la frecuencia esperada de clonas silvestres y mutantes. Al graficar los datos de frecuencia contra tipo de mutantes, como se muestra en la figura 21, se obtuvo claramente una distribución binomial, confirmando la reproducibilidad y robustez del método de mutagénesis.

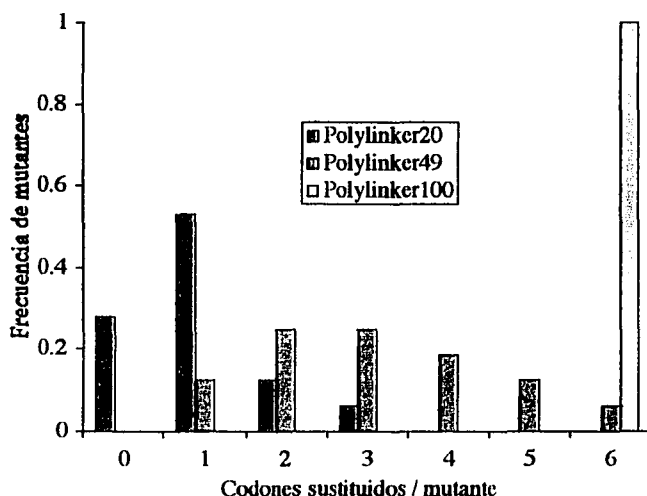


Figura 21. Frecuencia experimental de variantes obtenidas en las bibliotecas Polylinker20, Polylinker49 y Polylinker100 aleatorizadas con tasas de mutagénesis de 20%, 49% y 100% respectivamente, usando el método de mutagénesis basado en Fmoc-dímeros.

Adicionalmente, vale la pena mencionar que el método de mutagénesis basado en dímeros es muy versátil. Por ejemplo, se pueden generar diferentes subconjuntos de aminoácidos, ya sea modificando la mezcla de Fmoc-dímero amiditos o la mezcla de DMTr-monómero-amiditos que completan a los codones mutantes como se muestra en la figura 7. La distribución de variantes (conteniendo pocos o muchos reemplazos de codones) puede ser dirigida a través de la selección apropiada de la mezcla mutagénica de dímeros y adicionalmente, dicha contaminación puede

realizarse a través de un protocolo de pre-adición [38] a fin de optimizar el uso de estos compuestos tan valiosos.

En el presente trabajo se demostró el funcionamiento del método a través de la mutagénesis de seis codones contiguos, pero puede ser fácilmente aplicado a codones no contiguos y para ventanas hasta de 15 aa por oligonucleótido, que pueden ser confiablemente sintetizados hasta 75 nucleótidos de tamaño. Con ventanas de 15 codones y PCR recursiva, se podría explorar completamente genes del tamaño de *bla_{pUC19}* con solo 18 oligonucleótidos mutantes y tener una alta probabilidad de encontrar la mayoría de mutantes sencillas y dobles. Otro tipo de mutantes múltiples también podrían representarse en una forma inaccesible por cualquier otro método.

Tabla XI. SECUENCIAS DE DNA DE CLONAS GENERADAS CON LA BIBLIOTECA DE OLIGONUCLEOTIDOS POLYLINKER20.

WT	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.1	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.2	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	CTT	TCT	CGCGAATTC
20.3	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	ATT	CGCGAATTC
20.4	AAGCTT	GGA	GCC	TTT	GAG	CGC	GGG	GAA	CGCGAATTC
20.5	AAGCTT	GGA	GCC	CAA	GAG	GGC	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.6	AAGCTT	GGA	GCC	GTT	GAG	GAT	GGG	GCG	CGCGAATTC
20.7	AAGCTT	GGA	GTT	GGT	GAG	CGT	GGG	TTT	CGCGAATTC
20.8	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.9	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CAA	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.10	AAGCTT	GGA	GCC	CGC	GAG	TGC	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.11	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	CTT	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.12	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	CAA	CGCGAATTC
20.13	AAGCTT	GGA	GCC	GAA	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.14	AAGCTT	GGA	GCC	GCG	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.15	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	ACG	CGCGAATTC
20.16	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.17	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.18	AAGCTT	GGA	GCC	GGC	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.19	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	CCG	TCT	CGCGAATTC
20.20	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	AAA	CGCGAATTC
20.21	AAGCTT	GGA	GCC	CTT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.22	AAGCTT	GGA	AGC	GGT	GAG	CAT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.23	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	CCG	TCT	CGCGAATTC
20.24	AAGCTT	GGA	GCC	TGC	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.25	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.26	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	AAT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.27	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.28	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.29	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	TGC	TCT	CGCGAATTC
20.30	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.31	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	CAT	TCT	CGCGAATTC
20.32	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	AGC	CGCGAATTC
20.33	AAGCTT	GGA	GCC	A . .	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.34	AAGCTT	GGA	GCC	A . .	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.35	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GAG	CG .	GGG	TCT	CGCGAATTC
20.36	AAGCTT	GGA	GCC	GGT	GA .	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla XII. SECUENCIAS DE DNA DE CLONAS GENERADAS CON LA BIBLIOTECA DE OLIGONUCLEOTIDOS POLYLINKER49.

WT	AAGCTTGGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.1	AAGCTTGGA	GCC	TAT	TTT	TAA	GGG	AAA	CGCGAATTC
49.2	AAGCTTGGA	ATT	GGT	GAG	GTT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.3	AAGCTTGGA	GCC	TGC	GAG	CCG	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.4	AAGCTTGGA	GCC	GGT	TAT	AAA	GGG	CAT	CGCGAATTC
49.5	AAGCTTGGA	GCC	GGT	GAG	CAT	GGG	TGC	CGCGAATTC
49.6	AAGCTTGGA	TAT	GGT	GAG	CGT	GGG	CTT	CGCGAATTC
49.7	AAGCTTGGA	GCC	TAT	ATT	TGC	GGG	TCG	CGCGAATTC
49.8	AAGCTTGGA	AAA	GGT	GAG	CGC	GGG	TAT	CGCGAATTC
49.9	AAGCTTGGA	GCC	CAT	GAT	CGT	GGG	CAT	CGCGAATTC
49.10	AAGCTTGGA	GAA	GGT	GAG	CGT	GGG	AAT	CGCGAATTC
49.11	AAGCTTGGA	CGC	GGT	ATT	TCG	CCG	AAA	CGCGAATTC
49.12	AAGCTTGGA	TTT	CAA	GAG	CGT	GGG	ATT	CGCGAATTC
49.13	AAGCTTGGA	TGC	CGC	TAT	TAT	CAT	TTT	CGCGAATTC
49.14	AAGCTTGGA	TAT	GTT	GAG	GCG	GGC	ACG	CGCGAATTC
49.15	AAGCTTGGA	GCC	CCG	GAG	ATT	ATT	TCT	CGCGAATTC
49.16	AAGCTTGGA	GCC	TGC	CAA	CGT	CAT	ACG	CGCGAATTC
49.17	AAGCTTGGA	GCC	CGC	GAG	CGT	GGG	TAT	CGCGAATTC
49.18	AAGCTTGGA	GCC	TCG	CGC	GTT	CAA	AGC	CGCGAATTC
49.19	AAGCTTGGA	GCC	CGC	GAG	CGT	GGG	CAT	CGCGAATTC
49.20	AAGCTTGGA	GCC	ACG	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.21	AAGCTTGGA	GCC	GGT	TAT	GTT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.22	AAGCTTGGA	GCC	GGT	GAG	AAA	GGC	CTT	CGCGAATTC
49.23	AAGCTTGGA	TGC	GGT	GAG	CGT	TCG	TCT	CGCGAATTC
49.24	AAGCTTGGA	GGC	GAA	GCG	CGT	CAT	TCT	CGCGAATTC
49.25	AAGCTTGGA	TCG	GGT	AGC	CAA	GGG	GCG	CGCGAATTC
49.26	AAGCTTGGA	GCC	TAT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.27	AAGCTTGGA	CGC	GTT	GAT	CAA	GCG	TGT	CGCGAATTC
49.28	AAGCTTGGA	GCC	GGT	TAA	TAA	GGG	GCG	CGCGAATTC
49.29	AAGCTTGGA	GCC	GGT	TAT	ATT	GGG	GGC	CGCGAATTC
49.30	AAGCTTGGA	TAA	GGT	CAA	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
49.31	AAGCTTGGA	TAA	GGT	CAA	CTT	ATT	TGC	CGCGAATTC
49.32	AAGCTTGGA	TAT	GAA	GAG	TTT	TAT	TCT	CGCGAATTC
49.33	AAGCTTGGA	CCG	GGT	AAA	ATT	AAA	GCCTT	CGCGAATTC
49.34	AAGCTTGGA	GGC	GGC	GAT	AT	CTT	TCT	CGCGAATTC
49.35	AAGCTTGGA	GCCAGCCGTCG	CTT	GGG	TAA			CGCGAATTC
49.36	AAGCTTGGA	AGC	CATTGAG	CGT	GGG	GAT		CGCGAATTC
49.37	AAGCTTGGA	TCG	GGT	GAG	GTT	GG	TCT	CGCGAATTC
49.38	AAGCTTGGA	GCC	CAA	GAG	CGT	CTT	TGCGC	CGCGAATTC

Tabla XIII. SECUENCIAS DE DNA DE CLONAS GENERADAS CON LA BIBLIOTECA DE OLIGONUCLEOTIDOS POLYLINKER100.

WT	AAGCTTGGG	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT	CGCGAATTC
100.1	AAGCTTGGG	ATT	TGC	GGC	TGC	TGC	AAT	CGCGAATTC
100.2	AAGCTTGGG	CCG	GAT	CCG	GAA	AGC	AGC	CGCGAATTC
100.3	AAGCTTGGG	GAA	CAT	ACG	CAA	TAT	TAA	CGCGAATTC
100.4	AAGCTTGGG	TTT	ACG	TAA	AGC	CTT	CAT	CGCGAATTC
100.5	AAGCTTGGG	AAA	TCG	CAT	ATT	GAA	CTT	CGCGAATTC
100.6	AAGCTTGGG	ACG	GCG	CAA	ACG	TCG	CCG	CGCGAATTC
100.7	AAGCTTGGG	TCG	TGC	CCG	TGC	CCG	GAT	CGCGAATTC
100.8	AAGCTTGGG	CCG	GAA	GAA	CCG	TAT	ATT	CGCGAATTC
100.9	AAGCTTGGG	AGC	CTT	GTT	TGC	ACG	ATT	CGCGAATTC
100.10	AAGCTTGGG	GGC	GAA	CCG	CCG	AAA	CAA	CGCGAATTC
100.11	AAGCTTGGG	GAT	TGC	CTT	CTT	TAA	TGC	CGCGAATTC
100.12	AAGCTTGGG	TGC	ATT	TAT	TTT	TAA	GTT	CGCGAATTC
100.13	AAGCTTGGG	CCG	GAT	AAT	CCG	CAT	CTT	CGCGAATTC
100.14	AAGCTTGGG	GAA	GAA	TCG	TAT	GAT	GAA	CGCGAATTC
100.15	AAGCTTGGG	CGC	GGC	CCG	GAT	CAA	TAA	CGCGAATTC
100.16	AAGCTTGGG	GGC	TGC	ATT	GAA	GGC	TAT	CGCGAATTC
100.17	AAGCTTGGG	GAA	GGC	GAT	GAA	CAT	AAA	CGCGAATTC
100.18	AAGCTTGGG	GAT	TTT	CAA	AAA	AGC	ACG	CGCGAATTC
100.19	AAGCTTGGG	CTT	CAA	GGC	GAT	CAT	TTT	CGCGAATTC
100.20	AAGCTTGGG	CTT	CAT	GGC	CCG	CAT	CAA	CGCGAATTC
100.21	AAGCTTGGG	GCG	CCG	TTT	TAT	AAA	TAT	CGCGAATTC
100.22	AAGCTTGGG	CGC	CCG	GAT	TAA	CCG	TAA	CGCGAATTC
100.23	AAGCTTGGG	CGC	TAA	CGC	CAA	AAA	GAA	CGCGAATTC
100.24	AAGCTTGGG	CCG	CAA	ACG	TAA	AAT	ACG	CGCGAATTC
100.25	AAGCTTGGG	AAT	TCG	GAT	TCG	GAA	GTT	CGCGAATTC
100.26	AAGCTTGGG	GCG	GCG	TAT	TGC	GAT	GAA	CGCGAATTC
100.27	AAGCTTGGG	CTT	CGC	ACG	CGC	ACG	TAA	CGCGAATTC
100.28	AAGCTTGGG	TAA	AAA	TCG	GCG	AAA	TAT	CGCGAATTC
100.29	AAGCTTGGG	TAA	CTT	GAT	TGG	CGC	GTT	CGCGAATTC
100.30	AAGCTTGGG	CAT	TCG	TGC	GAT	TGC	TAA	CGCGAATTC
100.31	AAGCTTGGG	TGC	GTT	GCG	CAT	TAT	CTT	CGCGAATTC
100.32	AAGCTTGGG	AAA	AAT	CAA	CCG	CGT	TTT	CGCGAATTC
100.33	AAGCTTGGG	TGC	TAA	TCG	TGC	GTA	T	CGCGAATTC
100.34	AAGCTTGGG	CC	GAT	AAA	GTT	GAA	CAA	CGCGAATTC
100.35	AAGCTTGGG	GCG	GCT	AAG	TT			CGCGAATTC
100.36	AAGCTTGGG	ATT	AGC	C	TTT	CTT	CGC	CGCGAATTC
100.37	AAGCTTGGG	GAT	GAA	AAA	G	TTT	CAA	CGCGAATTC
100.38	AAGCTTGGG	GAA	TGC	GAA	CGC	TCG		CGCGAATTC
100.39	AAGCTTGGG	GAA	ATA	T	TGC	TGC	GAA	CGCGAATTC
100.40	AAGCTTGGG	TAT	CCG	TTT	TAA	TAA	T	CGCGAATTC
100.41	AAGCTTGGG	AG	GGC	CCG	TCG	AGC	GTT	CGCGAATTC

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES GENERALES

- 1 Se logró desarrollar un método de mutagénesis basado en codones, en el cual las unidades mutagénicas son introducidas en forma de trinucleótidos.
- 2 A estos trinucleótidos se les indujo una doble ortogonalidad con respecto a los mononucleótidos convencionales usados en síntesis de oligonucleótidos. De esta manera, los trinucleótidos fueron protegidos en el hidroxilo 5' con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), mientras que los fosfatos internucleotídicos y el fosforamidito terminal fueron protegidos con el grupo etilo.
- 3 Se desarrolló una ruta de síntesis (esquema III) reproducible para la preparación de Fmoc-trinucleótido amiditos, siendo viable para cualquier combinación de nucleósidos. La reacción procede en la dirección 3'→5', iniciando con el nucleósido 3' dimetoxitritilado. Es importante resaltar que las tres reacciones consecutivas que dan lugar a un acoplamiento internucleotídico proceden en un solo matraz, facilitando el proceso.
- 4 La presencia de Fmoc en el hidroxilo 5' y la función fosforamidito en el hidroxilo 3' de los trinucleótidos permite contaminar la secuencia nucleotídica silvestre ensamblada a base de DMTr-mononucleótidos.
- 5 La eficiencia de incorporación del Fmoc-trinucleótido varía en forma lineal con su concentración, y por tanto la tasa de contaminación y la frecuencia de mutantes en la biblioteca es altamente controlable.
- 6 El grupo protector internucleotídico etilo, introducido con los trinucleótidos resultó estable a hidracina buffereada e hidróxido de amonio concentrado, condiciones que generaron oligonucleótidos en solución parcialmente protegidos.
- 7 Se demostró el principio de prueba de separación de oligonucleótidos parcialmente protegidos, a través de electroforesis para homopolímeros de timidina de 15 nucleótidos y 21 nucleótidos (resultados recientes no mostrados), en los cuales se aleatorizaron 3 y 5 codones respectivamente.
- 8 El Fmoc-trinucleótido-etil-amidito GCT se utilizó para mutagenizar 4 residuos del activador transcripcional PspF. Una preselección por electroforesis permitió enriquecer el banco clonado con mutantes dobles con respecto a la frecuencia generada en la biblioteca completa. Por tanto, la separación de variantes también funciona con secuencias mixtas de nucleótidos, pero habrá que optimizar el método. Una estrategia potencial podría ser la aplicación de

- 9 HPLC de fase reversa, aprovechando la hidrofobicidad de los fosfotriésteres presentes en las secuencias mutantes.
- 10 Se implementó una estrategia alterna de mutagénesis a nivel de codón, utilizando Fmoc-dinucleótido amiditos como unidades mutagénicas. Estos dinucleótidos son completados a codones mutantes durante el ensamble del oligonucleótido.
- 11 Con un conjunto de sólo 5 Fmoc-dinucleótidos fuimos capaces de generar un conjunto de 20 codones al hacerlos reaccionar con una mezcla de los monómeros A, G, C y T durante el ensamble de los oligos mutagénicos. Estos 20 codones codifican a 18 de los aminoácidos más comunes, conteniendo una sola redundancia para serina y un codón de paro.
- 12 A diferencia de la estrategia de mutagénesis con Fmoc-trinucleótidos, donde se requiere un gran número de sintones para representar a cada aminoácido, en la estrategia basada en Fmoc-dinucleótidos sólo se requieren 5 compuestos, representando por tanto un método de variación más económico.
- 13 El método basado en dímeros es muy versátil. Por ejemplo, haciendo referencia a la figura 15, si la contaminación se realiza únicamente con el Fmoc-dinucleótido TT y se completa en la tercera posición con una mezcla de los cuatro monómeros, se generarán los codones TTT, CTT, ATT y GTT que codifican a fenilalanina, leucina, isoleucina y valina respectivamente, representando un subconjunto de residuos hidrofóbicos. Si en cambio se usa una mezcla de los dímeros AA/AT y la tercera posición se completa con el monómero G, se generarán los codones GAA y GAT que codifican a glutámico y aspártico, representando un subconjunto de residuos ácidos.
- 14 Finalmente, el método de mutagénesis basado en Fmoc-dinucleótidos demostró su utilidad al haber reproducido mutantes de la enzima β -lactamasa previamente reportadas, pero también por haber generado mutantes nuevas. Un ejemplo muy interesante está representado por la doble mutante B4CAZmut11 (Tabla IX), en la cual se sustituyó la arginina 164 por histidina y el glutámico 240 por valina. Si bien en esta mutante se sustituyó el codón de glutámico gag por el codón de valina gtt por el reemplazo de dos nucleótidos, es evidente que este mismo cambio de aminoácido se puede generar por una mutación puntual en el codón gag y generar el codón gtg de manera natural que también codifica para valina. En vista de que la sustitución R164H ha aparecido en numerosas mutantes clínicas de la enzima β -lactamasa TEM-1, no nos sorprendería que pronto apareciera esta doble mutante en aislados clínicos, en razón del frecuente uso de ceftazidima en los tratamientos terapéuticos.

MATERIALES Y METODOS

CONSIDERACIONES GENERALES

La síntesis química de DNA, desde la preparación de los monómeros hasta el ensamble de oligonucleótidos, requiere de atmósferas inertes y reactivos secos, por lo que todos los disolventes usados en este trabajo, excepto en las purificaciones, fueron anhidros.

Las reacciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno y el material de vidrio usado para ellas fue horneado a 200°C. Los disolventes fueron transferidos con cánulas y los compuestos altamente reactivos fueron manejados con jeringas desechables o cánulas de plástico dependiendo del volumen a usar. Las purificaciones se realizaron por "cromatografía rápida en columna" usando silica gel 60H para placa (partícula de 5-40 µm, Merck) y nitrógeno para presurizar el sistema.

Las reacciones y purificaciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatoplasmas de silica gel 60 con un indicador fluorescente a 254 nm y por tanto fueron visualizadas por sombreado con luz U.V. longitud de onda corta. Asimismo, se utilizaron tres sistemas de eluyentes dependiendo de la polaridad del material a analizar:

- Sistema A diclorometano:metanol 95:5
- Sistema B diclorometano:metanol 90:10
- Sistema C diclorometano:acetato de etilo:triethylamina 45:45:10

El sistema A, por ejemplo, se utilizó para analizar los dinucleótidos o trinucleótidos completamente protegidos, el sistema B para compuestos protegidos en solo uno de los hidroxilos terminales y el sistema C para fosforamiditos.

La estructura química de los compuestos preparados en este trabajo fue confirmada por RMN de ¹H, ³¹P y por comparación en HPLC con controles sintetizados por el método convencional de síntesis de ADN.

A continuación, se describe la síntesis de aquellos compuestos preparados a lo largo de este trabajo.

5'-O-(4,4'-DIMETOXITRITIL)TIMIDINA (*DMTr-dT*).

Este compuesto fue preparado a una escala de 50 mmol, por adición de cloruro de dimetoxitritilo en polvo a 2'-desoxytimidina previamente disuelta en piridina, siguiendo el procedimiento

descrito por Jones [77]. El compuesto se obtuvo en forma de polvo blanco con un rendimiento de 74% y sus datos espectroscópicos se concentraron en la tabla XIV.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-MONOMEROS (*Fmoc-dT*, *Fmoc-dA^{bz}*, *Fmoc-dC^{bz}*, *Fmoc-dG^{iBu}*).

Los cuatro compuestos fueron sintetizados en escala de 16 mmol, adicionando lentamente el cloruro de 9-fluorenilmetoxycarbonilo en polvo (5.00 g, 19.3 mmol), en un periodo de 1.5 hr, a cada uno de los monómeros (2'-desoxytimidina, 2N-isobutiril-2'-desoxyguanosina, 6N-benzoil-2'-desoxyadenosina ó 4N-benzoil-2'-desoxycitidina) previamente disueltos o resuspendidos en piridina a 0°C, a fin de minimizar los subproductos de protección en el hidroxilo 3'. Concluida la adición, las reacciones se mantuvieron 30 min más a temperatura ambiente y la piridina fue eliminada en rotavapor. El concentrado aceitoso se redisolvió en diclorometano (150 ml) y se lavó en forma sucesiva con bicarbonato de sodio saturado (2 x 20ml) y cloruro de sodio saturado (2 x 20ml) para eliminar los subproductos iónicos. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y cada uno de los productos se recuperó en forma de espuma blanca por evaporación al alto vacío en rotavapor. A diferencia del método reportado por Lehmann [78] en el cual los Fmoc-monómeros fueron purificados por cromatografía en columna, nosotros obtuvimos dichos compuestos en alta pureza (>95%) y rendimiento (>65%) por simples procesos de reprecipitación sobre éter etílico (*Fmoc-dT* y *Fmoc-dG^{iBu}*) o metanol (*Fmoc-dC^{bz}* y *Fmoc-dA^{bz}*). Los datos espectroscópicos de cada uno de ellos se concentraron en la tabla XIV.

3'-O-(4,4'-DIMETOXITRITIL)MONOMEROS (*dT-DMTr*, *dA^{bz}-DMTr*, *dC^{bz}-DMTr*, *dG^{iBu}-DMTr*).

1ª Parte: Protección del hidroxilo 5' con TBDMS.

Estos compuestos se prepararon a una escala de 10 mmol, iniciando con la adición lenta, a 0°C, de cloruro de *tert*-butil-dimetil-silano (1.66 g, 11 mmol) disuelto en 15 ml de piridina a una mezcla del nucleósido (2'-desoxytimidina, 2N-isobutiril-2'-desoxyguanosina, 6N-benzoil-2'-desoxyadenosina o 4N-benzoil-2'-desoxycitidina) e imidazol (1.36 g, 20 mmol), disueltos en 30 ml del mismo disolvente, bajo una fuerte agitación magnética. Estas condiciones permiten generar de manera casi exclusiva el producto protegido en el hidroxilo 5'. Tras la adición, la reacción se mantuvo 30 min más a temperatura ambiente y entonces se terminó con metanol, se

Tabla XIV. RMN de ¹H de monómeros protegidos en el hidroxilo 5' con el grupo Fmoc o en el hidroxilo 3' con el grupo DMTr. Para cada señal se indica, en estricto orden, el desplazamiento químico en ppm, tipo de señal y constantes de acoplamiento (subrayadas) en Hertz. s= singulete, d= doblete, dd= doble de doble, ddd= doble de doble de doble, t= triplete, q= cuarteto, m= multiplete, bs= singulete ancho

Protón	DMTr-dT	dT-DMTr	Fmoc-dT	dC ^{bz} -DMTr	Fmoc-dC ^{bz}	dG ^{ib} -DMTr	Fmoc-dG ^{ib}	dA ^{bz} -DMTr	Fmoc-dA ^{bz}
H1'	6.42 dd 5.5, 7.5	6.14 dd 5.5, 8.5	6.36 t 7.0	6.27 dd 5.2, 7.5	6.23 t 6.2	6.15 dd 10.0, 5.6	6.18 t 6.0	6.35 dd 5.2, 10.0	6.52 t 6.6
H2' ^α	2.43 ddd 1.0, 6.0, 13.0	1.71 ddd 1.5, 5.5, 13.5	2.36 ddd 1.0, 6.5, 13.5	2.21 ddd 1.5, 5.5, 13.8	2.50 ddd 1.5, 6.3, 13.2	1.69 dd 13.6, 5.2	2.46 m	2.71 ddd 5.2, 10.4, 13.2?	2.89 ddd 6.6, 6.6, 13.5?
H2' ^β	2.30 ddd 6.5, 8.0, 13.0	1.91 ddd 6.8, 8.5, 13.5	2.09 ddd 6.5, 6.5, 13.5	1.92 ddd 6.0, 7.5, 13.8	2.09 ddd 6.3, 6.3, 13.2	2.43 ddd 5.6, 10.0, 13.6	2.64 m	1.73 dd 5.2, 13.2	2.61 ddd 4.5, 6.3, 13.5?
H3'	4.56, ddd 2.5, 6.0, 8.5	4.35 ddd 2.0, 2.0, 6.5	4.35 m	4.36 d 6.0	4.26 <u>Traslap</u>	4.49 d 5.2	4.80 bs	5.79, dd?	4.71 bs
H4'	4.07, q 3.0	3.97 q 2.5	4.12 q 3.0	3.91 dd 1.8, 3.0	4.15 q 3.0	4.05 bs	4.28 bs	4.07 bs	4.28 q 3.0
H5' upfield	3.36 dd 3.0, 10.5	3.31 ddd 3.0, 6.0, 11.5	4.39 dd 3.0, 11.5	3.25 dd 3.0, 11.2	4.41 d 3.0	3.29 t 11.2	4.39 m	3.33 t 11.6	4.45 señal traslapada
H5' downfield	3.45 dd 3.0, 10.5	3.65 d 11.5	4.44 dd 5.0, 11.5	3.63 dd 1.8, 11.2	4.41 d 3.0	3.71 d 11.2	4.39 m	3.74 d 11.6	4.45 señal traslapada
OH	2.99 d 3.5	2.58 t 3.0	5.04 d 3.5	2.50 bs	5.53 bs	5.17 d 10.4	5.47 bs	4.63 d 5.2?	2.69 bs
ArNHCO	-----	-----	-----	9.10 bs	10.87 bs	8.69 s	10.56 s	9.14 s	9.03 bs
H _a (Ph-DMTr)	7.40 d 7.0	7.44 d 7.5	-----	Señal traslapada	-----	7.45 d 7.2	-----	7.52 d 8.0	-----
H _b (Ph-DMTr)	<u>Traslap</u>	7.29 m 7.0, 1.5	-----	Señal traslapada	-----	7.30 t 7.2	-----	7.32 d 8.0	-----
H _c (Ph-DMTr)	<u>Traslap</u>	7.22 m 7.5, 1.0	-----	Señal traslapada	-----	7.24 t 7.2	-----	7.24 t 8.4	-----
H _a (MeOPh-DMTr)	<u>Traslap</u>	7.34 d 8.5	-----	7.34 d 9.0	-----	7.34 d 8.8	-----	7.37 d 8.8	-----
H _b (MeOPh-DMTr)	6.83 d 8.5	6.83 t 9.0	-----	6.79 d 8.7	-----	6.84 t 8.8	-----	6.85 t 8.8	-----
CH ₂ O (DMTr)	3.77 s	3.786, 3.785, 2s	-----	3.74 s	-----	3.79, 3.78, 2s	-----	3.796, 3.792, 2s	-----
H _α (Fmoc)	-----	-----	7.58 dd 7.5, 1.0	-----	7.60 d 7.5	-----	7.46 dd 7.5, 2.1	-----	7.52 d 7.8
H _β (Fmoc)	-----	-----	7.31 td 7.5, 1.0	-----	7.32 td 7.5, 0.9	-----	7.18 qd 7.2, 1.5	-----	7.28 t 7.5
H _γ (Fmoc)	-----	-----	7.41 t 7.5	-----	7.39 t 7.5	-----	7.29 t 7.5	-----	7.37 t 7.5
H _δ (Fmoc)	-----	-----	7.76 d 7.5	-----	7.78, 7.77, 2d 7.2	-----	7.65 d 7.5	-----	7.73 d 7.5
CH (Fmoc)	-----	-----	4.25 t 7.0	-----	4.26 t 6.9	-----	4.14 t 7.2	-----	4.24 t 6.9
CH ₂ (Fmoc)	-----	-----	4.53, dd 10.5, 7.0 4.46, dd 10.5, 7.0	-----	4.51 dd 10.5, 7.2 4.46 dd 10.5, 6.6	-----	4.30 d 7.2	-----	4.45 dd 6.9, 10.5 4.42 dd 6.9, 10.5
Otras señales	9.30, 1H, H3(dT), s 1.46, 3H, CH ₃ (dT), d 1.0 7.59, 1H, H6(dT), q 1.0	8.84, 1H, H3(dT), bs 1.83, 3H, CH ₃ (dT), d 1.0 7.25, 1H, H6(dT), q 1.5	10.24, 1H, H3(dT), bs 1.80, 3H, CH ₃ (dT), d 1.0 7.34, 1H, H6(dT), q 1.0	7.45, 1H, H5 (dC), d 7.2? 8.17, 1H, H6 (dC), d 7.5 7.81, H ₄ (bz), 2H, dd 7.2, 1.5 7.52, H ₄ (bz), 1H, m 7.5, 1.2 7.43, H ₄ (bz), <u>Traslap</u> .	7.51, 1H, H5 (dC), d 7.5? 8.06, H6 (dC), d 7.2 8.03, H ₄ (bz), dd 8.3, 1.2 7.59, H ₄ (bz), <u>Traslap</u> . 7.49, H ₄ (bz), t 8.4	12.11, 1H, H1 (dG), s 7.65, 1H, H8 (dG), s 2.64, 1H, CH(Bu), hep 2.2 1.22, 3H, CH ₃ (Bu), d 6.8 1.21, 3H, CH ₃ (Bu), t 6.8	12.42, 1H, H1 (dG), s 7.93, 1H, H8 (dG), s 2.85, 1H, CH(Bu), hep 6.6 1.20, 6H, CH ₂ (Bu), d 6.6	8.70, 1H, H2 (dA), s 8.05, 1H, H8 (dA), s 8.01, 2H, H ₄ (bz), d 2.6 7.60, 1H, H ₄ (bz), t 2.6? 7.48, 2H, H ₄ (bz), t 2.6?	8.80, 1H, H2 (dA), s 8.23, 1H, H8 (dA), s 7.99, 2H, H ₄ (bz), d 6.9 7.52, 1H, H ₄ (bz), <u>traslap</u> . 7.60, 2H, H ₄ (bz), <u>traslap</u> .

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

concentró en rotavapor hasta la formación de un aceite, se resuspendió en diclorometano (120 ml) y se lavó como los Fmoc-monómeros. Los cuatro compuestos fueron obtenidos en forma de espuma blanca.

2ª Parte: Protección del hidroxilo 3' con DMTr.

Cada uno de los compuestos obtenidos en la primera parte, 5'-O-TBDMS-monómeros, fueron coevaporados con piridina (2 x 15 ml) para remover las posibles trazas de agua, y se hicieron reaccionar, por 12 h, con un exceso de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (5.0 g, 15 mmol) en 15 ml del mismo disolvente. Cada una de las reacciones se terminaron en forma rutinaria (metanol, concentración en rotavapor, lavados, etc.) y se sometieron a una purificación rápida en columna para eliminar el exceso de DMTr y aislar cada uno de los monómeros bisustituídos. El DMTr, en forma de éter metílico eluyó con 40% de acetato de etilo en hexanos, mientras que los compuestos biprotegidos fueron recuperados con 60 u 80% de acetato de etilo, obteniéndose como espumas ligeramente amarillas. En este punto se pesó la cantidad de material obtenido y quedó listo para la siguiente reacción.

3ª Parte: Remoción del grupo TBDMS.

Cada uno de los compuestos bisustituídos obtenidos en la segunda parte, se disolvió en 100 ml de THF y se trató con 1.1 equivalente químico de fluoruro de tetrabutilamonio, por 12 h, para remover el grupo TBDMS. Las reacciones fueron terminadas en forma rutinaria y cada uno de los productos 3'-dimetoxitritilo fue aislado por cromatografía en columna, a través de gradientes de acetato de etilo en hexanos, que fueron desde 70% hasta 100%, con cambios de 10 grados porcentuales. Los rendimientos totales siempre fueron superiores a 74%.

La datos espectroscópicos de los cuatro compuestos se resumen en la tabla XIV.

SINTESIS DE ALQUILDICLOROFOSFITOS.

Estos compuestos fueron preparados esencialmente por el método descrito por Martin y Pizzolato [79]. Primeramente, los alcoholes metílico, etílico, isopropílico e isobutílico se secaron por reflujo sobre hidruro de calcio y se recuperaron en forma anhidra por destilación.

A continuación, cada uno de estos alcoholes (0.57 mol) se adicionó gota a gota a tricloruro de fósforo (50 ml, 0.57 mol), a -20°C bajo agitación magnética fuerte. Las adiciones se realizaron en 1 h y las reacciones se continuaron por 1 h a temperatura ambiente. Los compuestos

metildiclorofosfito (δ 1.406 gr/ml) y etildiclorofosfito (δ 1.286 gr/ml) se recuperaron por destilación a presión normal, alrededor de 90 y 115°C respectivamente, mientras que los compuestos isopropildiclorofosfito (δ 1.26 gr/ml) e isobutildiclorofosfito (δ 1.20 gr/ml) se recuperaron por destilación en condiciones de presión reducida (aproximadamente a 25 mm de Hg). Estos dos compuestos destilaron entre 50 y 75 C° y en general todos se obtuvieron con rendimientos superiores a 65%.

ALQUIL-*N,N*-DIISOPROPILAMINOCOLOROFOSFORAMIDITOS.

El alquildiclorofosfito (154 mmol) diluido con 20 ml de éter seco, se adiciona gota a gota en atmósfera inerte a una solución enfriada a -40 °C de *N,N*-diisopropilamina seca (40.4 ml, 308 mmol) y éter (250 ml) provista de agitación mecánica. Se deja reaccionar a temperatura ambiente por 4h a pesar de la precipitación inmediata de una gran cantidad de clorhidrato de diisopropilamonio. La mezcla es filtrada (usando una cánula de plástico provista con un filtro de teflón en uno de sus extremos) a otro matraz, junto con dos lavados etéreos del precipitado y se elimina todo el disolvente usando un vacío suave. Posteriormente se somete a vacío intenso por 10 min para eliminar cualquier residuo volátil a temperatura ambiente, quedando un líquido viscoso que es sometido a destilación al alto vacío (\approx 1 mm de Hg) en presencia de fluoruro de cesio sólido. Los productos metil, etil, isopropil e isobutil-*N,N*-diisopropilclorofosforamiditos destilaron a 45, 65, 69 y 75°C respectivamente.

2-TRIMETILSILILETIL-*N,N*-DIISOPROPILAMINOCOLOROFOSFORAMIDITO.

Este reactivo fosfitilante se preparó en dos etapas sucesivas, partiendo desde el tricloruro de fósforo y 2-trimetilsililetanol, evitando aislar el intermediario 2-trimetilsililetildiclorofosfito, debido a que en experimentos previos este compuesto se descompuso durante el proceso de destilación. En la primera etapa se siguió el procedimiento usado para la preparación de alquildiclorofosfitos, mientras que en la segunda etapa se usó el procedimiento para la preparación de alquil-*N,N*-diisopropilclorofosforamiditos, solo que en este caso se adicionó un pequeño exceso de *N,N*-diisopropilamina (0.2 equivalentes) con respecto a la cantidad inicial de tricloruro de fósforo, para asegurar que todo el compuesto intermediario reaccionara. El compuesto esperado destiló en forma de un líquido incoloro muy viscoso, a 87°C al alto vacío y mostró una densidad de 0.992 gr/ml.

5'-O-(4,4'-DIMETOXITRITIL)TIMIDIN-3'-O-(N,N-DIISOPROPILAMINO)-
ALQUILFOSFORAMIDITOS (*DMTrdT-alquil-amidito*).

1.08 g de DMTr-dT (2 mmol) se coevaporan con tetrahidrofurano anhidro (2 x 10 ml) hasta formación de espuma y se dejan secando al alto vacío por 20 min, a 45°C para eliminar cualquier traza de humedad. Se redisuelve en 10 ml de THF, se adiciona 0.69 ml de diisopropiletilamina seca (4 mmol) y enseguida el reactivo fosfitilante (2.4 mmol), dejándose reaccionar 30 min bajo agitación magnética. Tras este tiempo, la reacción debe haberse completado y es terminada con la adición de 1 ml de NaHCO₃ saturado. Se diluye con 50 ml de diclorometano y se lava en forma convencional con NaHCO₃ y NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentra en rotavapor hasta formación de espuma, siempre en presencia de unas gotas de trietilamina. La espuma se redisuelve en una solución de piridina al 5% en diclorometano y se purifica por cromatografía en columna, eluyendo el compuesto con el mismo sistema. Los compuestos, en general mostraron una pureza superior a 90%, según el análisis por HPLC y se obtuvieron con rendimientos superiores a 80%. Los datos espectroscópicos de los cinco DMTrdT-alquilfosforamiditos se concentró en la tabla XV.

SINTESIS DE PENTADECATIMIDILATOS PARCIALMENTE PROTEGIDOS.

Cada uno de los DMTrdT-alquil-amiditos (250 mg) fue secado por coevaporación con acetonitrilo anhidro (2 x 2 ml), resuspendido en 3 ml de éste disolvente, filtrado en membrana de teflón y colocado uno a uno en la posición X de un sintetizador de DNA provisto de 5 viales para fosforamiditos, mientras que en la posición 'T' se colocó un DMTrdT-βcianoetil-amidito comercial. Una vez oxidado el fósforo trivalente a fósforo pentavalente, el grupo protector β-cianoetilo se vuelve muy lábil a condiciones básicas suaves y generará fosfatos iónicos en la desprotección final a base de NH₄OH.

Usando cada uno de los DMTrdT-alquil-amiditos, se sintetizaron 5 juegos de los siguientes pentadecanucleótidos:

5' TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT 3'	Clave: T ₁₅
5' TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT 3'	Clave: T ₁₂ X ₃ -R
5' TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT 3'	Clave: T ₉ X ₆ -R
5' TpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpTpT 3'	Clave: T ₆ X ₉ -R

Tabla XV. RMN de ^1H y ^{31}P de DMTr-alkuil-amiditos. Para cada señal se indica, en estricto orden, el desplazamiento químico en ppm, tipo de señal y constantes de acoplamiento (entre paréntesis) en Hertz. s= singulete, d= doblete, dd= doble de doble, ddd= doble de doble de doble, t= triplete, q= cuarteto, m= multiplete, bs= singulete ancho. * se observaron dos señales, una correspondiente a cada diastereoisómero.

Protón	DMT-dT	DMTdT-Me-amidito	DMTdT-Et-amidito	DMTdT-Pr-amidito	DMTdT-Bu-amidito	DMTdT-TMSE-amidito
CH, (dT)	1.46, d (1.0)	1.41, bs*	1.38, d (0.8)*	1.36, bs*	1.38, d (1.2)*	1.35, d (1.2)*
H ^{2'} B	2.30, ddd (6.5, 8.0, 14.0)	2.31, ddd (6.4, 6.4, 13.2)	2.31, m	2.30, m	2.31, m	2.28, ddd (6.8, 6.8, 13.2)
H ^{2'} α	2.43, ddd (3.0, 6.0, 14.0)	2.49, ddd (2.8, 5.6, 13.2)*	2.49, ddd (2.8, 5.6, 13.2)*	2.53, ddd (2.8, 6.0, 13.6)*	2.48, ddd (2.4, 5.6, 13.2)*	2.46, ddd (2.0, 5.6, 13.2)*
H ^{5'} upfield	3.36, dd (3.0, 10.5)	3.32, dd (2.8, 10.4)	3.32, dd (2.4, 10.8)	3.31, dd (2.4, 10.8)*	3.32, señal traslapada	3.30, dd (2.6, 12.0)*
H ^{5'} downfield	3.45, dd (3.0, 10.5)	3.49, señal traslapada	3.46, señal traslapada	3.47, m	3.47, m	3.48, señal traslapada
CH ₂ O (DMT)	3.77, s	3.79, s	3.78, s	3.79, s	3.79, s	3.76, s
H ^{4'}	4.07, q (3.0)	4.16, q (2.4)*	4.17, q (1.6)*	4.18, q (2.0)*	4.15, q (2.0)*	4.14, bs*
H ^{3'}	4.56, ddd (2.5, 6.0, 8.5)	4.66, m	4.65, m	4.62, m	4.65, m	4.64, m
H ^{1'}	6.42, dd (5.5, 7.5)	6.41, dd (6.0, 7.6)*	6.42, dd (5.6, 7.6)*	6.42, dd (5.6, 8.0)*	6.43, dd (6.0, 7.6)*	6.44, dd (6.0, 8.0)*
H _o (McOPh)	6.83, d (8.5)	6.83, d (8.8)	6.83, d (7.6)	6.83, d (8.8)	6.83, d (8.8)	6.80, d (8.4)
H _m (McOPh)+ H _m (Ph) + H _p (Ph)	7.20-7.30, 7H, m	7.30, señales traslapadas	7.30, señales traslapadas	7.30, señales traslapadas	7.30, señales traslapadas	7.25, señales traslapadas
H _o (Ph)	7.40, d (7.0)	7.40, m	7.41, m	7.40, m	7.4, m	7.37, d (7.2)
H ₆	7.59, q (1.0)	7.64, q (1.2)*	7.64, q (0.8)*	7.64, bs*	7.63, q (1.2)*	7.61, q (7.2)*
H ₃	9.30, s	-----	-----	-----	-----	-----
CH(N ^o Pr)	-----	3.55, m	3.54, m	3.54, m	3.54, m	3.52, m
CH ₂ (N ^o Pr) ¹	-----	1.26, 1.5 H, d (6.8) 1.25, 1.5 H, d (6.8) 1.16, 4.5 H, d (6.8) 1.15, 1.5 H, d (6.8) 1.05, 3 H, d (6.8)	1.25, 1.5 H, d (6.8) 1.24, 1.5 H, d (6.8) 1.15, 4.5 H, d (6.8) 1.14, 1.5 H, d (6.8) 1.04, 3.0 H, d (6.8)	1.25, d (6.4) 1.24, d (6.8) 1.15, d (6.8) 1.14, d (6.8) 1.04, d (6.8)	1.25, d (6.4) 1.24, d (6.4) 1.16, d (6.4) 1.15, d (6.4) 1.04, d (6.4)	1.23, d (6.4) 1.22, d (6.4) 1.13, d (6.4) 1.01, d (6.4)
Otras señales	2.99 (OH), d (3.5)	3.26 (CH ₂ OP), d (13.2)	1.11, CH ₂ (Et), t (6.8) 3.69, CH ₂ O (Et), m	1.19, 1.21, 1.33, CH ₂ (O ^o Pr) d (5.6) 3.90, CH (O ^o Pr), m*	0.81, 0.82, 0.91, 0.95, CH ₂ (Bu), 4d (6.8) 1.70, CH(Bu), sept (6.8) 3.27, CH ₂ (Bu), m*	0.04, 0.01, -0.04, MeSi, 3s 0.00, CH ₂ Si, t (7.2) 4.04, CH ₂ OP, m
³¹ P	-----	147.88, 147.31, 2s	145.42, 144.6, 2s	143.99, 143.32, 2s	146.05, 145.72, 2s	144.35, 144.12, 2s

TESIS CON
 SALA DE ORIGEN

Es importante observar que el pentadecatimidilato T₁₅ fue sintetizado exclusivamente con el DMTrdT-βcianoetil-amidito, a fin de ser usado como control en los experimentos electroforéticos. Tras la desprotección alcalina, este compuesto generaría una especie completamente ionizada. En las especies modificadas, Tp representa un nucleótido ensamblado con DMTrdT-βcianoetil-amidito, que dará lugar a un fosfato iónico, mientras que T_p representa un nucleótido ensamblado con un DMTrdT-alquil-amidito (X). En las claves, R representa el tipo de grupo protector (Me, Et, ¹Pr, ¹Bu o TMSE).

Cada uno de estos oligos, aún unido al soporte de síntesis, fue separado en fracciones de 2 mg y se sometió a las siguientes condiciones de reacción:

1. NH₄OH al 28%, 55°C, 12 h.
2. NH₄OH al 28%, 25°C, 10 min, 1 h, 4 h, 26 h, 72 h.
3. NH₃, 2M en metanol, 25°C, 5 min y 1 h.
4. Tiofenol:triethylamina 3:1; 25°C, 1 h; 60°C, 1 h y 12 h → NH₄OH, 1 h
5. Etilendiamina:etanol 1:1; 25°C, 2 h; 55°C, 7 h.
6. Hidracina 0.5M en piridina:ácido acético 4:1, 25°C, 24 h → NH₄OH, 1 h

En los casos de las condiciones 1, 2, 3 y 5, los oligos fueron recuperados en el sobrenadante, mismo que fue evaporado por vacío intenso a 45°C, y el residuo fue redisolto en 50 µl de agua. Las condiciones 4 y 6 no son capaces de hidrolizar al grupo succinilo que une al oligo con el soporte y en consecuencia, el sobrenadante fue eliminado por filtración y el oligo fue removido por un tratamiento básico suave con NH₄OH en 1 h.

2µl de cada muestra se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%, conteniendo urea 8M, utilizando T₁₅ como estándar de comparación y azul de bromofenol al 0.1% en formamida para rastrear el proceso de migración. Los geles fueron visualizados por irradiación con luz ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm) sobre una placa de silica gel derivatizada con una sustancia fluorescente a esa longitud de onda.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSIN-3'-O-(*N,N*-DIISOPROPILAMINO)-ETOXIFOSFORAMIDITO (**FmcdG^{iBu}-etil-amidito**).

Este compuesto se sintetizó por el mismo procedimiento descrito en la preparación de los DMTrdT-alquil-amiditos, usando las siguientes cantidades de reactivos:

FmcdG^{iBu} ----- 2.8 g (5 mmol)

DIPEA	-----	1.74 ml (10 mmol)
EtOPCIN ⁱ Pr ₂	-----	1.37 ml (6.5 mmol)
THF	-----	50 ml

Tras la purificación por cromatografía en columna, el compuesto fue obtenido con un rendimiento de 62.4 % (2.29 g) en forma de una espuma ligeramente amarilla, portando como principal contaminante el correspondiente H-fosfonato.

RMN de ¹H de la mezcla diastereomérica: 7.821 ppm, H₈, 1H, s; 7.759, H_δ (Fmoc), 2H, d, *J*= 7.6 Hz; 7.569 y 7.552, H_α (Fmoc), 2H, 2d, *J*= 7.2 y 6.4 Hz; 7.394, H_γ (Fmoc), 2H, m; 7.316, H_β (Fmoc), 2H, m; 6.264, H1', 1H, t, *J*= 6.8 Hz; 4.648, H3', 1H, m; 3.734, CH₂ (EtO), 2H, m; 3.634, CH ('Pr), 2H, m; 2.853, CH ('Bu), 1H, m; 2.641, H2', 2H, m; 1.201, CH₃ ('Bu + 'Pr + EtO), 21H, m. RMN de ³¹P: 148.083 y 147.583, 2s.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSIN-3'-ETILFOSFATO-5'-4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITIDIN-3'-O-(4,4'-DIMETOXITRITILO) [Fmoc-GC-DMTr].

El compuesto FmocdG-etil-amidito (2.21 g, 3 mmol) se coevaporó con THF (2 x 10 ml), se redisolvió en 20 ml del mismo disolvente y se transfirió a un matraz que contenía una mezcla del nucleósido dC^{bz}-DMTr (1.26 g, 2 mmol) y tetrazol (420 mg, 6 mmol) previamente coevaporados con el mismo disolvente (2 x 10 ml). Se dejó reaccionar por 1 h, observándose aproximadamente un 80% de reacción con respecto al reactivo limitante (dC^{bz}-DMTr). A pesar de dejar la reacción 1 h más, ésta no mostró avance, por lo que se adicionó 7 ml de hidróperóxido de terc-butilo para oxidar el fosfito internucleotídico a fosfato, dejándose a su vez reaccionar por 2 h. La reacción fue terminada en forma rutinaria y el compuesto sintetizado fue purificado por cromatografía en columna, eluyendo con isopropanol al 5% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se reunieron, concentraron y precipitaron sobre n-hexano, obteniendo tras filtración y secado al alto vacío 1.50 g de material en forma de polvo blanco (rendimiento 57.8%), con una pureza superior a 95% según el análisis por HPLC.

RMN de ¹H de la mezcla diastereomérica: 12.187 ppm, H(dG), 1H, s; 10.430, NHCO(dG), 1H, bs; 8.822, NHCO(dC), 1H, bs; 8.129, H6(dC), 1H, d, *J*= 7.6 Hz; 7.794, H8(dG), 1H, s; 7.745, Ho(bz), 2H, d, *J*=7.6; 7.549, H_δ(Fmoc), 2H, d, *J*= 7.6 Hz; 6.84 y 6.81, Ho(MeOPh), 2d, *J*= 8.0 Hz; 6.386, H1'(dC), 1H, dd, *J*= 6.0 y 7.6 Hz; 5.958, H1'(dG), 1H, dd, *J*= 6.0 y 8.4; 5.109,

H3'(dG), 1H, m; 4.218, CH(Fmoc), 1H, t, $J= 7.2$; 4.086, CH₂(Et), 2H, m; 3.71 y 3.768. CH₃O(DMTr), 6H, 2s; 3.944, H4'(dC), 1H, bs; 3.604, H2', 1H, m; 2.80, CH(ib), 1H, sept, $J= 6.8$ Hz; 2.659, H2', 1H, m; 2.420, H2', 1H, m; 1.777, H2', 1H, quint; 1.257, CH₃(ib) + CH₃(Et), 9H, m. Las señales no reportadas aparecieron traslapadas con otras y no fueron distinguibles. RMN de ³¹P: -0.992 ppm, 1P, s.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXICARBONIL)-6N-BENZOIL-2'-DESOXYADENOSIN-3'-O-(N,N-DIISOPROPILAMINO)-ETOXIFOSFORAMIDITO (FmocdA-Et-amidito).

Este compuesto se sintetizó por el procedimiento descrito en la preparación de los DMTrdT-alquil-amiditos, usando las siguientes cantidades de reactivos:

FmocdA ^{bz}	-----	1.66 g (3 mmol)
DIPEA	-----	1.04 ml (6 mmol)
EtOPCIN ⁱ Pr ₂	-----	0.95 ml (4.5 mmol)
THF	-----	20 ml

Tras la purificación por cromatografía en columna, el compuesto fue obtenido con un rendimiento de 47.4 % (1.03 g) en forma de una espuma ligeramente amarilla, conteniendo como principal contaminante el correspondiente H-fosfonato.

RMN de ¹H de la mezcla diastereomérica: 9.381 ppm, ArNHCO, 1H, s; 8.773, H2, 1H, s; 8.260, H8, 1H, s; 7.980, H_α(bz), 2H, d, $J= 7.2$ Hz; 7.725, Hδ(Fmoc), 2H, d, $J= 7.2$ Hz; 7.455, H_m(bz), 2H, t, $J= 7.6$ Hz; 7.364, H_γ, 2H, t, $J= 7.6$ Hz; 7.279, Hβ (Fmoc), 2H, t, $J= 7.6$ Hz; 6.510, H1', 1H, dd, $J= 2.0$ y 6.4 Hz; 4.782, H3', 1H, m; 4.232, CH (Fmoc), 1H, t, $J= 7.2$ Hz; 3.745, CH₂ (EtO), 2H, m; 3.648, CH(ⁱPr), 2H, m; 2.911, H2', 1H, m; 2.726, H2', 1H, m; 1.194-1.296, CH₃ (EtO + ⁱPr), 15H, m. RMN de ³¹P: 148.211 y 148.053 ppm, 2s.

3'-O-(4,4'-DIMETOXITRITIL)TIMIDIN-5'-O-(N,N-DIISOPROPILAMINO)-ETOXIFOSFORAMIDITO (Et-amidito-dTDMTr).

Este compuesto se sintetizó por el procedimiento descrito en la preparación de los DMTrdT-alquil-amiditos, usando las siguientes cantidades de reactivos:

dT-DMTr	-----	1.63 g (3 mmol)
DIPEA	-----	1.04 ml (6 mmol)
EtOPCIN ⁱ Pr ₂	-----	0.8 ml (3.8 mmol)

THF ----- 20 ml

Tras la purificación por cromatografía en columna, el compuesto fue obtenido con un rendimiento de 65.5 % (1.45 g) en forma de una espuma ligeramente amarilla, portando como principal contaminante el correspondiente H-fosfonato.

RMN de ^1H de la mezcla diastereomérica: 7.714 y 7.547 ppm, H₆, 1H, 2q, $J= 1.6$ Hz; 7.448, H_o(Ph), 2H, m; 6.838, H_o(MeOPh), 4H, m; 6.482 y 6.430, H1', 2dd, $J= 5.6$ y 9.2 Hz, $J= 5.2$ y 9.6 Hz; 4.336, H3', 1H, m; 3.912, H4', 1H, bs; 3.789, CH₃O, 6H, s; 3.583, CH₂(EtO), 2H, m; 3.470, CH(Pr), 2H, m; 3.241, H2'α, 1H, m; 1.890 y 1.885, CH₃(dT), 2d, $J= 1.2$ Hz; 1.730, H2'β, 1H, m; 1.263-0.977, CH₃(EtO + Pr), 15H, m. RMN de ^{31}P : 147.747 y 147.478, 2s.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXYCARBONIL)-4N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYADENOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITOSINA (FmocAGC).-RUTA DE SINTESIS I-

El dímero Fmoc-GC-DMTr (321 mg, 0.25 mmol) se desfluoreniló con 6 ml de piridina:trietilamina:agua 3:1:1 por 15 min, a temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente, se adicionó el tetrazol (140 mg, 2 mmol) y se coevaporaron juntos con piridina (2 x 5 ml) y THF (2 x 5 ml) hasta sequedad para eliminar cualquier traza de humedad. A su vez, el compuesto FmocdA-Et-amidito (364 mg, 0.5 mmol) también se coevaporó con THF (2 x 3 ml), se disolvió en 5 ml de este disolvente y se adicionó a la primera mezcla, dejándose reaccionar por 30 min. El análisis por CCF mostró que la reacción se había completado con respecto al dímero, y en consecuencia la reacción se paró con etanol (1 ml), seguida de la adición de 3 ml de hidroperóxido de terc-butilo para oxidar el fosfito intermediario a fosfato en 50 min. La mezcla de reacción se concentró en rotavapor y se coevaporó con THF (2 x 10 ml) para eliminar el hidroperóxido adicionado en exceso. El residuo se disolvió en 10 ml de diclorometano, se enfrió a 0°C, y se trató con 50 ml de TCA al 2% en diclorometano, preenfriado a la misma temperatura. La reacción se mantuvo por 20 min a 0°C, tiempo suficiente para completar la remoción del grupo DMTr y fue neutralizada con 5 ml de piridina y lavada de manera rutinaria. El compuesto se purificó por cromatografía en columna, eluyendo con metanol al 9% en diclorometano y obteniéndose en forma de un polvo blanco tras evaporación del disolvente (232 mg, rendimiento: 66.1%).

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITIDINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-TIMIDINA (**FmocGCT**). -RUTA DE SINTESIS 1-

El dímero Fmoc-GC-DMTr (963 mg, 0.75 mmol) se destriló con 150 ml de TCA al 2% en diclorometano, a 0°C por 10 min, tiempo suficiente para completar la desprotección. Se adicionó 12 ml de piridina para neutralizar el ácido y la mezcla fue lavada en forma rutinaria con NaHCO₃ y NaCl. Tras evaporar el disolvente, el residuo anaranjado aceitoso se transfirió a otro matraz que ya contenía el tetrazol (210 mg, 3 mmol), se coevaporaron juntos con THF (3 x 10 ml) y se mezclaron con el compuesto Et-amidito-dT-DMTr (1.07 g, 1.5 mmol), dejándose reaccionar por 1 hr. Se adicionó 7 ml de hidroperóxido de terc-butilo y se terminó la reacción en forma rutinaria. La reacción fue nuevamente destrilada y sometida a purificación en columna, obteniendo el compuesto en forma de polvo blanco (401 mg, rendimiento: 40.6 %) tras precipitarlo sobre éter etílico y secarlo al alto vacío.

RMN de ¹H de la mezcla diastereomérica: 8.176 y 8.090, H6(dC), 1H, 2m; 7.859, H8(dG) + H₀(bz), 3H, m; 7.713, Hδ(Fmoc), 2H, m; 6.217, H1', 3H, m; 5.225, H3'(dC), 1H, m; 5.125, H3'(dG), 1H, m; 3.477, H2', 1H, m; 2.908, H2', 1H, m; 2.732, H2', 1H, m; 2.384, H2', 1H, m; 1.854, CH₃(dT), 3H, m; 1.355, CH₃(Et), 6H, m; 1.193, CH₃(ib), 6H, m. Las señales no reportadas aparecieron traslapadas con otras y no fueron distinguibles. RMN de ³¹P: -0.675 y -1.096 ppm, 2P, 2s.

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-4N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYADENOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITOSINA-3'-O-(N,N-DIISOPROPILAMINO)-ETOXIFOSFORAMIDITO (**FmocAGC-Et-amidito**).

Este compuesto se sintetizó por el procedimiento descrito en la preparación de los DMTrdT-alquil-amiditos, usando las siguientes cantidades de reactivos:

FmocAGC	-----	200 mg (0.14 mmol)
DIPEA	-----	74 µl (0.43 mmol)
EtOPCIN ⁱ Pr ₂	-----	90 µl (0.42 mmol)
THF	-----	3 ml

Tras la purificación por cromatografía en columna y precipitación sobre una mezcla de n-hexano:éter etílico 1:1, el compuesto fue obtenido en forma de polvo blanco, con un rendimiento de 43.2 % (97 mg).

5'-O-(9-FLUORENILMETOXCARBONIL)-2N-ISOBUTIRIL-2'-DESOXYGUANOSINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITIDINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-TIMIDINA-3'-O-(N,N-DIISOPROPILAMINO)-ETOXIFOSFORAMIDITO (FmocGCT-Et-amidito).

Este compuesto se sintetizó por el procedimiento descrito en la preparación de los DMTrdT-alquil-amiditos, usando las siguientes cantidades de reactivos:

FmocGCT	-----	368 mg (0.14 mmol)
DIPEA	-----	146 μ l (0.84 mmol)
EtOPCIN ⁱ Pr ₂	-----	178 μ l (0.84 mmol)
THF	-----	5 ml

Tras la purificación por cromatografía en columna y precipitación sobre n-hexano, el compuesto fue obtenido en forma de polvo blanco, con un rendimiento de 14.6% (54 mg).

RMN de ¹H de la mezcla diastereomérica: 8.231 y 8.151 ppm, H₆(dC), 1H, 2d, *J*= 7.6 Hz; 7.860, H₆(dT), 1H, d, *J*= 2.0 Hz; 7.745, H δ (Fmoc), 2H, d, *J*= 7.6; 6.22, H₁' , 3H, m; 5.223, H₃'(dC), 1H, m; 5.124, H₃'(dG), 1H, m; 3.595, CH₂(Et-amidito), 2H, m; 1.925, CH₃(dT), 3H, m. Las señales no reportadas aparecieron traslapadas con otras y no fueron distinguibles. RMN de ³¹P: -0.717, 2P(V), m; 148.498, 148.419, 148.138 y 148.077, 1P(III), 4s.

4N-BENZOIL-2'-DESOXYCITIDINA-3'IL-ETILFOSFATO-5'IL-TIMIDINA-3'-O-(4,4'-DIMETOXITRITILO (dCT-DMTr). -RUTA DE SINTESIS 2-

El monómero dT-DMTr (1.63 g, 3 mmol) se coevaporó con THF (3 x 10 ml) hasta formación de espuma, dejándose secar por 15 min al alto vacío. Se disolvió en 20 ml de este disolvente y se le adicionó la diisopropiletilamina (625 μ l, 3.6 mmol) y el agente fosfitilante EtOPCINⁱPr₂ (762 μ l, 3.6 mmol), dejándose reaccionar en agitación magnética por 30 min, tiempo suficiente para que la reacción se completara. El fosforamidito recién formado se transfirió con cánula de plástico a otro matraz que ya contenía el compuesto FmocdC (1.96 g, 3.5 mmol) y tetrazol (840mg, 12 mmol) previamente coevaporados con THF. En 30 min el acoplamiento internucleotídico ya se

había completado, y se adicionó 5 ml de hidroperóxido de terc-butilo para oxidar el fosfito intermediario al fosfato en 1 h. La mezcla de reacción se concentró y lavó en forma convencional, concentrándose hasta formación de espuma. Esta se adsorbió en 5 g de silica gel 60H y se cromatografió sobre 55 g más del mismo soporte. El compuesto eluyó en forma pura con metanol al 2% en diclorometano. Se trató con 20 ml de piridina:triethylamina:agua 3:1:1 por 15 min para remover el grupo Fmoc, se evaporó el disolvente en rotavapor y el residuo aceitoso se disolvió en 2 ml de diclorometano y se precipitó sobre 50 ml de éter etílico:n-hexano 1:1, obteniéndose finalmente en forma de un polvo blanco (2.01 g, rendimiento: 69.1%).

RMN de ^1H de la mezcla diastereomérica: 9.538 y 9.310 ppm, H3 (dT), 1H, 2s; 9.292, ArNHCO (dC), 1H, s; 8.308 y 8.278, H6 (dC), 1H, 2d, $J= 7.6$ Hz; 7.910, H_o(bz), 2H, d, $J= 7.6$ Hz; 6.850, H_o(MeOPh), 4H, m; 6.33, H1' (dC), 1H, m; 6.203, H1' (dT), 1H, m; 5.093 y 5.019, H3' (dC), 1H, 2m; 4.300 y 4.235, H3' (dT), 1H, 2m; 3.786, CH₃O, 6H, s; 3.672, CH₂(EtO), 2H, m; 2.713 y 2.643, H2', 1H, 2ddd; 1.950 y 1.899, H2', 1H, 2ddd; 2.265 y 1.855, CH₃(dT), 3H, 2s; 1.929, H2', 1H, m; 1.707, H2', 1H, ddd, $J= 6.4, 6.4$ y 13.6 Hz; 1.291 y 1.267, CH₃(EtO), 3H, 2t, $J= 7.2$ Hz; RMN de ^{31}P : -0.796 ppm, s.

(FmocGCT). -RUTA DE SINTESIS 2-

Este trinucleótido se sintetizó por el procedimiento descrito para dCT-DMTr, utilizando las siguientes cantidades de reactivos.

Reacción de fosfitilación:

dCT-DMTr	-----	1.32 g (1.36 mmol)
Diisopropiletilamina	-----	283 μl (1.63 mmol)
EtOPCIN'Pr ₂	-----	345 μl (1.63 mmol)
THF	-----	15 ml

Reacción de acoplamiento:

FmocdG ^b	-----	1.07 g (1.9 mmol)
Tetrazol	-----	457 mg (6.5 mmol)

Reacción de oxidación:

^t BuOOH	-----	5 ml
--------------------	-------	------

Reacción de desprotección:

TCA al 3% en diclorometano	---	100 ml
----------------------------	-----	--------

La diferencia más significativa con respecto a dCT-DMTr, correspondió a la reacción de desprotección, ya que en lugar de remover el grupo Fmoc, se removió el grupo DMTr. El compuesto se purificó por cromatografía en columna, eluyendo con metanol al 9% en diclorometano y fue recuperado en forma de espuma blanca (840 mg, rendimiento: 46.2 %).

Fmoc-GCT-Et-amidito crudo.

El trinucleótido FmocGCT (840 mg, 0.60 mmol) obtenido por la ruta de síntesis 2, se fosfitó igual que los dos trinucleótidos anteriores, solo que en vez de intentar purificarlo por cromatografía, se recuperó en forma cruda, precipitándolo sobre una mezcla de éter etílico:n-hexano 1:1, a temperatura ambiente. Fue recuperado por filtración y secado al alto vacío en forma de polvo blanco (766 mg, rendimiento: 84.1%).

Reactividad del trímero Fmoc-GCT-Et-amidito crudo.

El compuesto Fmoc-GCT-Et-amidito crudo (90.8 mg, 60 μ mol) se coevaporó con THF (2 x 2 ml), se secó al alto vacío por 15 min, se disolvió en 1.5 ml de acetonitrilo anhidro y se filtró a través de un filtro de jeringa provisto con membrana de teflón de 0.45 μ m de poro a un vial seco, bajo atmósfera de nitrógeno. Esta solución, 40 mM, fue el "stock" para preparar 500 μ l de otras tres soluciones a concentraciones 10, 20 y 30 mM, diluyendo siempre con acetonitrilo.

Cada una de estas soluciones, incluyendo el stock, se colocó una a una en el vial X del sintetizador de ADN y se utilizó para sintetizar por duplicado la secuencia:

5' TXTA 3'

utilizando el ciclo especial para acoplamiento de Fmoc-trímeros, el cual carece de los pasos de oxidación, acetilación y destrilación solo para la adición de X. Como material de inicio se usó el soporte convencional DMTrdA^{bz}-CPG y las T's fueron adicionadas usando el fosforamidito común DMTrdT- β cianoetil-amidito colocado en su posición normal en el sintetizador. La eficiencia de acoplamiento del trinucleótido en cada experimento, se midió colectando el catión DMTr liberado de cada una de las T's, aforando cada uno de ellos a 10 ml con ácido p-toluensulfónico 0.1M en acetonitrilo y determinando la absorbancia a 416 nm. Se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Eficiencia} = (1 - A_2/A_1)(100)$$

Dos muestras, una de ellas generada con la solución 10 mM y otra con 40 mM, se destilaron con una solución de tiofenol:triethylamina 3:1 (300µl, 55°C, 1h) y NH₄OH concentrado (0.5 ml, 75°C, 1h), analizándose por HPLC contra controles de los oligos GCTTA y TTA a fin de confirmar la autenticidad de la especie generada con el trinucleótido. Para este propósito se usó una columna Ultrasphere-C18 de Beckman de 4.6 x 250 mm y un gradiente de acetonitrilo de 5% a 15% en buffer de acetato de triethylamonio 0.1 M, pH 7.0, con un flujo de 1 ml/min.

ENSAMBLE DEL OLIGONUCLEOTIDO MUTAGENICO GAFTGA.

La preparación del oligo mutagénico requirió el uso de un sintetizador automático de DNA provisto de 5 viales, cuatro de ellos para el suministro de las bases normales (en los que se colocaron los respectivos DMTr-βcianoetil-fosforamiditos a concentración 0.1 M en acetonitrilo) que se utilizaron para ensamblar los nucleótidos de la secuencia silvestre del oligo y un quinto vial denominado X en el que se colocó el trinucleótido FmocGCT-Et-amidito crudo a una concentración 8M en acetonitrilo. Es importante mencionar que antes de la dilución final, el trinucleótido fue coevaporado con acetonitrilo anhidro (3 x 1.5 ml) para eliminar cualquier traza de humedad y fue filtrado por membrana de teflón de 0.45 µm.

El oligo mutagénico se sintetizó con la siguiente secuencia:

5' G TTC GGT CAC GAA GCG (GGG/get) GCG (TTT/get) (ACC/get) (GGT/get) GCG CAA AAA CGT CAT 3'

donde las letras mayúsculas representan los codones silvestres ensamblados con química convencional, es decir, nucleótido por nucleótido, y las letras minúsculas a los codones mutantes que codifican para alanina. De esta manera, un oligo mutante podrá contener el codón silvestre **GGG** o el codón mutante **get**, pero no ambos en la misma posición y por esa razón se agruparon en paréntesis.

La síntesis se realizó en varios pasos, utilizando el ciclo especial de síntesis para adición de Fmoc-trinucleótidos, el cual carece de los pasos de oxidación, acetilación y destritilación solo cuando se adiciona X. Esto se hace con el fin de que las cadenas de oligonucleótidos crecientes, que no reaccionaron con el trinucleótido, no sean bloqueadas por acetilación; en vez de que esto ocurra, las cadenas que no reaccionaron se acoplan con el siguiente nucleótido convencional que definirá la base 3' del codón silvestre a explorar. Dos acoplamientos consecutivos con nucleótidos convencionales completarán el codón silvestre. De esta manera, el ensamble se inició con la síntesis del fragmento:

5' GGTX GCG CAA AAA CGT CAT 3'

usando como material de inicio el soporte DMTrdT-CPG y programando la síntesis en la modalidad tritilada. Completado el proceso, la columna fue tratada manualmente con 2 ml de DBU 0.1 M en acetonitrilo, por 1 min, a través de una jeringa a fin de remover el grupo Fmoc. Se instaló nuevamente la columna en el sintetizador y se programó la adición de los siguientes fragmentos:

ACCX

TTTX

GGGX GCG

G TTC GGT CAC GAA GCG

repetiendo el proceso de desfluorenilación al término de cada uno de ellos donde se adicionó el trinucleótido. Una vez completado el oligo mutagénico, se removió el grupo DMTr en el mismo sintetizador, se transfirió el soporte de síntesis a un vial de vidrio de 2 ml, se trató con 1.5 ml de hidracina 0.5 M en piridina:ácido acético 4:1 por 24 h, se recuperó el soporte por filtración, se trató con 1 ml de NH₄OH por 2h, a temperatura ambiente, para recuperar el oligo. La solución amoniacal se concentró repetidas veces con n-butanol hasta formarse un "pellet", las trazas de este alcohol se eliminaron por vacío intenso y el pellet fue resuspendido en 200 µl de agua. El oligo fue purificado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, conteniendo urea 8M y fue desetilado con 300 µl de una mezcla NH₄OH:tiofenol 3:1, a 55°C, 9 h. El oligo fue nuevamente concentrado con n-butanol (2 x 1ml), seguido de lavados con etanol (2 x 1ml) para remover las trazas de tiofenol. Se secó el pellet en vacío y se resuspendió en 100 µl de agua.

AMPLIFICACION Y CLONACION DEL OLIGO MUTAGENICO GAFTGA.

El oligo mutagénico GAFTGAmutup y otro oligo de secuencia AGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAG que incluye el sitio de restricción *Bgl* II fueron usados para amplificar un fragmento de 728 bp (pares de bases) por PCR convencional, usando como templado el gene *pspF* contenido en el plásmido pMJ15. El fragmento fue purificado por gel de agarosa y columnas QG de Qiagen. A continuación, tal fragmento se usó como megaprimero con otro oligo de secuencia GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG que contenía el sitio de restricción *Eco* RI y nuevamente con el gene *pspF* para generar por PCR fragmentos de 1289 bp. Estos fragmentos que contenían a los genes mutantes de *pspF* se sometieron a una

digestión doble con las enzimas *Bgl* II/*Eco* RI y los fragmentos digeridos se purificaron como antes y se ligaron al vector pMJ15 por 12 h a 17°C, usando la ligasa T4 de ADN. La reacción de ligación se desalificó por extracciones con n-butanol y una cuarta parte de ella se electroporó en 30 µl de células electrocompetentes de *E. coli JM101*. Las células transformadas se mezclaron con 1 ml solución SOC y se incubaron a 37°C por 1h para su recuperación del choque eléctrico. Se plateó 1µl de esta solución en medio sólido LB conteniendo ampicilina a 200 µg/ml y se incubó 12 h a 37° para cuantificar el tamaño de la biblioteca y caracterizar el tipo de variantes por secuenciación de ADN.

PURIFICACION DE PLASMIDO Y SECUENCIACION DE ADN.

De la caja de petri anterior, se inocularon 20 colonias al azar en 3 ml de medio LB conteniendo ampicilina a 200 µg/ml, por 12 h a 37°C. Tras este tiempo de crecimiento, se recuperaron las células por centrifugación a 9,000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el plásmido de cada una de ellas a través de un “kit” comercial (Cat. No. 1 754 785 de Roche) para purificación de este material. El fundamento del kit consiste básicamente en lisar la célula en condiciones alcalinas, destruir el ARN a través de una ARNasa, precipitar el ADN cromosomal con hidrocloreuro de guanidinio y recuperar el plásmido en solución por una columna de afinidad a ácidos nucleicos.

La secuenciación de ADN se realizó por el método de dideoxyterminadores marcados fluorescentemente por extensión por PCR, usando un secuenciador automático de ADN de Applied Biosystems, modelo ABI prism 377.

Fmoc-DINUCLEOTIDOS. La parte metodológica correspondiente al área de Fmoc-dímeros y su aplicación a esquemas de mutagénesis a nivel de codón, se detalla en el artículo acompañante y por tal razón no será descrita en esta sección.

BIBLIOGRAFIA

1. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. 2000, New York: Springer-Verlag.
2. Williams, J.C., *et al.* (1999). *Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power.*, *Protein Eng*, **12**(3): p. 243-50.
3. Shaw, A., R. Bott, and A.G. Day (1999). *Protein engineering of alfa-amylase for low pH performance.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**: p. 349-352.
4. You, L. and F.H. Arnold (1996). *Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide.*, *Protein Eng.*, **9**(1): p. 77-83.
5. Branden, C. and J. Tooze, *Introduction to protein structure*. 1991, New York: Garland publishing.
6. Brannigan, J.A. and A.J. Wilkinson (2002). *Timeline: Protein engineering 20 years on.*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(12): p. 964-70.
7. Cormack, B.P. and K. Struhl (1993). *Regional codon randomization: defining a TATA-binding protein surface required for RNA polymerase III transcription.*, *Science*, **262**(5131): p. 244-8.
8. Farinas, E.T., T. Bulter, and F.H. Arnold (2001). *Directed enzyme evolution.*, *Curr Opin Biotechnol*, **12**(6): p. 545-51.
9. Declerck, N., *et al.* (1995). *Hyperthermostable mutants of Bacillus licheniformis alpha-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation.*, *Protein Eng.*, **10**(5): p. 541-9.
10. Clackson, T. and J.A. Wells (1994). *In vitro selection from protein and peptide libraries.*, *Trends Biotechnol*, **12**(5): p. 173-84.
11. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale (1988). *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation.*, *Nucleic Acids Res*, **16**(13): p. 6127-45.
12. Smith, G.P. (1985). *Filamentous Fusion Phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion.*, *Science*, **228**: p. 227-228.
13. Hanes, J. and A. Pluckthun (1997). *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(10): p. 4937-42.

14. Reetz, M.T., *et al.* (1998). *Time-resolved IR-thermographic detection and screening of enantioselectivity in catalytic reactions.*, *Angew Chem, Int Ed Engl*, **37**(19): p. 2647-2650.
15. Soumillion, P. and J. Fastrez (2001). *Novel concepts for selection of catalytic activity.*, *Current Opinion in Biotechnology*, **12**: p. 387-394.
16. Caruthers, M., *DNA synthesis for nonchemists: the phosphoramidite method on silica supports.*, in *Synthesis and applications of DNA and RNA.*, S. Narang, Editor. 1987, Academic Press, Inc.: San Diego, CA. p. 47-94.
17. Atkinson, T. and M. Smith, *Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphite-triester method.*, in *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, M.J. Gait, Editor. 1984, IRL Press: Oxford. p. 35-81.
18. Sinha, N.D., *et al.* (1984). *Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl- N,N-dialkylamino-N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product.*, *Nucleic Acids Res*, **12**(11): p. 4539-57.
19. Cadwell, R.C. and G.F. Joyce (1992). *Randomization of genes by PCR mutagenesis.*, *PCR Methods Appl*, **2**(1): p. 28-33.
20. Stemmer, W.P. (1994). *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(22): p. 10747-51.
21. Zhao, H., *et al.* (1998). *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination.*, *Nat Biotechnol*, **16**(3): p. 258-61.
22. Shafikhani, S., *et al.* (1997). *Generation of large libraries of random mutants in Bacillus subtilis by PCR-based plasmid multimerization.*, *Biotechniques*, **23**(2): p. 304-10.
23. Zacco, M., *et al.* (1996). *An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues.*, *J Mol Biol*, **255**(4): p. 589-603.
24. Zacco, M. and E. Gherardi (1999). *The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase.*, *J Mol Biol*, **285**(2): p. 775-83.
25. Sirotkin, K. (1986). *Advantages to mutagenesis techniques generating populations containing the complete spectrum of single codon changes.*, *J Theor Biol*, **123**(3): p. 261-79.

26. Vartanian, J.P., M. Henry, and S. Wain-Hobson (1996). *Hypermutable PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions.*, *Nucleic Acids Res*, **24**(14): p. 2627-31.
27. Hermes, J.D., *et al.* (1989). *A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers.*, *Gene*, **84**(1): p. 143-51.
28. Ner, S.S., D.B. Goodin, and M. Smith (1988). *A simple and efficient procedure for generating random point mutations and for codon replacements using mixed oligodeoxynucleotides.*, *Dna*, **7**(2): p. 127-34.
29. del Rio, G., J. Osuna, and X. Soberon (1994). *Combinatorial libraries of proteins: analysis of efficiency of mutagenesis techniques.*, *Biotechniques*, **17**(6): p. 1132-9.
30. Virnekas, B., *et al.* (1994). *Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis.*, *Nucleic Acids Res*, **22**(25): p. 5600-7.
31. Lyttle, M.H., *et al.* (1995). *Mutagenesis using trinucleotide beta-cyanoethyl phosphoramidites.*, *Biotechniques*, **19**(2): p. 274-81.
32. Ono, A., *et al.* (1995). *The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis.*, *Nucleic Acids Res*, **23**(22): p. 4677-82.
33. Gaytan, P., *et al.* (1998). *Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method.*, *Chem Biol*, **5**(9): p. 519-27.
34. Cormack, B.P. and K. Struhl (1992). *The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells.*, *Cell*, **69**(4): p. 685-96.
35. Glaser, S.M., D.E. Yelton, and W.D. Huse (1992). *Antibody engineering by codon-based mutagenesis in a filamentous phage vector system.*, *J Immunol*, **149**(12): p. 3903-13.
36. Hooft van Huijsduijnen, R.A., G. Ayala, and J.F. DeLamarter (1992). *A means to reduce the complexity of oligonucleotides encoding degenerate peptides.*, *Nucleic Acids Res*, **20**(4): p. 919.
37. Sondek, J. and D. Shortle (1992). *A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(8): p. 3581-5.

38. Gaytan, P., *et al.* (2001). *Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols.*, *Nucleic Acids Res*, **29**(3): p. E9.
39. Arkin, A.P. and D.C. Youvan (1992). *Optimizing nucleotide mixtures to encode specific subsets of amino acids for semi-random mutagenesis.*, *Biotechnology (N Y)*, **10**(3): p. 297-300.
40. Beaucage, S.L. and R.P. Iyer (1992). *Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach.*, *Tetrahedron*, **48**(12): p. 2223-2311.
41. Kuijpers, W.H., *et al.* (1990). *Synthesis of well-defined phosphate-methylated DNA fragments: the application of potassium carbonate in methanol as deprotecting reagent.*, *Nucleic Acids Res*, **18**(17): p. 5197-205.
42. Miller, P.S., *et al.* (1982). *Synthesis and template properties of an ethyl phosphotriester modified decaoxyribonucleotide.*, *Biochemistry*, **21**(22): p. 5468-74.
43. Yamana, K., *et al.* (1991). *Deoxyribonucleoside 3'-phosphorobisamidites in the synthesis of isopropyl phosphotriester oligodeoxyribonucleotide analogues.*, *Tetrahedron Lett.*, **32**(36): p. 4721-4724.
44. Stec, W.J., *et al.* (1985). *Synthesis and absolute configuration of P-chiral O-isopropyl oligonucleotide triesters.*, *Tetrahedron Lett.*, **26**(18): p. 2191-2194.
45. Hau, J.F., U. Asseline, and N.T. Thuong (1991). *Octathymidylates involving alternating neopentylphosphothionotriester-phosphodiester linkages with controlled stereochemistry at the modified P-center.*, *Tetrahedron Lett.*, **32**(22): p. 2497-2498.
46. wada, T. and M. sekine (1994). *2-(Trimethylsilyl)ethyl as a phosphate protecting group in oligonucleotide synthesis.*, *Tetrahedron Lett.*, **35**(5): p. 757-760.
47. Kuijpers, W.H., *et al.* (1993). *The application of the AMB protective group in the solid-phase synthesis of methylphosphonate DNA analogues.*, *Nucleic Acids Res*, **21**(15): p. 3493-500.
48. Celebuski, J.E. and C. Chan (1992). *Synthesis and utility of a DNA phosphorylating agent based on 2-(triphenylsilyl)ethanol.*, *J. Org. Chem.*, **57**: p. 5535-5538.
49. Chao, H.G. and M.S. Bernatowicz (1993). *N,N-diisopropyl-bis[2-(trimethylsilyl)ethyl]phosphoramidite. An attractive phosphitylating agent compatible*

- with the Fmoc/t-butyl strategy for the synthesis of phosphotyrosine containing peptides., *Tetrahedron Lett.*, **34**: p. 3337-3380.
50. Gallo, K.A., *et al.* (1986). *Alkyl phosphotriester modified oligodeoxyribonucleotides. V. Synthesis and absolute configuration of Rp and Sp diastereomers of an ethyl phosphotriester (Et) modified EcoRI recognition sequence, d[GGAA(Et)TTCC]. A synthetic approach to regio- and stereospecific ethylation-interference studies.*, *Nucleic Acids Res*, **14**(18): p. 7405-20.
 51. Maher, L.J., 3rd and B.J. Dolnick (1988). *Comparative hybrid arrest by tandem antisense oligodeoxyribonucleotides or oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates in a cell-free system.*, *Nucleic Acids Res*, **16**(8): p. 3341-58.
 52. Brown, T., *et al.* (1989). *A new base-stable linker for solid-phase oligonucleotide synthesis.*, *J Chem Soc Chem Commun*, **14**: p. 891-893.
 53. Kayushin, A.L., *et al.* (1996). *A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries.*, *Nucleic Acids Res*, **24**(19): p. 3748-55.
 54. Yañez, J.A., *Rutas alternas de síntesis para Fmoc-trinucleósido-difosfato-fosforamiditos*, in *Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería*. 1999, Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Morelos. p. 105.
 55. Morrison, K.L. and G.A. Weiss (2001). *Combinatorial alanine-scanning.*, *Curr Opin Chem Biol*, **5**(3): p. 302-7.
 56. Jovanovic, G., L. Weiner, and P. Model (1996). *Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the Escherichia coli stress-induced psp operon.*, *J Bacteriol*, **178**(7): p. 1936-45.
 57. Morett, E. and L. Segovia (1993). *The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains.*, *J Bacteriol*, **175**(19): p. 6067-74.
 58. Paul, C.H. and A.T. Royappa (1996). *Acid binding and detritylation during oligonucleotide synthesis.*, *Nucleic Acids Res*, **24**(15): p. 3048-52.
 59. Temsamani, J., M. Kubert, and S. Agrawal (1995). *Sequence identity of the n-1 product of a synthetic oligonucleotide.*, *Nucleic Acids Res*, **23**(11): p. 1841-4.

60. Fearon, K.L., *et al.* (1995). *Investigation of the 'n-1' impurity in phosphorothioate oligodeoxynucleotides synthesized by the solid-phase beta-cyanoethyl phosphoramidite method using stepwise sulfurization.*, *Nucleic Acids Res*, **23**(14): p. 2754-61.
61. Neuner, P., R. Cortese, and P. Monaci (1998). *Codon-based mutagenesis using dimer-phosphoramidites.*, *Nucleic Acids Res*, **26**(5): p. 1223-7.
62. Jelsch, C., *et al.* (1993). *Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution.*, *Proteins*, **16**(4): p. 364-83.
63. Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur, and J.M. Frere (1998). *Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity.*, *Biochem J*, **330**(Pt 2): p. 581-98.
64. Knox, J.R. (1995). *Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure.*, *Antimicrob Agents Chemother*, **39**(12): p. 2593-601.
65. Ambler, R.P., *et al.* (1991). *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases.*, *Biochem J*, **276**(Pt 1): p. 269-70.
66. Venkatachalam, K.V., *et al.* (1994). *Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime.*, *J Biol Chem*, **269**(38): p. 23444-50.
67. Frere, J.M., *et al.* (1991). *Diversity of the mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics.*, *Res Microbiol*, **142**(6): p. 705-10.
68. Cantu, C., III, W. Huang, and T. Palzkill (1996). *Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime.*, *J Biol Chem*, **271**(37): p. 22538-45.
69. Vakulenko, S.B., *et al.* (1999). *Effects on substrate profile by mutational substitutions at positions 164 and 179 of the class A TEM(pUC19) beta-lactamase from Escherichia coli.*, *J Biol Chem*, **274**(33): p. 23052-60.
70. Bradford, P.A., *et al.* (1996). *TEM-28 from an Escherichia coli clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum beta-lactamases.*, *Antimicrob Agents Chemother*, **40**(1): p. 260-2.
71. Soweck, J.A., *et al.* (1991). *Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1pTZ18R beta-lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam.*, *Biochemistry*, **30**(13): p. 3179-88.

72. Banerjee, S., *et al.* (1998). *Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase.*, *Biochemistry*, **37**(10): p. 3286-96.
73. Hayes, F., B. Hallet, and Y. Cao (1997). *Insertion mutagenesis as a tool in the modification of protein function. Extended substrate specificity conferred by pentapeptide insertions in the omega-loop of TEM-1 beta-lactamase.*, *J Biol Chem*, **272**(46): p. 28833-6.
74. Huletsky, A., J.R. Knox, and R.C. Levesque (1993). *Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling.*, *J Biol Chem*, **268**(5): p. 3690-7.
75. Saves, I., *et al.* (1995). *Mass spectral kinetic study of acylation and deacylation during the hydrolysis of penicillins and cefotaxime by beta-lactamase TEM-1 and the G238S mutant.*, *Biochemistry*, **34**(37): p. 11660-7.
76. Ward, B. and T. Juehne (1998). *Combinatorial library diversity: probability assessment of library populations.*, *Nucleic Acids Res*, **26**(4): p. 879-86.
77. Jones, R.A., *Preparation of protected deoxyribonucleosides*, in *Oligonucleotide Synthesis -a practical approach-*, M.J. Gait, Editor. 1984, IRL press: Oxford. p. 23-33.
78. Lehmann, C., *et al.* (1989). *Solid-phase synthesis of oligoribonucleotides using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) for 5'-hydroxyl protection.*, *Nucleic Acids Res*, **17**(7): p. 2379-90.
79. Martin, D.R. and P.J. Pizzolato (1950). *J. Am. Chem. Soc.*, **72**: p. 4585.

Artículo de mutagénesis basada en Fmoc-dinucleótidos

Novel ceftazidime-resistance β -lactamases generated by a codon-based mutagenesis method and selection

Paul Gaytán*, Joel Osuna and Xavier Soberón

Instituto de Biotecnología/UNAM, Ap. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

Received as resubmission June 27, 2002; Accepted June 30, 2002

ABSTRACT

Four known and nine new ceftazidime-resistance β -lactamases were generated by a novel, contaminating codon-based mutagenesis approach. In this method, wild-type codons are spiked with a set of mutant codons during oligonucleotide synthesis, generating random combinatorial libraries of primers that contain few codon replacements per variant. Mutant codons are assembled by tandem addition of a diluted mixture of five Fmoc-dimer amidites to the growing oligo and a mixture of four DMTr-monomer amidites to generate 20 trinucleotides that encode a set of 18 amino acids. Wild-type codons are assembled with conventional chemistry and the whole process takes place in only one synthesis column, making its automation feasible. The random and binomial behavior of this approach was tested in the polylinker region of plasmid pUC19 by the synthesis of three oligonucleotide libraries mutagenized at different rates and cloned as mutagenic cassettes. Additionally, the method was biologically assessed by mutating six contiguous codons that encode amino acids 237–243 (ABL numbering) of the TEM_{pUC19} β -lactamase, which is functionally equivalent to the clinically important TEM-1 β -lactamase. The best ceftazidime-recognizing variant was a triple mutant, R164H:E240K:R241A, displaying a 333-fold higher resistance than the wild-type enzyme.

INTRODUCTION

Many methods have been developed to accelerate the artificial evolution of proteins, either by enzymatic mutagenesis of the genes that encode them or by amplification from mutant primers. Enzymatic methods are mainly based on PCR techniques [e.g. error-prone PCR (1), DNA shuffling (2) and StEP (3)], taking advantage of the low fidelity of some thermostable DNA polymerases under special amplification conditions. For instance, *Taq* DNA polymerase may exhibit base substitution error rates ranging from 10^{-2} to 10^{-5} (4). However, these approaches are limited to point mutations and each wild-type amino acid will only change to a fraction of the other 20 (5). A similar effect is seen with libraries of spiked

oligos (6), where each wild-type nucleotide is contaminated with the other three bases during oligonucleotide assembly. In order to cover all the sequence space, several schemes of saturation mutagenesis have been described. The most popular are the 'NNN' and 'NNG/C' approaches (7), which generate pools of 61 and 31 sense codons, respectively, that encode the 20 amino acids. Unfortunately, when a region of some amino acids has to be sampled, these strategies only allow the complete exploration of a maximum of four amino acids due to the restriction imposed by the practical transformation efficiency of 10^7 variants (7). Additionally, the frequency of mutants generated with these saturation methods is strongly biased towards those sequences encoded by redundant codons. Codon redundancy has been circumvented by the use of sets of DMTr-trimer amidites (DMTr represents the 4,4'-dimethoxy-trityl protecting group) that encode all 20 amino acids (8) or a subset of them (9,10). However, in contrast to enzymatic and spiked methods, all common saturation schemes of mutagenesis generate libraries enriched with variants bearing multiple amino acid substitutions and single mutants are poorly represented. The enrichment of libraries with variants carrying few codon replacements in codon-based mutagenesis approaches can be performed by an appropriate contamination of the wild-type codon with a specific mutant codon (11).

In 1998, Neuner *et al.* (12) described an ingenious codon-based saturation mutagenesis method that combines the use of DMTr-dimer amidites and a resin-splitting approach (13) as a means to eliminate codon redundancy in random oligonucleotide libraries. In this method, subsets of different codons with the sequence B₁B₂B₃ can be generated if during oligonucleotide synthesis, proceeding in the common 3'→5' direction, the growing oligo is split into four fractions and each of these is coupled to a specific mix of DMTr-dimer amidites bearing the sequences B₂B₃, corresponding to the second and third nucleotide positions of the mutant codons. Mutant codons are completed by coupling a specific DMTr-monomer amidite to each separated fraction to define the first nucleotidic position B₁. Disappointingly, this scheme of mutagenesis requires the use of 11 DMTr-dimer amidites and falls into the resin-splitting procedures, which are very tedious, laborious and impractical to automate.

We took this concept of dimers, employing the fact that the Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) and DMTr protecting groups are mutually orthogonal (11) (Fmoc is labile to base and stable to acid, while DMTr is the converse) to develop a novel codon-based mutagenesis method executed in a contaminating approach. The randomness of the method lies in the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 777 3 29 16 04; Fax: +52 777 3 17 23 88; Email: paul@ibt.unam.mx

combination of five Fmoc-dimer amidites and four DMTr-monomer amidites to generate 20 trinucleotides that encode a set of 18 amino acids, as illustrated in Figure 1. In this method, the growing oligonucleotide is contaminated (spiked) with a diluted mix of Fmoc-dimer amidites, the wild-type codon is assembled with conventional DMTr-monomer amidites and the set of mutant codons is completed with a mix of DMTr-monomer amidites, as shown in Figure 2. This mutagenic cycle of synthesis can be repeated for each wild-type codon where variability is to be explored.

The randomness and the binomial behavior of this approach were evaluated in the polylinker region of plasmid pUC19 by the synthesis of three oligonucleotide libraries mutagenized at different rates and cloned as mutant cassettes. Additionally, the method was biologically assessed by mutating a region of six contiguous amino acids [237–243, ABL numbering (14)] located between the end of the B3 β -strand and at the beginning of the B4 β -strand of the TEM_{pUC19} β -lactamase (15) and selecting mutants with a marked change of specificity from ampicillin towards ceftazidime (CAZ). TEM_{pUC19} β -lactamase (16) was chosen as the model protein because this enzyme is found in the world wide spread plasmid pUC19, because it is enzymologically equivalent to the well known TEM-1 enzyme, in that it contains only two neutral amino acids replacements, and because numerous natural (www.lahey.org/studies/temtable.htm) and laboratory mutants of TEM-1 (17–20) have demonstrated that significant determinants of the specificity change from ampicillin to CAZ are located in the randomized region.

MATERIALS AND METHODS

³¹P NMR analysis was performed at 162 MHz, using 85% triphosphoric acid as the external reference. The oligonucleotide libraries were assembled on two DNA synthesizers (model 391) from Applied Biosystems using a 0.2 μ mol standard protocol as recommended by the manufacturer. HPLC analyses were performed on a System Gold chromatograph and an ultrasphere C18 analytical column (4.6 \times 250 mm), both from Beckman, with detection at 260 nm. *N*-acyl-deoxynucleosides and thymidine were purchased from Chemgenes and DMTr-deoxynucleoside β -cyanoethyl phosphoramidites (DMTr-monomer amidites) from Glen Research. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), *N,N*-diisopropylethylamine, *t*-butyl-hydroperoxide and all ancillary reagents for oligonucleotide synthesis were purchased from Aldrich. Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was purchased from Fisher, while anhydrous acetonitrile was from American Bioanalytical. All chemical reactions in solution phase were followed by thin layer chromatography (TLC) on aluminum-backed silica gel 60 F₂₅₄ sheets (Merck) using a mix of ethyl acetate/dichloromethane/triethylamine (45:45:10 v/v) as the elution system. 5'-Fmoc-monomers were synthesized and recovered by the method described by Lehmann *et al.* (21). 3'-DMTr-monomers were prepared by our reported procedure (11). The phosphorylating agent chloro(diisopropylamino)-ethoxyphosphine (EtOPCINⁱPr₂) used in the synthesis of Fmoc-dimers and their corresponding amidites was prepared according to Atkinson and Smith (22), using ethoxydichlorophosphite instead of methoxydichlorophosphite.

The antibiotics cefotaxime (CTX), ampicillin (AMP) and kanamycin (KAN) were bought from Sigma Chemical Co., while CAZ was from Glaxo. Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were purchased from New England Biolabs, while *Taq* DNA polymerase, plasmid pUC19 and deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) were bought from Boehringer Mannheim and used according to standard protocols. Plasmid pT4Bla was the parent plasmid of all random libraries. It is a β -lactamase promoter derivative from cloning vector pT4 (kindly donated by Peter Kast and Ying Tang, ETH, Zurich, Switzerland), containing 3.2 kb that include the KAN resistance gene and also the ColE1 and *f1* origins of DNA replication. *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'* *proAB*, *lacI^q* *lacZ*ΔM15, *Tn10*(*tet^r*)] was obtained from Stratagene and used for the cloning and plasmid purification procedures.

Synthesis of Fmoc-dimer amidites

Synthesis of Fmoc-dimers, precursor synthons of the Fmoc-dimer amidites, proceeded in the 3'→5' direction in a completely protected scheme to ensure the exclusive formation of 3'-5' phosphotriester bonds and in a 'one pot' approach to avoid isolation of the intermediate phosphoramidite (Scheme 1). We describe here the procedure used for synthesis of the Fmoc-TT dimer and its corresponding amidite. The other four Fmoc-dimer amidites, AA, AT, CG and GC, were prepared with the same general procedure.

5'-*O*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)thymidine-3'-yl-ethylphosphate-5'-yl-thymidine (Fmoc-TT dimer)

3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine (1.53 g, 3.3 mmol) was dried by co-evaporation with anhydrous tetrahydrofuran (2 \times 10 ml) and redissolved in 25 ml of the same solvent. *N,N*-diisopropylethylamine (0.68 ml, 3.9 mmol) and the phosphorylating agent (0.84 ml, 3.9 mmol) were added using independent disposable syringes under a nitrogen atmosphere and with magnetic stirring. After 30 min reaction, TLC analysis showed complete conversion of the nucleoside to its phosphoramidite and this reaction mixture was transferred by teflon tubing to another flask containing a mixture of 5'-*O*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)thymidine (2.2 g, 4 mmol) and tetrazol (1.05 g, 15 mmol), previously co-evaporated with THF (2 \times 10 ml). After 60 min of the second reaction, the TLC analysis showed complete disappearance of the intermediate phosphoramidite (limiting reagent) and an excess of *t*-butyl hydroperoxide was added to oxidize the recently formed phosphite-triester bond to the more stable phosphate-triester. After 1 h reaction, the mixture was concentrated to dryness, redissolved in dichloromethane (100 ml) and tandemly washed with a saturated solution of sodium bicarbonate (2 \times 20 ml) and brine (2 \times 20 ml). The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated until formation of a foam. The fully protected dimer was detriethylated with 3% trichloroacetic acid (TCA) in dichloromethane (200 ml) at 0°C for 20 min and was immediately neutralized with a saturated solution of sodium bicarbonate. The mixture was washed as before and concentrated to a foam. The Fmoc-TT dimer was purified by flash column chromatography using silica gel 60 H (5–40 μ m; Merck) as the stationary phase, eluting with 3% methanol in dichloromethane. The pure compound was recovered as a

white powder after precipitation over *n*-hexane and vacuum drying.

5'-O-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)thymidine-3'-yl-ethylphosphate-5'-yl-thymidine-3'-yl-O-ethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidite (Fmoc-TT amidite)

The Fmoc-TT dimer (1.19 g, 1.5 mmol) was dried by co-evaporation with anhydrous THF (2 × 10 ml) and was redissolved in 15 ml of the same solvent. *N,N*-diisopropylethylamine (0.43 ml, 2.5 mmol) and the phosphitylating agent (0.47 ml, 2.25 mmol) were added using independent disposable syringes under a nitrogen atmosphere and with magnetic stirring. After 35 min reaction an abundant amount of precipitate corresponding to *N,N*-diisopropylethylammonium chloride arose, but the reaction was continued for an additional 25 min. TLC analysis showed a complete transformation of the starting dimer to a more hydrophobic product corresponding to its phosphoramidite. The reaction was quenched with a saturated solution of sodium bicarbonate (5 ml), diluted with dichloromethane and washed as before. The crude compound was finally recovered as a white powder after precipitation over *n*-hexane and vacuum drying.

Random oligonucleotide libraries

Three oligonucleotides of sequence agtgcgaagcttgga-GCC/B₁B₂B₃-GGT/B₁B₂B₃-GAG/B₁B₂B₃-CGT/B₁B₂B₃-GGG/B₁B₂B₃-TCT/B₁B₂B₃-cgcgaatcgtaac were assembled at different levels of mutagenesis containing the mutant codons B₁B₂B₃ represented in Figure 1. The wild-type codons subjected to mutagenesis are those marked in capital letters. It is worth noting that the wild-type nucleotides of the sequence were added by common DMTr-monomer amidites while the codons B₁B₂B₃ were incorporated by a mix of the five Fmoc-dimer amidites described above and an equimolar mixture of four DMTr-monomer amidites, as shown in Figure 2. The flanking arms included two restriction sites, *Hind*III and *Eco*RI.

The assembly process required the use of two DNA synthesizers, labeled A and B (Fig. 2). Synthesizer A was fitted out with common reagents for oligonucleotide synthesis, including clean 50 mM DMTr-monomer amidites. At position X (fifth vial from left to right) a mix B₂B₃ of the five Fmoc-dimer amidites TT:AA:AT:GC:CG in the relative molar ratio 1.0:1.03:1.03:1.03:1.23 and at a total 50 mM concentration in anhydrous acetonitrile was installed for assembly of the library polylinker100. Synthesizer B was prepared with the common activating, capping and oxidizing solutions, but the detritylating reagent was substituted for a 'defluorenylating' reagent made up of 0.1 M DBU in acetonitrile. This solution was used to remove the Fmoc protecting groups of the incorporated dimers. At position X (fifth vial from left to right) an equimolar 100 mM acetonitrile solution of the four DMTr-monomer amidites (A, C, G and T) was installed to complete the mutant codons. This mixture of monomers is usually designated N, but here is named B₁ because these monomers will define the first 5' nucleotide position of the mutant codons. With regard to the synthesis program, co-delivery of amidites and tetrazol to the column was accomplished by three pulses of 3 s (~400 μl), as opposed to the conventional pulses of 3 × 2 s. Under these conditions, clean DMTr-monomer amidites were coupled with an efficiency of 98%, while Fmoc-dimer amidites were coupled with an efficiency of 95%. The

assembly of polylinker100 (mutated at saturation, 100%) started on synthesizer A with synthesis of the sequence 5'-(B₂B₃)-cgcggtatcatt-3' in the trityl-on mode. Next, the column was transferred to synthesizer B, the Fmoc protecting groups were removed and one coupling with the mix B₁ was performed to complete the mutant codons B₁B₂B₃, in trityl-on mode. The column was returned to synthesizer A for one coupling with the mix Fmoc-B₂B₃ and then to synthesizer B to complete the mutant codons. This process was repeated four more times and finally the sequence agtgcgaagcctgga was added on synthesizer A, in trityl-off mode, to complete the library and remove the last DMTr protecting group.

For the second library, originally expected to be mutated at 50%, the assembly started on synthesizer A programming the sequence TC(T/B₂B₃)-cgcgaatcgtaac in the trityl-on mode. The bases in parentheses were automatically co-delivered to the growing chain. During this step the wild-type sequence grew by only 1 nt, while the pool of mutant sequences grew by 2 nt. In the next two cycles of synthesis, the wild-type codon was completed with addition of clean DMTr-monomer amidites, while the mutant segments bearing the Fmoc protecting group were in standby. As before, the column was transferred to synthesizer B to complete the set B₁B₂B₃. The column was returned to synthesizer A for three coupling cycles to add the sequence 5'-GG(G/B₂B₃)-3' and then the mutant codons were completed on synthesizer B. The cycling processes were repeated for each wild-type codon to be explored. Finally, the 5' flanking region gataaatctgga was added on synthesizer A. The level of mutagenesis per codon, indicated by the incorporation of Fmoc-B₂B₃, was determined by the difference in absorbance of the DMTr cation released from the previous nucleotide to the mutagenized codon and the DMTr-monomer amidite incorporated with the mix Fmoc-B₂B₃. This library was mutated at an average 48.9% per codon and was named polylinker49.

For the third library, 100 mM solutions of clean DMTr-monomer amidites were installed in synthesizer A and a 20 mM solution of Fmoc-B₂B₃ in the X position. This oligo was synthesized as was polylinker49 and mutated at an average 20.5% per codon. It was named polylinker20.

Two additional libraries of sequences 5'-ggttttatgctg-ataaatctgga-GCC/B₁B₂B₃-GGT/B₁B₂B₃-GAG/B₁B₂B₃-CGT/B₁B₂B₃-GGG/B₁B₂B₃-TCT/B₁B₂B₃-cgcggtatcattgcagcactgg-3' and 5'-gataaatctgga-GCC/B₁B₂B₃-GGT/B₁B₂B₃-GAG/B₁B₂B₃-CGT/B₁B₂B₃-GGG/B₁B₂B₃-TCT/B₁B₂B₃-cgcggtatcatt-3' were synthesized to mutate the region 237-243 of the TEM_βCT19 β-lactamase. The first library was named Blamut63 and the second Blamut42, to reflect their respective lengths. The main differences between the two libraries were the sizes of the flanking regions (marked in lower case), the relative ratio of components in the mutagenic mix and the level of mutagenesis. Blamut63 was assembled using 100 mM DMTr-monomer amidites and the mix Fmoc-B₂B₃ at 40 mM in the same ratio of components as was used for the polylinker libraries. Blamut42 was also synthesized with 100 mM DMTr-monomer amidites, but Fmoc-B₂B₃ was at 50 mM and the ratio of the components was 1.0:1.0:1.1:1.8:2.3 for TT:AA:AT:GC:CG, respectively.

The solid supports containing the libraries were subjected to treatment with 0.5 ml of thiophenol/triethylamine (3:1 v/v) for 2 h at 55°C to remove the internucleotide ethyl groups of the

mutant codons. The supernatant was removed by filtration and each support was subjected to an overnight treatment with concentrated ammonium hydroxide to remove all remaining protecting groups and release the oligonucleotides from the supports. Libraries were purified on 15% polyacrylamide gels containing 8 M urea and recovered in deionized water after *n*-butanol desalting.

Relative reactivity of Fmoc-dimer amidites

Each mix Fmoc-B₂B₃ used for assembly of the libraries was tested by coupling to a solid support carrying dA^{bz} in order to generate a pool of five trimers with the sequences TTA, AAA, ATA, CGA and GCA. Previous experiments performed by conventional chemistry had demonstrated that such a pool was well resolved by HPLC, using a gradient of 5–12% acetonitrile in 20 min, at a flow of 1 ml/min, and 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0, as the aqueous buffer. These experiments were performed in duplicate and the relative reactivities were determined by correcting the integrated areas of each component using calculated molar extinction coefficients (23).

Cloning of mutant cassettes

Duplexes of the libraries polylinker20, polylinker49 and polylinker100 were generated by extension of the complementary primer 5'-gattacgaattcgcg-3' and the Klenow fragment (3'→5' exo-) of DNA polymerase I as described earlier (11,24). The products were double digested with the restriction enzymes *Hind*III and *Eco*RI and cloned into the previously opened plasmid pUC19. These recombinant plasmids were electroporated into XL1-Blue cells and one-thousandth of the electroporation mixture was plated on LB agar containing AMP at 200 µg/ml. The plates were incubated overnight at 37°C and many clones per library were sequenced to complete 32 in-phase sequences.

Amplification and cloning of libraries Blamut63 and Blamut42

Each oligonucleotide library and a primer of sequence 5'-agccgtggatcgtggtcgaatcattaccaatgcttaacag-3', which included the underlined cleavage site *Xho*I, were used to amplify a 195 bp fragment (megaprimer) by conventional PCR, using as template the gene *bla*_{pUC19}. These megaprimers were purified in agarose gels and on QG columns from Qiagen. They were independently combined with a primer of sequence 5'-cgggcatgctattacaattccgtgctgcctattcccttttgcggcattt-3', containing the underlined cleavage site *Nco*I, and plasmid pUC19 to yield 873 bp fragments by PCR. These fragments containing the complete mutant genes of *bla*_{pUC19} were subjected to double digestion with the enzymes *Nco*I and *Xho*I and the fragments were purified as before and ligated overnight to plasmid pT4Bla, using T4 DNA ligase. The ligation reaction was desalted with *n*-butanol and one-quarter of it was electroporated on 30 µl of electrocompetent *E. coli* XL1-Blue cells. After a 1 h recovery of the transformed cells in 1 ml of SOC medium, 1 µl of this mixture was plated on a solid LB plate containing 25 µg/ml KAN and was incubated overnight at 37°C to quantify the library size. The remaining solution was diluted with 19 ml of liquid LB containing 26.3 µg/ml KAN and was incubated overnight at 37°C. Each library arising from Blamut63 and Blamut42 was recovered as

a population of mutant plasmids using miniprep columns from Qiagen.

Selection of active mutants

For selection of functional mutants again CAZ, each library of mutant plasmids arising from Blamut63 and Blamut42 was used to transform *E. coli* XL1-Blue cells by electroporation. The mixture was plated on five LB plates (200 µl each) containing CAZ at 12.5 µg/ml and incubated for 16–20 h at 37°C. Resistant mutants that arose on these plates were inoculated into 3 ml of liquid LB (containing 25 µg/ml KAN) and were incubated overnight at 37°C to recover plasmid from each of them. Plasmids were retransformed, subcloned and sequenced.

Antibiotic susceptibility

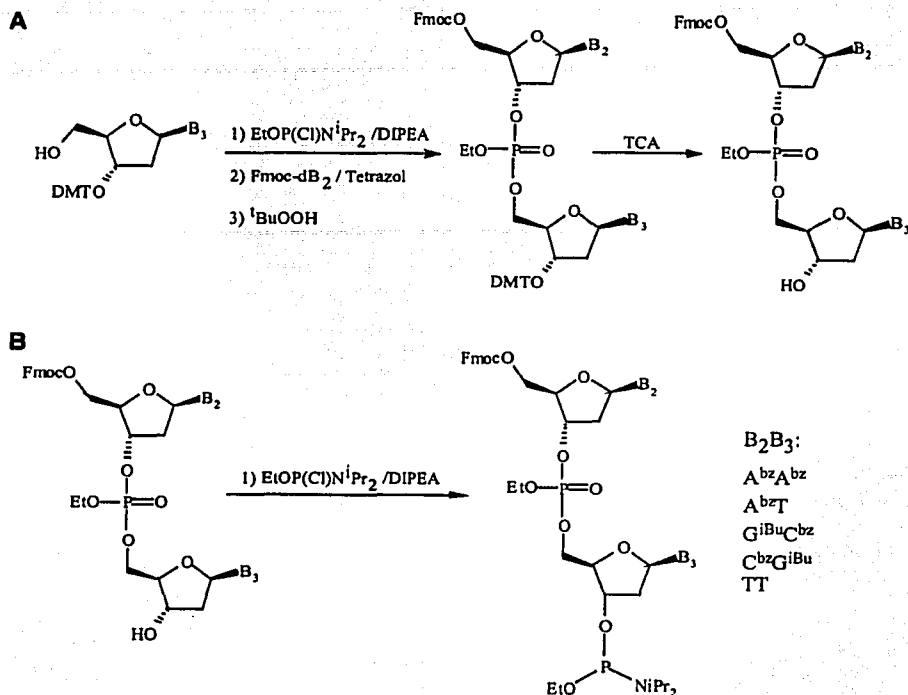
Minimum inhibitory concentrations (MICs) of *E. coli* XL1-Blue cells carrying mutant plasmids obtained by CAZ selection were assessed in solid LB plates containing 2-fold increasing concentrations of the antibiotics AMP and CTX. For CAZ, we used linear increasing concentrations, starting with three low concentrations (0.10, 0.125 and 0.150 µg/ml) to determine the MIC of the wild-type TEM_{pUC19} β-lactamase and ending with six higher concentrations (10, 15, 20, 30, 40 and 50 µg/ml) for the mutants. Assay of each mutant was performed at three different dilutions (10⁴, 10⁵ and 10⁶ c.f.u./drop). Spotting of cells was done with a multipipette device, inoculating 5 µl per dilution. Plates were incubated at 37°C for 16–20 h and the presence of colonies in the most diluted spot was interpreted as a signal of resistance.

RESULTS

Fmoc-dimer amidites

Chemical synthesis of five Fmoc-dimers with the sequences TT, AA, AT, GC and CG, precursors of the target Fmoc-dimer amidites, was accomplished in two stages, as shown in Scheme 1A. In the first stage, fully protected dimers were obtained through a 'one pot' reaction where activation of the 3' nucleoside, coupling with the 5' nucleoside and oxidation of the internucleotidic phosphite took place without isolation of any intermediate material. In the second stage, each crude fully protected dimer was detritylated and purified by flash column chromatography. In general, Fmoc-dimers were obtained in modest to good yields, but with very high standards of purity as assessed by HPLC and ³¹P NMR (Table 1). It is worth noting that each Fmoc-dimer was obtained as a mixture of two diastereoisomers due to the chiral center formed in the internucleotidic phosphotriester, accounting for the pair of peaks that appeared in HPLC and ³¹P NMR. Table 1 also shows the appropriate protected starting nucleosides required to assemble each dimer.

Fmoc-dimer amidites were obtained by phosphorylation of the corresponding Fmoc-dimers (Scheme 1B) and were recovered in a crude form to avoid chromatographic purification of such reactive species, a step that is frequently deleterious to the overall yield. In spite of this, the four Fmoc-dimer amidites (TT, AA, AT, GC) were highly pure, as indicated in Table 1, and only CG resulted in low purity due to formation of a large amount of an H-phosphonate subproduct.



Scheme 1. Synthetic pathway for preparation of Fmoc-dimer amidites. DMTr, 4,4'-dimethoxytrityl group; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl group; DIPEA, *N,N*-diisopropylethylamine; t BuOOH, *t*-butyl-hydroperoxide; TCA, trichloroacetic acid.

Table 1. Analysis and results of the Fmoc-dimer amidites TT, AA, AT, GC and CG and their corresponding precursors

Compound	Starting nucleosides	Yield (%)	Purity (%)	Retention time (min)	^{31}P NMR (p.p.m.)
Fmoc-TT	5'-O-Fmoc-dT, 3'-O-DMT-dT	55.2	95.6	4.34, 4.59	-0.483, -1.216
Fmoc-TT amidite	Fmoc-TT	90.5	82.4	18.78, 18.95, 19.65	148.399, 147.998, -0.671, -0.695, -0.718
Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$	5'-O-Fmoc-d A^{bz} , 3'-O-DMT-d A^{bz}	50.6	94.5	7.07, 7.45	-0.896, -1.135
Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$ amidite	Fmoc- $A^{bz}A^{bz}$	79.4	82.1	24.32, 24.58, 24.71, 24.91	148.210, 148.190, 148.178, -0.695, -0.900
Fmoc- $A^{bz}T$	5'-O-Fmoc-d A^{bz} , 3'-O-DMT-dT	61.9	93.2	5.69, 5.98	-0.567, -1.098
Fmoc- $A^{bz}T$ amidite	Fmoc- $A^{bz}T$	71.5	91.2	21.48, 22.21	148.30, 148.00, -0.668, -0.685, -0.705
Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$	5'-O-Fmoc-d G^{iBu} , 3'-O-DMT-d C^{bz}	89.6	97.9	6.95, 7.94	0.092, -1.683
Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$ amidite	Fmoc- $G^{iBu}C^{bz}$	89.0	82.1	24.01, 24.29, 25.27, 25.48	149.10, 148.70, 148.30, -0.530, -0.607, -0.705, -0.718
Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$	5'-O-Fmoc-d C^{bz} , 3'-O-DMT-d G^{iBu}	48.2	98.0	8.29	-1.263, -1.656
Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$ amidite	Fmoc- $C^{bz}G^{iBu}$	82.4	54.5	25.19, 25.38, 26.90, 27.07	148.452, 147.968, 147.656, -1.545, -1.697, -1.828

Although this subproduct reduces the purity of the expected amidite, it is innocuous during the coupling reaction. Each Fmoc-dimer amidite was obtained as a mixture of four diastereoisomers because two chiral phosphorus atoms were generated per molecule, one corresponding to the internucleotidic phosphotriester and another one to the phosphoramidite function. Such a diastereoisomeric mixture was evident in the HPLC analysis of the compounds AA, GC and CG, where four peaks appeared. ^{31}P NMR analysis revealed two highly differentiated sets of signals, one of them

centered around 148 p.p.m., corresponding to the phosphoramidite function, and the other one around -1.0 p.p.m., corresponding to the internucleotidic phosphate.

Oligonucleotide libraries

Performance of the dimer approach for the non-saturating codon-based mutagenesis method was assessed by the assembly of five libraries. These included a mutagenic window of six contiguous codons that encode amino acids Ala237, Gly238, Glu240, Arg241, Gly242 and Ser243 of the

B ₁				B ₂ B ₃			
T	C	A	G				
TAA Phe	CAA Gln	AAA Lys	GAA Glu	AA			
TTT Phe	CTT Leu	ATT Ile	GTT Val	TT			
TAT Tyr	CAT His	AAT Asn	GAT Asp	AT			
TGC Cys	CGC Arg	AGC Ser	GGC Gly	GC			
TCG Ser	CCG Pro	ACG Thr	GCG Ala	CG			

Figure 1. Codons B₁B₂B₃ generated with the mix of dimers TT, AA, AT, GC and CG and four monomers.

TEM_{pUC19} β-lactamase. Three libraries were constructed to demonstrate the robustness and reliability of the method, while the other two were applied to a real problem, the search for mutants displaying a change of specificity from AMP towards CAZ that could emerge in nature due to the increasing use of this cephalosporin in clinical treatments.

Polylinker libraries

The first three libraries of sequence agtgcaaacttgga-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-cgcgaatctgaatc were mutated at three experimental rates (20.5, 48.9 and 100%), substituting each wild-type codon marked in capital letters with the pool of trimers B₁B₂B₃ shown in Figure 1. Since these oligos were designed to be cloned in the polylinker region of plasmid pUC19 through the HindIII and EcoRI sites, they were named polylinker20, polylinker49 and polylinker100. In fact, synthesis of polylinker100 was very simple because the growing oligo was saturated with a mix of the five Fmoc-dimer amidites (Fmoc-B₂B₃), the unreacted chains were blocked by acetylation, the Fmoc group was removed and the mutant codons were completed with a mixture of the four DMTr-monomer amidites (DMTr-B₁). For assembly of polylinker49, we originally expected 50% mutagenesis per codon and, knowing of the similarity of reactivity between monomers and dimers (12.25), a 50 mM mix Fmoc-B₂B₃ and 50 mM clean DMTr-monomer amidites were co-delivered to the synthesis column, obtaining a substitution near to that wanted. At this point, we must remember that each wild-type codon was completed by two successive couplings with clean DMTr-monomer amidites while the mutant codons were completed with the mix B₁, as shown in Figure 2. Polylinker20 was planned to be mutated at 17%, however, under the conditions used for polylinker100 and polylinker50, the mix Fmoc-B₂B₃ would have to be at 10 mM, and with co-delivery with the 50 mM DMTr-monomer amidites the resultant mixture would

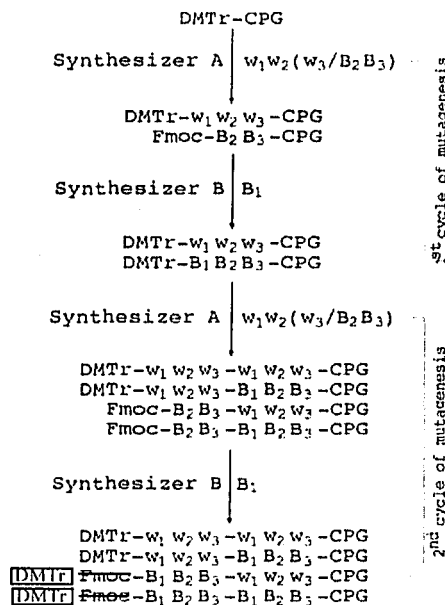
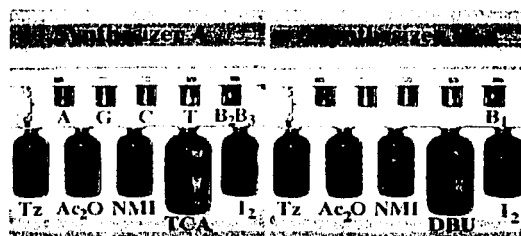


Figure 2. Contaminating approach of the codon-based mutagenesis method through the use of Fmoc-dimer amidites. The rationale for the method is thoroughly described in the Discussion. For simplicity, the process is exemplified with a two codon window and the wild-type flanking regions are not shown. The process was performed with two DNA synthesizers, displayed at the top. The cycle of mutagenesis was as follows. The growing oligo linked to the solid support (CPG) is reacted, in synthesizer A, with a mix of diluted Fmoc-dimer amidites (B₂B₃) and a concentrated DMTr-monomer amidite (DMTr-w₁) that defines the 3' nucleotide of the wild-type codon to be explored; two additional couplings with common DMTr-monomer amidites are executed to complete the wild-type codon (w₁w₂w₃); the column is transferred to synthesizer B, the Fmoc group is removed and all the growing mutant segments are reacted with a mix of DMTr-monomer amidites (DMTr-B₁) to generate a set mutant codons (B₁B₂B₃). In the repetition the column is moved to synthesizer A and the cycle of mutagenesis is repeated as many times as there are codons to be mutated. Ancillary reagents: activating solution (tetrazole, Tz), capping A (acetic anhydride, Ac₂O), capping B (N-methylimidazole, NMI), detritylating agent (TGA), oxidation solution (I₂), defluorenylating solution (DBU).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

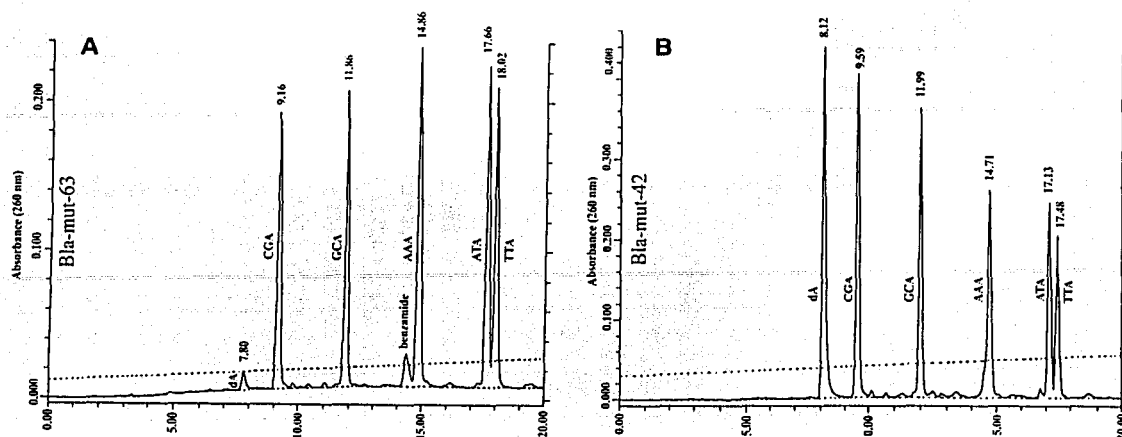


Figure 3. HPLC analysis of trimers assembled with the mixtures of Fmoc-dimer amidites TT:AA:AT:GC:CG in the ratios (A) 1.0:1.03:1.03:1.03:1.23 and (B) 1.0:1.0:1.1:1.8:2.3.

Table 2. Expected (P_{Theor}) and experimental (P_{Exp}) frequency of in-phase mutants generated with the five oligonucleotide libraries assembled in this work, under no selective conditions

Mutant codons per variant	Polylinker20 ($\alpha = 20.5\%$)		Polylinker49 ($\alpha = 48.9\%$)		Polylinker100 ($\alpha = 100\%$)		Blamut63 ($\alpha = 29.0\%$)		Blamut42 ($\alpha = 40.5\%$)	
	P_{Theor}	P_{Exp}	P_{Theor}	P_{Exp}	P_{Theor}	P_{Exp}	P_{Theor}	P_{Exp}	P_{Theor}	P_{Exp}
0	0.262	0.281 (9)	0.016	0.000 (0)	0.000	0.000 (0)	0.128	0.428 (6)	0.047	0.500 (8)
1	0.393	0.531 (17)	0.094	0.125 (4)	0.000	0.000 (0)	0.314	0.214 (3)	0.187	0.063 (1)
2	0.246	0.125 (4)	0.234	0.250 (8)	0.000	0.000 (0)	0.321	0.286 (4)	0.311	0.000 (0)
3	0.082	0.062 (2)	0.313	0.250 (8)	0.000	0.000 (0)	0.175	0.071 (1)	0.276	0.313 (5)
4	0.015	0.000 (0)	0.234	0.187 (6)	0.000	0.000 (0)	0.053	0.000 (0)	0.138	0.125 (2)
5	0.001	0.000 (0)	0.094	0.125 (4)	0.000	0.000 (0)	0.009	0.000 (0)	0.037	0.000 (0)
6	0.000	0.000 (0)	0.016	0.062 (2)	1.000	1.000 (32)	0.000	0.000 (0)	0.004	0.000 (0)
Analyzed sequences		32		32		32		14		16

α represents the experimental average level of mutagenesis. P_{Theor} was calculated by the equation of binomial distribution (24). The kinds of mutants found in each library are indicated in parentheses. The sequences of libraries polylinker20, polylinker49 and polylinker100 are available as Supplementary Material.

have been 30 mM, and a poor coupling efficiency would have been obtained. For this reason the 50 mM clean DMTr-monomer amidites were substituted for 100 mM solutions and the mix Fmoc-B₂B₃ was at 20 mM. A slightly higher mutagenesis rate resulted, but it is not experimentally significant. The three libraries were subjected to a two-step deprotection and were purified by polyacrylamide gel electrophoresis. The Fmoc-B₂B₃ solutions used for these libraries contained the Fmoc-dimer amidites TT:AA:AT:GC:CG in the molar ratio 1.0/1.03/1.03/1.03/1.23, a combination that yielded an even frequency of trimers (TTA, AAA, ATA, GCA and CGA) when coupled to a solid support carrying dA, as shown in Figure 3A.

Cloning of the libraries polylinker20, polylinker49 and polylinker100

These mutagenic oligonucleotides were converted into their corresponding DNA duplexes by extension of the complementary primer gattacgaatggeg under mild polymerization

conditions, using the Klenow fragment of DNA polymerase that lacks 3'→5' and 5'→3' exonuclease activity, in order to avoid any additional mutagenic condition. The duplexes were double digested with the enzymes *Hind*III and *Eco*RI and cloned into the polylinker region of plasmid pUC19 as mutagenic cassettes. With this modification the AMP resistance gene *tem*_{pUC19} remained intact and the electroporated XL1-Blue cells were plated on solid LB containing AMP to generate three libraries of mutants (11,24). From the libraries polylinker20, polylinker49 and polylinker100, 36, 38 and 41 clones, respectively, were sequenced (see Supplementary Material) in order to complete sets of 32 in-phase mutants. The additional sequences contained 4, 6 or 9 nt insertions or deletions, respectively, and were not considered for the statistical analysis. In-phase mutants followed a binomial behavior predicted by the experimental level of mutagenesis as seen in Table 2 and Figure 4. In this sense the robustness and reproducibility of the method has been completely demonstrated. It is worth noting that the rate of aberrant

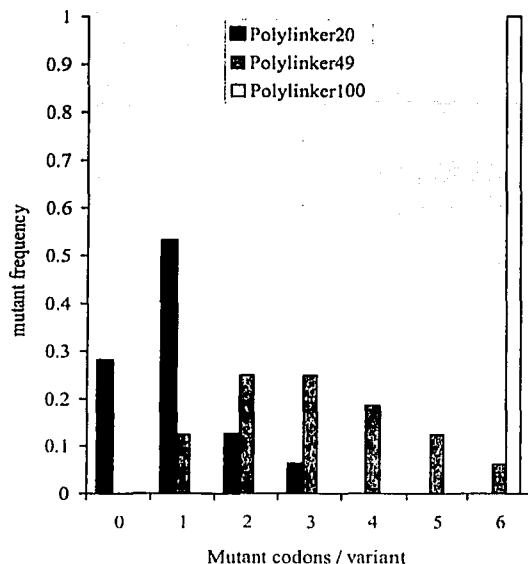


Figure 4. Experimental frequency of variants generated in the libraries polylinker20, polylinker49 and polylinker100, subjected to 20, 49 and 100% levels of mutagenesis, respectively.

mutations increased with the level of mutagenesis, indicating the likely existence of contaminants in the Fmoc-dimer amidites that are magnified as the concentration is increased, or perhaps due to incomplete removal of the Fmoc group. We do not consider the observed proportion of aberrant sequences as significant for the purpose of library creation, especially at the lower level of mutagenesis.

β -Lactamase libraries

A library of sequence 5'-ggttattgctgataaatctgga-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-cgcggatcattgcageactgg-3' was assembled using 100 mM clean DMTr-monomer amidites and a 40 mM mixture of B₂B₃. The ratio of components for this mix was the same as that used for the polylinker libraries. Under these conditions of reaction we expected to obtain a 28.6% level of mutagenesis. Experimentally we obtained an average 29.0% per codon. This mutagenic primer contains 63 nt and was named Blamut63.

The second library assembled for mutagenesis of β -lactamase was synthesized with the sequence 5'-gataaatctgga-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-cgcggatcatt-3' and named Blamut42. This oligo was implemented with shorter flanking arms as compared to Blamut63 and was mutated with 50 mM Fmoc-B₂B₃ mix and 100 mM DMTr-monomer amidites. In contrast to the mix Fmoc-B₂B₃ used for library Blamut63, which was ~20% more concentrated in the dimer CG to compensate for its minor reactivity with regard to the other dimers, the mix used for this experiment was 80 and 130% more concentrated in the dimers GC and CG with regard to the other components. When

this mix was coupled to dA^{bz}, a pool of the trinucleotides TTA, AAA, ATA, GCA and CGA in the molar ratio 1.01/1.10/1.00/1.60/1.91 was obtained by HPLC analysis (Fig. 3B). With regard to the level of mutagenesis, we expected to obtain a 33% value based on the concentration of reagents, however, the experimental result was 40.5%. The only explanation we find for this bias is a probable mis-adjustment in the flow rate of the amidites and a large amount of Fmoc-B₂B₃ must have been added to the column in comparison to the DMTr-monomer amidites. The libraries were deprotected and purified as for the polylinker libraries.

Cloning and selection of libraries Blamut42 and Blamut63

Since the region 237–243 of the TEM_{pUC19} β -lactamase to be mutated is encoded by nucleotides 703–720 of the gene *tem_{pUC19}*, composed of 858 nt, and the flanking sequences did not contain putative restriction sites for the enzymes *Nco*I and *Xho*I, available in the recipient plasmid pT4Bla, it was evident that the oligonucleotide libraries could not be introduced as cassettes, and the process would require two rounds of PCR to complete the mutant genes.

The oligonucleotide libraries Blamut63 and Blamut42 and a primer complementary to the 3' position of the *bla_{pUC19}* gene were used to generate two megaprimers (26) by PCR using as template the *bla_{pUC19}* gene contained in plasmid pUC19. In a second PCR, these megaprimers were independently used with another primer complementary to the 5' position of the *bla_{pUC19}* gene to generate complete mutant genes, again using plasmid pUC19 as template. After a double digestion with the restriction enzymes *Nco*I and *Xho*I, the fragments were cloned into plasmid pT4Bla, which also contained the KAN resistance gene, and the resultant ligations were used to transform *E. coli* XL1-Blue cells. One-thousandth of each electroporation mixture was plated on solid LB containing KAN to quantify the library size, giving in both cases an average size of 1.5×10^6 variants. Twenty clones of each library were selected at random and labeled with a sequential number and either the prefix 63M or 42M, indicating the library from which they came. Their plasmid DNA was isolated and subjected to DNA sequencing to analyze the distribution of variants in the mutagenic window, with no selection for β -lactamase function. Among them, three Blamut63 and one Blamut42 were contaminated with other sequences and were not included in the analysis. Three clones per library resulted with nucleotide insertions or deletions, while six wild-type sequences occurred in Blamut63 and eight in Blamut42. The remaining sequences were in-phase mutants and are shown in the upper sections of Tables 3 and 4. The sequence analysis of the amplified region found between the megaprimer and the 5' primer of several clones showed that a 0.095% base substitution error rate was introduced by the PCR. A similar result (0.11%) was reported by Shafikhani *et al.* (4).

Once the variability of both libraries had been assessed, we arbitrarily selected a wild-type clone from one of the libraries to use as a control. The identities of the wild-type gene *bla_{pUC19}* and the promoter *bla* were confirmed by complete DNA sequencing. The bacterial background resistance to CAZ was considered at 0.15 μ g/ml, although the precise minimum concentration at which we still observed some growth was 0.125 μ g/ml. In order to isolate mutants with at least a

Table 3. DNA sequence of the region 237–243 of clones generated with the random oligonucleotide library Blamut63 with and without CAZ selection

Clone	Amino acid and nucleotide sequence					
	A237	G238	E240	R241	G242	S243
Wild-type	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
No selection						
63M1		ATT				
63M2	CAT	GCG	TAA			
63M3				CGC		CTT
63M4	GCG		CAA			
63M5			AGC			
63M6	TTT					
63M7		GAT				GCG
63M8	GTT		TAT			
CAZ selection						
63caz1			CGC			
63caz2			AGC			
63caz3		AGC	AAA			
63caz4			AAA	GCG		
63caz5			CGC			
63caz6			CGC			
63caz7		TCG	CGC			
63caz8		TCG	CGC			
63caz9			CGC			
63caz11			AAA	GCG		
63caz12			AAA	GCG		
63caz13			CGC	GAT		

Empty cells represent wild-type codons.

100-fold increase in resistance with respect to the wild-type clone, each library was retransformed and the transformation mixture was distributed on five LB plates containing 12.5 µg/ml CAZ. After incubation, 13 colonies arose for Blamut63 (Table 3, lower section) and 11 for blamut42 (Table 4, lower section). As these resistance mutants were generated by CAZ selection, they were numerically ordered and labeled with the prefix 63caz or 42caz. Each colony was independently inoculated in liquid LB containing KAN and the plasmid was recovered. After analysis on agarose gels, mutants 63caz10 and 42caz3 turned out to be false positives and were discarded. Each plasmid containing a mutant gene was retransformed, subcloned and sequenced in order to ensure that the specificity changes of the isolated mutants towards CAZ were indeed due to a change in their amino acid sequence and not to additional mechanisms of resistance of the cells, such as generation of mutant penicillin-binding proteins insensitive to the antibiotic or mutant porins that prevent entry of the antibiotic into the periplasmic area (27). All clones were grouped according to their sequence and analyzed for resistance against AMP, CAZ and CTX. The results for both libraries are shown in Table 5.

DISCUSSION

In this work we describe the benefits of a novel codon-based mutagenesis method for the random modification of a region of amino acids that is supposed to be implicated in a protein function. This approach reduces codon redundancy by contaminating wild-type codons with a set of mutant codons, as applied to enrich libraries with variants carrying few replacements. The resultant libraries allow a more complete exploration of the sequence space concerning single, double

Table 4. DNA sequence of the region 237–243 of clones generated with the random oligonucleotide library Blamut42 with and without CAZ selection

Clone	Amino acid and nucleotide sequence					
	A237	G238	E240	R241	G242	S243
Wild-type	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
No selection						
42M1			GTG	TCG		TCG
42M2					AGG	GAT
42M3	CGC	CGC	GCG		GAA	AGC
42M4			GAA	GAA	GGC	
42M5	ACG		GGG	GCG	TGC	AGC
42M6			CGC			GAT
42M7						TTT
42M8	GCT		TCG	GAT		GCG
CAZ selection						
42caz1		AAT	AAA	CAA		
42caz2			---	GCG		
42caz4			CGC			
42caz5			---	GCG		
42caz6		AGC	AAG	GGC		
42caz7			CGC			
42caz8			AAA	GCG		
42caz9			AAG			
42caz10		AAT	AAG	GAA		
42caz11			GTT			

Empty cells represent wild-type codons.

42caz2 and 42caz5 correspond to codon-deletion mutant where GAG and CGT were replaced for GCG.

and triple mutants in long mutagenic windows as opposed to conventional saturation methods.

Considering that a pool of 20 trinucleotides may be generated by combination of five dimers and four monomers, as illustrated in Figure 1, the rationale for the codon-based mutagenesis method we developed, as shown in Figure 2, is that wild-type codons may be contaminated with a pool of mutant codons if during oligonucleotide synthesis a diluted mix of Fmoc-dimer amidites (Fmoc-B₂B₃) and a concentrated solution of a common DMTr-monomer amidite (DMTr-w₃) are co-delivered and coupled to the growing oligonucleotide. Many chains will react with the monomer DMTr-w₃, growing by only 1 nt, while few chains will react with the mix Fmoc-B₂B₃, growing by 2 nt. Since the Fmoc and DMTr protecting groups are mutually orthogonal (11), two additional cycles of synthesis can be executed with conventional DMTr-monomer amidites to complete the wild-type codon while the mutant segments stay arrested. Next, the Fmoc group is removed, while the wild-type codon is in standby, and a mix of DMTr-monomer amidites (DMTr-B₁) is coupled to the mutant segments to complete the set of codons B₁B₂B₃. This mutagenic cycle can be repeated for each wild-type codon to be explored. Such an approach requires six positions for phosphoramidites, four for clean DMTr-monomer amidites, one for the mutagenic mix Fmoc-B₂B₃ and the last one for the mix DMTr-B₁, and seven ancillary bottles. Since the instruments at our disposal are equipped with only five vials for phosphoramidites and six ancillary bottles, two DNA synthesizers, labeled A and B (Fig. 2), were necessary to assemble the libraries. In fact, most of the assembly process takes place in synthesizer A and the synthesis column is only transferred to synthesizer B to complete each set of mutant

Table 5. Amino acid replacements in CAZ resistance mutants obtained from the libraries Blamut63 and Blamut42 and their corresponding susceptibilities to different antibiotics

Clone	Amino acid (codon)				MIC ($\mu\text{g/ml}$)	CAZ	CTX
					AMP		
Wild-type	R164 (cgt)	G238 (ggt)	E240 (gag)	R241 (cgt)	2400	0.15	0.06
B3M7, B3M8		S (tcg)	R (cgc)		2400	20	1.92
B3M3		S (age)	K (aaa)		1200	15	0.06
B4M6		S (age)	K (aag)	G (ggc)	1200	15	0.48
B4M1		N (aat)	K (aaa)	Q (caa)	600	15	0.24
B4M10		N (aat)	K (aag)	E (gaa)	600	15	0.48
B4M2, B4M5		A (gcg)	--	A (gcg)	2400	20	0.48
B4M9	H (cat)		K (aag)		2400	15	0.12
B3M1, B3M5, B3M6, B3M9	H (cat)		R (cgc)		1200	30	0.24
B3M2	H (cat)		S (age)		1200	20	0.12
B4M11	H (cat)		V (glt)		1200	10	0.12
B3M4, B3M11, B3M12, B4M8	H (cat)		K (aaa)	A (gcg)	600	50	0.48
B4M4, B4M7	C (tgt)		R (cgc)		1200	20	0.24
B3M13	C (tgt)		R (cgc)	D (gat)	600	10	0.12

Empty cells represent wild-type codons.

B4M2 and B4M5 correspond to a codon-deletion mutant where GAG and CGT were replaced for GCG.

codons. It should be noted that the method can be implemented in only one synthesizer, completing the mutant codons by co-delivery of the four clean DMTr-monomer amidites to the column, with the concomitant price of obtaining a bias towards G and A residues (P.Gaytán, personal results), and syringe removal of the Fmoc group. Better automation could be achieved with other synthesizer models equipped with eight phosphoramidite vials, such as the 394 DNA/RNA synthesizer from Applied Biosystems (Foster City, CA) or the ASM-800 DNA synthesizer from Biosset Ltd (Novosibirsk, Russia), and an appropriate synthesis program.

In order to assess the method, five Fmoc-dimer amidites of sequences TT, AA, AT, GC and CG were synthesized as shown in Scheme 1. These compounds were chosen because on combination in the 5' position with any of the other monomers (A, T, G or C) 19 sense codons and one nonsense codon are generated, most of them of preferential use in *E.coli*. These 19 trimers encode 18 amino acids and there is only one redundancy, for serine. Methionine and tryptophan were excluded from the library because their inclusion would have required the use of two additional Fmoc-dimer amidites, increasing codon redundancy. Preliminary coupling results with each independent Fmoc-dimer amidite revealed that they were as reactive as conventional DMTr-monomer amidites, in agreement with previous reports on DMTr-dimer amidites (12,25). Such a result suggested that the level of mutagenesis could be controlled by appropriate selection of the clean DMTr-monomer amidites and the mix Fmoc-B₂B₃ concentrations if these were co-delivered to the synthesis column.

In order to demonstrate the robustness and reproducibility of the method, three oligonucleotide libraries of sequence agtgcacagcttggg-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-cgegaattcgaatc were mutated at different experimental rates (20.5, 48.9 and 100%), substituting each wild-type codon marked in capital letters with the pool of trimers B₁B₂B₃. These results were in close agreement with the expected values (17, 50 and 100%), confirming our hypothesis of the relationship between the reactivities of the components and the level of mutagenesis. The libraries were labeled polylinker20, polylinker49

and polylinker100, respectively, and cloned into the polylinker region of plasmid pUC19 as mutant cassettes (11,24). As shown in Table 2 and Figure 4, the analysis of 32 in-phase sequences per library (see Supplementary Material) from random selected clones showed that the least contaminated library was enriched with single mutants, the half-mutated library was enriched with double and triple mutants and the saturated library contained only multiple mutants. The three libraries followed a binomial distribution and the expected frequency of variants per library was well correlated with the experimental results, demonstrating the confidence of the method.

Biological assessment of the approach was carried out by mutating six contiguous codons in the *bla*_{pUC19} gene that encode the amino acids Ala237, Gly238, Glu240, Arg241, Gly242 and Ser243 of the TEM_{pUC19} β -lactamase, a region shown in Figure 5. Residue 239 does not exist in TEM-type β -lactamases according with Ambler numbering (14). This region comprises important determinants of the specificity change from AMP to CAZ, as exemplified by the replacement of the Glu240 residue by a positively charged amino acid such as lysine or arginine (18,20).

We tested two oligonucleotide libraries at different levels of mutagenesis, spiking the codons 5'-GCC-GGT-GAG-CGT-GGG-TCT-3' with the mutant codons B₁B₂B₃. These libraries were named Blamut63 and Blamut42, according to their nucleotide composition. Blamut63 was synthesized with longer flanking arms than those assembled in Blamut42. The libraries were mutated at 29 and 40%, respectively, with two mutagenic mixes containing different ratios of the five Fmoc-dimer amidites. Each library was converted to a megaprimer by a first PCR and into complete mutant genes by a second PCR. These gene libraries were cloned and the variants that emerged with and without CAZ selection were analyzed by DNA sequencing.

Only 8 of 14 clones of the non-selected Blamut63 library were mutant (Tables 2 and 3), representing a 57% efficiency of mutagenesis. However, based on the 29% level of mutagenesis, Blamut63 should contain 12.8% wild-type clones as

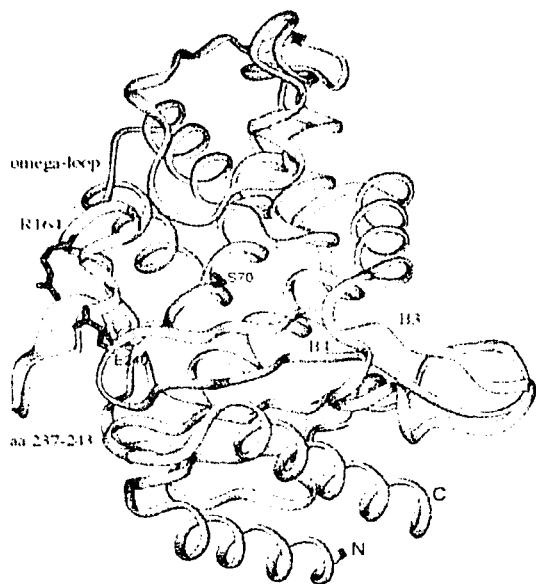


Figure 5. Structure of TEM-1 β -lactamase, similar to TEM_{pUC19} β -lactamase. The mutated region is displayed in green and the Ω -loop in yellow, while the catalytic residue Ser70 and the important specificity residues Arg164 and Glu240 are shown in red for reference.

calculated by a binomial distribution (24). This result indicates that a 30% difference in wild-type sequence exists between the cloned library and the expected oligonucleotide library. A similar bias (45%) was also observed with the non-selected mutants of library Blamut42 (Tables 2 and 4). In comparison with the frequency of variants observed in the polylinker libraries, it is evident that enrichment of the wild-type sequence arose during the PCRs, either due to better hybridization of the most template-similar sequences (28) or by *in vitro* recombination of incomplete fragments (3). Returning to the non-selected mutants of Blamut63, it is worth noting its enrichment in double mutants correlating with the level of mutagenesis. Another remarkable result is represented by the set of 14 mutant codons obtained in these variants, which encoded 12 different amino acids, most of them represented only once, a result that is in agreement with an even frequency of trimers (Fig. 3A) generated with the mutagenic mix used for this library. Therefore the frequency of amino acids in the libraries is predictable from the reactivities obtained through HPLC analysis of trimers generated with the mix. Apparently the best combination to ensure an even frequency of mutant amino acids must be equimolar in TT, AA, AT and GC because they exhibit similar reactivities and CG must be used in a 0.23 molar excess due to its lower reactivity. Mutants for the codon GGG were not found in this library, because experimentally this was poorly contaminated and the analyzed sample was very small, however, it did occur in Blamut42.

In the non-selected mutants of Blamut42 (Table 4) all codons of the target window were explored and mainly triple mutants were obtained bearing alternating mutant and wild-type codons, a result only accessible through this kind of contaminating method or with cumbersome resin-splitting methods (13). This library was biased towards mutant codons assembled with the GC and CG dimers, as a consequence of the major concentration of these compounds in the mutagenic mix. This result is interesting, because one could deliberately enrich libraries with different subsets of amino acids without excluding the others.

Some deletions of 1 and 2 nt also occurred in both libraries. Such mutations seem to be inherent subproducts generated during conventional synthesis, perhaps as a consequence of incomplete capping or detritylation during the cycles of synthesis. Such a hypothesis is supported because one of them fell in a 5' flanking region and another one in a wild-type codon located in the mutagenic window and exclusively assembled with conventional DMTr-monomer amidites. Frameshift mutations of this kind have also been reported with other oligonucleotide-based mutagenesis methods (9,10,29,30), but their precise origin is not clear.

Another surprising result found in Blamut42 was the emergence of mutant codons that were not generated with the mix of dimers. They were point mutants generated by *Taq* DNA polymerase errors. For instance, the wild-type codon GAG was changed to GTG, GGG and AAG. The analysis of non-selected clones from Blamut63 and Blamut42, in a region located between the megaprimers and the 5' primer, allowed us to calculate an error rate of 0.095%. On average, 1 nt was substituted per mutant gene and these point mutations were distributed along the genes in an apparently random mode.

The libraries were selected over a high concentration of CAZ, 100-fold higher than the wild-type TEM_{pUC19} β -lactamase. After sequencing, the resultant mutants, 12 for Blamut63 and 10 for Blamut42, shown in the lower section of Tables 3 and 4, respectively, were grouped and subjected to susceptibility tests against the penicillin antibiotic AMP and the cephalosporin compounds CAZ and CTX (Table 4).

The first point to note from Tables 3–5 is that residues Ala237, Gly242 and Ser243 were always conserved under CAZ selection, suggesting that they are the optimal amino acids for efficient hydrolysis of this cephalosporin. A similar result was previously found only for Ala237 (18), through conventional NNC/C mutagenesis of the three contiguous amino acids Ala237, Gly238 and Glu240, but has never been described for the amino acids Gly242 and Ser243. The method was also able to reproduce the double mutants G238S:E240R and G238S:E240K and the triple mutant G238S:E240K:R241G that emerged in two independent libraries (17,20). The triple mutants G238N:E240K:R241Q and G238N:E240K:R241E, although new, are essentially similar to the double mutant G238N:E240K (18).

As seen from the middle of Table 5, some very interesting double and triple mutants occurred in both libraries, where the mutations were separated by at least 74 amino acids. The substitution of Arg164 by either histidine or cysteine was clearly generated by a *Taq* DNA polymerase error, replacing a guanine for an adenine or a cytosine for a thymine, respectively, in the original wild-type codon. It has been demonstrated that substitution of the residue Arg164 by any of the

other 19 amino acids increases the resistance to CAZ (16). It has been suggested that this change of specificity from penicillins towards cephalosporins is due to disruption of a salt bridge formed between the highly conserved residues Arg164 and Asp179, relaxing the Ω -loop structure that covers the active site pocket and, therefore, allowing a better fit of bulkier antibiotics in the active site. In fact, mutation R164H has emerged in eight different clinical isolates (www.lahey.org/studies/temtable.htm) in combination with replacements at other positions. One example is the natural double mutant TEM-28, carrying the changes R164H:E240K, which also emerged in our libraries as mutant 42caz9. The question at this point is why Arg164 was replaced by histidine and cysteine and not by asparagine or serine if single mutants of these amino acids display higher CAZ resistance, as was demonstrated by Vakulenko *et al.* (16)? The reason is really simple, a change from Arg to Asn requires two base substitutions in the wild-type codon cgt, a very unlikely event in point mutation strategies. In the case of mutation R164S, a nucleotide transversion is required, which is less likely to occur as compared to the transitions that gave rise to the histidine and cysteine codons.

Analyzing the region mutagenized with the oligonucleotide libraries in all the CAZ-resistant mutants shown in Table 5, a preferential substitution of Glu240 by positively charged amino acids such as lysine or arginine was evident. This result is in agreement with the suggestion that a specificity change towards CAZ may also be obtained by formation of an electrostatic interaction between the side chain of the amino acid and the carboxyl group attached to the oximino chain of the antibiotic (31). In this sense, the increase in CAZ resistance of the double mutants R164H:E240K, R164H:E240R, R164C:E240R is a result of the combination of two effects: an expansion of the active site and an electrostatic interaction between the substrate and the mutant enzyme.

The best of our variants, displaying a 333-fold increase in CAZ resistance in comparison to the wild-type enzyme, was the triple mutant R164H:E240K:R241A, which combines the two effects described above. However, the additional substitution of Arg241 by alanine generates a 3-fold increase in resistance with respect to the double mutant R164H:E240K. A reduction in the volume of the side chain of residue 241 could make room to allow a better fit of the bulky and negatively charged β -chain of CAZ.

Other evidence that suggests a better fit of the β -chain of CAZ in the active site comes from the doubly isolated mutant 42caz2 and 42caz5. It corresponds to a substitution-deletion mutant in which two contiguous amino acids, Glu240 and Arg241, were replaced by one alanine. Such codon deletion may have occurred by incomplete removal of one Fmoc group incorporated with the dimers and incomplete capping or detritylation of one of the subsequently added nucleotides. This deletion might generate an expansion of the groove formed between the Ω -loop and the turn that joins β -strands B3 and B4 and could account for the 133-fold increase in CAZ resistance. This finding agrees with described specificity changes towards CAZ caused by expansions of the active site due to relaxation (16), reduction (32) or enlargement (33) of the Ω -loop structure (Fig. 5).

The double mutant R164H:E240S is interesting because a serine at position 240 is the most frequent amino acid found in

the class A β -lactamases (14). Perhaps this mutant increases its affinity for CAZ through formation of a hydrogen bond between the hydroxyl of the side chain and the carboxylate of the oximino moiety in the antibiotic.

From a clinical point of view, the double mutant R164H:E240V is interesting because both mutations can be generated by single point mutations of the original codons. However, the replacement of glutamate by valine requires a transversion from adenine to thymine, and this may be the reason why it has not yet emerged in clinical isolates. This mutant clearly developed CAZ resistance by the expansion (34) model of the active site pocket. In mutant clones containing G238S it has been proposed that expansion may be caused by steric hindrance of serine with the residue Met69 or Asn170, by shifting the position of either the B3 β -strand (34) or the Ω -loop (35). We speculate that, in contrast to the polar wild-type Glu240 residue, which is facing the aqueous solvent, the hydrophobic side chain of valine moves away from the aqueous medium and generates steric hindrance with any of the amino acids mentioned above, expanding the active site.

From all these results, the versatility of the method may be highlighted, as different subsets of amino acids can be represented in the region modified with primers, modifying the mix of Fmoc-dimer amidites or the mix of DMTr-monomer amidites in the third position, as shown in Figure 1. The frequency of variants (few versus multiple codon replacements) can be controlled by the appropriate selection of the concentration of the mutagenic mix and, additionally, the contamination of the wild-type sequence may be performed by a pre-addition protocol (24) in order to optimize the use of the Fmoc-dimer amidites.

Here we have explored a window of six contiguous codons, but the method can be easily applied to windows of non-contiguous codons and/or larger windows of up to 15 amino acids per oligonucleotide, which can be reliably made up to 75 bases long. With a window of 15 codons and a recursive PCR approach (36) one could completely explore genes of the size of *bla_{PLUC19}* (263 amino acids) with only 18 mutant oligonucleotides and a high likelihood of completing the search of most single and double mutants. Other multiple mutants would also be well represented in a manner unavailable by any other method.

The present requirement for non-commercial compounds may be easily overcome because we have demonstrated the reproducibility of the synthetic pathway for Fmoc-dimer amidites and, for instance, Monomer Sciences (New Market, AL) sells 5'-Fmoc-monomers while Chemgenes (Ashland, MA) offers services to synthesize dimers. Furthermore, the ethyl protecting group could be replaced by the common β -cyanoethyl group in order to simplify the final oligonucleotide deprotection.

This mutagenesis method allowed us not only to find known β -lactamase mutants, but also new specificity mutants. The finding that expansion of the groove located between the Ω -loop structure and the turn joining the B3 and B4 β -strands through deletion of one amino acid located in this region also affords activity towards CAZ suggests the value of a method that deliberately introduces codon deletions. Such a method is currently unavailable, but can be conveniently implemented through orthogonal chemistry.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Gabriela Flores, Eugenio López, Jorge A. Yañez, Santiago Becerra, Maricela Olvera and René Hernández for their technical assistance in the laboratory. We must also thank Philippe Neuner for authorization to reproduce a modified version of his figure 2 and Humberto Flores for useful advice in the writing of this paper.

REFERENCES

- Cadwell,R.C. and Joyce,G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, **2**, 28–33.
- Stemmer,W.P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 10747–10751.
- Zhao,H., Giver,L., Shao,Z., Affholter,J.A. and Arnold,F.H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 258–261.
- Shafikhani,S., Siegel,R.A., Ferrari,E. and Schellenberger,V. (1997) Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques*, **23**, 304–310.
- Sirotkin,K. (1986) Advantages to mutagenesis techniques generating populations containing the complete spectrum of single codon changes. *J. Theor. Biol.*, **123**, 261–279.
- Hermes,J.D., Parekh,S.M., Blacklow,S.C., Koster,H. and Knowles,J.R. (1989) A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene*, **84**, 143–151.
- del Rio,G., Osuna,J. and Soberon,X. (1994) Combinatorial libraries of proteins: analysis of efficiency of mutagenesis techniques. *Biotechniques*, **17**, 1132–1139.
- Virnekas,B., Ge,L., Pluckthun,A., Schneider,K.C., Wellnhofer,G. and Moroney,S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5600–5607.
- Lytell,M.H., Napolitano,E.W., Calio,B.L. and Kauvar,L.M. (1995) Mutagenesis using trinucleotide beta-cyanoethyl phosphoramidites. *Biotechniques*, **19**, 274–281.
- Ono,A., Matsuda,A., Zhao,J. and Santi,D.V. (1995) The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4677–4682.
- Gaytan,P., Yanez,J., Sanchez,F., Mackie,H. and Soberon,X. (1998) Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method. *Chem. Biol.*, **5**, 519–527.
- Neuner,P., Cortese,R. and Monaci,P. (1998) Codon-based mutagenesis using dimer-phosphoramidites. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1223–1227.
- Glaser,S.M., Yelton,D.E. and Huse,W.D. (1992) Antibody engineering by codon-based mutagenesis in a filamentous phage vector system. *J. Immunol.*, **149**, 3903–3913.
- Ambler,R.P., Coulson,A.F., Frere,J.M., Ghuysen,J.M., Joris,B., Forsman,M., Levesque,R.C., Tiraby,G. and Waley,S.G. (1991) A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.*, **276**, 269–270.
- Jelsch,C., Mourey,L., Masson,J.M. and Samama,J.P. (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins*, **16**, 364–383.
- Vakulenko,S.B., Taihi-Tronche,P., Toth,M., Massova,I., Lerner,S.A. and Mobashery,S. (1999) Effects on substrate profile by mutational substitutions at positions 164 and 179 of the class A TEM(pUC19) beta-lactamase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23052–23060.
- Palzkill,T. and Botstein,D. (1992) Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 beta-lactamase. *J. Bacteriol.*, **174**, 5237–5243.
- Cantu,C.,III, Huang,W. and Palzkill,T. (1996) Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237–240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22538–22545.
- Cantu,C.,III, Huang,W. and Palzkill,T. (1997) Cephalosporin substrate specificity determinants of TEM-1 beta-lactamase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29144–29150.
- Venkatachalam,K.V., Huang,W., LaRocco,M. and Palzkill,T. (1994) Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23444–23450.
- Lehmann,C., Xu,Y.Z., Christodoulou,C., Tan,Z.K. and Gait,M.J. (1989) Solid-phase synthesis of oligonucleotides using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) for 5'-hydroxyl protection. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2379–2390.
- Atkinson,T. and Smith,M. (1984) Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphite-triester method. In Gait,M.J. (ed.), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK, pp. 35–81.
- Rorer,P.N. (1975) Optical properties of nucleic acids, absorption and circular dichroism spectra. In Fasman,G.D. (ed.), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. 152, p. 589.
- Gaytan,P., Yanez,J., Sanchez,F. and Soberon,X. (2001) Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e9.
- Kumar,G. and Poonian,M.S. (1984) Improvements in oligodeoxyribonucleotide synthesis: methyl *N,N*-dialkylphosphoramidite dimer units for solid support phosphite methodology. *J. Org. Chem.*, **49**, 4905–4912.
- Merino,E., Osuna,J., Bolivar,F. and Soberon,X. (1992) A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechniques*, **12**, 508–510.
- Frere,J.M., Joris,B., Granier,B., Matagne,A., Jacob,F. and Bourguignon-Bellefroid,C. (1991) Diversity of the mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Res. Microbiol.*, **142**, 705–710.
- Ward,B. and Juchne,T. (1998) Combinatorial library diversity: probability assessment of library populations. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 879–886.
- Osinga,K.A., Van der Blik,A.M., Van der Horst,G., Groot Koerkamp,M.J., Tabak,H.F., Veeman,G.H. and Van Boom,J.H. (1983) *In vitro* site-directed mutagenesis with synthetic DNA oligonucleotides yields unexpected deletions and insertions at high frequency. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 8595–8608.
- Sondek,J. and Shortle,D. (1992) A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 3581–3585.
- Sowek,J.A., Singer,S.B., Ohringer,S., Malley,M.F., Dougherty,T.J., Gougoutas,J.Z. and Bush,K. (1991) Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1pTZ18R beta-lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam. *Biochemistry*, **30**, 3179–3188.
- Banerjee,S., Pieper,U., Kapadia,G., Pannell,L.K. and Herzberg,O. (1998) Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity and structure of class A beta-lactamase. *Biochemistry*, **37**, 3286–3296.
- Hayes,F., Hallett,B. and Cao,Y. (1997) Insertion mutagenesis as a tool in the modification of protein function. Extended substrate specificity conferred by pentapeptide insertions in the omega-loop of TEM-1 beta-lactamase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28833–28836.
- Huletsky,A., Knox,J.R. and Levesque,R.C. (1993) Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3690–3697.
- Saves,I., Buret-Schilz,O., Maveyraud,L., Samama,J.P., Prome,J.C. and Masson,J.M. (1995) Mass spectral kinetic study of acylation and deacylation during the hydrolysis of penicillins and cefotaxime by beta-lactamase TEM-1 and the G238S mutant. *Biochemistry*, **34**, 11660–11667.
- Prodromou,C. and Pearl,L.H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.*, **5**, 827–829.